

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Reakce rakovinných buněk na cílené poškození DNA
genotoxickými léčivy**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Ondřej Votroubek
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Majera Dušana, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne *podpis bakaláře*

Poděkování:

Děkuji vedoucí mojí práce Mgr. Dušaně Majera, Ph. D. za odborné vedení a cenné rady při psaní bakalářské práce a za všechnu pomoc a trpělivost, kterou se mnou měla během praktické části této práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Ondřej Votroubek
Název práce	Reakce rakovinných buněk na cílené poškození DNA genotoxickými léčivy
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Majera Dušana, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Molekula DNA je neustále pod útokem mnoha poškozujících faktorů tvořících různé chyby, které mohou způsobit rozvoj mnoha onemocnění, mimo jiné i rakoviny. Buňky však mají mechanismy, pro eliminaci a opravu těchto chyb. Těchto mechanismů je několik a jsou navzájem propojené, přičemž jejich mutace vedou k rozvoji dalších onemocnění a specifických druhů rakovin. Poškození DNA se však dá i využít pro léčebné účely, kdy genotoxická léčiva využívají nefunkčních DNA opravných systémů v rakovinných buňkách (tím vzniká specifická a nejsou toxické pro zdravé buňky; Hosoya a Miyagawa, 2014) a navozují apoptosu a tím zpomalí či úplně zastaví růst tumoru. Takovéto genotoxické léčivo je i PARP inhibitor olaparib, který již byl schválen pro klinické použití a sepantronium bromid, který byl dříve pokládán za inhibitor survivinu a v klinických testech selhal, stále s ním však probíhá výzkum, jelikož jeho efekt je mnohem komplikovanější (kromě dalších vlivů přímo indukuje poškození DNA; Glaros *et al.*, 2012) a stále představuje slibnou látku pro boj s rakovinou.

Klíčová slova	poškození DNA, oprava DNA poškození, genotoxická léčiva, sepantronium bromid, YM155, olaparib, PARP inhibitor
Počet stran	83
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Ondřej Votroubek
Title	Targeting DNA damage responses in cancer cells by genotoxic drugs
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Majera Dušana, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

Molecule of DNA is constantly under attack by many damaging factors that creates various errors, that can cause the development of many diseases, including cancer. However cells have mechanisms for elimination and repair of these errors. There are several types of these mechanisms, they are connected and their mutations lead to development of other diseases and specific types of cancer. DNA damage can also be used for therapeutic purposes, genotoxic drugs use defective DNA damage repair systems in cancer cells (this cause specificity of these drugs, because they are non-toxic to normal healthy cells; Hosoya and Miyagawa, 2014) and induces apoptosis and thus slows or completely stops tumor growth. Such genotoxic drug is the PARP inhibitor olaparib, which has already been approved for klinical use, and sepantronium bromide (YM155), which was previously considered as the inhibitor of survivin and has failed in clinical trials, but its research is still ongoing, because its effect is more complicated (among other effects it directly induces DNA damage; Glaros *et al.*, 2012) and is still a promising substance for cancer treatment.

Keywords	DNA Damage, DNA Damage Repair, Genotoxic Drugs, Sepantronium Bromide, YM155, Olaparib, PARP Inhibitor
Number of pages	83
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Poškození DNA, druhy a vznik	2
2.1.1	Zlom na jednom vlákně DNA	4
2.1.2	Zlom na obou vláknech DNA	4
2.1.3	Buněčná odpověď na poškození DNA	5
2.1.4	Signalizace DNA poškození	7
2.2	Způsoby opravy DNA	10
2.2.1	Excizní reparace nukleotidů	11
2.2.2	Excizní reparace bází	12
2.2.3	Oprava cestou Fanconiho anémie	14
2.2.4	Reparace chybného párování bází	14
2.2.5	Reparace jednovláknového zlomu	15
2.2.6	Žíhání jednoho vlákna DNA	16
2.2.7	Homologní rekombinace	17
2.2.8	Nehomologní spojování konců	21
2.3	Využití poškození opravných systémů DNA při léčbě rakoviny	22
2.4	DNA poškozující látky využívané v léčbě rakoviny	23
2.4.1	Cisplatina	23
2.4.2	Nukleosidové analogy	25
2.4.3	Alkylační činidla	27
2.5	Poly(ADP-ribose) polymerasy	28
2.5.1	PARP inhibitory	31
2.5.2	Olaparib	34
2.5.3	Ostatní PARP inhibitory	34
2.5.4	Rezistence k PARP inhibitorům	35
2.6	Sepantronium bromid	36
2.6.1	Survivin a vliv sepantronium bromidu na něj	37
2.6.2	Vliv sepantronium bromidu na tvorbu DNA poškození	38
2.6.3	Vliv na topoisomerasy	40
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
3.1	Materiál a metodika	41
3.1.1	Buněčná kultura	41

3.1.2	Chemikálie	41
3.1.3	Přístrojové vybavení	42
3.1.4	Materiál	43
3.1.5	Kultivace buněčných linií	43
3.1.6	Pasážování a počítání buněk	44
3.1.7	Rozmrazování a zamrazování buněk	44
3.2	Určení vlivu zkoumaných látek na viabilitu buněk	45
3.2.1	Test tvorby kolonií	45
3.2.2	XTT	45
3.2.3	Imunofluorescence	46
3.2.4	Zpracování výsledků	47
4	VÝSLEDKY	48
4.1	Tvorba kolonií	48
4.2	XTT	50
4.3	Imunofluorescence	51
5	DISKUZE	54
6	ZÁVĚR	57
7	ZDROJE	58
8	SEZNAM ZKRATEK	76

Cíle práce

V teoretické části mojí bakalářské práce si kladu za cíl shrnutí dosavadních poznatků o poškození DNA, důvody vzniku těchto poškození, jejich důsledky pro buňky a hlavně systémy, kterými je buňka schopna opravit poškození DNA. Toto shrnutí zahrnuje i využití genotoxických látek v lékařství, jejich základní rozdělení a použití. Co se těchto látek týče, hlavní pozornost jsem obrátil k olaparibu a sepantronium bromidu, jelikož v rámci praktické části jsem provedl experimenty s oběma zmiňovanými látkami na buněčné kultury. Popisuji postupy provedených cytotoxických analýz pomocí testu tvorby kolonií a tetrazoliové soli XTT a vizualizaci poškození DNA na fluorescenčním mikroskopu pomocí markerů DNA poškození a samozřejmě jejich výsledky.

1 ÚVOD

Jedním ze základních účelů všech živých organismů je předání jejich genetické informace další generaci živočichů. Genetická informace se v buňkách vyskytuje ve formě deoxyribonukleové kyseliny neboli DNA. Molekula DNA má poměrně složitou strukturu a neustále dochází k jejímu poškozování a vzniku chyb v její sekvenci, jelikož na ni působí celá řada vlivů, ať už vnějších nebo vnitřních a každý den se tak na DNA v každé buňce organismu objevují nové chyby a štěpy řetězců. Chyby v DNA mohou způsobit rozvoj rakoviny, pokud nejsou eliminovány opravnými systémy buňky. Tyto systémy jsou však dvousečnou zbraní a jejich mutace vedou k rozvoji mnoha specifických rakovin, přičemž mohou pomáhat buňkám žít déle a dělit se i navzdory vysokému počtu mutací a genové nestabilitě (Jackson a Bartek, 2009).

Poškození DNA se však dá využít i pro léčbu rakoviny, kdy v buňkách uměle indukujeme poškození DNA a následně opravné systémy spustí apoptosu. Tímto způsobem se zastaví růst nádoru a rakovinné buňky zaniknou. Pro tento typ léčby se používají metody radioterapie, chemoterapie a také genotoxická léčiva, což jsou mutageny se známým efektem na buňku. Při cíleném poškození DNA v boji s rakovinou se využívá hlavně abnormalit v DNA opravných systémech, které jsou přítomné jen v rakovinných buňkách, a ne v normálních zdravých buňkách organismu (Hosoya a Miyagawa, 2014), čímž se snižuje toxicita použitých léčiv.

V této práci byl zkoumán efekt dvou genotoxických léčiv, olaparibu a YM155 na buněčné kultury. Olaparib patří mezi inhibitory poly(ADP-ribosa) polymerasy (PARP) a sepantonium bromid (YM155) se řadí mezi inhibitory survivinu. Nyní se však ukazuje, že jeho celkový efekt na buňku je složitější a mimo jiné přímo indukuje poškození DNA (Majera a Mistrík, 2020). Vzájemná spolupráce obou těchto léčiv a vliv na buňku by mohly být případně využity při léčbě rakoviny.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Poškození DNA, druhy a vznik

Tím nejdůležitějším cílem živých organismů je předání jejich genetické informace. Genetická informace je v buňkách organismů uložena ve formě DNA, která se skládá ze dvou řetězců nukleotidů tvořících pravotočivou šroubovici (tzv. B-DNA, nejčastější forma).

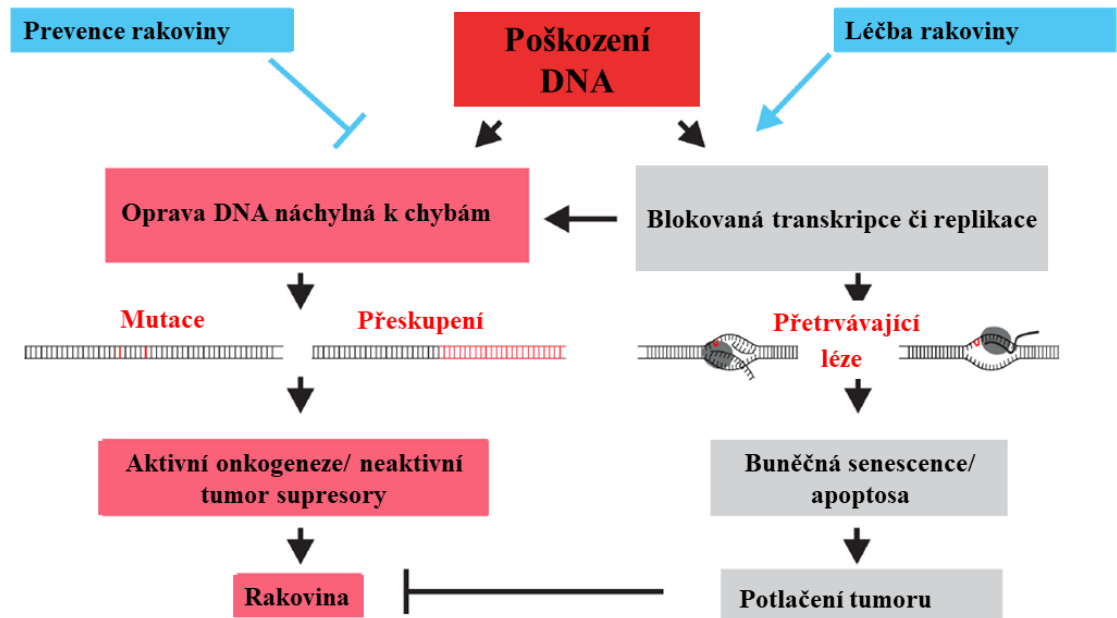
Molekula DNA vyžaduje jistou údržbu, protože neustále balancuje mezi udržováním genetické stability a eliminací mutačních změn, které by způsobily ztrátu evolučního potenciálu (Torgovnick a Schumacher, 2015). DNA molekula je neustále pod tlakem rozličných endogenních a exogenních vlivů na její integritu a v každé buňce lidského organismu denně proběhne až 70 000 poškození DNA (Lindahl a Barnes, 2000). Většina z nich je vedlejším produktem normálního metabolismu buňky nebo replikace DNA, některé jsou však indukované různými mutageny, například radiací nebo toxickými látkami (Friedberg *et al.*, 2006; Jackson a Bartek, 2009; Ciccia a Elledge, 2010).

Poškození molekuly DNA může způsobovat chyby při replikaci nebo transkripci a může vést k různým mutacím a chromozomálním aberacím (jako jsou například duplikace a delecce chromozomů) a k rozvoji mnoha onemocnění, mimo jiné i rozvoji rakoviny. Chyby v DNA totiž mohou vést k mutacím, které ovlivňují onkogeny a tumor supresorové geny (Torgovnick a Schumacher, 2015).

Onkogeny způsobují rakovinné bujení, mohou vznikat při poškození protoonkogenu, který je zodpovědný za správný růst tkáně (Chial, 2008). Mezi onkogeny či onkogenní proteiny patří například Ras GTPasy, receptor 2 lidského epidermálního růstového faktoru (HER2), cyklin D1, β -katenin, *MYC* geny a další (Stien *et al.*, 2006; Weinstein a Joe, 2006).

Tumor supresorové geny jsou antionkogeny, geny, které regulují buněčné dělení, účastní se oprav DNA, a při mutaci těchto genů dojde k maligní transformaci buňky, což vede k rakovinnému růstu (viz Obr. 1) (Slaninová, n. d.). Nejznámějšími tumor supresory jsou například Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM, což je také jeden z hlavních signalizačních proteinů poškození DNA, viz kapitola Signalizace DNA poškození), P53,

tumor supresorový gen rakoviny prsu typu 1 či 2 (*BRCA1* a *BRCA2*), retinoblastomový protein (RB) a Von Hippel–Lindau tumor supresor (VHL) (Sherr, 2004).



Obr. 1 Vliv poškození DNA na buňku. Pokud je poškození chybně opraveno, dojde k aktivaci onkogenů a umlčení tumor supresorů a následně k rozvoji rakoviny. Poškození může zablokovat transkripci či replikaci a spustí se senescence nebo apoptóza, což zastaví růst tumoru a eliminuje poškozené buňky (upraveno podle: Torgovnick a Schumacher, 2015).

Endogenní poškození má svůj zdroj uvnitř buňky, může nastat při běžném buněčném metabolismu, např. při nesprávném vložení deoxyribonukleotidů během replikace DNA (Torgovnick a Schumacher, 2015). Endogenní poškození může způsobit chyby DNA bází, např. alkylaci, hydrolýzu (ta způsobuje deaminaci, depurinaci a depyrimidinaci nukleotidových bází) nebo oxidaci způsobenou intracelulárními kyslíkovými radikály (ROS), které vznikají jako vedlejší produkty mitochondriální respirace (Lindahl a Barnes, 2000).

Exogenní zdroje poškození DNA přichází z vnějšího prostředí. Podle jejich charakteru se dělí na fyzikální (různá záření, např. UV, ionizační a další) nebo chemické (chemoterapeutická léčiva, industriální chemikálie, cigaretový kouř a další). Vliv exogenních mutagenů na DNA má široké spektrum účinků, od tvorby cyklobutanových

pyrimidinových dimerů (CPD) a pyrimidin (6-4) pyrimidonového fotoprojektu (6-4PP, vzniká ozářením UV) až po narušení jednoho či obou řetězců DNA, kdy vznikají zlomy DNA řetězce. Tyto zlomy mohou být dvojí, zlom na obou vlákních šroubovice (DSB) nebo jen na jednom vlákně (SSB) (Ciccía a Elledge, 2010).

2.1.1 Zlom na jednom vlákně DNA

SSB sice nejsou tak toxické jako DSB, ale taky představují pro buňku seriózní problém. Jednovláknové zlomy mohou zablokovat replikaci a transkripci a mohou způsobovat různá dědičná neurodegenerativní onemocnění (Caldecott 2008).

SSB se tvoří po oxidaci deoxyribosy volnými kyslíkovými radikály (tyto radikály vznikají při buněčném metabolismu nebo při vystavení buňky H₂O₂, infračervenému záření a radiomimetickým léčivům, což jsou léčiva, napodobujících účinek radioaktivního záření, Shiel, n. d). Vznikají taky jako meziprojektu při opravě bází, opravě DSB a po inhibici topoisomerasy 1 (TOP1; topoisomerasa je enzym, který ovlivňuje terciální strukturu DNA, tzv. supercoiling = překroucení) (Polo a Jackson, 2011).

2.1.2 Zlom na obou vlákních DNA

DSB nevzniká tak často, jako SSB, ale je mnohem toxickejší (Khanna a Jackson, 2001) a závažnější, jelikož při DSB nezůstává netknuté vlákně, které by se dalo použít jako opravný templát a bez opravy vedou tato poškození ke genové nestabilitě, chromozomovým zlomům a translokacím, což následně způsobuje různá postižení (vývojové poruchy, neurodegenerativní poruchy, imunodeficienci, radiosensitivitu, sterilitu, náchylnost na vznik tumorů atd.) (Jackson a Bartek, 2009).

K tvorbě DSB dochází vlivem ionizačního záření, radiomimetických léčiv nebo při ošetření buněk inhibítorem topoisomerasy 2 (TOP2), který brání uvolňování napětí překroucených řetězců pomocí TOP2. DSB mohou také vznikat při normálních fyziologických procesech, při meióze, úpravě telomer, maturaci buněk imunitního systému nebo při replikaci DNA, která už obsahuje nějakou chybu (např. SSB) (Friedberg *et al.*, 2006; Jackson a Bartek, 2009).

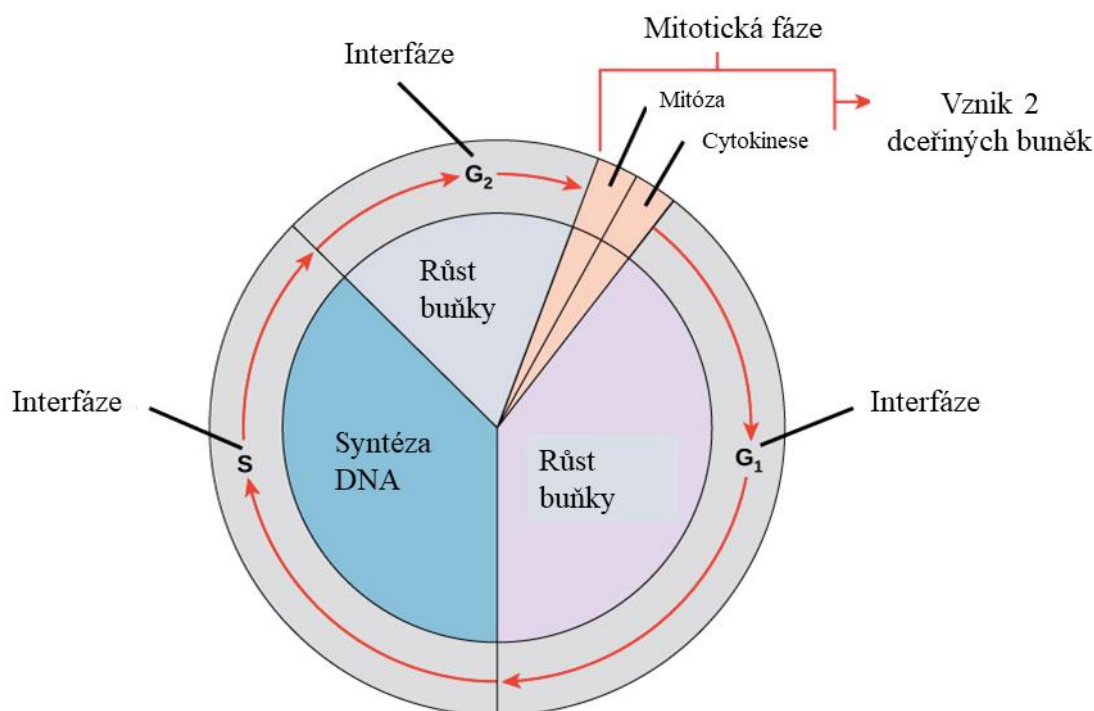
2.1.3 Buněčná odpověď na poškození DNA

Pokud by neexistoval způsob, jak zlomy DNA opravit, DSB i SSB by se v buňce hromadily a vedly by k buněčné smrti.

Eukaryotické buňky mají způsoby, jak poškození DNA opravit, tento systém je souhrnně nazývaný DNA Damage Response (DDR). Ten zahrnuje procesy, které signalizují poškození DNA a jeho samotnou opravu (Rouse a Jackson 2002a; Harrison a Haber, 2006; Harper a Elledge, 2007). DDR je složitý systém zahrnující mnoho faktorů a proteinů, které však také můžou mutovat a špatné fungování některého mechanismu opravy DNA způsobuje řadu chorob.

Chybné DDR může způsobit i chyby v imunitním systému. Například mutace v NHEJ podsystemu DDR (viz kapitola Nehomologní spojování konců) způsobují chyby ve funkci B a T lymfocytů. Z toho potom vychází i rozvoj některých typů rakoviny, jako jsou lymfomy a leukémie B a T lymfocytů (Jackson a Bartek, 2009). Některé DDR defekty dokonce způsobují lidskou sterilitu, jelikož DDR je zapojeno i ve spermatogenezi (Bartkova *et al.*, 2007) a některé dědičné poruchy DDR jsou spojeny s neplodností (Matzuk a Lamb, 2008).

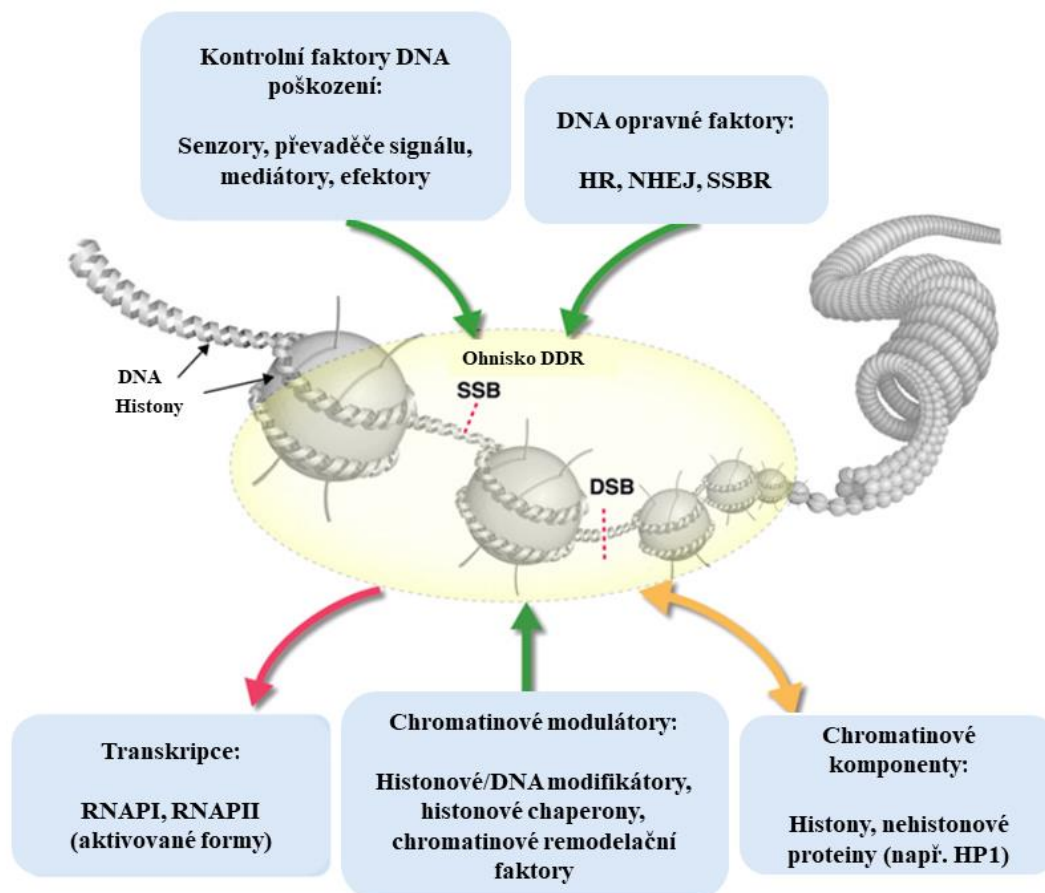
Hlavní funkcí DDR je ovšem ochrana před rakovinou. Normálně fungující DDR se běžně aktivuje už v brzké fázi tvorby rakoviny, už při prvních neoplastických lézích a v drtivé většině případů ochrání buňku před vznikem nádorů (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005). Oprava DNA je úzce spojena s buněčným cyklem (viz Obr. 2) skrze signalizační dráhy a kontrolní body, zvané DNA Damage Checkpoints (Harrison a Haber, 2006; Harper a Elledge, 2007; Lazzaro *et al.*, 2009). Odpovědí na neopravenou DNA je zdržení nebo úplné zastavení buněčného cyklu (senescence) před nebo během replikace DNA (G1/S a intra-S kontrolní body) nebo před buněčným dělením (G2/M kontrolní bod), zabrání se tak přenosu chyby v DNA replikaci (Polo a Jackson, 2011). Může také dojít ke spuštění apoptózy, tedy řízené buněčné smrti. Apoptóza i senescence se dají potenciálně použít při léčbě tumorů (Campisi *et al.*, 2007; Halazonetis *et al.*, 2008).



Obr. 2 Buněčný cyklus. Jednotlivé fáze jsou G₁, S, G₂ a M. V cyklu se nachází kontrolní body, kde probíhá kontrola DNA, při detekci poškození může dojít k zadržení cyklu, senescenci či apoptose. Kontrolní body jsou na rozhraní fází G₁/S, G₂/M a uvnitř fáze S, tzv. intra-S.

Upraveno podle ["The cell cycle: Figure 1", OpenStax College, Biology (CC BY 3.0)].

DNA eukaryot je přirozeně obtočena kolem histonových proteinů a složená do chromatinových vláken tvořících chromozomy. Tato skutečnost funkci DDR komplikuje. Chromatin totiž brání detekci a následné opravě DNA lézí, ale dá se dynamicky modulovat (viz Obr. 3) pomocí methylace DNA (Kulis a Esteller, 2010) a post-translačními modifikacemi histonů (Kouzarides, 2007), inkorporací nekanonických histonů (Bernstein a Hake 2006) a přemístováním histonů pomocí ATP-dependentních remodelačních komplexů (Clapier a Cairns, 2009), což je pro funkci DDR důležité (nejvíce prozkoumanou modifikací je fosforylace histonové varianty H2AX na chromatinu obklopujícím místa s DSB, viz kapitola Signalizace DNA poškození) (Rogakou *et al.*, 1998).



Obr. 3 Proteinová dynamika na místech DNA poškození. Na SSB a DSB jsou rekrutovány faktory kontrolních bodů DNA poškození (senzory, převaděče signálu, mediátory a efekторы) a DNA opravné faktory (HR, NHEJ, SSBR, viz kapitola Způsoby opravy DNA). Do opravy jsou zapojeny chromatinové modulátory a chromatinové komponenty (histony a nehistonové proteiny jako heterochromatinový protein HP1), směrem ven z místa poškození probíhá transkripce za pomoci RNA polymeras (RNAPI a RNAPII) (upraveno podle Polo a Jackson, 2011).

2.1.4 Signalizace DNA poškození

K signalizaci zlomu DNA slouží komplexní, specificky koordinované a složité signalizační systémy, ve kterých spolupracují různé proteiny, které se podle funkce při opravě DNA dělí na senzory, převaděče signálu, mediátory a efekторы (viz Obr. 3), přičemž nejvýznamnější senzory jsou MRE11-RAD50-NBS1 (MRE11 = protein meiotické rekombinace 11, NBS1 = Nijmegen breakage syndrome), zkráceně MRN, což je sensorový komplex detekující DSB (Lavin, 2007), a replikační protein A (RPA) detekující akumulaci ssDNA vznikající při tvorbě zlomů (Polo a Jackson, 2011).

Ve většině eukaryot je SSB a DSB nejprve detekováno proteiny poly(ADP-ribosa) polymeráza 1 a 2 (PARP1 a PARP2) (Benjamin a Gill, 1980; Ohgushi *et al.*, 1980; de Murcia a Menissier de Murcia, 1994; D'Amours *et al.*, 1999), které se naváží na poškozená místa DNA pomocí domény jménem zinkový prst na N-konci (PARP1) (Menissier-de Murcia *et al.*, 1989) nebo přímo N-koncem (PARP2) (Amé *et al.*, 1999). Navázání PARP1 na DNA spustí poly(ADP) ribosylaci (PARylaci), viz kapitola Poly(ADP-ribosa) polymerasy.

Hlavní senzory DSB jsou heterodimer X-ray repair cross-complementing protein 6 a 5 (XRCC6 a XRCC5, neboli Ku70/Ku80) a MRN komplex, které se dají využít i pro *in vitro* identifikaci DSB, jelikož se na DSB přímo vážou (Mimori a Hardin 1986; de Jager *et al.*, 2001) a jsou to jedny z prvních proteinů, které se vážou na DSB *in vivo* (Lisby *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). Ku70/Ku80 tvoří prstencový útvar kolem DNA vlákna, na které se váže skrze DSB konec (Walker *et al.*, 2001) a MRN komplex se váže přes globulární region složený z MRE11 a RAD50 ATPasové domény. Dimerizace MRE11 zajišťuje stabilitu vazby s DNA, kdežto dimerizace RAD50 spojuje poškozené DNA konce dohromady (de Jager *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2008). Ku70/Ku80 je důležitý při opravném systému NHEJ (viz kapitola Nehomologní spojování konců), jelikož se jako první navazuje na DSB konce a aktivuje katalytickou podjednotku DNA-dependentní protein kinasy (DNA-PKcs), která díky tomu vytvoří holoenzym DNA-dependentní protein kinasa (DNA-PK) (Gottlieb a Jackson, 1993). Heterodimer Ku70/Ku80 je jaderný komplex, který má vysokou afinitu k DNA koncům, ať už tupým nebo lepkavým, ty však musí mít jen krátkou přesahující ssDNA. Příliš dlouhé ssDNA na koncích má sníženou afinitu ke Ku70/Ku80 (Mimori a Hardin, 1986).

MRN i RPA se také navazují na konce zlomů DNA. MRN rekrutuje a aktivuje apikální DDR kinasu ATM (Uziel *et al.*, 2003; Falck *et al.*, 2005; Lee a Paull, 2005) a RPA rekrutuje ATM a RAD3-spřízněnou kinasu (ATR) přes senzor zvaný ATR-interakční protein (ATRIP) (Cortez *et al.*, 2001; Rouse a Jackson, 2002b; Zou a Elledge, 2003) a Ewingův s tumorem asociovaný antigen 1 (ETAA1) (Bass *et al.*, 2016).

ATM a ATR jsou nejdůležitějšími signalizačními komponenty DDR. Řadí se mezi skupinu proteinů PIKK (fosfatidylinositol-3-kinasové proteiny), jejichž společným znakem je C-koncová kinasová doména obklopená podjednotkami FAT a FATC, které regulují jeho kinasovou aktivitu (Cimprich a Cortez, 2008). Substráty pro ATM a ATR

se navzájem překrývají, sestávají z více než 700 proteinů, z nichž drtivá většina je zapojena do opravy DNA, zastavení buněčného cyklu a transkripce, ale účinkují také v imunitním systému a intracelulárním přenosu proteinů (Matsuoka *et al.*, 2007).

ATM pomáhají mediátorové proteiny jako mediátor kontrolního bodu poškození DNA 1 (MDC1), P53-vázací protein 1 (53BP1) a BRCA1 (Harrison a Haber, 2006; Harper a Elledge, 2007; Lazzaro *et al.*, 2009). MDC1 váže E3 ubikvitin ligasu RING Finger Protein 8 (RNF8), ta katalyzuje polyubikvitinaci histonu H2A, rekrutuje komplex obsahující BRCA1-Abraxas-RAP80 (RAP80 = s receptorem spojený protein 80) a druhou E3 ubikvitin ligasu RING Finger protein 168 (RNF168; Doil *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2009). BRCA1-RAP80 komplex obsahuje deubikvitinační enzymy, které upravují ubikvitin u chromatinů kolem DSB a je důležitý při blokaci resekce DNA konce (Feng *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2009; Coleman a Greenberg, 2011; Hu *et al.*, 2011). Zato 53BP1 je naproti tomu rekrutován na chromatin vázáním na dvojité chromatinové značky histon H4 s monoethylovaným lysinem K20 (H4K20me1 nebo H4K20me2) a histon H2A s monoubikvitinovaným lysinem K15 (H2AK15Ub), což je cíl RNF168 (Fradet-Turcotte *et al.*, 2013).

Aktivovaná ATM fosforyluje histonový serin 139 (Ser139) ze skupiny H2AX na serin γ H2AX, tento histon je přítomný na chromatinu obklopujícím DSB a poté se na něj naváže MDC1, který indukuje aktivaci dalšího ATM-MRN komplexu, což utvoří zpětnovazebnou smyčku, ve které se znovu fosforyluje H2AX a signál se tak šíří dále od místa zlomu, dochází k modulaci chromatinu a díky tomu se tam můžou navázat komponenty opravy DNA (Huen a Chen, 2008; Polo a Jackson, 2011).

RPA signalizační protein pokryje ssDNA, rekrutuje ATRIP a vznikne tak komplex, který pomůže přesně lokalizovat poškození na DNA (Zou a Elledge, 2003) a nasměruje tam komplex zvaný RAD9-RAD1-HUS1 (9-1-1), který tvoří svorku, která se na místo poškození naváže skrze interakci s RAD17-replikačním faktorem C na 5' konec vlákna ssDNA. Po navázání 9-1-1 komplexu se může navázat topoisomerasu-vázací protein 1 (TOPBP1), který aktivuje ATR aktivací ATRIP (Cimprich a Cortez, 2008). Dalším mediátorem ATR aktivace je Claspin (Smits *et al.*, 2010). Plně aktivovaná ATR fosforyluje efektorovou checkpoint kinasu 1 (CHK1) na Ser317 a Ser345. Další substráty pro ATR fosforylaci jsou: ATRIP, RAD17, RAD9, TOPBP1, Claspin, H2AX, ATP-dependentní helikasa Wernerova syndromu (WRN), Bloom syndrome protein

(BLM), BRCA1 a protein Fanconioho anémie skupiny D2 (FANCD2) (Cimprich a Cortez, 2008).

Pro ATR jsou mediátorovými proteiny TOPBP1 a Claspin (Harrison a Haber, 2006; Harper a Elledge, 2007; Lazzaro *et al.*, 2009).

Transducerové kinasy ATM a ATR následně aktivují efektorové checkpoint kinasy (CHK1 a CHK2), které poté rozvedou signál o poškození DNA po celém jádře (Polo a Jackson, 2011) a redukují cyklin-dependentní kinasy (CDK). Finálním cílem této kaskády jsou transkripční faktory, regulátory buněčného cyklu, systémy apoptózy a DNA opravné faktory (Harrison a Haber, 2006; Harper a Elledge, 2007; Lazzaro *et al.*, 2009). Inhibice CDK zpomalí nebo úplně zastaví buněčný cyklus v kontrolních bodech (G1-S, intra-S, G2-M), což buňce poskytne dostatečnou dobu pro opravu DNA (viz Obr. 2).

Zároveň s tím, signalizace ATM/ATR podporuje opravné procesy rekrutací opravných faktorů na místa poškození a aktivací DNA opravných proteinů jejich úpravou (fosforylace, acetylace, ubikvitinizace nebo sumoylace) (Huen a Chen, 2008).

V nepoškozených, normálně fungujících buňkách je ATM v jádře ve formě neaktivního dimeru, který má blokovanou FAT doménu (právě ta je zodpovědná za kinasovou aktivitu) a až při poškození DNA projde autofosforylací na Ser367, Ser1893 a Ser1981 (Ser1981 se nachází na FAT doméně), což vede k disociaci dimeru a uvolnění aktivního kinasového monomeru (Bakkenist a Kastan, 2003; Kozlov *et al.*, 2006).

Signalizace a oprava zlomů DNA je propojená s dalšími metabolickými pochody DNA, jako jsou replikace a transkripce, ATM například dokáže lokálně inhibovat transkripci prováděnou RNA polymerasami I a II (RNAPI a RNAPII) na místech, kde je DNA poškozena (Kruhlak *et al.*, 2007; Shanbhag *et al.*, 2010). Tato transkripční inhibice je zároveň spojena s odstraněním aktivních RNA polymeras z poškozeného místa, což ukazuje, že proteinová dynamika v místě poškození funguje dvěma směry, zatímco opravné faktory jsou navazovány, jiné faktory jsou disociovány (Polo a Jackson, 2011).

2.2 Způsoby opravy DNA

Poškození DNA je několik druhů a jejich oprava se liší v jistých krocích. Některé jsou opraveny relativně jednoduchým zvrtným procesem, většina je ovšem opravována celými komplexy proteinů a jimi zprostředkovaných sekvencí katalytických reakcí. Kvůli

tomu se DDR dělí na podsystemy. Nejvýznamnější jsou excizní reparace nukleotidů (NER), excizní reparace bází (BER), oprava cestou Fanconihho anémie (FA), reparace chybného párování bází (MMR), žihání jednoho vlákna DNA (SSA), reparace jednovláknového zlomu (SSBR), nehomologní spojování konců (NHEJ) a homologní rekombinace (HR) (Jackson a Bartek, 2009).

Různě diferencované buňky mají rozdílné požadavky na DDR systémy, například některé DNA-opravné dráhy jsou down-regulovány po diferenciaci buněk, což ukazuje, že oprava DNA je pro nedělící se buňky méně důležitá (Jackson a Bartek, 2009). Navíc se u některých buněk mění požadavky na opravu i během vývoje, u savců se takhle mění nároky na opravu DSB během rozvoje nervové soustavy, kdy HR systém je nejdůležitější během proliferace neuronů a NHEJ přebírá hlavní roli až po finální diferenciaci neuronů (Orii *et al.*, 2006). NHEJ je tak pravděpodobně jediným post-mitotickým způsobem opravy DSB v neuronech, kdežto dělící se neuronové prekursory využívají HR (Jackson a Bartek, 2009).

2.2.1 Excizní reparace nukleotidů

Excizní reparace nukleotidů (NER) opravuje poškození DNA způsobené UV zářením (6-4PP) a CPD nebo intravláknové překřížení, cyklupuriny tvořenými ROS a polycyklickými aromatickými uhlovodíky (Friedberg, 2001; Hanawalt, 2001; Mullenders a Berneburg, 2001).

Celkově se NER skládá ze 4 hlavních kroků: rozpoznání chyby, rozvinutí DNA kolem léze, vystřížení a odstranění poškozené části vlákna a syntéza nového vlákna společně s ligací. NER se dělí na dva podsystemy: globální genomové NER (GG-NER nebo také GGR), který kontroluje celý genom a opravuje chyby na netranskribovaných doménách DNA a druhý systém je NER spojený s transkripcí (TC-NER nebo také TCR), který pracuje v aktivně expresovaných genech. Aktivuje se, když RNAPII zastaví svou aktivitu kvůli chybě na DNA vláknu. Rozdíl mezi GG-NER s TC-NER spočívá ve fázi rozpoznání poškození a v tom, že TC-NER pracuje rychleji, než GG-NER (Hanawalt a Spivak, 2008).

GG-NER rozpozná poškození DNA pomocí proteinových komplexů XPC-HR23B-Centrin2 (HR23B = opravný protein RAD23 homolog B) a XPE-DDB2 (DDB2 = poškození DNA vázající protein 2), spustí se opravné procesy rekrutací NER

faktorů. Multiproteinový komplex lidský transkripční faktor II (TFIIH, z podjednotek XPB, XPD, CDK7, cyklinu H = CCNH; faktoru aktivace 1 CDK-aktivační kinasy = MNAT1; a všeobecných transkripčních faktorů IIIH podjednotky 1 až 5 = GTF2H1, GTF2H2, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5) tvoří dočasně otevřenou DNA strukturu užitím 3'-5' a 5'-3' nukleázové aktivity dvou ATP-dependentních helikas skupiny Xeroderma pigmentosum B a D (XPB a XPD) (Evans, 1997). XPD má helikasové vlastnosti a také zajistí navázání XPC na místo DNA zlomu. Domény Arch a Fe-S z XPD utvoří žlábek, kudy prochází poškozená DNA ve směru 5'-3' a je rozvíjena její dvoušroubovicová struktura. Po odvinutí dostatečně dlouhé části DNA vlákna (27-30 bp), jsou odhalena ssDNA vlákna plně pokryta RPA (de Laat *et al.*, 1998). RPA spolu s proteinem Xeroderma pigmentosum komplementační skupiny A (XPA; který se navazuje na 5' konec léze) (Krasikova *et al.*, 2010) zodpovídají za správné umístění endonukleolytických mediátorů vystřížení chybné DNA. Samotné vystřížení provádí dvě specifické endonukleasy, XPF-ERCC1 (provede stříh na 5'-konci zlomu; ERCC1 = protein 1 pro excizní opravu DNA) a protein XPG, který provede stříh na 3'-konci na druhém vlákně) (Fagbemi *et al.*, 2011). Za použití komplementárního templátu syntetizuje DNA polymerasa δ (Pol δ ; pro nereplikující se buňky) a ϵ (Pol ϵ ; pro dělící se buňky) novou sekvenci DNA. Syntéza začíná na 3' konci vzniklém činností XPF-ERCC1. Celý proces potom na 3' konci uzavře ligasa I nebo III (LigI, LigIII). (Moser *et al.*, 2007).

TC-NER pracuje v transkriptujících se částech DNA, spouští se ve chvíli, kdy je RNAPII blokována DNA zlomem. Po tomto zastavení je do místa poškození rekrutován protein Cockaynova syndromu skupiny B (CSB), ten rekrutuje protein Cockaynova syndromu skupiny A (CSA). Právě poruchy TC-NER jsou spojeny s Cockaynovým syndromem (CS, 80 % pacientů) (Natale, 2011). Dále se TC-NER v zásadě neliší od GG-NER, následuje rozvinutí helikázami XPB a XPD a tak dále (Torgovnick a Schumacher, 2015).

2.2.2 Excizní reparace bází

Excizní reparace bází (BER) odstraňuje poškozené nukleotidové báze. Poškození bází vzniká v důsledku oxidace, vyvolané spontánně během zánětu, při vystavení exogenním činidlům (např. ionizační radiace, UV záření) nebo důsledkem mutagenních alkylačních

látek a exogenních karcinogenů (např. nitrosiaminy) (Christmann *et al.*, 2003). Mezi nejčastější poškození bází patří N-alkylované puriny, pyrimidiny s narušenou strukturou, 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-OxoG, ten je vysoce mutagenní kvůli špatnému párování s adeninem), inkorporovaný uracil a mnoho dalších (Christmann *et al.*, 2003). BER je nejvíce aktivní v G1 fázi buněčného cyklu (Dianov a Hubscher, 2013).

Poškozená báze je identifikována specifickou DNA glykosylasou, která dokáže rozeznat poškozené báze nebo chybně vložené báze a následně dokáže tyto chyby i odstranit hydrolyzou N-glykosidové vazby (Schärer a Jiricny, 2001). Glykosylasy přítomné v BER mechanismu se dělí na dvě skupiny. První skupina odstraňuje modifikovanou bázi a zanechá na DNA apurinová/apyrimidinová místa (tzv. AP místa), kdežto druhá skupina AP místo vyřízne svojí 3'-endonukleázovou aktivitou, čímž vznikne SSB (Wilson a Barsky, 2001). Mezi glykosylasy první skupiny patří i apurinická-apyrimidická endonukleasa 1 (APE1), která je stimulována proteinem XRCC1, se kterým i interaguje (Vidal *et al.*, 2001). XRCC1 slouží jako jakési lešení pro opravné proteiny a podporuje jejich akumulaci na místě poškození. AP vznikající činností endonukleas první skupiny jsou 5'-deoxyribose fosfát (5'dRP) a 3'-OH (Wilson a Barsky, 2001).

Po tomto kroku může BER pokračovat dvěma cestami, krátkou a dlouhou, v obou hraje roli DNA polymerasa β (Pol β). V krátké cestě vykazuje Pol β i lyasovou aktivitu, díky ní odstraní 5'dRP a vloží na jeho místo správný nukleotid (Dianov *et al.*, 1992; Sobol *et al.*, 1996; Wiebauer a Jiricny, 1990). V dlouhé cestě Pol β váže první nukleotid na 3'konec AP (Podlutzky *et al.*, 2001), ovšem v tomto případě je AP redukované nebo oxidované a Pol β nedokáže odštěpit 5'dRP (Nakamura *et al.*, 2000). Po disociaci Pol β proto přijde na řadu proliferační jaderný antigen (PCNA) společně s Pol ϵ nebo Pol δ a replikační faktorem C (RF-C) (Stucki *et al.*, 1998), které společně syntetizují vlákno až 10 nukleotidů (Christmann *et al.*, 2003). Na 5'AP konci vlákna jsou potom přesahující nukleotidy tvořící klapkovitou strukturu 5'-dRP, která je odštěpena klapkovou endonukleasou 1 (FEN1) stimulovanou proteinem PCNA (Klungland a Lindahl, 1997). Následnou ligaci opraveného vlákna provádí DNA LigI a LigIII. (Tomkinson *et al.*, 2001). LigIII spojuje vlákna u krátké cesty za pomoci interakce s XRCC1, Pol β a PARP1 (Kubota *et al.*, 1996). LigI je u dlouhé cesty BER, interaguje s Pol β a PCNA.) (Prasad *et al.*, 1996; Srivastava *et al.*, 1998).

Důležitou roli v regulaci BER má P53, který celý systém stimuluje *in vitro* přímou interakcí s APE a Pol β a stabilizuje její vazbu na AP místa (Zhou *et al.*, 2001).

2.2.3 Oprava cestou Fanconiho anémie

Opravný systém Fanconiho anémie (FA) je zodpovědný za opravu zesíťování DNA, ať už intervláknového nebo intravláknového. Toto zesíťování blokuje procesy transkripce a replikace (van der Heijden *et al.*, 2004). Zesíťování DNA vzniká vlivem chemoterapeutických látek (např. cisplatina nebo mitomycin C) (van der Heijden *et al.*, 2004) nebo při přirozené interakci s lipid peroxidacími produkty (např. malondialdehyd) (Stone *et al.*, 2008).

V FA opravném systému je zahrnuto několik opravných proteinů, dělicích se do tří skupin. Hlavní jádro systému tvoří proteiny Fanconiho anémie skupiny A, B, C, E, G, I a M (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCG, FANCI a FANCM). Další skupinou je I-D2 komplex, zahrnující proteiny FANCD2 a FANCI (Walden a Deans, 2014). Třetí skupinou jsou downstreamové proteiny (Torgovnick a Schumacher, 2015).

Iniciační fází opravy je tvorba heterodimeru FANCM a FA-asociovaného proteinu 24 kDa (FAAP24), který rozpoznává DNA intervláknové překřížení a rekrutuje další FA faktory na místo poškození, tedy zastavenou replikační vidličku (Torgovnick a Schumacher, 2015). Poté dochází k monoubikvitinilaci I-D2 heterodimeru (FANCD2 a FANCI), který následně lokalizuje místo poškození na chromatinu a interaguje s dalšími opravnými proteiny a downstreamovými FA proteiny (FANCD1, FANCDN, FANCI, FANCS; FANCS a FANCD1 jsou více známé pod názvy BRCA1 a BRCA2.) a pokračuje oprava pomocí homologní rekombinace (viz kapitola Homologní rekombinace) (Kim a D'Andrea, 2012). Nakonec proběhne deubikvitinace I-D2 komplexu pomocí ubikvitin specifické-peptidasy 1 (USP1) (Kim a Kim, 2016).

2.2.4 Reparace chybného párování bází

Reparace chybného párování bází (MMR) rozpoznává a opravuje chyby v párování nukleotidových bází vzniklé spontánní nebo indukovanou deaminací, oxidací nebo methylací nebo chybou při replikaci (Modrich a Lahue, 1996; Umar a Kunkel, 1996). MMR má na starosti také inserční či deleční smyčky (IDL) (Jiricny, 2006) vzniklé

jednovláknovým stříhem. Tyto chyby v DNA mohou vznikat i kvůli tzv. skluzu DNA polymeras (Friedberg, 2001; Jiricny, 2006). MMR pracuje v drtivé většině v aktivně se dělících buňkách (Wagner a Meselson, 1976).

Detektory MMR systému jsou MutS α a MutS β komplexy. MutS α se skládá z MSH2 a MSH6 proteinů (MSH6 je známý i jako G/T-vázající protein, zkráceně GTBP; Palombo *et al.*, 1995), rozpoznává chybné párování bází a IDL o velikosti 1-2 bp. MutS β se skládá z MSH2 a MSH3 a je určen pro detekci IDL o velikosti 2-12 bp (Iyama a Wilson, 2013).

Po nalezení vad na DNA a navázání detekčních komplexů vstupuje do hry jeden ze tří heterodimerních komplexů MutL α (MLH1-PMS2), MutL β (MLH1-MLH3) a MutL γ (MLH1-PMS2) (MLH = lidský MutL homolog, PMS2 = MMR endonukleasa 2). Po rekrutování vytváří trojitou strukturu spolu s MutS. Nejdůležitější z nich pro MMR je komplex vytvořený z MutL α , je schopný se translokovat v obou směrech na poškozené oblasti vlákna a rekrutuje PCNA, RFC a exonukleasu 1 (EXO1). Tyto proteiny vykonají resekci vadné části (Guillotin a Martin, 2014). MMR potřebuje nějakým způsobem rozpoznat správné templátové vlákno a chybné dceřinné vlákno. Tento diskriminační signál pro dceřinná vlákna zajišťují pravděpodobně nesouvislosti při syntéze dceřiných vláken (zaostávající dceřinné vlákno je syntetizováno skrze Okazakiho fragmenty, které se spojují dohromady) a právě tyto malé zářezy ve struktuře vlákna jsou vstupním bodem pro EXO1 (Liberti *et al.*, 2013; Pavlov *et al.*, 2003). Dalším způsobem diskriminace dceřinného vlákna může být asymetricky vázané PCNA na vedoucí vlákno (Constantin *et al.*, 2005) a další mechanismy. Funkce MutL β zatím není zcela známá, MutL γ se účastní meiotické rekombinace (Zhang *et al.*, 2005). Po resekci provedou DNA Pol δ a DNA LigI resyntézu vystřiženého vlákna (Larrea *et al.*, 2010).

2.2.5 Reparace jednovláknového zlomu

Reparace jednovláknového zlomu (SSBR) má na starosti opravu, jak už název napovídá, SSB, které vznikají buď oxidativním poškozením ROS, na AP místech (kvůli poškození DNA či spontánním pochodům byla přerušena N-glykosylová vazba mezi bází a ribosou a zůstala pouze sacharido-fosfátová páteř DNA; Chatterjee a Walker, 2017) či v důsledku vadné aktivity DNA TOP1 (Wang, 2002; Hegde *et al.*, 2008). Vzniká i během normální aktivity BER činností APE1.

SSBR pracuje ve třech trochu odlišných cestách, podle zdroje SSB (Chatterjee a Walker, 2017). Prvně je potřeba detekce poškozeného místa, dalším krokem bývá zpracování konců vláken, protože SSB mají na koncích abnormální struktury, buď na 3'-konci, 5'-konci nebo na obou. Před opravou je potřeba je upravit na normální 3'-hydroxylovou skupinu a 5'-fosfátovou skupinu. SSB vzniklé během BER činností APE1 obsahují 5'-deoxyribosový fosfát (dRP), který je odstraňován 5'-dRP lyasovou aktivitou Pol β (McKinnon a Caldecott, 2007).

Při dlouhé verzi SSBR jsou SSB detekovány PARP1 proteiny, které podstoupí rychlou PARylaci [viz kapitola Poly(ADP-ribosa) polymerasy], disociují a detekují tak další SSB (D'Amours *et al.*, 1999; Davidovic *et al.*, 2001). Následující krok je zpracování konců SSB pomocí APE1 (která je stimulována interakcí s XRCC1, který funguje, jako lešení a hraje důležitou roli v koordinaci a rekrutaci proteinů SSBR), polynukleotid kinasa 3'-fosfatasy (PNKP) a aprataxinu (APTX) (McKinnon a Caldecott, 2007). Následně je poškozený 5'-konec odstraněn aktivitou FEN1 s pomocí PARP1 a PCNA. Vznikne ssDNA, ke které je komplementární část syntetizována pomocí Pol β a Pol δ/ϵ . Konečnou ligaci má na starosti LigI, jejíž aktivita je závislá na přítomnosti PCNA a XRCC1 (Lan *et al.*, 2004; Mortusewicz *et al.*, 2006; McKinnon a Caldecott, 2007).

Krátká verze SSBR, kdy SSB vzniká činností BER, se liší od dlouhé verze v tom, že resyntézu zprostředkuje pouze Pol β a ligaci provádí LigIII (McKinnon a Caldecott, 2007).

Poslední variantou je TOP1-SSB cesta, což je varianta PARP1-dependentní dlouhé cesty. V tomhle případě jsou konce SSB zpracovány tyrosyl-DNA fosfodiesterasou 1 (TDP1), který odstraňuje TOP1 z 3'-konce zlomu (Caldecott, 2008).

2.2.6 Žihání jednoho vlákna DNA

Žihání jednoho vlákna DNA (SSA), je přídatný opravný mechanismus DSB, který spojuje dva homologní 3'- ssDNA konce pomocí žihání, kdy ovšem dochází k delecí mezi žihanými místy (Pâques a Haber, 1999) a tento mechanismus je tedy náchylný na chyby. SSA potřebuje k práci rozsáhlou resekci DNA konce a přemístění RPA z ssDNA, aby byla odhalena komplementární homologní sekvence. Přemístění RPA proteinů probíhá u savců pomocí RAD52, u kvasinek pomocí RAD51 (Scully *et al.*, 2019).

2.2.7 Homologní rekombinace

Homologní rekombinace (HR), patří spolu s nehomologním spojováním konců (viz kapitola Nehomologní spojování konců) mezi systémy pro opravu zlomů obou vláken DNA (DSBR) (Hartlerode a Scully, 2009; Pardo *et al.*, 2009). Oba systémy jsou navzájem komplementární (Polo a Jackson, 2011). HR také může znovu nastartovat zastavenou replikační vidličku nebo spolupracovat s FA při opravě intervláknového překřížení DNA (Kennedy a D'Andrea, 2005).

HR potřebuje, jak název naznačuje, homologní templát ze sesterské chromatidy, díky tomu je teoreticky bezchybná. HR opravuje DSB post-replikativně v S a G2 fázi buněčného cyklu (Roy *et al.*, 2011). HR zahrnuje systémy, které zajistí invazi do templátového DNA vlákna a opravnou syntézu (Mazón *et al.*, 2010).

Iniciace celého HR systému je podmíněna vznikem ssDNA pomocí MRN, v procesu katalyzovaném pomocí RAD51, BRCA1 a BRCA2, jelikož ssDNA infiltruje templátové vlákno, díky kterému mohou další HR komponenty resyntezovat správné vlákno (spolupráce polymeras, nukleas, helikas, ligas a dalších faktorů) (Jackson a Bartek, 2009).

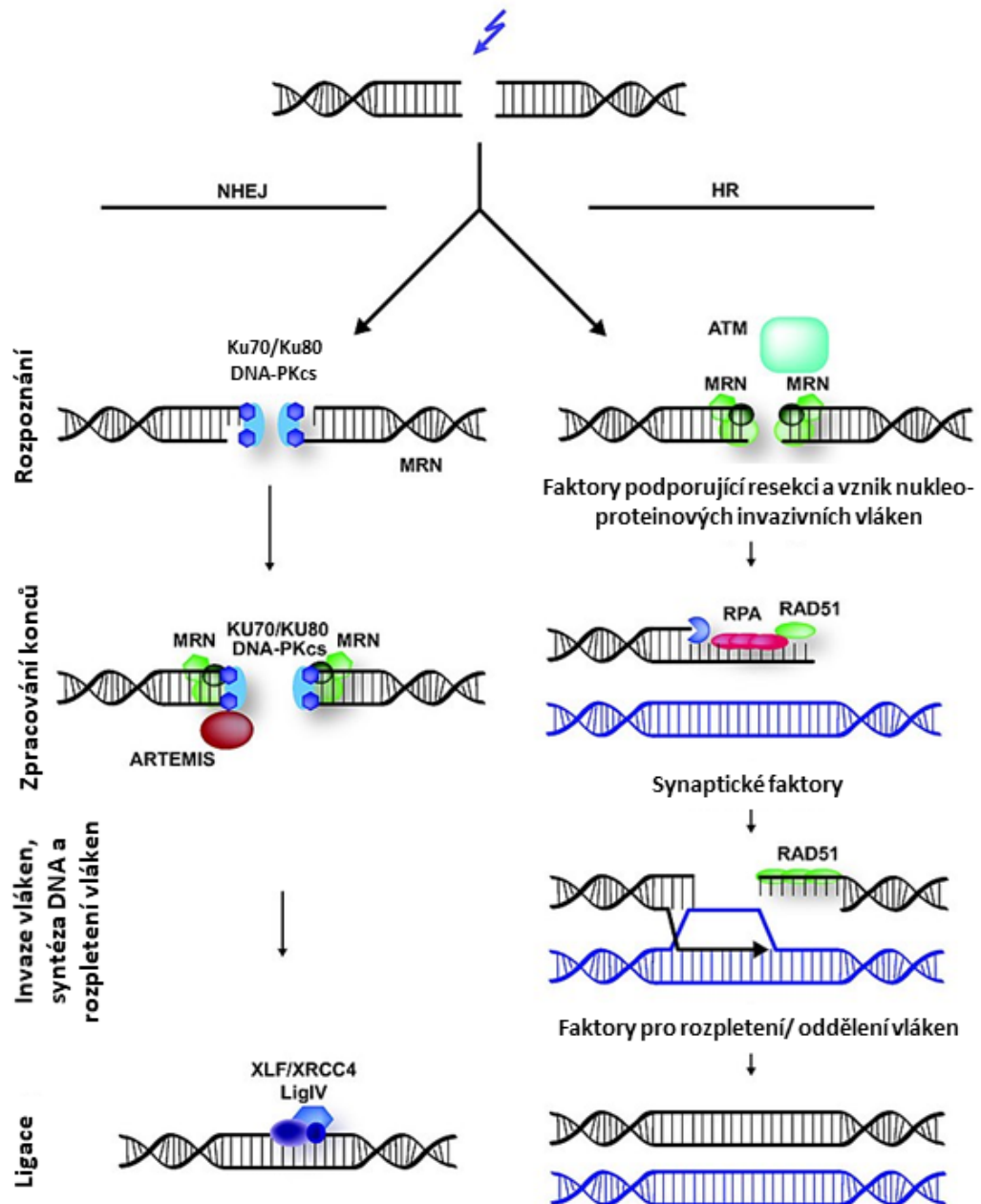
MRN komplex se navazuje na oba konce DSB, následně rekrutuje ATM a histonovou acetyltransferasu TIP60 (Sun *et al.*, 2005; Stracker a Petrini, 2011). ATM se aktivuje pomocí TIP60 a fosforyluje chromatin H2AX, který potom může navázat MDC1 (Bhatti *et al.*, 2011). MDC1 je poté fosforylováno díky ATM a funguje jako lešení pro vazbu ubiquitin E3 ligas RNF8 a RNF168 (Altmeyer a Lukas, 2013), ty ubiquitinují H2AX, který následně funguje jako vazebné místo pro 53BP1 a BRCA1. To celé se děje v S a G2 fázi buněčného cyklu, kde BRCA1 má větší koncentraci než 53BP1 a spustí ubiquitinaci retinoblastom-vázajícího proteinu 8 (RBBP8) (Yu *et al.*, 2006; Chapman *et al.*, 2012). V tu chvíli se navážou na DNA i další HR komponenty, RPA a RAD51 (Chatterjee a Walker, 2017).

Následuje resekce konců DSB. Resekce se skládá z nukleotického zpracování DNA od 5'ke 3'konci MRN komplexem (Rupnik *et al.*, 2010) v kombinaci s pomocnými faktory jako CtIP, RECQ helikasami (skupina, kam patří i proteiny BLM a WRN) a nukleasami EXO1 a DNA replikační helikasa/nukleasa 2 (DNA2) (Zou a Elledge, 2003; Bernstein a Rothstein, 2009; Mimitou a Symington, 2009; Huertas, 2010; Longhese *et al.*, 2010; You a Bailis, 2010).

Resekce se podle způsobu provedení dělí na krátkou a dlouhou. Krátká resekce je zprostředkována endonukleasovou aktivitou MRN a CtIP a je stimulována proteiny na koncích DNA, jako jsou Ku70/Ku80 (navázané na koncích zlomů) a RPA nebo nukleosomy (Limbo *et al.*, 2007; Sartori *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2011). Během resekce jsou Ku70/Ku80 odstraněny z konce DNA, což poskytne vstupní bod pro resekci dlouhého dosahu. Ta je zprostředkována proteiny EXO1 nebo BLM spolu s DNA2 (Nimonkar *et al.*, 2011, Daley *et al.*, 2017). Po resekci vznikne volný přesahující 3'-konec ssDNA. RPA proteiny pokryjí tento přesahující 3'-konec, ten se díky nim nemůže navázat na žádný nežádoucí homologní řetězec. Před dalším krokem jsou však RPA odstraněny rekombinačními mediátory (u obratlovců jsou to BRCA2 a BRCA1-associated RING domain protein 1 = BARD1). Po odstranění RPA se naváže na ssDNA RAD51 rekombinasa (San Filippo *et al.*, 2008). Vznikne RAD51 filament, což je dynamická struktura, která hledá homologní oblast na templátovém homologním DNA a provádí invazi ssDNA do sesterské chromatidy (Scully *et al.*, 2019). RAD51 vlákno vytváří synaptický komplex složený ze třívláknového DNA helixu, který podporuje navázání do templátu (Chen *et al.*, 2008). Pokud RAD51 najde vhodný homolog, synapse se stabilizuje (odstraněním RAD51 pomocí RAD54 a RAD54B, to uvolní 3'-OH ssDNA) a nepotřebné druhé vlákno napadené molekulou je odsunuto pryč, vytvoří D-smyčku (dislokační smyčka) (van der Heijden *et al.*, 2008) a zbývající komplementární vlákna (templát a invazivní ssDNA s volným 3'-koncem) se navážou na sebe a spustí se DNA polymerasa Pol δ , která spolu s LigIII prodlužuje invazivní vlákno (Chatterjee a Walker, 2017; Scully *et al.*, 2019).

Po navázání invazivního vlákna do templátu se HR dá rozdělit na dva odlišné podsystemy. První podsystem převažuje v meioticky se dělících buňkách (Pâques *et al.*, 1999) a označuje se jako klasický HR nebo také dvojité Hollidayovo překřížení (dHJ), kde invazivní vlákno a templát tvoří strukturu dHJ. Díky tomuto překřížení může dojít k rekombinaci (crossing-overu) mezi oběma vlákny, záleží na prostorové orientaci dHJ (Sarbjana a West, 2014). Po provedení opravy vlákna dojde k rozpletení dHJ pomocí helikas a resolvasových enzymů, vlákna se od sebe oddělí a vrátí se na svá místa, za vzniku kompletní opravené DNA. Rekombinace ovšem nemusí proběhnout vždy, dHJ může být rozpleteno pomocí komplexu BTR (složený z proteinů BLM, TOP3 α a RMI1/RMI2, záleží na polaritě dHJ; RMI1 = methylthioribosa-1-fosfát isomerasa; Bizard *et al.*, 2014).

Druhým HR podsystemem, dominantním pro somatické buňky je SDSA (na syntéze závislé žíhání vlákna), kdy je RAD51 navázáno jen na jeden konec DSB, kde druhý konec zůstane pasivní (Pâques *et al.*, 1999). Jak přesně k tomu dochází, není přesně známo. Druhý konec zlomu se poté žíhá se syntetizovaným vláknem (Scully *et al.*, 2019). D-smyčka je v SDSA rozpuštěna pomocí enzymu helikasa 1 regulující elongaci telomer (RTEL1) (Barber *et al.*, 2008). Při SDSA tedy nedochází k rekombinaci a při mitóze je to více užívaná HR cesta (Torgovnick a Schumacher, 2015; Scully *et al.*, 2019). Shrnutí celého systému viz Obr. 4.



Obr. 4 Hlavní způsoby opravy DSB: NHEJ a HR. NHEJ spojuje poškozená vlákna DNA a vyžaduje resekci ssDNA na koncích zlomů, což vede ke ztrátě genetické informace. Detekci zajišťuje heterodimer Ku70/80, který naváže PKcs protein. Ten fosforyluje a verbuje další opravné faktory, hlavně resekční enzymy Artemis a MRN. Po resekci LigIV s pomocí XLF a XRCC4 spojí oba konce DNA vláken. HR využívá homologní oblasti v sesterské chromatidě. Tento systém je teoreticky bezchybný. Po detekci pomocí MRN je aktivován ATM komplex, který fosforyluje H2AX histon a další opravné faktory. MRN provede resekci a vznikne ssDNA. To je hned pokryto RPA, které nahradí RAD51. Vlákno s RAD51 pronikne do templátového vlákna sesterské chromatidy, kde dojde k navázání na homologní oblast a syntéze opraveného vlákna. Vzniká D-smyčka. Může dojít k rekombinaci. Následuje rozpletení vláken a jejich návrat na svá místa (upraveno podle Lans *et al.*, 2012).

2.2.8 Nehomologní spojování konců

Nehomologní spojování konců (NHEJ) je další ze systémů opravy DSB. Na rozdíl od HR nevyužívá templát DNA (Lieber, 2010). NHEJ je převládající způsob opravy DSB u eukaryot, zprostředkovává přímou ligaci poškozených konců DNA vláken (aniž by je moc upravoval) (Polo a Jackson, 2011) bez potřeby homologních sekvencí mezi nimi a nezáleží mu na fázi buněčného cyklu (Lieber, 2010).

53BP1 hraje důležitou regulační roli při rekrutování NHEJ komponentů (Panier a Boulton, 2014). Jako první DSB rozpozná heterodimer Ku70/80, v rámci sekund se na něj naváže, aby zabránil nechtěné resekcí (Pang *et al.*, 1997; Mari *et al.*, 2006; Soutoglou *et al.*, 2007; Mimitou a Symington, 2010) a aktivuje protein kinasu DNA-PKcs (Gottlieb a Jackson, 1993), která interaguje s XRCC4 proteinem. PKcs odsunuje Ku heterodimer a fosforyluje sebe i další okolní faktory, čímž je aktivuje (Gottlieb a Jackson, 1993; Yoo a Dynan, 1999; Weterings a Chen, 2008). XRCC4 spolu s Ku stabilizuje konce zlomu proti sobě (Malivert *et al.*, 2010; Hammel *et al.*, 2011; Andres *et al.*, 2012). Tyto konce jsou upraveny resekcí. Tu provádí MRN komplex a protein Artemis (tvoří komplex s PKcs; Moshous *et al.*, 2001). Po resekcí zůstanou mezi vlákny mezery, ty jsou vyplněny Pol μ a Pol λ (Ramadan *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2010). LigIV (v asociaci s XRCC4 a XRCC4 podobný faktor = XLF) nakonec provede ligaci obou konců a dokončí NHEJ proces (Jackson a Bartek, 2009).

NHEJ se dělí na dva podsystémy, výše popsany je klasický cNHEJ (viz Obr. 4), ale existuje ještě alternativní spojování konců, tzv. aEJ. Alternativní systém buňka využívá, pokud je základní cNHEJ nějak narušen (Polo a Jackson, 2011). Pracuje s 3' koncem ssDNA a je mutagenní, jelikož tvoří inserce a delece na místech opravy (Scully *et al.*, 2019). U cNHEJ se předpokládá, že dochází jen k minimální resekcí vláken (Burma *et al.*, 2006), ovšem u aEJ dochází vždy k resekcí mikrohomologů na místě poškození DNA (Guirouilh-Barbat *et al.*, 2007)

Alternativní způsob závisí na terminálních mikrohomologích přímo na koncích zlomů. Obejde se bez XRCC4 (Bennardo *et al.*, 2008), LigIV a Ku proteinů. V aEJ je hlavním komponentem Pol θ , funguje jako helikasa i jako polymerasa, přičemž helikasa odstraní RPA z ssDNA, zatímco polymerasová funkce Pol θ stabilizuje oba DNA konce naproti sobě (Kent *et al.*, 2015; Mateos-Gomez *et al.*, 2017). Další polymerasy vyplní prostor mezi vlákny syntézou (McVey *et al.*, 2016) a DNA ligasa je spojí. Pol θ a celé aEJ se

nejspíše vyvinulo jako opravný faktor určitých lézí DNA spojených s replikací, které jsou špatné substráty pro cNHEJ. (Scully *et al.*, 2019).

NHEJ se pokládá za poměrně často mutagenní systém opravy DNA, jelikož způsobuje delece nebo inserce na opravovaných místech a je náchylný k chybám (Lieber, 2010; Polo a Jackson, 2011). Některé studie však tvrdí, že samotný cNHEJ systém je ve své podstatě poměrně přesný a vzniklé chyby způsobuje hlavně chybný aEJ (jehož plný mechanismus ještě nebyl prozkoumán; Charbonnel *et al.*, 2011), možnost cNHEJ adaptovat se na nedokonale komplementární konce vláken a také nutnost nejprve chemicky zpracovat nekompatibilní DNA konce, než dojde k jejich přímé ligaci (Bétermier *et al.*, 2014).

2.3 Využití poškození opravných systémů DNA při léčbě rakoviny

Společným a základním znakem rakovin je genová nestabilita (Stratton *et al.*, 2009). Většina karcinogenních látek poškozuje DNA a způsobuje mutace (Hoeijmakers, 2001; Kastan a Bartek, 2004). Dalším zdrojem mutací jsou však i zděděné chyby v DDR, které přispívají k náchylnosti na vznik mnoha rakovin. Například defekty v NER systému způsobují UV hypersensitivní choroby jako Xeroderma pigmentosum (XP), Cockaynův syndrom a trichothiodystrofie (TTD) (Cleaver, 2005), mutace v MMR způsobují tzv. Lynchův syndrom (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom = HNPCC), vedou k predispozici ke kolorektálnímu karcinomu, rakovině žaludku, vaječníků a dalším karcinomům (Guillotin a Martin, 2014). Nepřítomnost MMR byla navíc potvrzena u 15 % primárních druhů karcinomů (Furgason a Bahassi, 2013). Mutace FA systému způsobují Fanconiho anémii, autosomální recesivní chorobu, způsobující retardaci, neplodnost, selhání kostní dřeně, tuhé tumory hlavy, krku, ledvin, jater, rakovinu kůže a další (Cerbinskaite *et al.*, 2012).

Mezi převažující způsoby léčby rakoviny patří kromě chirurgických zákroků radioterapie a chemoterapie. V chemoterapii jsou využívány látky, které způsobují cílené poškození DNA, generují DNA zlomy a mutace, ty totiž nejen způsobují tvorbu nádoru, ale mohou také zpomalovat růst rakoviny a spouštět smrt maligních buněk. Užívané koncentrace těchto látek ve zdravých tkáních nepůsobí vážné vedlejší efekty, ale v rakovinných buňkách prokazují velkou efektivitu. To je způsobeno faktem, že většina (pravděpodobně všechny) druhů rakovin mají mutace v DDR a to není schopné provádět

efektivní opravu. Jenže DDR je běžně i zdrojem rezistence rakovinných buněk proti chemoterapeutikům, tudíž jeho cílená inhibice zvyšuje efektivitu radioterapie (tento efekt se nazývá radiosenzitizace) a chemoterapie. Inhibice DDR může také zablokovat apoptózu a tím snížit toxicitu pro zdravé tkáně (Jackson a Bartek, 2009).

Jelikož se DDR často doplňují a sdílejí některé komponenty, mutace jednoho proteinu může způsobit ovlivnění hned několika DDR systémů najednou. Rakovinné buňky už obsahují mutace DDR, cílené mutace chemoterapeutickými účinky tak mají na rakovinné buňky mnohem větší dopad než na zdravou tkáň. Například PARP inhibitory, které jsou relativně netoxické pro normální tkáň, ovšem v HR-defektních buňkách vykazují cytotoxicitu, obzvláště v těch, které obsahují mutace v genech *BRCA1* nebo *BRCA2* (viz kapitola PARP inhibitory) (Bryant *et al.*, 2005; Farmer *et al.*, 2005; Jackson a Bartek, 2009).

2.4 DNA poškozující látky využívané v léčbě rakoviny

2.4.1 Cisplatina

Cisplatina, známá taky jako Peyronův chlorid, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, *cis*-diamindichlorplatina (CDDP), je nejvíce užívané chemoterapeutické léčivo (Torgovnick a Schumacher, 2015), povolené FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, USA) od roku 1978. Původně byla používána na léčbu rakoviny močového měchýře a varlat (Kelland, 2007b), postupně se začala používat i na léčbu dalších karcinomů (malobuněčný a nemalobuněčný karcinom plic, rakovina krku a hlavy, vaječníků, děložního hrdla a kolorektální karcinom) (Lebwohl a Canetta, 1998; Galanski, 2006).

Funkce cisplatinu je závislá na měďném transportéru 1 (CTR1) a transportéru organických kationtů (OCT), které regulují příjem cisplatinu do buňky (Torgovnick a Schumacher, 2015). Jakmile se cisplatina dostane do cytoplazmy, je aktivována reakcí s vodou. Voda může nahradit jednu nebo obě *cis*-chloro skupiny v molekule cisplatinu. Nejvíce reaktivní je monoaqua forma, může reagovat s mnoha cytoplazmatickými nukleofilními substráty (redukovaný glutathion = GSH, methionin a metalothioneiny = MT), nejdůležitější vlastností je však to, že napadá DNA, z čehož vychází její cytotoxický efekt (Galluzzi *et al.*, 2011). Cisplatina způsobuje inter i intra

vláknové překřížení DNA, jelikož v jádře cisplatina napadá nukleofilní N7 na purinových bázích, což vede k tvorbě monofunkčních aduktů, které jsou schopny vytvářet zmiňovaná překřížení vláken (Dasari a Tchounwou, 2014). Cisplatinou zasažené buňky se zastavují v G2 fázi buněčného cyklu a aktivují se jejich DDR dráhy. Pokud je poškození příliš rozsáhlé, dojde k buněčné smrti (to způsobuje kaskáda ATM/ATR/P53) (Damia *et al.*, 2001; Pabla *et al.*, 2008).

Buňky si však dokážou proti cisplatině vytvořit imunitu nebo proti ní mohou mít imunitu vrozenou, to potom brání použití cisplatinu k léčbě rakoviny (Torgovnick a Schumacher, 2015). V rezistentních buňkách bylo objeveno, že proteiny ovládající výdej cisplatinu z buňky [ABC (ATP vázající kazeta) ATPasy jako např. protein spojený s rezistencí na více léčiv = MRP; a měděné ATPasy typu 7A a 7B = ATP7A a ATP7B] mají zvýšenou expresi (Burger *et al.*, 2011), ovšem i interakce s GSH a MT může zapříčinit rezistenci vůči cisplatině. To platí i o zvýšené aktivitě FA, NER a MMR systémů, které opravují škody cisplatinou způsobené (Torgovnick a Schumacher, 2015).

Cisplatina však způsobuje i vedlejší efekty, jako nefrotoxicita a neurotoxicita (Kelland, 2007a). Tyto vedlejší účinky a schopnost buněk vytvořit si po nějakém čase rezistenci vedly k tvorbě dalších léčiv založených na platině (Torgovnick a Schumacher, 2015) např. karboplatina, používaná na léčbu rakoviny vaječníků, krku, hlavy a plic (Dasari a Tchounwou, 2014). Místo dvou *cis*-chloro skupin obsahuje dvouvazný dikarboxylový ligand, který zpomaluje reaktivitu sloučeniny a zmenšuje pravděpodobnost vedlejších účinků (hlavní negativní efekt je trombocytopenie, snížená tvorba trombocytů) (Torgovnick a Schumacher, 2015). V buňce tvoří stejné adukty jako cisplatina (Harrap, 1985).

Další FDA schválené léčivo na bázi platiny je oxaliplatina. 1,2-diaminocyklohexanový ligand a oxalátová skupina dávají oxaliplatině nové vlastnosti, oproti předchozím platinovým léčivům. Je méně závislá na CTR1 transportéru (Holzer *et al.*, 2006) a tvoří v DNA adukty, které MMR systém není schopen rozpoznat a nehrozí tedy tvorba rezistence skrze MMR (Fink *et al.*, 1996). Oxaliplatina se používá pro léčbu rakovin rezistentních na cisplatinu a karboplatinu (Raymond *et al.*, 2002) a také v kombinaci s 5-fluorouracilem na léčbu kolorektální rakoviny (Kelland, 2007b).

Fenatriplatina, nejnovější z této skupiny látek, usmrcuje rakovinné buňky efektivněji, než její předchůdci a zdá se, že buňky nejsou schopné si na ni vybudovat rezistenci

(Park *et al.*, 2012). Fenantriplatina formuje vysoce účinné monofunkční adukty na DNA (Kellinger *et al.*, 2013), které jsou schopné inhibovat RNA i DNA polymerasu (Hucke *et al.*, 2018), mimo jiné i Polη, která má na svědomí tvorbu rezistence vůči cisplatině (Hicks *et al.*, 2010).

2.4.2 Nukleosidové analogy

Další látky používané v boji proti rakovině jsou nukleosidové analogy. Jsou to modifikované purinové a pyrimidinové nukleosidy, základní prekursory ATP, DNA a RNA. Tahle skupina látek je užívána při léčbě hematologických malignit i pevných tumorů a také na léčbu virových onemocnění (Galmarini *et al.*, 2002).

Cytotoxicita nukleosidových analogů spočívá v inhibici replikace a transkripce. K inhibici těchto pochodů dochází po inkorporaci do DNA či RNA nebo přímou interferencí s kriticky důležitými enzymy replikace a transkripce (polymerasy, kinasy, ribonukleotidové reductasy, metyltransferasy, nukleosidfosforylasy a thymidylát syntasy) (Jordheim *et al.*, 2013).

Příjem do buňky regulují dvě skupiny nukleosidových transportérů (NT): rovnovážné NT (ENT) a koncentrační NT (CNT) (Zhang *et al.*, 2007) a stejné enzymy, které se v buňce starají o dodávku dNTP pro DNA syntézu (deoxycitidin kinasa = dCK, deoxyguanosin kinasa = dGK, thymidin kinasa 1 a 2 = TK1 a TK2) fosforylují nukleosidové analogy na mono-, di- a tri- fosfátovou formu. Cytotoxicita nukleosidových analogů je aktivní ve formě trifosfátu (Jordheim a Dumontet, 2007).

Jenže nukleosidové analogy napadají každou množící se buňku, jsou tedy málo specifické, a to způsobuje spoustu vedlejších účinků (od potlačení funkcí kostní dřeně a inhibice imunitního systému, až po neurotoxicitu). Napadené buňky si také mohou vytvořit rezistenci vůči nukleosidovým analogům. Toho dosáhnou snížením hladiny fosforylačních kinas dCK/dGK nebo ztrátou exprese NT (Torgovnick a Schumacher, 2015).

První FDA schválený nukleosidový analog byl cytarabin (nebo také ara-c), vytvořený modifikací 2-deoxycitidinu. Byl schválený již v roce 1969 na léčbu akutní myeloidní leukémie (AML) (Johnson, 2001). Cytarabin obsahuje na pozici 2' na sacharidu hydroxylovou skupinu, která je po proniknutí do buňky fosforylována dCK. Vzniká

trifosfátová forma arabinofuranosylcytosin trifosfát (ara-CTP), která může při syntéze DNA nahradit deoxycytidin trifosfát (dCTP) a je tak vložena do DNA. Inkorporovaná ara-CTP je špatným substrátem pro DNA polymerasu, což vede k zastavení replikační vidličky (Ross *et al.*, 1990).

Gemcitabin je také 2-deoxycytidinový analog, obsahuje 2 fluory na 2' pozici sacharidu. Gemcitabin se používá v léčbě tuhých tumorů (tumor slinivky, prsu, vaječníků a nemalobuněčný tumor plic) (Ewald *et al.*, 2008). Funguje stejně jako ara-c, tedy zavedením jeho trifosfátové formy do DNA a kompeticí s dCTP (Hertel *et al.*, 1990). Také má schopnost inhibovat ribonukleotid reduktasu a snížit tak buněčnou zásobu deoxynukleotidů (Wang *et al.*, 2007). V porovnání s cytarabinem buňky gemcitabin lépe absorbují, má delší retenční čas (Plunkett *et al.*, 1995) a podporuje antiproliferační účinky cisplatinu při rutinní léčbě (van Moorsel *et al.*, 2000).

Troxacitabin je odlišný typ nukleosidového analogu. Stereochemické formy přírodních nukleosidů mají konfiguraci β -D, troxacitabin má opačnou konfiguraci β -L. Je fosforylován jiným typem kinas (3-fosforylglycerát kinasy) a jeho absorpce není řízena pomocí ENT či CNT. Antiproliferační účinek troxacitabinu byl klinicky prokázán jak pro tuhé tumory, tak pro hematologické malignity (Swords a Giles, 2007).

CNDAC je cytosinový analog, který má úplně jiný způsob účinku, místo zastavení buněčného cyklu v S fázi (jako ara-c, gemcitabine a troxacitabin), CNDAC způsobuje zastavení v G2 fázi a indukuje tak tvorbu DSB (Wang *et al.*, 2008).

Fludarabin a cladribin jsou purinové analogy s modifikovaným 2'-deoxyadenosinem, užívané pro léčbu hematologických malignit. Fludarabin obsahuje fluor na pozici 2' na adenosinu a fosfátovou skupinu na 5' uhlíku arabinózy. Cladribine má místo fluoru chlor. Jejich funkce spočívá v inkorporaci do DNA a následné aktivaci DDR (Huang *et al.*, 1990). Také interferují s ribonukleotid reduktasou, DNA ligasou, DNA primasou (Clarke *et al.*, 2002) a skrze aktivační faktor 1 apoptické proteasy (APAF-1) indukují apoptózu (Genini *et al.*, 2000). Obě látky však vykazují cytotoxicitu i pro nedělící se buňky (Galmarini *et al.*, 2002).

Clofarabin byl vyvinut na zlepšení účinku fludarabinu a cladribinu a v roce 2006 začal být používán k léčbě dětské akutní lymfoblastické leukémie (Bonate *et al.*, 2006). Na pozici 2' na purinovém uhlíku nese fluor. Trifosfátová forma blokuje DNA syntézu, inhibuje ribonukleotid reduktasu a spouští apoptózu uvolněním

cytochromu C z mitochondrií (Ewald *et al.*, 2008). Clofarabin je cytotoxický pro nemalobuněčnou rakovinu plic, rakovinu tlustého střeva, ledvin, centrálního nervového systému, vaječnicků, prostaty a prsou (Bonate *et al.*, 2006).

2.4.3 Alkylační činidla

Alkylační činidla patří mezi nejstarší protinádorové látky. Prvním z nich schválený FDA v roce 1949 byl chlormethyn, prodáváný jako Mustargen a používal se proti leukémii a lymfomii (Torgovnick a Schumacher, 2015).

Alkylační činidla tvoří reaktivní meziprodukty, které napadají nukleofilní skupiny na DNA bázích, a to bez ohledu na fázi buněčného cyklu. Alkylace může probíhat i na RNA, proteinech i lipidech. N-alkylace jsou cytotoxické, kdežto O-alkylace jsou spíše mutagenní (Torgovnick a Schumacher, 2015). Alkylační činidla mohou být mono- nebo bifunkční, záleží na počtu jejich reaktivních míst. Podle toho dochází k reakci s jedním, či dvěma vlákny DNA. Monoalkylace způsobí přenos jediné alkylové skupiny, a tedy jedinou modifikaci DNA vlákna, což vede k chybnému párování nebo k SSB vlivem tvorby AP míst. Bifunkční alkylační činidlo dokáže napadnout dvě různé báze na stejném nebo rozdílném vlákně DNA a tvoří tak inter- nebo intravláknové zesíťování, což způsobuje inhibici separace vláken během replikace nebo transkripce (Torgovnick a Schumacher, 2015). Zesíťování dosáhneme i mezi přilehlými bázemi upravenými monoalkylačním činidlem (Fu *et al.*, 2012).

BER systém opravuje produkty N-alkylace (DNA glykosylasa rozpozná a odstraní DNA lézi za tvorby AP). O-alkylaci opravují systémy NER a MMR nebo pomocí O⁶-methylguanin-DNA methyltransferasay (MGMT), která transportuje vložené alkylové skupiny na svoje auto-inaktivační domény (Pegg *et al.*, 1995). Všechny zmíněné systémy spolupracují s HR, či FA, pokud je potřeba opravit komplexnější lézi způsobenou bifunkčními činidly (Torgovnick a Schumacher, 2015).

Alkylační činidla užívaná v boji s rakovinou se dělí do 5 skupin: dusíkaté yperity, alkylové sulfonáty, ethyleniminy, triaziny a nitrosoureasy (Torgovnick a Schumacher, 2015).

Dusíkaté yperity jsou z nich nejstarší skupinou, jsou bifunkční a mají vysokou toxicitu, proto je použití některých z nich omezeno jen na veterinární účely.

Chlorambucil a bendasmutin se používají pro léčbu chronické lymfatické leukémie (CLL). Melphalan je standardní látka užívaná společně s glukokortikoidem prednisonem pro léčbu různých karcinomů (prsů, vaječníků, Hodgkinova choroba a další) (Alexanian *et al.*, 1967). Nejužívanější z této kategorie je však cyklofosfamid, který má nejširší spektrum použití. Je užíván k léčbě hematologických malignit a tuhých tumorů (rakovina močového měchýře, mozku, prsu, děložního čípku, plic, vaječníků a varlat) (Emadi *et al.*, 2009). Ifosfamid je podobný cyklofosfamidu strukturou i využitím. Obě látky potřebují aktivaci cytochromem p450 v játrech (Torgovnick a Schumacher, 2015).

Mezi alkylové sulfonáty patří busulfan, nejdůležitější bifunkční činidlo pro léčbu chronické myelogenní leukémie (CML) (Haut *et al.*, 1961), lymfomů a myeloproliferativních poruch (Torgovnick a Schumacher, 2015).

Ethyleniminy jsou také bifunkční činidla a patří mezi ně například thiotepa a altreamin. Thiotepa se používá při rakovině prsu a močového měchýře (Maanen *et al.*, 2000), altreamin při rakovině vaječníků následovanou užitím cisplatiny (Chan *et al.*, 2004).

Triaziny a nitrosoureas jsou dvě skupiny monoalkylačních činidel. Hlavní rozdíl mezi nimi je v alkyl donorové skupině (u triazinů je to methyl a u nitrosoureas je to chloroethyl). Mezi triaziny patří dakarbazin, v játrech aktivované činidlo pro léčbu melanomů (Hersh *et al.*, 2011) a temozolomid, užívaný hlavně na mozkové tumory, jelikož je vysoce kompatibilní s nervovým systémem (Stupp *et al.*, 2005). Nitrosoureas redukují proliferaci několika rakovinných linií *in vitro* (Gnewuch a Sosnovsky, 1997) a vykazují vliv proti tuhým i netuhým tumorům. Také se dají využít proti rakovinám kůže a mozku a patří mezi ně carmustin, lomustin, nimustin a fotemustin (Torgovnick a Schumacher, 2015).

Nežádoucí vedlejší efekty alkylačních činidel jsou únava a nevolnost společně s myelosupresí a imunosupresí a srdečními dysfunkcemi. Navíc jsou tato činidla mutagenní a karcinogenní (Torgovnick a Schumacher, 2015).

2.5 Poly(ADP-ribose) polymerasy

Důležitou roli v regulaci DDR mají PARP proteiny. Interagují s chromatinem a modifikují proteiny. Kvůli tomu PARP proteiny spotřebovávají NAD^+ pro tvorbu slabě negativně nabitého polymeru poly(ADP-ribóz), které mohou být lineární i rozvětvené

s délkou 200 až 400 monomerů, kdy se nikotinamid uvolňuje jako vedlejší produkt (Lindahl *et al.*, 1995). Tento proces se nazývá PARylace, je to reverzibilní proces a patří mezi post-translační modifikace proteinů. PARylace je důležitá pro mnoho DDR faktorů, zajišťuje jejich navázání na poškozená místa DNA skrze modifikaci chromatinu. Degradaci těchto polymerů v případě potřeby provádí poly(ADP-ribóza) glykohydrolasa (PARG), která má endoglykosidickou a exoglykosidickou aktivitu a produkuje mono(ADP-ribosyl)ované proteiny a mono(ADP-ribosu) (Brochu *et al.*, 1994; Thomassin *et al.*, 1992).

Do PARP skupiny náleží několik proteinů (Amé *et al.*, 2004), ale nejdůležitější z nich je PARP1 (Zheng *et al.*, 2020). PARP1 je z nejméně expresovaný, je lokalizovaný v jádře buněk a má důležitou roli v opravných systémech BER, SSB, HR a NHEJ (Ray Chaudhuri a Nussenzweig, 2017), jelikož PARP1 interaguje s DDR proteiny a ovlivňuje jejich funkci PARylací, například P53, XPA, MRN komplex, MSH6, DNA LigIII a LigIV, RAD51, XRCC1, DNA-PKcs, Ku70, jaderný faktor κ B (NF- κ B) a mnoho dalších. PARylací těchto faktorů může PARP1 interferovat s funkcemi těchto proteinů, jako jsou regulace transkripce, DNA oprava, regulace buněčného cyklu a apoptóza. (Pleschke *et al.*, 2000).

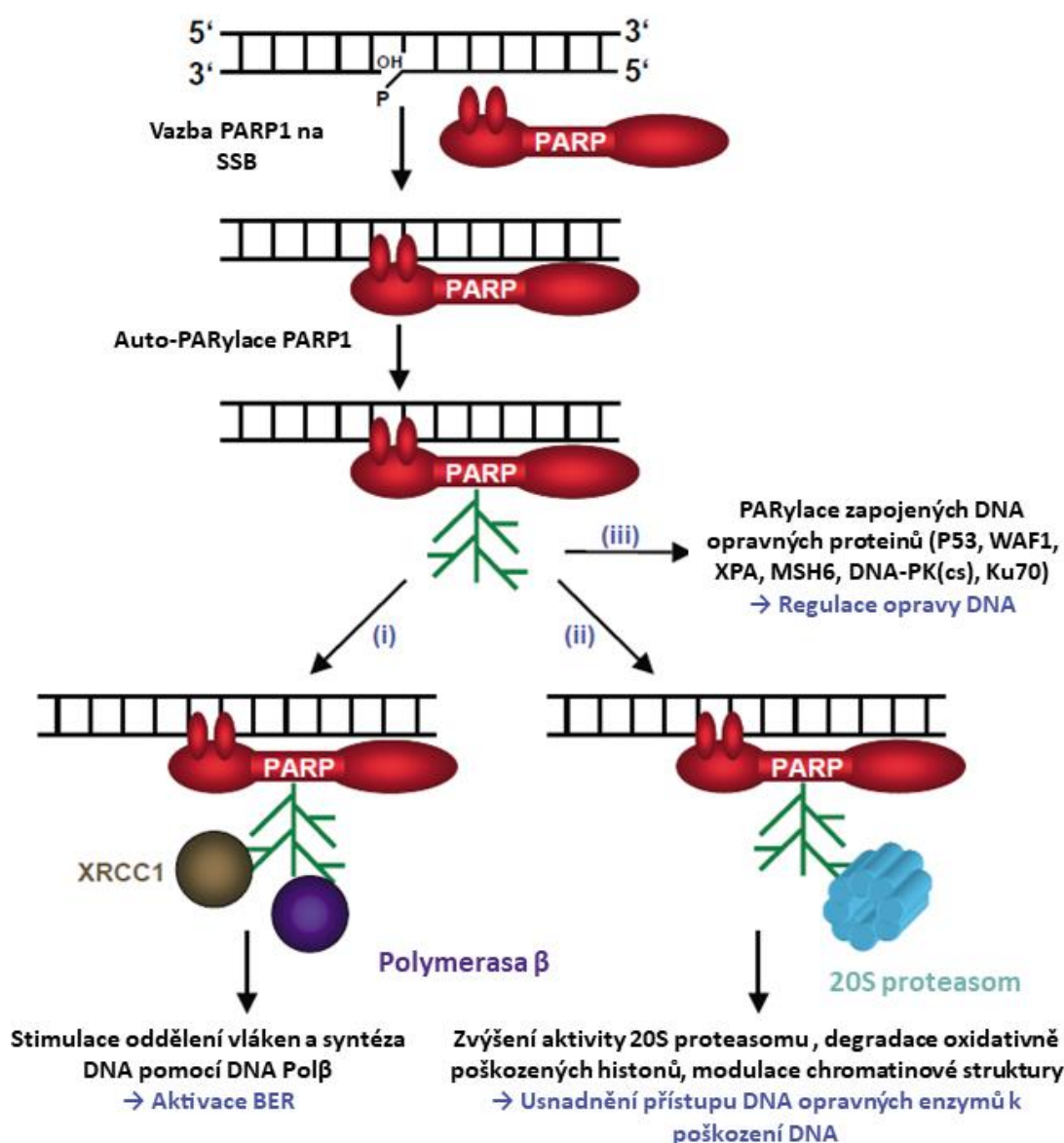
PARP1 je vysoce konzervovaný eukaryotní protein (Ray Chaudhuri a Nussenzweig, 2017), skládá se ze 3 různých domén: N-koncové DNA-vázající domény skládající se ze dvou zinkových prstů (těmi se váže na DNA poškození) (Gradwohl *et al.*, 1990; Hassa a Hottiger, 2008), C-koncové katalytické podjednotky vázající NAD^+ a vnitřní domény, kde je akceptorové místo pro poly(ADP-ribózu) (Kameshita *et al.*, 1984). Při identifikaci DNA poškození (SSB i DSB) a navázání na DNA PARP1 podlehne auto-PARylaci. Poté jsou rekrutovány a PARylovány i další opravné faktory (Zheng *et al.*, 2020).

Vliv PARP1 na DDR se skládá ze tří mechanismů (viz Obr. 5):

- Přímá interakce polymerizované PARP1 s XRCC1 (Caldecott *et al.*, 1996; Masson *et al.*, 1998) a Pol β (Dantzer *et al.*, 2000), což jsou klíčové proteiny BER systému (Schreiber *et al.*, 2002). PARP1 *in vitro* stimuluje společně s FEN1 funkci Pol β (konkrétně dlouhou variantu BER) (Lavrik *et al.*, 2001; Prasad *et al.*, 2001; Sanderson a Lindahl, 2002).
- PARP1 provádí remodelaci chromatinu při vzniku DNA poškození. Polymerizovaná PARP1 interaguje s 20S proteasomem skrze ADP-ribózové polymery. Proběhne

PARylace 20S proteasomu, což zvýší jeho proteolytickou aktivitu (Mayer-Kuckuk *et al.*, 1999), což je konkrétně degradace histonů s oxidativním poškozením. Degradace poškozených histonů vede k remodelaci chromatinu a to způsobí, že DNA opravné faktory se mohou navázat na poškozené místo (Christmann *et al.*, 2003).

- Specifická sekvence pro vazbu PARP byla nalezena ve velkém množství DDR komponentů. Jejich PARylací může PARP1 potenciálně interferovat s funkcemi těchto proteinů (Pleschke *et al.*, 2000).



Obr. 5 Role PARP v opravě DNA. Vazba PARP1 na SSB způsobí auto-PARylaci a zvýšení jeho aktivity. Aktivovaný PARP1 je zapojený v opravě DNA vícero způsoby: (i) přímou interakcí a PARylací XRCC1 a Pol β (tak stimuluje BER), (ii) PARylací a aktivací 20S proteasomu (to vede k relaxaci chromatinu) a (iii) potenciální PARylací DNA opravných komponentů (tím moduluje DNA opravu) (upraveno podle Christmann *et al.*, 2003).

PARylace využívá pro tvorbu polymerů NAD⁺. AutoPARylace PARP1 je iniciována DNA poškozením, ovšem při přílišném poškození DNA může dojít ke zužitkování velkého množství NAD⁺ a vyčerpání ATP (Carson *et al.*, 1988), což může způsobit apoptózu (Rouleau *et al.*, 2010).

Další způsob, jak PARP opravuje DNA je při výskytu ssDNA tvořené topoisomerasou, respektive z její přerušené aktivity. TOP1 zmírňuje topologický stres DNA vláken tak, že mírně narušuje jedno vlákno, obtáčí ho kolem druhého a poté ho znovu zaceluje. Pokud je však práce TOP1 přerušena, vznikají TOP1-DNA štěpné komplexy (TOP1cc). Ty se z DNA odstraňují pomocí TDP1 (Yang *et al.*, 1996; Pouliot *et al.*, 1999; Pommier, 2006). TDP1 je cíl PARP1 a PARylace ho nejen stabilizuje, ale i zvýší rekrutaci TDP1 na TOP1cc a celkově tak pomůže jeho odstranění. Nebo může být vzniklý TOP1cc cílem XRCC1, což je také podpořeno PARP1-TDP1 komplexem (Das *et al.*, 2014). Buňky s deficiencí v PARP tak mají sníženou aktivitu TDP1 (Ray Chaudhuri a Nussenzweig, 2017).

2.5.1 PARP inhibitory

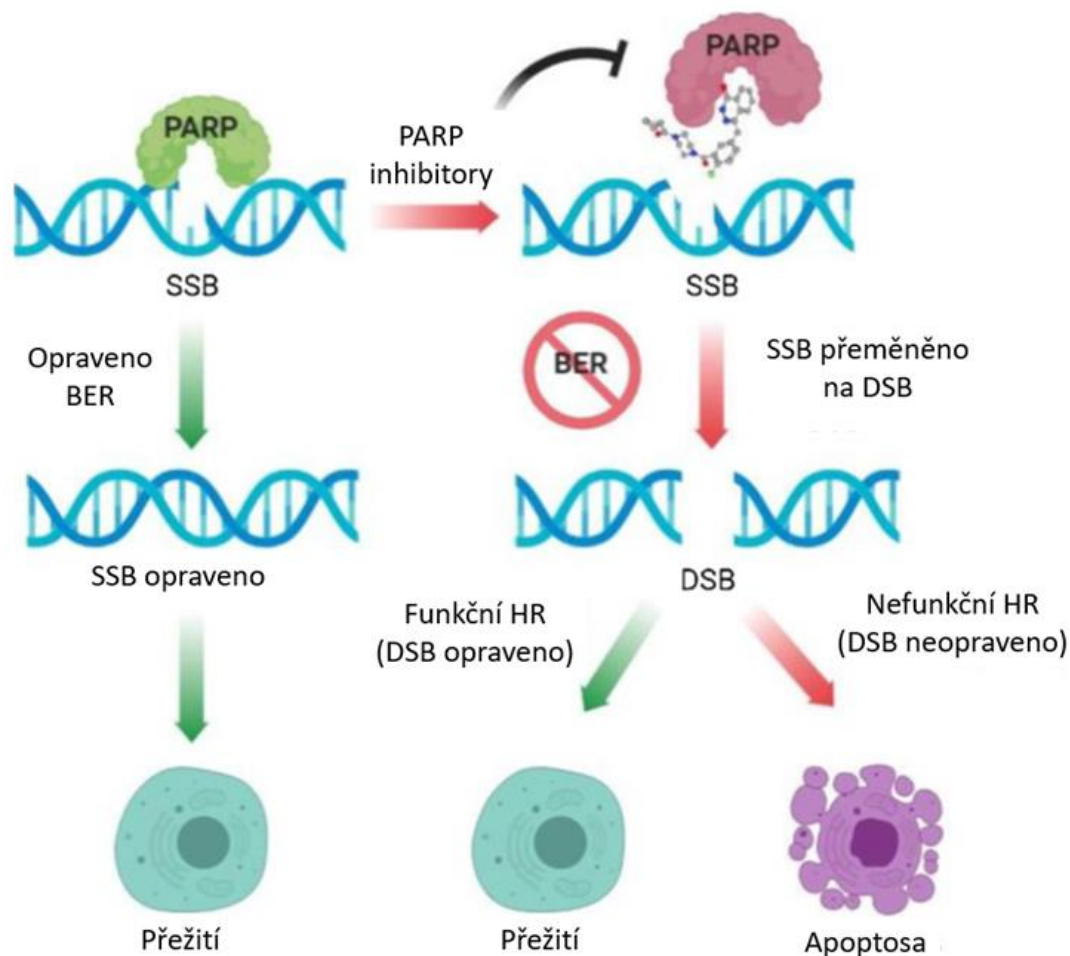
PARP inhibitory jsou chemoterapeutika používaná pro inhibici PARP proteinů v HR defektních rakovinách. Fungují na principu syntetické letality. Syntetická letalita je uměle vyvolaná letalita způsobená kombinací dvou a více mutací, které samostatně nezpůsobí buněčnou smrt, ale jejich vzájemná kombinace ano. PARP inhibitory takhle fungují v buňkách s mutací v *BRCA1* a *BRCA2* genech. BRCA1 a BRCA2 proteiny jsou tumor supresory důležité v DDR, jelikož fungují jako mediátory signálu a transkripční regulátory. Tvoří komplex s RAD51, proteinem důležitým v systému HR (Scully, 2000). BRCA1 tvoří také komplex s P53 proteinem (Ouchi *et al.*, 1998), který zastavuje buněčný cyklus kvůli opravě DNA nebo apoptóze. Mutace *BRCA* genů může způsobit několik druhů rakoviny, převážně však rakovinu prsu a vaječníků (Dziadkowiec *et al.*, 2016).

PARP inhibitory brání opravě SSB, jelikož zastaví systém BER. Dojde k akumulaci SSB a zastavení replikační vidličky. Začnou vznikat DSB, které buňka nedokáže opravit kvůli mutaci v *BRCA* genech a nefunkčnosti HR systému (viz Obr. 6) (Zheng *et al.*, 2020).

Ovšem i defekty v dalších genech HR vedou v kombinaci s PARP inhibitory k apoptóze. Například homolog fosfatasy a tensinu (*PTEN*) je hlavním tumor supresorovým genem zapojeným v expresi RAD51 proteinu, který má také důležitou

funkci v HR. PTEN deficientní buňky jsou tedy také citlivé na PARP inhibitory (Chen, 2011). Stejně tak chyby v FA systému činí buňky náchylné na syntetickou letalitu při použití PARP inhibitorů (McCabe *et al.*, 2006) (což je testováno PARP inhibitorem veliparibem; Chen, 2011). Teoreticky by měly být PARP inhibitory použitelné proti všem tumorům s nefunkčním HR či NHEJ (tzn. že nedokáží opravovat DSB). Syntetická letalita má velkou výhodu, jelikož ovlivňuje jen rakovinné buňky a tím se snižuje cytotoxicita použitých léčiv. Je tedy velmi selektivní.

FDA už schválila pro použití 3 PARP inhibitory pro léčbu rakoviny vaječnicků s BRCA mutací, jsou to olaparib, rucaparib a niraparib (Zheng *et al.*, 2020). Prvním byl olaparib. Další PARP inhibitory (veliparib, iniparib a BMN-673) jsou ve fázi klinických testů (Tangutoori *et al.*, 2015), testují se proti rakovině prsu a vaječnicků. Měly by fungovat i proti rakovině prostaty a slinivky s HR defektem (Jackson a Bartek, 2009). Testuje se jejich použití v samostatné léčbě nebo v kombinaci s jinou chemoterapií či radioterapií i proti tumorům bez mutace v *BRCA* genech (Tangutoori *et al.*, 2015). PARP inhibitory se dají použít ve dvou případech, buď pro prvotní léčbu a zmenšení tumoru nebo jako prevence po hlavní léčbě, která brání návratu tumoru (tzv. udržovací léčivo) (Zheng *et al.*, 2020).



Obr. 6 Mechanismus působení PARP inhibitorů. Při inhibici PARP1 nemůže buňka opravovat SSB (kvůli defektu v BER), které se časem přetvoří v DSB. Pokud buňka nedokáže opravovat DSB kvůli mutaci v HR systému, dojde k apoptóze, a tedy zastavení a zničení tumoru (upraveno podle Zheng *et al.*, 2020).

Přesný mechanismus inhibice PARP1 se dá rozdělit na dva podsystemy. PARP inhibitor se může navázat na aktivní místo PARP a zabránit tak jeho enzymatické aktivitě nebo se může navázat na PARP-chromatinový komplex a zachytí tak enzym v jeho nefunkčním stádiu na chromatinu. Např. olaparib se váže na aktivní místo, talazoparib zachytává komplex PARP-chromatin (O’Cearbhaill, 2018; Franzese *et al.*, 2019).

PARP inhibitory jsou srovnatelně cytotoxické jako jiné chemoterapeutické látky. Nejčastěji způsobované vedlejší účinky jsou únava, nevolnost, anémie, bolest hlavy, zvracení a bolesti břicha, zvracení a průjem (Ledermann *et al.*, 2012; Domchek *et al.*, 2016; Mirza *et al.*, 2016; Coleman *et al.*, 2017). Vzácně se objevují

myelodysplastický syndrom (MDS) a akutní myeloidní leukémie (AML), nicméně ty mohou být zaviněny předcházející platinovou léčbou (Pujade-Lauraine *et al.*, 2017).

2.5.2 Olaparib

Olaparib je orálně podávaný PARP inhibitor. Z celé skupiny PARP inhibitorů je nejlépe prozkoumaný a pochopený (Sessa, 2011).

S olaparibem proběhlo několik klinických testů a byl oficiálně schválen pro použití jako udržovací léčivo u všech žen s karcinomem vaječnicků, které předtím podstoupily léčbu platinou bez ohledu na BRCA mutaci (Zheng *et al.*, 2020). Byl také oficiálně schválen jako léčivo BRCA mutované rakoviny vaječnicků u pacientek, které prodělaly tři a více různých chemoterapií (Pujade-Lauraine *et al.*, 2017). Olaparib se také používá proti HER2-negativní metastazující rakovině prsu s mutací genů *BRCA1/2* a jako udržovací léčivo pro metastazující adenokarcinom pankreatu s mutací v genech *BRCA1/2* (Mediately, n. d.). Nadále však probíhají různé testy a experimenty v kombinaci s jinými chemoterapeutiky, hlavně s platinovými léčivy, anti-angiogenetickými inhibitory a imunoterapeutiky (Zheng *et al.*, 2020). Mimo jiné probíhají i experimenty s využitím olaparibu při léčbě rakoviny prostaty, kde ve fázi II klinických testů prokázal slibné výsledky při podávání pacientům s metastatickou kastraci-rezistentní rakovinou prostaty, která měla zvýšenou rezistenci ke standardním protirakovinným léčivům (ClinicalTrials.gov number, NCT01682772) (Mateo *et al.*, 2015).

2.5.3 Ostatní PARP inhibitory

Dalšími významnými užívanými PARP inhibitory jsou rucaparib, niraparib, talazoparib a veliparib.

Rucaparib je dost podobný olaparibu. Je schválený pro použití při preventivní terapii dospělých pacientů s rakovinou vejcovodu či vaječnicků, kteří jsou citliví na použití platinových léčiv. Musí se u nich vyskytovat delece *BRCA* genu a musí předtím podstoupit dvě chemoterapie (Coleman *et al.*, 2017).

Niraparib je třetí FDA schválený PARP inhibitor. Použití má pro stejnou skupinu pacientů jako rucaparib (Zheng *et al.*, 2020).

Talazoparib a veliparib jsou zatím ve fázi klinických testů, ovšem talazoparib byl schválen pro použití při léčbě rakoviny prsu s mutací v genech *BRCA1/2* (Litton *et al.*, 2018).

Veliparib se testuje pro použití při léčbě rakoviny plic, prsu, vaječníků a dalších tuhých tumorů v kombinaci s další chemoterapií (Loibl *et al.*, 2018; Atrafi *et al.*, 2019; Owonikoko *et al.*, 2019).

2.5.4 Rezistence k PARP inhibitorům

Při klinických testech PARP inhibitorů se ovšem také ukázalo, že buňky mohou proti PARP inhibitorům získat rezistenci. Tuto rezistenci buňky získávají několika způsoby. Základní rezistencí je zpětná sekundární mutace *BRCA* genů, kdy dojde k obnovení funkce HR systému (Sakai *et al.*, 2008).

Další možností vzniku rezistence je potlačení funkce NHEJ. NHEJ a HR normálně soutěží o DSB substráty a vzájemně se potlačují (Ceccaldi *et al.*, 2016). Při vyřazení HR systému se zvýší aktivita NHEJ a chyby v NHEJ systému vedou k rezistenci na PARP inhibitory (McCormick *et al.*, 2017). Studie ukázaly, že klíčem pro získání rezistence proti PARP inhibitorům je protein 53BP1 v *BRCA* defektních buňkách (Zheng *et al.*, 2020).

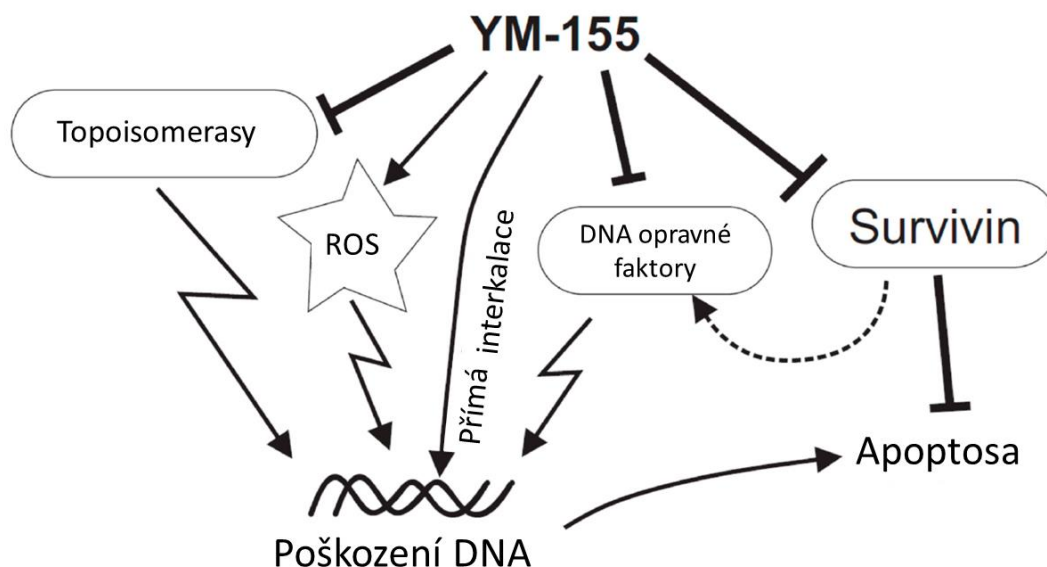
Stabilizace DNA replikační vidličky je také způsob zisku rezistence proti PARP inhibitorům. Při ztrátě genů *BRCA* nebo *FA* se replikační vidlička stává nestabilní a její další aktivita tvoří DSB, které se dají využít chemoterapeutickými léčivými. V takovém případě přežijí jen tumorové buňky se stabilizovanou replikační vidličkou (Zheng *et al.*, 2020). MRE11 nukleasa je klíčová v této rezistenci, jelikož je zodpovědná za degradaci DNA na zastavené replikační vidličce. MRE11 provádí resekci DNA na DSB a tvoří ssDNA jako substrát pro HR. Pokud je v *BRCA* mutantních buňkách exprese MRE11 potlačena je dosaženo ochrany replikační vidličky a rezistence k PARP inhibitorům (Ray Chaudhuri *et al.*, 2016).

Rezistenci buňek vůči PARP inhibitorům mají na svědomí i glykoproteinové efluxní pumpy, které snižují intracelulární koncentraci PARP inhibitoru (Montoni *et al.*, 2013).

2.6 Sepantronium bromid

Sepantronium bromid, známý spíše jako YM155 [(1-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4,9-dioxo-3-(pyrazin-2-ylmethyl)-4,9-dihydro-1H-naphtho[2,3-d]imidazolium bromid] je malá molekula patřící mezi inhibitory survivinu (Rauch *et al.*, 2014). YM155 projevil terapeutické účinky při potlačení růstu rozličných nádorů (rakovina prsu, prostaty, ne Hodgkinův lymfom a mnohé další) *in vitro* i při testech se zvířaty (Rauch *et al.*, 2014), nicméně při testech druhé fáze se ukázaly negativní výsledky (Kelly *et al.*, 2013; Clemens *et al.*, 2015; Kudchadkar *et al.*, 2015; Papadopoulos *et al.*, 2016), jelikož molekulární mechanismus jeho účinku není ještě plně a správně znám (Hong *et al.*, 2017). Na mnohé testované rakovinné buněčné linie má letální účinky již v nanomolárním množství (Cheng *et al.*, 2015). YM155 je běžně považován za inhibitor survivinu jeho účinnost ovšem úplně nekoreluje s hladinou survivinu v buňce a některé experimenty ukázaly, že místo indukce apoptózy skrze inhibici survivinu působí YM155 i cytostaticky (Arora *et al.*, 2012), způsobuje poškození DNA a inhibuje topoisomerasu.

Survivin totiž není jeho jediným cílem, zatím však není úplně jasné, zda je YM155 interkalátorem, topoisomerasovým inhibitorem, narušitelem opravných procesů, producentem ROS nebo vše zároveň (viz Obr. 7). Je však jasné, že YM155 má více molekulárních cílů a mechanismů účinku, což sice jeho výzkum dělá těžším, zároveň by se však mohl dát využít proti vícero typům rakoviny (Majera a Mistrík, 2020).



Obr. 7 Mechanismy účinku YM155. Kromě inhibice survivinu studie dokazují, že přímo ovlivňuje komponenty opravy DNA, inhibuje topoisomerasy TOP1 a TOP2 α , tvoří ROS a funguje jako interkalátor (upraveno podle Majera a Mistrík, 2020).

2.6.1 Survivin a vliv sepantronium bromidu na něj

Survivin, nebo také bakulovirální inhibitor apoptózy obsahující opakování 5 je protein kódovaný genem *BIRC5*. Survivin patří do skupiny proteinů nazývaných inhibitory apoptózy (IAP). Je z této skupiny nejmenší (jeho velikost je 16,5 kDa) (Sah *et al.*, 2006; Altieri, 2013). Hlavní funkcí IAP proteinů je potlačení apoptických kaspas (Altieri, 2010).

Exprese survivinu je ve vztahu s metastázickým šířením, invazivitou tumoru a špatnou prognózou spojenou s chemorezistencí (Church a Talbot, 2012; Altieri, 2013). Navíc je potřebný pouze při vývinu plodu, ale ve zdravé dospělé tkáni už se běžně nevyskytuje a je znovu expresován právě při vývoji tumoru, kde je důležitým faktorem pro přežití maligních buněk. takže jeho inhibice je selektivní. To z něj činí dobrý cíl při boji s rakovinou (Knauer *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2009; Altieri, 2013; Lladser *et al.*, 2011). Jeho zvýšená exprese v tumoru by mohla mít za vinu vývin rezistence vůči léčebným procedurám (Yamamoto *et al.*, 2008; Wheatley a Altieri, 2019). Při výzkumu rakoviny vaječníků byla zvýšená hladina survivinu pozorována až v 74 % případů a jeho zvýšená exprese byla ve větším množství pozorována v pokročilých stádiích nemalobuněčných tumorů plic (Kelly *et al.*, 2013). Inhibice survivinu by tedy byla dobrou strategií v boji

s chemo/radiorezistentními nádory (Majera a Mistrik, 2020). Jenže survivin nemá enzymatickou aktivitu, kterou by šlo inhibovat (Rauch *et al.*, 2014), takže jeho inhibitory se musí zaměřovat na jeho regulaci. Látky potlačující survivin způsobují kromě apoptozy i zpomalení rakovinného růstu a větší citlivost buněk k chemoterapeutickým látkám jako např. cisplatina nebo gemcitabin (Yoon *et al.*, 2012; Fragni *et al.*, 2016; Takeda *et al.*, 2016; Manouchehri a Kalafatis, 2017), použití inhibitorů survivinu má tak největší potenciál v kombinaci s dalšími látkami (Rauch *et al.*, 2014).

YM155 inhibuje survivin navázáním na jeho promotor. Na survivinový promotor jsou vázány RNA-vázající vazebný faktor 3 zesilovače interleukinu s jaderným faktorem 110 (ILF3/NF110) a jadernou RNA-vázající protein 54 kilodaltonů (P54NRB). YM155 se přímo váže na survivinový promotor a ruší komplex ILF3-P54NRB (Yamauchi *et al.*, 2012), jelikož C-koncová oblast ILF3/NF110 je důležitá pro podpoření exprese survivinu, ale i pro vysoko afinitní vazbu s YM155 (Nakamura *et al.*, 2012), skrze ni tedy může YM155 ovlivňovat expresi survivinu. Nicméně při pokusu udělat buňky rakoviny vaječníku více senzitivní vůči cisplatině užitím YM155 nebylo dosaženo požadovaných výsledků. Navíc knockout survivinu neovlivnil množství poškození DNA po použití cisplatin. Z toho vyplývá, že survivin není jediný cíl YM155 (Mir *et al.*, 2014).

YM155 může potlačovat expresi survivinu i skrze disrupci vazby specifického proteinu 1 (SP1) na survivinový promotor (Cheng *et al.*, 2012). SP1 je transkripční faktor se zinkovým prstem, který se přednostně váže na sekvenci DNA bohatou na guanin a cytosin (Rauch *et al.*, 2014) a spouští expresi promotoru survivinu. YM155 mění lokalizaci SP1, ovšem přílišná exprese SP1 může blokovat negativní efekt YM155 na survivinový promotor (Cheng *et al.*, 2012). Zablokování SP1 vede k zastavení buněčného cyklu kvůli inhibici cyklinu D1 a indukci proteinu p27 (Grinstein *et al.*, 2002). Inhibice SP1 pomocí YM155 může tedy mít antiproliferační účinky na rakovinné buňky (Rauch *et al.*, 2014).

2.6.2 Vliv sepantronium bromidu na tvorbu DNA poškození

Qin *et al.* (2014) ve své práci prokázali, že YM155 zvyšuje citlivost buněk při radioterapii, kdy v buněčných liniích Eca109 a TE13 s karcinomem dlaždicových buněk jícnu došlo ke změně buněčného cyklu. Kontrolní bod G2/M byl narušen a buňky byly vlivem radioterapie více náchylné k apoptóze, jelikož byla snížena oprava radiačního

poškození (Qin *et al.*, 2014). Stejný radiosenzitizační efekt byl pozorován i při inhibici dráhy ATR-CHK1 (Benada a Macurek, 2015), což potvrzuje, že ATR kinasa je dalším cílem YM155 (Mazzio *et al.*, 2018).

YM155 způsobuje i samotné poškození DNA, jelikož při použití YM155 byly pozorovány i aktivace komponentů DDR (ATR, ATM, CHK1, CHK2 a P53) a také větší hladina mediátorové RNA pro XRCC5. To značí, že YM155 způsobuje DSB, a to bez ohledu na hladinu survivinu (Hong *et al.*, 2014). Hlavním důkazem jeho DNA poškozujícího účinku bylo zjištění, že DNA poškození vzniká už při mnohem menších koncentracích YM155, než jaké jsou potřeba pro inhibici survivinu (Glaros *et al.*, 2012).

Několik studií ukázalo, že léčba YM155 způsobuje zvýšený výskyt poškození DNA skrze vliv na HR nebo NHEJ. Při výzkumu s radiosenzitivací nemalobuněčné rakoviny plic (NSCLC) pomocí YM155 bylo pozorováno, že po ozáření se survivin rychle akumuloval v jádře a interagoval s DNA-PKcs a Ku heterodimerem, což jsou esenciální prvky NHEJ. Systém NHEJ tedy může být taky cílem YM155 (Hu *et al.*, 2015).

Co se vlivu na HR týče, tak po použití YM155 byly v buňkách rakoviny prsu sníženy hladiny několika HR komponentů, konkrétně BLM, EXO1, BRCA1, BRCA2 a RAD51 rekombinasa, důležitý komponent HR (Véquaud *et al.*, 2016). Další ovlivnění HR systému bylo pozorováno i u buněk glioblastomu, kde byla snížena exprese RAD51 a BRCA1. Účinnost HR tak byla snížena o cca 40 % (Zhang *et al.*, 2018). Autoři tohoto experimentu také navrhli další způsob radiosenzitivujícího efektu YM155 v glioblastomových buňkách, zahrnující inhibici buněčné invaze. Jelikož je radioterapie standartní léčbou glioblastomu a radiace může paradoxně i pomoci rozvoji rakoviny, má tenhle objev velký význam. Po ozáření může dojít k migraci a invazi ozářených rakovinných buněk (Park *et al.*, 2006). Tento efekt je usnadněn díky epitelo-mezenchymálnímu přechodu (EMT) indukovaným radiační terapií (El Bezawy *et al.*, 2017). YM155 může v gliomových buňkách zvrátit EMT, nejspíš skrze inhibici STAT3 (Zhang *et al.*, 2018), což je transkripční faktor s esenciální rolí v EMT (Tong *et al.*, 2017). Pozorované EMT změny po použití YM155 byly nezávislé na survivinu (Zhang *et al.*, 2018).

Kromě vlivu na DDR má YM155 další možné vlivy na tvorbu DNA poškození. Výzkumy například odhalily, že nezáleží ani tak na hladině survivinu jako spíš na blíže necharakterizovaném nosiči rozpuštěné látky SLC35F2, který transportuje YM155

a podporuje citlivost buněk k YM155. V buňkách s jeho zvýšenou expresí je DNA více poškozená a při dalším výzkumu bylo zjištěno, že YM155 vykazuje stejné vlastnosti, jako DNA interkalátory (Winter *et al.*, 2014).

Další vliv YM155 je tvorba oxidativního poškození. Přesně na kyslíku závislé redoxně aktivované oxidativní poškození DNA. Bylo zjištěno, že YM155 způsobuje štěpy DNA a tvoří ROS v přítomnosti katalas a při hypoxických podmínkách (což znamená, že kyslík a peroxid vodíku nejsou důležité) (Wani *et al.*, 2018).

YM155 prokázal účinek také proti P53-deficientní lidské hormon-rezistentní rakovině prostaty (HRPC) (Schneider a Krämer, 2011), což je běžná příčina úmrtí mužů (Joshua *et al.*, 2008; Risbridger *et al.*, 2010). YM155 při HRPC vyvolává apoptózu a autofágii (Wang *et al.*, 2011). Také je efektivní proti dětské akutní lymfoblastické leukémii (ALL) (Rauch *et al.*, 2014).

2.6.3 Vliv na topoisomerasy

Hong *et al.* (2017) dokázali, že YM155 v H1299 buňkách napadá topoisomerasy TOP1 (snižuje torzní pnutí při replikaci a transkripci) a TOP2 α (katalyzuje rozpojování a spojování vláken duplexní DNA a umožňuje změnu topologie), jeho použití způsobilo buněčné poškození a zpoždění oprav DSB. Oprava DNA byla méně efektivní a byl snížený počet RAD51 opravných center.

Inhibitory topoisomeras (topoisomerické jedy) testované klinicky tvoří jako vedlejší efekt své práce také sekundární malignity. Nejlepší by bylo vyvinout/objevit protirakovinné léčivo napadající specificky lidskou TOP2 α (Delgado *et al.*, 2018). A právě vliv YM155, které napadá topoisomerasy a zastavuje buněčný cyklus buněk ve fázích G1/S, G2/M (Hong *et al.*, 2017), by se k tomuto účelu dal využít v kombinaci s dalšími inhibitory topoisomeras (Majera a Mistrik, 2020).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metodika

3.1.1 Buněčná kultura

Na experimenty s látkami Olaparib a YM155 v této bakalářské práci byly použity buněčné linie U2OS a Capan-1. Obě linie byly pořízeny od American Type Culture Collection (ATCC).

U2OS je buněčná linie odvozená z lidského osteosarkomu epiteliálních buněk izolovaná v roce 1964 od 15leté dívky trpící osteosarkomem kosti holenní [(ATCC products U2OS (ATCC® HTB-96™)].

Capan-1 je buněčná linie odvozená z lidského pankreatického adenokarcinomu izolovaného z jaterní metastáze 40letému muži. Má deficienci v *BRCA2* genu [(ATCC products Capan-1 (ATCC® HTB-79™)].

3.1.2 Chemikálie

4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI)

Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, 2 mg/ml, 4 °C; life technologies

Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG, 2 mg/ml, 4 °C; life technologies

Anti-53BP1 (H-300), rabbit polyclonal IgG, 4 °C, 200 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology

Anti-γH2AX (Ser139), clone, mouse monoclonal antibody, 4 °C, 1 mg/ml; EMO Milipoer Corp.

Cukr moučka (sacharosa)

Dimethylsulfoxide (DMSO), A3672-250ml; Panreac Quimica S.L.U.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), with Stable Glutamine and Sodium Pyruvate, High Glucose, sterile filtered, 500ml; Biosera

Ethanol, 70%, 4 °C

Fetální bovinní sérum (FBS) Heat Inactivated, sterile-filtered, cell culture tested, F9665-500ML; Sigma-Aldrich

Formaldehyd, 4%, 4 °C

Fosfátový pufr (PBS) 10x zásobní roztok, 1 litr (pH 7,4): NaCl 80,1 g, KCl 2 g, Na₂HPO₄ 14,4 g, KH₂PO₄ 2,7 g, HCl pro stanovení pH, deionizovaná voda; 1x pracovní roztok = rozředění zásobního roztoku 10:1

Krystalová violet' (methylová violet' 2B, C₂₄H₂₈N₃Cl)

Lak: LEMAC COLOUR nail enamel, bezbarvý

Médium pro ředění protilátek (ABD médium; 10% FBS, 0,02% azid v DMEM)

Olaparib, zásobní roztok = 10 mmol·l⁻¹, Selleckchem

Penicilin/Streptomycin (100ml), P11-010 PAA; The Cell Culture Company

Sepantronium bromid (YM155); zásobní roztok = 10 mmol·l⁻¹, Selleckchem

Triton X-100 (Tx-100; 0,2% v PBS)

Trypsin (1x), TrypLEtm Express 12605-028; Gibco

VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI - LS-J1033

Voda deionizovaná (pomocí přístroje Aqua osmotic)

XTT [2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid], v koncentraci 0,9 mg/ml v RPMI médiu; Trevigen's TACSTM XTT kit

XTT aktivátor (elektron-vázající reagent fenazin methosulfát), zásobní roztok 50x v dH₂O; Trevigen's TACSTM XTT kit

3.1.3 Přístrojové vybavení

Box skříňový mrazící (-86 °C); New Brunswick Scientific Innova U725

Centrifuga LabogeneScanspeed 1236R

Inkubátor Heracell 150i s atmosférou CO₂

Invertovaný fluorescenční mikroskop BX71 (Olympus)

Laminární box (Flowbox) Herasafe KS

Mikroskop Zeiss Primo Vert

Pipeta multi-kanálová

Sada pipet

Spektrofotometr Tecan (program I-Control), Švýcarsko

Stolní skener

Třepačka VORTEX 3, IKA

Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer, Beckman Coulter

Vodní lázeň Memmert

3.1.4 Materiál

1,5 ml mikrozkušavky; Eppendorf

2 ml mikrozkušavky; Eppendorf

Centrifugační zkumavky 15 ml; GenFollower

Kultivační láhev 75 cm, s filtrem; Techno Plastic Products

Kultivační destičky, 96 jamkové

Kultivační destičky, 6 jamkové

Petriho misky

Plastové inserty

Sada špiček na pipety

3.1.5 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie byly kultivovány v 75 ml kultivačních lahvích, ty byly umístěny v inkubátoru při 37 °C a 5% koncentraci CO₂. Při kultivaci bylo použito médium DMEM s přidanými látkami (ve finální koncentraci: FBS 10%, Penicilin/Streptomycin 1%).

Experimenty s buněčnými liniemi proběhly ve sterilních podmínkách v laminárním boxu.

3.1.6 Pasážování a počítání buněk

Z kultivační lahve s buněčnou kulturou bylo odsáto staré médium a láhev byla promyta 10 ml pracovního roztoku PBS. PBS bylo také odsáto a do láhve byl přidán 1 ml trypsinu. Buňky byly trypsinovány v inkubátoru při 37 °C přibližně 10 minut, průběh byl kontrolován na světelném mikroskopu.

Po skončení trypsinizace bylo k buňkám přidáno 9 ml DMEM média a potom mohly být buňky použity k počítání či další kultivaci (provedené použitím 1 ml suspenze buněk s médiem a dalšími 9 ml DMEM). Pasážování se provádělo při dosažení dostatečné konfluence buněčné kultury dvakrát týdně.

Počítání buněk bylo prováděno na přístroji Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer, Beckman Coulter, kdy do speciální zkumavky určené pro tento přístroj bylo napipetováno 500 µl buněčné suspenze a přístroj následně spočítal živé buňky, z jejichž počtu vycházely další experimenty.

3.1.7 Rozmrazování a zamrazování buněk

Při zamrazování buněk byla buněčná kultura nejprve zcentrifugována (200 RCF, 5 minut), retentát byl odsát a pelet byl rozsuspendován v roztoku mrazícího média (roztok FBS a DMSO 9:1). Směs byla po jednom mililitru odpipetována do kryozkumavek a ty byly uskladněny v mrazáku (-80 °C).

Při rozmražení byly kryozkumavky rozmrazeny ve vodní lázni a jejich obsah byl potom smíchán s 9 ml DMEM média a centrifugován (200 RCF, 5 minut), médium bylo následně odsáto a pelet rozmíchán v 1 ml DMEM, nakonec byly buňky přepipetovány do 75 ml kultivační lahve, do které bylo přidáno 9 ml DMEM. Před další prací byly buňky umístěny v inkubátoru (37 °C, 5% koncentrace CO₂).

3.2 Určení vlivu zkoumaných látek na viabilitu buněk

Při zjišťování vlivu testovaných látek (tedy olaparibu a YM155) na životnost a dělení buněčných kultur byly použity cytotoxické analýzy pomocí testu tvorby kolonií a tetrazoliové soli 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid (zkráceně XTT) a dále byla provedena imunofluorescencenční analýza.

Olaparib i YM155 byly rozpuštěny v DMSO a naředěny v médiu na požadované koncentrace a přidány k buněčné suspenzi. Pro kontrolu vlivu rozpouštědla bylo použito DMSO naředěné pomocí DMEM média stejně, jako ve vzorcích s látkami.

3.2.1 Test tvorby kolonií

Test tvorby kolonií (neboli Colony Formation Assay – CFA, první z provedených cytotoxických analýz) byl proveden tak, že do 6 jamkové kultivační destičky bylo do jamek vysazeno 100, 200, 300, 400, 500 a 1000 buněk (obě kultury) v suspenzi s médiem (v každé jamce 2 ml). Při první části experimentu nebyly přidávány žádné ze studovaných látek, byla sledována pouze schopnost buněk tvořit kolonie a rychlost tvorby kolonií při určitém počtu buněk, nejlepší množství bylo vybráno pro samotné experimenty s léčivý, kde ve všech 6 jamkách bylo stejné množství buněk a byly k nim přidány i studované látky olaparib a YM155. Jedna jamka byla vždy kontrolní, do ní bylo přidáno pouze DMSO.

Po 10 dnech byly kolonie obarveny. Nejprve bylo odsáto médium, potom byly všechny jamky promyty ethanolem (70%, 4 °C, 15 min). Po odsání ethanolu byla přidána krystalová violet (15 min). Po jejím odsátí byly destičky pořádně vysušeny (na vzduchu), naplněny cukrem (obyčejná kuchyňská sacharóza) a nakonec byly destičky naskenovány na stolním skeneru.

3.2.2 XTT

Při cytotoxické analýze XTT byly buněčné suspenze vysazeny na 96 jamkové kultivační destičky (100 µl do každé jamky). V okrajových jamkách bylo pouze DMEM médium (kvůli možnému odpařování suspenze z okraje). Při experimentu bylo používáno 4000 buněk na jamku pro U2OS a 7500 buněk na jamku pro Capan-1.

K suspenzím byly přidávány rozpuštěný a naředěný olaparib a YM155 ve čtyřech požadovaných koncentracích (pro olaparib to byly koncentrace $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro YM155 $0,625 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1,25 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $2,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Každá koncentrace byla použita v tripletu v množství $20 \mu\text{l}$ na jamku, v první řadě buněčné suspenze byl mock, tzn. žádná ze studovaných látek, pouze DMSO pro negativní kontrolu. K suspenzi byly látky přidány samostatně i v kombinaci.

Po kultivaci v inkubátoru (přibližně 48 hodin) byly buněčné kultury na destičkách zkontrolovány mikroskopicky a pak bylo provedeno samotné XTT.

XTT se používá pro spektroskopické měření viability buněk. Je to relativně rychlá a citlivá metoda, ve které je žlutá tetrazoliová sůl přeměněna pomocí sukcinátetrazoliumreduktasy (ta je lokalizována v mitochondriích metabolicky aktivních buněk) na oranžový formazan. Formazan je detekován spektrometricky při 450-490 nm (Roehm *et al.*, 1991).

XTT reagent byl smíšen s aktivátorem fenozin methosulfátem (na 5 ml reagentu $100 \mu\text{l}$ aktivátoru) a $50 \mu\text{l}$ bylo přidáno do jamek s buňkami a studovanými látkami. Poté byly destičky inkubovány přibližně 60-80 min. Když XTT změnilo barvu (tvorba formazanu) na spektrofotometru Tecan (program I-Control) byla změřena absorbance buněk a kontrolních jamek při hodnotách 630 nm a 475 nm. Vlnová délka 630 nm byla použita pro eliminaci rušivé absorbance pozadí (otisky prstů, destička samotná atd.). 475 nm je absorbance formazanu.

3.2.3 Imunofluorecence

Pro imunofluorescenční analýzu cytotoxicity byly buňky vysazeny na plastové inserty. Do Petriho misek byly vysazeny buňky linie Capan-1 (byly pužity 2 miliony buněk v suspenzi s 12 ml média). Do této Petriho misky byly umístěny inserty (předtím byly povrchově sterilizovány UV zářením). Proběhla kultivace v inkubátoru (cca 24 hodin).

Po nárůstu kultury na sklíčkách byly sklíčka přemístěny do 12 jamkové kultivační destičky. Do každé jamky byl přidán 1 ml inkubované suspenze a také studované látky v požadovaných koncentracích (v množství $1 \mu\text{l}$, jedna jamka jako kontrola, tedy pouze s DMSO).

Po další kultivaci v inkubátoru (cca 48 hodin) bylo z jamek odsáto médium a byly třikrát promyty PBS (1x). Buňky byly posléze zafixovány formaldehydem (4%, 4 °C, 15 min) a poté znovu promyty PBS (dvakrát). Následně byly buňky permeabilizovány pomocí Tx-100 (0,2% v PBS, 5 min) a znovu promyty v PBS (třikrát).

Po těchto krocích byly sklíčka pomocí pinzety vyjmuty z destičky a umístěny do misky pokryté parafilmem. Na stranu porostlou buňkami bylo přidáno 100 µl roztoku protilátek anti-53BP1 (polyklonální z králíka) a anti- γ H2AX (monoklonální z myši) v ABD (1:500). Po hodině barvení byly sklíčka umyta PBS (třikrát) a bylo na ně dáno 100 µl roztoku sekundárních protilátek Alexa 488 anti-mouse (z kozy) a Alexa 568 anti-rabbit (z kozy) v ABD (1:500). Znovu se nechaly hodinu reagovat, po hodině byla sklíčka promyta PBS (třikrát) a obarvena DAPI (roztok s deionizovanou vodou 1:10 000, 2 min). Sklíčka byla naposledy promyta PBS (třikrát) a deionizovanou vodou. Nechala se uschnout a po důkladném osušení byly ze sklíček vyrobeny preparáty pro mikroskop.

Na podložní sklíčko bylo položeno sklíčko s fluorescenčně obarvenou buněčnou kulturou, na kulturu byly kapnuty 4 µl Vectashield mounting média s DAPI a bylo překryto krycím sklíčkem. Sklíčko s kulturou bylo k podložnímu sklíčku přiděleno bezbarvým lakem. Takto připravené preparáty byly automaticky nasnímány invertovaným fluorescenčním mikroskopem BX71 (Olympus) s pomocí softwaru ScanR Acquisition (Olympus).

3.2.4 Zpracování výsledků

U CFA byly výsledné kolonie naskenovány na stolním skeneru (cukr byl v jamkách pro lepší kontrast) a poté byl počet a velikost kolonií spočítán programem Rutinka. Vyhodnocení těchto výsledků bylo provedeno v programu MS Office Excel, grafické zpracování v MS Office PowerPoint.

U XTT byla odečtena absorbance pozadí a průměr z absorbance média. Pro životnost buněk při různých koncentracích studovaných látek byla vypočtena lineární regrese, aritmetický průměr i směrodatná odchylka, to vše i grafické zpracování výsledků bylo provedeno v programu MS Office Excel.

4 VÝSLEDKY

4.1 Tvorba kolonií

Po provedení prvních experimentů bylo jako ideální množství buněk pro další postup určeno 300 buněk U2OS na jamku a 1000 buněk Capan-1 na jamku. Z těchto množství po 10 dnech inkubace narostly dostatečně velké buněčné kolonie vhodné pro další analýzu (pro CFA by měla buněčná kolonie sestávat minimálně z 50 buněk; Franken *et al.*, 2006), a tedy i pro další postup. Buněk U2OS muselo být méně, jelikož jejich rychlost proliferace, a tedy i rychlost zdvojení populace byla rychlejší než u linie Capan-1, zdvojení populace U2OS totiž trvá zhruba 29 hodin (Sigma Aldrich products U2OS Cells GFP-NUP98) a u Capan-1 přibližně 41 hodin (McIntyre a Kim, 1984).

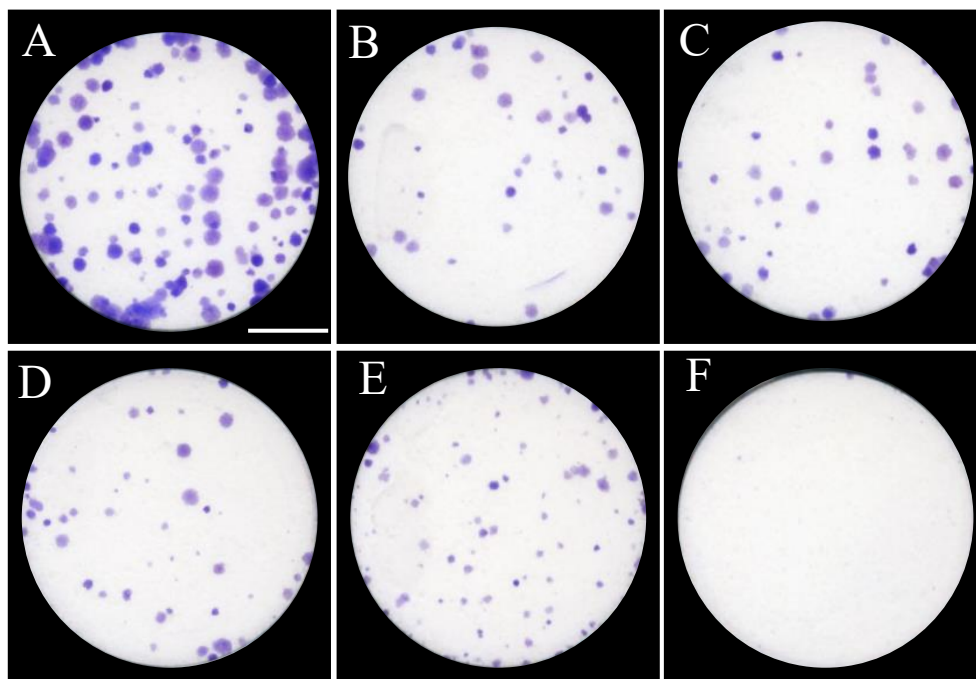
Na obrázcích 8 a 9 lze vidět, že kolonie U2OS jsou sice v menším počtu, ale o dost větší, v porovnání s koloniemi Capan-1, kterých je sice mnoho, ale jsou nepatrné.

Jak lze vidět na Obrázcích 8 a 9, látky olaparib i YM155 způsobují pokles v počtu buněčných kolonií linie U2OS i Capan-1 v porovnání s kontrolními jamkami s přídavkem DMSO (Obr. 8A a 9A). Obzvláště přídavek olaparibu vedl k signifikantnímu poklesu počtu kolonií v obou koncentracích (250 i 500 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, bez výrazného viditelného rozdílu), přičemž jeho vliv na Capan-1 se zdá větší. Vliv YM155 se výrazněji projevil až při nejvyšší použité koncentraci (4 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$), kdy ovšem u linie U2OS způsobil větší pokles počtu kolonií, než 500 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ olaparibu, což značí, že i v tak malém množství měl větší efekt na proliferaci buněk U2OS. Na Capan-1 měl větší vliv olaparib.

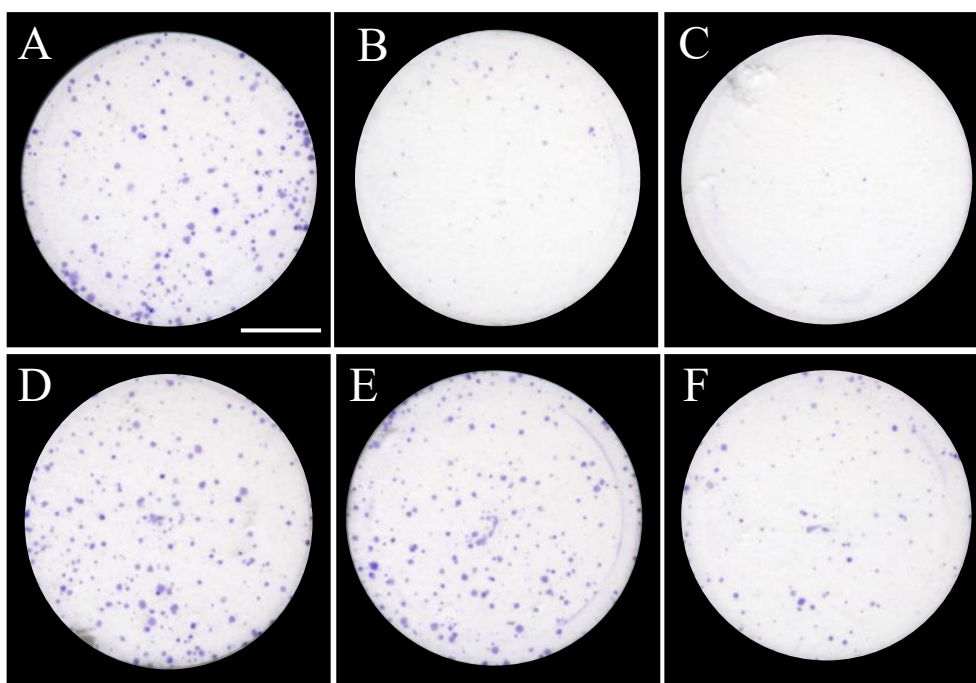
Procentuální analýza druhé nezávislé analýzy CFA je uvedena pouze pro YM155 (Obr. 10), jelikož při analýze olaparibu pravděpodobně nebyl správně nastavený kvantifikační program Rutinka a navzdory logickému očekávání, že PARP inhibitor olaparib bude více inhibovat linii Capan-1 (která obsahuje deficienci *BRCA2* genu), výsledky ukázaly pravý opak, tedy významný pokles buněčných kolonií U2OS, zatímco Capan-1 byl inhibován jen nepatrně).

Na obrázku 10 je křivka poklesu kolonií pod vlivem YM155, kde nejnižší koncentrace (1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ YM155) měla větší vliv na linii Capan-1, ovšem vyšší koncentrace efektivněji snížily počet kolonií U2OS, kde však mezi vlivem koncentrací 2 a 4 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ YM155 nebyl výrazný rozdíl, zato u linie Capan-1 byl zaznamenán téměř plynulý pokles. Celkově

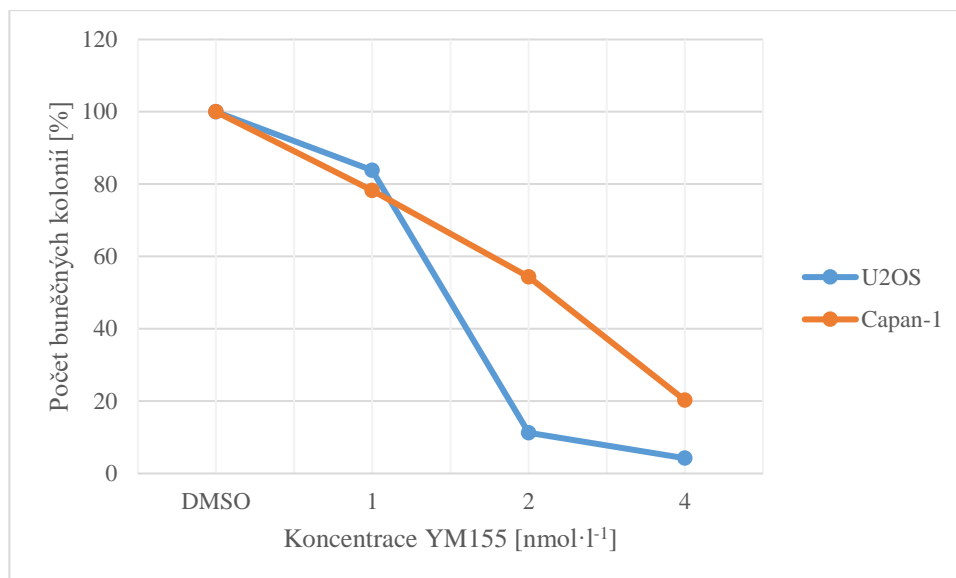
však měla nejvyšší koncentrace YM155 (tedy $4 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) větší efekt na linii U2OS (pokles o zhruba 96 %, kdežto u Capan-1 byl pokles jen o zhruba 80 %).



Obr. 8 CFA - U2OS, 300 buněk na jamku, A = DMSO, B = Olaparib $250 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, C = Olaparib $500 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, D = YM155 $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, E = YM155 $2 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, F = YM155 $4 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Stolní skener. Měřítka = 1 cm.



Obr. 9 CFA - Capan-1, 1000 buněk na jamku, A = DMSO, B = Olaparib $250 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, C = Olaparib $500 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, D = YM155 $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, E = YM155 $2 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, F = YM155 $4 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Stolní skener. Měřítka = 1 cm.

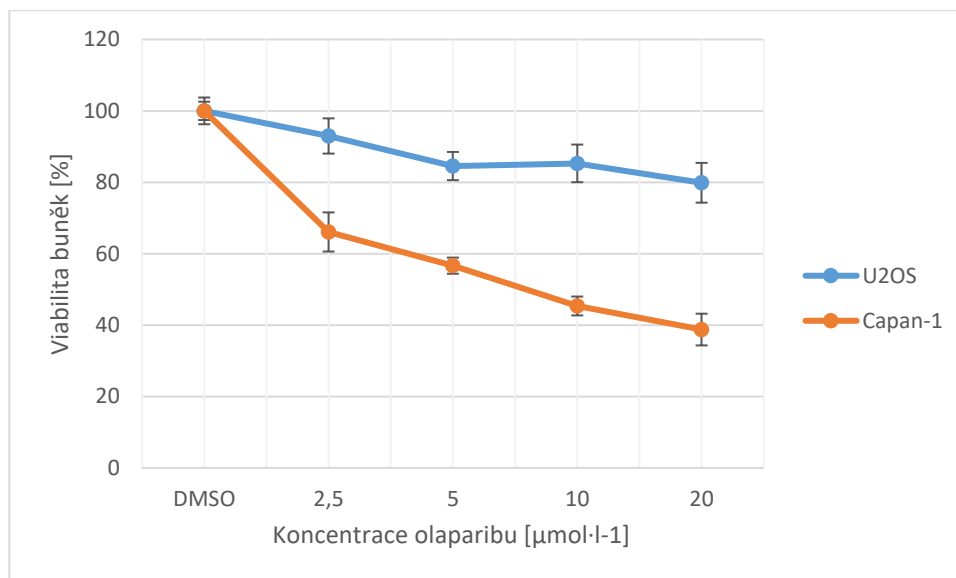


Obr. 10 Vliv YM155 na tvorbu buněčných kolonií.

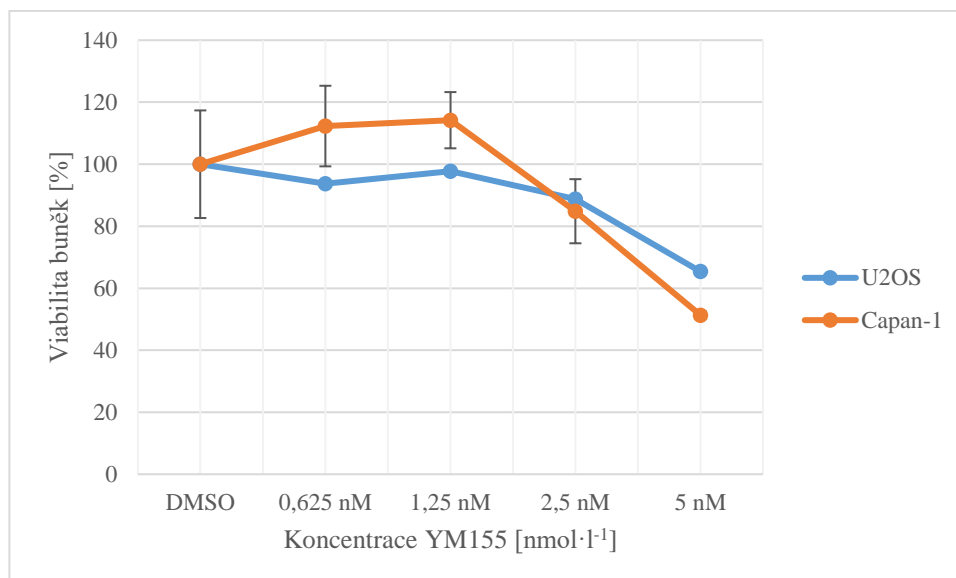
4.2 XTT

Při cytotoxické analýze pomocí XTT měl olaparib větší vliv na vibilitu linie Capan-1, kde byl pozorován výraznější pokles vitálních buněk ve všech 4 koncentracích (viz Obr. 11). Nejvyšší koncentrace olaparibu, tj. 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ snížila počet vitálních buněk U2OS o přibližně 20 %, kdežto u linie Capan-1 došlo ke snížení o zhruba 60 %.

YM155 (viz Obr. 12) nemělo v nejnižších koncentracích (0,625 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 1,25 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) výrazný vliv a u linie Capan-1 byl při těchto koncentracích zaznamenán nárůst počtu buněk. Vyšší koncentrace YM155 však způsobily rychlý pokles počtu vitálních buněk, přičemž výraznější pokles byl znovu zaznamenán u linie Capan-1, rozdíl mezi oběma liniemi ovšem nebyl tak výrazný, jako u olaparibu. Ovšem pouhých 5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ YM155 způsobilo u linie Capan-1 přibližně stejný pokles, jako 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ olaparibu.



Obr. 11 Vliv olaparibu na viabilitu buněk.



Obr. 12 Vliv YM155 na viabilitu buněk.

4.3 Imunofluorescence

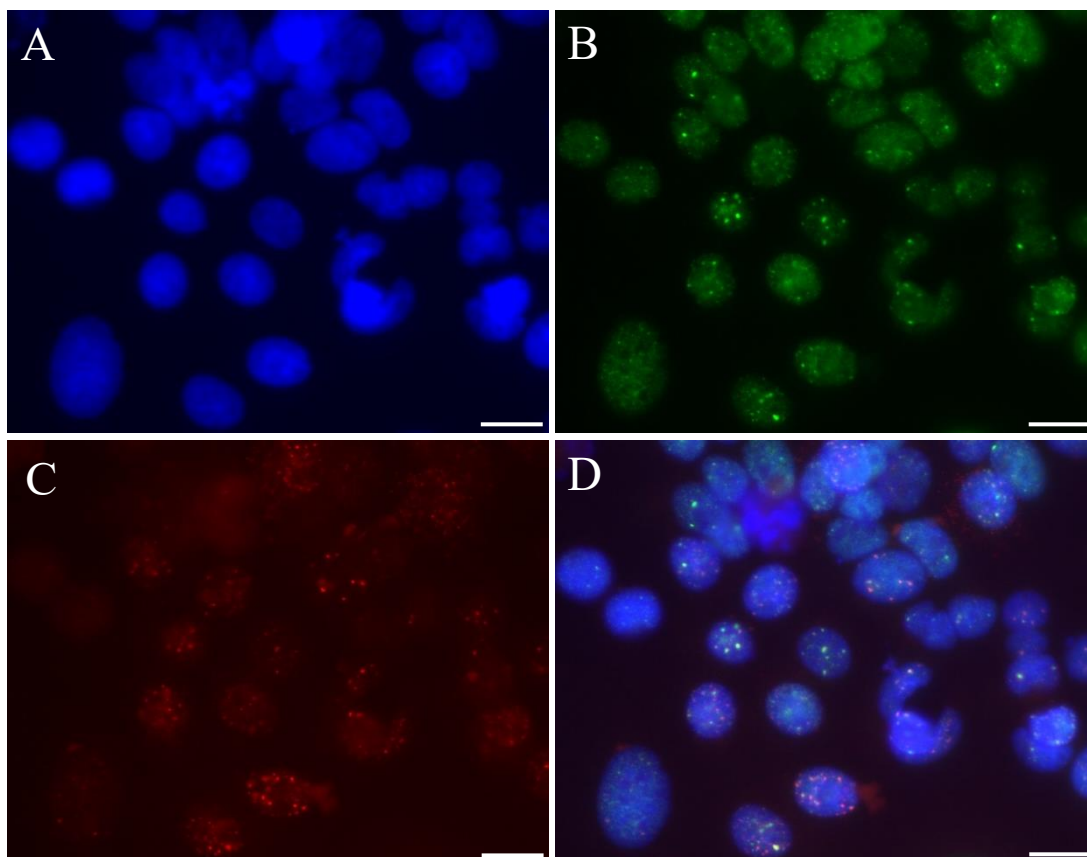
Imunofluorescenční analýza proběhla pouze s linií Capan-1, kdy bylo při prvních experimentech zjištěno adekvátní množství vysazených buněk. Jako ideální množství se ukázaly 2 miliony buněk, kdy byl buněk dostatek pro pozorování na fluorescenčním mikroskopu a zaznamenání poklesu v jejich počtu i zvýšené tvorbě míst s poškozenou DNA. Kvantifikace ani další opakování však z časových důvodů provedeny nebyly.

Při imunofluorescenci byly sledovány ohniska s DNA poškozením, které byly značeny pomocí primárních a sekundárních protilátek. Primární protilátky anti-53BP1

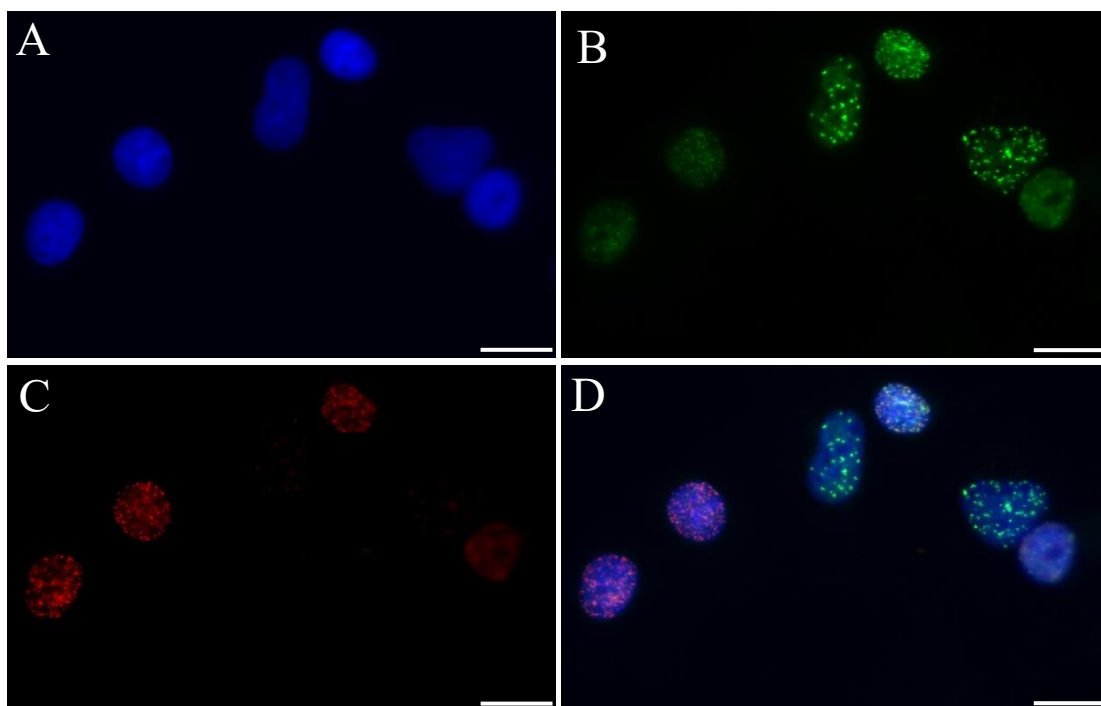
a anti- γ H2AX se totiž navazují na proteiny 53BP1 a γ H2AX, což jsou jedny z nejužívanějších markerů DNA poškození. Fosforylovaný histon H2AX, tedy γ H2AX, má důležitou roli při signalizaci vzniku DSB, jelikož po vzniku DSB dochází k fosforylaci histonu H2AX navázaného v okolí DSB na variantu γ H2AX pomocí PIKK proteinů (Valdiglesias *et al.*, 2013). Mezi PIKK proteiny spadají komplexy ATM a ATR, což jsou nejdůležitější signalizační komponenty DDR.

Fosforylovaná forma γ H2AX se používá jako marker DSB, jelikož tvoří ohniska v jádrech buněk, která se dají cytologicky vizualizovat fluorescenční mikroskopií (Rogakou *et al.*, 1998), přičemž každé jedno ohnisko γ H2AX by mělo odpovídat DSB (Valdiglesias *et al.*, 2013). Druhý použitý marker 53BP1 funguje na stejném principu, jelikož se váže na domény DSB.

Na obrázku 13 vidíme snímek buněk Capan-1 inkubovaných s DMSO (0,1%) a na obrázku 14 s olaparibem ($10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Snímky A zachycují kanál pro DAPI, kterým byly obarveny jádra buněk. Na snímcích B je kanál FITC, na kterém jdou vidět ohniska protilátky Alexa Fluor 488 navázané na primární protilátce anti- γ H2AX a na snímcích C jsou viditelné ohniska detekované protilátkou Alexa Fluor 568 navázané na protilátce anti-53BP1 zachycené na kanálu TxRED. Na snímcích D je zachycen překryv všech tří kanálů. Kvantifikace ohnisek sice nebyla provedena, ale i tak jde na obrázcích 13B a 14B vidět, že olaparib způsobil v buňkách linie Capan-1 více DSB, než kontrolní DMSO.



Obr. 13 Imunofluorescenční analýza – Capan-1, DMSO (0,1 %), kanály: A = DAPI, B = FITC, C = TxRED, D = překryv. Mikroskop Olympus BX71. Měřítko = 10 μm .



Obr. 14 Imunofluorescenční analýza – Capan-1 + olaparib $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, kanály: A = DAPI, B = FITC, C = TxRED, D = překryv. Mikroskop Olympus BX71. Měřítko = 10 μm .

5 DISKUZE

Bakalářská práce je zaměřena především na poškození DNA a látky, které jej cíleně způsobují. Takovéto genotoxické látky nacházejí uplatnění v medicíně, konkrétně onkologii, kde je využíváno skutečnosti, že většina rakovinných buněk má poškozený nějaký opravný systém DNA a použitím genotoxické látky dojde k poškození dalšího systému pro opravu DNA, čímž může dojít k syntetické letalitě specificky zaměřené proti rakovinným buňkám. Studium genotoxických látek je tedy důležité pro vývoj a optimalizaci léčiv používaných proti rakovině, která navzdory nepřetržitému pokroku v medicíně zůstává jednou z hlavních příčin úmrtí ve světě (skoro 10 milionů úmrtí za rok 2020; Ferlay *et al.*, 2020).

Cílem praktické části bakalářské práce bylo provést experimenty pro ověření a srovnání cytotoxické aktivity genotoxických látek olaparib a YM155 vůči rakovinným buněčným liniím U2OS a Capan-1. Původně měly být všechny experimenty provedeny ve třech opakováních, ze kterých by byl vypočten průměr, ovšem kvůli nedostatku času z důvodu pandemie zaviněné COVID-19 nebylo možno experimenty provést v původním plánu. Zároveň byly ze stejných důvodů zcela vypuštěny experimenty zkoumající vliv kombinace obou látek zároveň. V onkologickém výzkumu se často kombinuje použití více látek za účelem nalezení synergie a kombinace olaparibu a YM155 by mohla přinést zajímavé výsledky. Z důvodu nedostatku času však byla praktická část zaměřena pouze na optimalizaci experimentů s jednotlivými látkami použitými samostatně.

Právě kvůli vzájemnému působení byly látky pro práci původně vybrány, jelikož účinek PARP inhibitoru olaparibu je sice dobře známý a látka se již využívá v medicíně i nadále s ním však probíhají experimenty v kombinaci s dalšími genotoxickými látkami v rámci hledání synergického efektu (například platinová léčiva; Zheng *et al.*, 2020). Naproti tomu vliv YM155 se v medicíně zatím nepoužívá, jelikož jeho přesné účinky jsou stále předmětem výzkumu, vykazuje však mnohé slibné vlastnosti, jako silný antiproliferační efekt na mnohé testované rakovinné linie (Cheng *et al.*, 2015), schopnost radiosenzitizace buněk (Qin *et al.*, 2014) nebo inhibice TOP1 a TOP2 α a tím pádem tvorba DSB (Hong *et al.* 2017). Právě kombinace olaparibu a YM155 by mohla přinést zajímavé výsledky, kterých však navzdory původnímu plánu nebylo v této práci dosaženo.

V této práci byly použity dvě rakovinné buněčné linie, U2OS a Capan-1. Teoreticky by měla na vliv olaparibu více reagovat linie Capan-1, jelikož obsahuje deficienci v *BRCA2* genu, kterou PARP inhibitor olaparib využívá a způsobuje díky ní v buňkách syntetickou letalitu. Tento teoretický předpoklad byl při experimentech potvrzen, jelikož při první analýze CFA a při XTT byla linie Capan-1 skutečně olaparibem inhibována více než linie U2OS, která nemá deficienci v *BRCA* genech. Linie Capan-1 však byla citlivější i v případě YM155, ten ovšem inhiboval obě linie relativně podobně. Pouze u druhé provedené CFA analýzy se jako citlivější vůči oběma látkám (olaparib i YM155) ukázala linie U2OS. To však bylo nejspíš zaviněno špatně optimalizovaným experimentem, konkrétně přílišným nárůstem jednotlivých kolonií a špatně nastaveným kvantifikačním programem Rutinka (příliš velké kolonie srostly k sobě a kvantifikační program je vyhodnotil jako jednu kolonii, čímž chybně snížil počet kolonií).

Provedené cytotoxické analýzy pomocí CFA a XTT se liší hlavně v délce působení látek na buňky. Zatímco XTT analýza zobrazuje krátkodobý vliv látek (experiment probíhal přibližně 48 hodin), CFA trvala déle (10 dní) a vliv látek je tak možné studovat ve větším časovém rozmezí, což může přinést odlišné výsledky než XTT.

Z výsledků provedených analýz je zřejmé, že v porovnání s kontrolními vzorky kultivovanými s DMSO vykazují olaparib i YM155 cytotoxickou aktivitu, přičemž YM155 je vysoce cytotoxický již v nanomolárním množství (alespoň *in vitro* podmínkách), minimální množství však je $2 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, při nižších koncentracích nebyla buněčná proliferace výrazně narušena (při analýze pomocí XTT buňky dokonce přerostly kontrolních 100 % buněk kultivovaných s DMSO). Genotoxický účinek olaparibu sice není tak silný jako u YM155, ale na rozdíl od YM155 vykazuje signifikantnější rozdíly ve vlivu na použité rakovinné buněčné linie, kdy mnohem efektivněji inhibuje proliferaci linie Capan-1. Při srovnání vlivu obou léčiv při cytotoxické analýze pomocí XTT výsledky ukazují, že $5 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ YM155 způsobilo u linie Capan-1 přibližně stejný pokles, jako $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ olaparibu, tudíž minimálně při tomhle experimentu mělo YM155 přibližně 2000krát silnější cytotoxický účinek než olaparib.

Silná letalita YM155 vůči rakovinným buňkám je sice slibnou vlastností, ovšem klinické použití YM155 nebude možné, dokud nebude přesně určeno, jak YM155 v buňkách působí. Různé vědecké skupiny zatím zjistily, že YM155 není specificky inhibitor survivinu, jak se dříve myslelo, ale má více molekulárních cílů, jako je inhibice

topoisomeras (Hong *et al.*, 2017), tvorba oxidativního poškození skrze tvorbu ROS (Wani *et al.*, 2018) a přímá indukce poškození DNA (Glaros *et al.*, 2012). Může však mít i další dosud neobjevené molekulární cíle. Hong *et al.* (2017) sice objevili, že jedním z cílů YM155 jsou topoisomerasy, ovšem jak přesně je YM155 inhibuje už nezjistili. Právě určení přesného mechanismu působení YM155 je překážkou pro jeho klinické použití, přitom by však správně použitý YM155 mohl být velice slibným lékem proti několika typům rakoviny (díky inhibici topoisomeras například proti rakovině prsu, prostaty nebo plic; Ali a Abd Hamid, 2016) i v kombinaci s dalšími léčivy, jelikož jiné studie už odhalily, že YM155 zvyšuje vliv cisplatiny (Iwasa *et al.*, 2010) či radioterapie (Akamatsu *et al.*, 2008).

V porovnání s YM155 olaparib sice nemá tak silné genotoxické účinky, ale jeho mechanismus účinku byl již dostatečně prozkoumán a látka se již oficiálně užívá v léčbě několika druhů rakoviny. Konkrétně se používá při udržovací léčbě karcinomu vaječníku s mutací v genech *BRCA1* či *BRCA2* po prodělání chemoterapie či léčby platinou (Pujade-Lauraine *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2020), při léčbě HER2-negativní metastatické rakoviny prsu s mutací v genech *BRCA*, rakoviny vejcovodu a také při léčbě adenokarcinomu pankreatu (Mediately, n. d.) a kastročně rezistentního karcinomu prostaty (ClinicalTrials.gov number, NCT01682772) (Mateo *et al.*, 2015).

6 ZÁVĚR

Teoretickou část bakalářské práce tvoří literární rešerši, která se snaží shrnout dosavadní poznatky ohledně poškození DNA, jeho jednotlivých druhů a vzniku a hlavně, jak buňky reagují na DNA poškození. Dále jsou popsány způsoby opravy DNA a využití jejich poškození při léčbě rakoviny, kdy se využívá poškození DNA opravných systémů v rakovinných buňkách ve prospěch genotoxických látek, jako jsou cisplatina a další. Hlavní pozornost je věnována PARP inhibitorům, konkrétně olaparibu, který již byl oficiálně schválen jako lék proti rakovině prsu a vaječníku v buňkách s *BRCA* mutací i bez ní. Druhou látkou, na kterou se bakalářská práce zaměřuje, je YM155, který byl původně pokládán za inhibitor survivinu a dostal se až do druhé fáze klinických testů, ty však byly přerušeny a nyní jsou jeho přesné vlastnosti předmětem diskuse, kvůli čemuž nebyl dosud schválen jako léčivo proti rakovině. Jeho jednotlivé vlastnosti jsou shrnuty v závěrečné kapitole teoretické části bakalářské práce.

V praktické části bakalářské práce jsou výsledky experimentů provedených s oběma látkami, které měly za cíl určit a srovnat toxicitu olaparibu a YM155. Experimenty však nemohly být z časových důvodů pořádně dokončeny ve třech opakováních, jejich výsledky tak mohou být zkreslené, stejně tak nemohl být proveden experiment jejich společného vlivu na buněčné linie. První dva provedené experimenty jsou cytotoxické analýzy, měření viability buněk pomocí CFA a XTT. Při těchto experimentech se potvrdilo, že YM155 má silný antiproliferační účinek již v nanomolární koncentraci, přičemž olaparib vykazuje srovnatelné výsledky až v mnohem vyšších koncentracích (řádově 100krát či 1000krát vyšších). Posledním experimentem je imunofluorescenční analýza, kde jsou vizualizovaná jednotlivá ohniska poškození DNA. Tento experiment byl proveden pouze s olaparibem a nebyl řádně kvantifikován, i tak jde však vidět, že olaparib v jednotlivých buňkách skutečně zvýšil počet ohnisek proteinů 53BP1 a γ H2AX značících DSB.

Olaparib i YM155 mají genotoxické účinky na rakovinné buňky, olaparib se již využívá v onkologii a klinickému použití YM155 zatím brání nedostatečně prozkoumaný mechanismus jeho účinku. Pro výzkum látek využitelných v onkologii se také používají kombinace zkoumaných látek za účelem nalezení synergického účinku. Z tohoto důvodu by výzkum společného účinku olaparibu a YM155 mohl v budoucnu přinést zajímavé výsledky pro léčbu rakoviny.

7 ZDROJE

- Akamatsu Y., Murayama Y., Yamada T., Nakazaki T., Tsutsui Y., Ohta K., Iwasaki H. (2008): Molecular characterization of the role of the *Schizosaccharomyces pombe* nip1+/ctp1+ gene in DNA double-strand break repair in association with the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Molecular and cellular biology* **28**(11), 3639–3651.
- Alexanian R., Bergsagel D. E., Migliore P. J., Vaughn W. K., Howe C. D. (1967): Melphalan therapy for plasma cell myeloma. *Blood* **31**, 1–10.
- Ali Y., Abd Hamid S. (2016): Human topoisomerase II alpha as a prognostic biomarker in cancer chemotherapy. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **37**(1), 47–55.
- Altieri D. C. (2010): Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *The Biochemical journal* **430**(2), 199–205.
- Altieri D. C. (2013): Targeting survivin in cancer. *Cancer letters* **332**(2), 225–228.
- Altmeyer M., Lukas J. (2013): To spread or not to spread--chromatin modifications in response to DNA damage. *Current opinion in genetics & development* **23**(2), 156–165.
- Amé J. C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Muller S., Höger T., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G. (1999): PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *Journal of Biological Chemistry* **274**(25):17860-8.
- Amé J. C., Spenlehauer C., de Murcia G. (2004): The PARP superfamily. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **26**(8), 882–893.
- Andres S. N., Vergnes A., Ristic D., Wyman C., Modesti M., Junop M. (2012): A human XRCC4-XLF complex bridges DNA. *Nucleic acids research* **40**(4), 1868–1878.
- Arora R., Shuda M., Guastafierro A., Feng H., Toptan T., Tolstov Y., Normolle D., Vollmer L. L., Vogt A., Dömling A., Brodsky J. L., Chang Y., Moore P. S. (2012): Survivin is a therapeutic target in Merkel cell carcinoma. *Science translational medicine* **4**(133), 133ra56.
- ATCC products Capan-1 (ATCC® HTB-79™), dostupné na: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-79.aspx#characteristics> (13. 2. 2021).
- ATCC products U2OS (ATCC® HTB-96™), dostupné na: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-96.aspx#characteristics> (13. 2. 2021).
- Atrafi F., Groen H., Byers L. A., Garralda E., Lolkema M. P., Sangha R. S., Viteri S., Chae Y. K., Camidge D. R., Gabrail N. Y., Hu B., Tian T., Nuthalapati S., Hoening E., He L., Komarnitsky P., Calles A. (2019): A Phase I Dose-Escalation Study of Veliparib Combined with Carboplatin and Etoposide in Patients with Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer and Other Solid Tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **25**(2), 496–505.
- Barber L. J., Youds J. L., Ward J. D., McIlwraith M. J., O'Neil N. J., Petalcorin M. I., Martin J. S., Collis S. J., Cantor S. B., Auclair M., Tissenbaum H., West S. C., Rose A. M., Boulton S. J. (2008): RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. *Cell* **135**(2), 261–271.
- Bakkenist C. J., Kastan M. B. (2003): DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499–506.
- Bartkova J., Horejsí Z., Koed K., Krämer A., Tort F., Zieger K., Guldborg P., Sehested M., Nesland J. M., Lukas C., Ørntoft T., Lukas J., Bartek J. (2005): DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**(7035), 864–870.
- Bartkova J., Rajpert-De Meyts E., Skakkebaek N. E., Lukas J., Bartek J. (2007): DNA damage response in human testes and testicular germ cell tumours: biology and implications for therapy. *International journal of andrology* **30**(4), 282–291.
- Bass T. E., Luzwick J. W., Kavanaugh G., Carroll C., Dungrawala H., Glick G. G., Feldkamp M. D., Putney R., Chazin W. J., Cortez D. (2016): ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity. *Nature cell biology* **18**(11), 1185–1195.
- Benada J., Macurek L. (2015): Targeting the Checkpoint to Kill Cancer Cells. *Biomolecules* **5**(3), 1912–1937.

- Benjamin R. C., Gill D. M. (1980): Poly(ADP-ribose) synthesis in vitro programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* **255**(21):10502-8.
- Bennardo N., Cheng A., Huang N., Stark J. M. (2008): Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS genetics* **4**(6), e1000110.
- Bernstein E., Hake S. B. (2006): The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **84**(4), 505–517.
- Bernstein K. A., Rothstein R. (2009): At loose ends: resecting a double-strand break. *Cell* **137**(5), 807–810.
- Bétermier M., Bertrand P., Lopez B. S. (2014): Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process?. *PLoS genetics* **10**(1), e1004086.
- Bhatti S., Kozlov S., Farooqi A. A., Naqi A., Lavin M., Khanna K. K. (2011): ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**(18), 2977–3006.
- Bizard A. H., Hickson I. D. (2014): The dissolution of double Holliday junctions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **6**(7), a016477.
- Bonate P. L., Arthaud L., Cantrell W. R. Jr, Stephenson K., Secrist J. A. 3rd, Weitman S. (2006): Discovery and development of clofarabine: a nucleoside analogue for treating cancer. *Nature reviews. Drug discovery* **5**(10), 855–863.
- Brochu G., Duchaine C., Thibeault L., Lagueux J., Shah G. M., Poirier G. G. (1994): Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochimica et biophysica acta* **1219**(2), 342–350.
- Bryant H. E., Schultz N., Thomas H. D., Parker K. M., Flower D., Lopez E., Kyle S., Meuth M., Curtin N. J., Helleday T. (2005): Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**(7035), 913–917.
- Burger H., Loos W. J., Eechoute K., Verweij J., Mathijssen R. H., Wiemer E. A. (2011): Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **14**(1), 22–34.
- Burma S., Chen B. P., Chen D. J. (2006): Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA repair* **5**(9-10), 1042–1048.
- Caldecott K. W. (2008): Single-strand break repair and genetic disease. *Nature reviews. Genetics* **9**(8), 619–631.
- Caldecott K. W., Aoufouchi S., Johnson P., Shall S. (1996): XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic acids research* **24**(22), 4387–4394.
- Campisi J., d'Adda di Fagagna F. (2007): Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**(9):729-40.
- Carson D. A., Carrera C. J., Wasson D. B., Yamanaka H. (1988): Programmed cell death and adenine deoxynucleotide metabolism in human lymphocytes. *Advances in enzyme regulation* **27**, 395–404.
- Ceccaldi R., Rondinelli B., D'Andrea A. D. (2016): Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in cell biology* **26**(1), 52–64.
- Cerbinskaite A., Mukhopadhyay A., Plummer E. R., Curtin N. J., Edmondson R. J. (2012): Defective homologous recombination in human cancers. *Cancer treatment reviews* **38**(2), 89–100.
- Ciccio A., Elledge S. J. (2010): The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular Cell* **40**. 179–204.
- Cimprich K. A., Cortez D. (2008): ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 616–627.
- Clapier C. R., Cairns B. R.. (2009): The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual Review of Biochemistry* **78**. 273-304.
- Clarke M. L., Mackey J. R., Baldwin S. A., Young J. D., Cass C. E. (2002): The role of membrane transporters in cellular resistance to anticancer nucleoside drugs. *Cancer treatment and research* **112**, 27–47.

- Cleaver J. E. (2005): Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nature reviews. Cancer* **5**(7), 564–573.
- Clemens M. R., Gladkov O. A., Gartner E., Vladimirov V., Crown J., Steinberg J., Jie F., Keating A. (2015): Phase II, multicenter, open-label, randomized study of YM155 plus docetaxel as first-line treatment in patients with HER2-negative metastatic breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **149**(1), 171–179.
- Coleman K. A., Greenberg R. A. (2011): The BRCA1-RAP80 complex regulates DNA repair mechanism utilization by restricting end resection. *The Journal of biological chemistry* **286**(15), 13669–13680.
- Coleman R. L., Oza A. M., Lorusso D., Aghajanian C., Oaknin A., Dean A., Colombo N., Weberpals J. I., Clamp A., Scambia G., Leary A., Holloway R. W., Gancedo M. A., Fong P. C., Goh J. C., O'Malley D. M., Armstrong D. K., Garcia-Donas J., Swisher E. M., Floquet A., ... ARIEL3 investigators (2017): Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)* **390**(10106), 1949–1961.
- Constantin N., Dzantiev L., Kadyrov F. A., Modrich P. (2005): Human mismatch repair: reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction. *The Journal of biological chemistry* **280**(48), 39752–39761.
- Cortez D., Guntuku S., Qin J., Elledge S. J. (2001): ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science (New York, N. Y.)* **294**(5547), 1713–1716.
- Daley J. M., Jimenez-Sainz J., Wang W., Miller A. S., Xue X., Nguyen K. A., Jensen R. B., Sung P. (2017): Enhancement of BLM-DNA2-Mediated Long-Range DNA End Resection by CtIP. *Cell reports*, **21**(2), 324–332.
- Damia G., Filiberti L., Vikhanskaya F., Carrassa L., Taya Y., D'incalci M., Brogginini M. (2001): Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, **3**(1), 10–16.
- D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G. G. (1999): Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *The Biochemical journal* **342** (Pt 2), 249–268.
- Dantzer F., de La Rubia G., Ménissier-De Murcia J., Hostomsky Z., de Murcia G., Schreiber V. (2000): Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* **39**(25), 7559–7569.
- Dasari S., Tchounwou P. B. (2014): Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology* **740**, 364–378.
- Das B. B., Huang S. Y., Murai J., Rehman I., Amé J. C., Sengupta S., Das S. K., Majumdar P., Zhang H., Biard D., Majumder H. K., Schreiber V., Pommier Y. (2014): PARP1-TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage. *Nucleic acids research* **42**(7), 4435–4449.
- Davidovic L., Vodenicharov M., Affar E. B., Poirier G. G. (2001): Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Experimental cell research* **268**(1), 7–13.
- de Jager M., van Noort J., van Gent D. C., Dekker C., Kanaar R., Wyman C. (2001): Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Molecular Cell* **8**(5):1129-35.
- de Laat W. L., Appeldoorn E., Sugawara K., Weterings E., Jaspers N. G., Hoeijmakers J. H. (1998): DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair. *Genes & development*, **12**(16), 2598–2609.
- Delgado J. L., Hsieh C. M., Chan N. L., Hiasa H. (2018): Topoisomerases as anticancer targets. *The Biochemical journal* **475**(2), 373–398.
- de Murcia G., Ménissier de Murcia J. (1994): Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends in Biochemical Sciences* **19**(4):172-6.
- Dianov G. L., Hübscher U. (2013): Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. *Nucleic acids research* **41**(6), 3483–3490.
- Dianov G., Price A., Lindahl T. (1992): Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. *Molecular and cellular biology* **12**(4), 1605–1612.
- 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.
- Domchek S. M., Aghajanian C., Shapira-Frommer R., Schmutzler R. K., Audeh M. W., Friedlander M., Balmaña J., Mitchell G., Fried G., Stemmer S. M., Hubert A., Rosengarten O., Loman N., Robertson J. D., Mann H., Kaufman B. (2016): Efficacy and safety of olaparib monotherapy in germline BRCA1/2 mutation carriers with advanced ovarian cancer and three or more lines of prior therapy. *Gynecologic oncology* **140**(2), 199–203.
- Dziadkowiec K. N., Gašiorowska E., Nowak-Markwitz E., Jankowska A. (2016): PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting. *Menopause Review* **15**(4), 215–219. doi:10.5114/pm.2016.65667.
- El Bezawy R., Cominetti D., Fenderico N., Zuco V., Beretta G. L., Dugo M., Arrighetti N., Stucchi C., Rancati T., Valdagni R., Zaffaroni N., Gandellini P. (2017): miR-875-5p counteracts epithelial-to-mesenchymal transition and enhances radiation response in prostate cancer through repression of the EGFR-ZEB1 axis. *Cancer letters* **395**, 53–62.
- Emadi A., Jones R. J., Brodsky R. A. (2009): Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature reviews. Clinical oncology* **6**(11), 638–647.
- Evans E., Moggs J. G., Hwang J. R., Egly J. M., Wood R. D. (1997): Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *The EMBO journal* **16**(21), 6559–6573.
- Ewald B., Sampath D., Plunkett W. (2008): Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene* **27**(50), 6522–6537.
- Fagbemi A. F., Orelli B., Schärer O. D. (2011): Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. *DNA repair* **10**(7), 722–729.
- Falck J., Coates J., Jackson S. P. (2005): Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **434**(7033), 605–611.
- Farmer H., McCabe N., Lord C. J., Tutt A. N., Johnson D. A., Richardson T. B., Santarosa M., Dillon K. J., Hickson I., Knights C., Martin N. M., Jackson S. P., Smith G. C., Ashworth A. (2005): Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**(7035), 917–921.
- Feng L., Huang J., Chen J. (2009): MERIT40 facilitates BRCA1 localization and DNA damage repair. *Genes & development* **23**(6), 719–728.
- Ferlay J., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M., *et al.* (2020): Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020, dostupné na: <https://gco.iarc.fr/today> (22. 4. 2021).
- Fradet-Turcotte A., Canny M. D., Escribano-Díaz C., Orthwein A., Leung C. C., Huang H., Landry M. C., Kitevski-LeBlanc J., Noordermeer S. M., Sicheri F., Durocher D. (2013): 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* **499**(7456), 50–54.
- Fink D., Nebel S., Aebi S., Zheng H., Cenni B., Nehmé A., Christen R. D., Howell S. B. (1996): The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer research* **56**(21), 4881–4886.
- Fragni M., Bonini S. A., Stabile A., Bodei S., Cristinelli L., Simeone C., Zani D., Spano P. F., Berruti A., Memo M., Sigala S. (2016): Inhibition of Survivin Is Associated with Zoledronic Acid-induced Apoptosis of Prostate Cancer Cells. *Anticancer research* **36**(3), 913–920.
- Franken N. A., Rodermond H. M., Sta, J., Haveman J., van Bree C. (2006): Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols* **1**(5), 2315–2319.
- Franzese E., Centonze S., Diana A., Carlino F., Guerrera L. P., Di Napoli M., De Vita F., Pignata S., Ciardiello F., Orditura M. (2019): PARP inhibitors in ovarian cancer. *Cancer treatment reviews* **73**, 1–9.
- Friedberg E. C. (2001): How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature reviews. Cancer* **1**(1), 22–33.
- Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W., Wood R. D., Schultz R. A., Ellenberger T. (2006): DNA Repair and Mutagenesis. Second Edition. *The Quarterly Review of Biology* **81**(3), 273–.
- Fu D., Calvo J. A., Samson L. D. (2012): Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature reviews. Cancer* **12**(2), 104–120.

- Furgason J. M., Bahassi e. (2013): Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacology & therapeutics* (3), 298–308.
- Galanski M. (2006): Recent developments in the field of anticancer platinum complexes. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* **1**(2), 285–295.
- Galluzzi L., Senovilla L., Vitale I., Michels J., Martins I., Kepp O., Castedo M., Kroemer G. (2012): Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31**(15), 1869–1883.
- Galmarini C. M., Mackey J. R., Dumontet C. (2002): Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *The Lancet. Oncology* **3**(7), 415–424.
- Garcia V., Phelps S. E., Gray S., Neale M. J. (2011): Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* **479**(7372), 241–244.
- Genini D., Adachi S., Chao Q., Rose D. W., Carrera C. J., Cottam H. B., Carson D. A., Leoni L. M. (2000): Deoxyadenosine analogs induce programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria. *Blood* **96**(10), 3537–3543.
- Glaros T. G., Stockwin L. H., Mullendore M. E., Smith B., Morrison B. L., Newton D. L. (2012): The "survivin suppressants" NSC 80467 and YM155 induce a DNA damage response. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **70**(1), 207–212.
- Gnewuch C. T., Sosnovsky G. (1997): A Critical Appraisal of the Evolution of N-Nitrosoureas as Anticancer Drugs. *Chemical reviews* **97**(3), 829–1014.
- Gorgoulis V. G., Vassiliou L. V., Karakaidos P., Zacharatos P., Kotsinas A., Liloglou T., Venere M., Ditullio R. A. Jr, Kastrinakis N. G., Levy B., Kletsas D., Yoneta A., Herlyn M., Kittas C., Halazonetis T. D. (2005): Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**(7035), 907–913.
- Gottlieb T. M., Jackson S. P. (1993): The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**(1), 131–142.
- Gradwohl G., Ménissier de Murcia J. M., Moliniet M., Simonin F., Koken M., Hoeijmakers J. H., de Murcia G. (1990): The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(8), 2990–2994.
- Grinstein E., Jundt F., Weinert I., Wernet P., Royer H. D. (2002): Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene* **21**(10), 1485–1492.
- Guillot D., Martin S. A. (2014): Exploiting DNA mismatch repair deficiency as a therapeutic strategy. *Experimental cell research* **329**(1), 110–115.
- Guirouilh-Barbat J., Rass E., Plo I., Bertrand P., Lopez B. S. (2007): Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(52), 20902–20907.
- Halazonetis T. D., Gorgoulis V. G., Bartek J. (2008): An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* **319**(5868):1352-5.
- Hammel M., Rey M., Yu Y., Mani R. S., Classen S., Liu M., Pique M. E., Fang S., Mahaney B. L., Weinfeld M., Schriemer D. C., Lees-Miller S. P., Tainer J. A. (2011): XRCC4 protein interactions with XRCC4-like factor (XLF) create an extended grooved scaffold for DNA ligation and double strand break repair. *The Journal of biological chemistry* **286**(37), 32638–32650.
- Hanawalt P. C. (2001): Controlling the efficiency of excision repair. *Mutation research* **485**(1), 3–13.
- Hanawalt P. C., Spivak G. (2008): Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**(12), 958–970.
- Hartlerode A. J., Scully R. (2009): Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *The Biochemical journal* **423**(2), 157–168.
- Harper J. W., Elledge S. J. (2007): The DNA damage response: ten years after. *Molecular Cell* **28**(5):739-45.
- Harrap K. R. (1985): Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative. *Cancer treatment reviews* **12** Suppl A, 21–33.
- Harrison J. C., Haber J. E. (2006): Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annual review of genetics* **40**, 209–235.

- Hassa P. O., Hottiger M. O. (2008): The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**, 3046–3082.
- Haut A., Abbott W. S., Wintrobe M. M., Cartwright G. E. (1961): Busulfan in the treatment of chronic myelocytic leukemia. The effect of long term intermittent therapy. *Blood* **17**, 1–19.
- Hegde M. L., Hazra T. K., Mitra S. (2008): Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell research* **18**(1), 27–47.
- Hersh E. M., O'Day S. J., Powderly J., Khan K. D., Pavlick A. C., Cranmer L. D., Samlowski W. E., Nichol G. M., Yellin M. J., Weber J. S. (2011): A phase II multicenter study of ipilimumab with or without dacarbazine in chemotherapy-naïve patients with advanced melanoma. *Investigational new drugs* **29**(3), 489–498.
- Hertel L. W., Boder G. B., Kroin J. S., Rinzel S. M., Poore G. A., Todd G. C., Grindey G. B. (1990): Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer research* **50**(14), 4417–4422.
- Hicks J. K., Chute C. L., Paulsen M. T., Ragland R. L., Howlett N. G., Guéranger Q., Glover T. W., Canman C. E. (2010): Differential roles for DNA polymerases eta, zeta, and REV1 in lesion bypass of intrastrand versus interstrand DNA cross-links. *Molecular and cellular biology* **30**(5), 1217–1230.
- Hoeijmakers J. H. (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**(6835), 366–374.
- Holzer A. K., Manorek G. H., Howell S. B. (2006): Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Molecular pharmacology* **70**(4), 1390–1394.
- Hong M., Ren M., Silva J., Kennedy T., Choi J., Cowell J. K., Hao Z. (2014): Sepantronium is a DNA damaging agent that synergizes with PLK1 inhibitor volasertib. *American journal of cancer research* **4**(2), 135–147.
- Hong M., Ren M. Q., Silva J., Paul A., Wilson W. D., Schroeder C., Weinberger P., Janik J., Hao Z. (2017): YM155 inhibits topoisomerase function. *Anticancer Drugs* **28**(2), 142–152.
- Hosoya N., Miyagawa K. (2014): Targeting DNA damage response in cancer therapy. *Cancer science* **105**(4), 370–388.
- Hu S., Fu S., Xu X., Chen L., Xu J., Li B., Qu Y., Yu H., Lu S., Li W. (2015): The mechanism of radiosensitization by YM155, a novel small molecule inhibitor of survivin expression, is associated with DNA damage repair. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **37**(3), 1219–1230.
- Hu Y., Scully R., Sobhian B., Xie A., Shestakova E., Livingston D. M. (2011): RAP80-directed tuning of BRCA1 homologous recombination function at ionizing radiation-induced nuclear foci. *Genes & development* **25**(7), 685–700.
- Hucke A., Park G. Y., Bauer O. B., Beyer G., Köppen C., Zeeh D., Wehe C. A., Sperling M., Schröter R., Kantauskaitė M., Hagos Y., Karst U., Lippard S. J., Ciarimboli G. (2018): Interaction of the New Monofunctional Anticancer Agent Phenanthriplatin With Transporters for Organic Cations. *Frontiers in chemistry* **6**, 180.
- Huang P., Chubb S., Plunkett W. (1990): Termination of DNA synthesis by 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine. A mechanism for cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry* **265**(27), 16617–16625.
- Huen M. S., Chen J. (2008): The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell research* **18**(1), 8–16.
- Huertas P. (2010): DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nature structural & molecular biology* **17**(1), 11–16.
- Chan J. K., Loizzi V., Manetta A., Berman M. L. (2004): Oral altretamine used as salvage therapy in recurrent ovarian cancer. *Gynecologic oncology* **92**(1), 368–371.
- Chapman J. R., Taylor M. R., Boulton S. J. (2012): Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular cell* **47**(4), 497–510.
- Charbonnel C., Allain E., Gallego M. E., White C. I. (2011): Kinetic analysis of DNA double-strand break repair pathways in Arabidopsis. *DNA repair* **10**(6), 611–619.

- Chatterjee Nimrat, Walker Graham C. (2017): Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **58**(5), 235–263.
- Chen A. (2011): PARP inhibitors: its role in treatment of cancer. *Chinese journal of cancer* **30**(7), 463–471.
- Chen Z., Yang H., Pavletich N. P. (2008): Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature* **453**(7194).
- Cheng Q., Ling X., Haller A., Nakahara T., Yamanaka K., Kita A., Koutoku H., Takeuchi M., Brattain M. G., Li, F. (2012): Suppression of survivin promoter activity by YM155 involves disruption of Sp1-DNA interaction in the survivin core promoter. *International journal of biochemistry and molecular biology* **3**(2), 179–197.
- Cheng S. M., Chang Y. C., Liu C. Y., Lee J. Y., Chan H. H., Kuo C. W., Lin K. Y., Tsai S. L., Chen S. H., Li C. F., Leung E., Kanwar J. R., Huang C. C., Chang J. Y., Cheung C. H. (2015): YM155 down-regulates survivin and XIAP, modulates autophagy and induces autophagy-dependent DNA damage in breast cancer cells. *British journal of pharmacology* **172**(1), 214–234.
- Chial H. (2008): Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education* **1**(1), 33.
- Christmann M., Tomicic M. T., Roos W. P., Kaina B. (2003): Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **193**(1-2), 3–34.
- Church D. N., Talbot D. C. (2012): Survivin in solid tumors: rationale for development of inhibitors. *Current oncology reports* **14**(2), 120–128.
- Iwasa T., Okamoto I., Takezawa K., Yamanaka K., Nakahara T., Kita A., Koutoku H., Sasamata M., Hatashita E., Yamada Y., Kuwata K., Fukuoka M., Nakagawa K. (2010): Marked anti-tumour activity of the combination of YM155, a novel survivin suppressant, and platinum-based drugs. *British journal of cancer* **103**(1), 36–42.
- Iyama T., Wilson D. M. 3rd (2013): DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair* **12**(8), 620–636.
- Jackson S. P., Bartek J. (2009): The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**(7267), 1071–8.
- Jiricny J. (2006): The multifaceted mismatch-repair system. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**(5), 335–346.
- Johnson S. A. (2001): Nucleoside analogues in the treatment of haematological malignancies. *Expert opinion on pharmacotherapy* **2**(6), 929–943.
- Jordheim L. P., Dumontet C. (2007): Review of recent studies on resistance to cytotoxic deoxynucleoside analogues. *Biochimica et biophysica acta* **1776**(2), 138–159.
- Jordheim L. P., Durantel D., Zoulim F., Dumontet C. (2013): Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature reviews. Drug discovery* **12**(6), 447–464.
- Joshua A. M., Evans A., Van der Kwast T., Zielenska M., Meeker A. K., Chinnaiyan A., Squire J. A. (2008): Prostatic preneoplasia and beyond. *Biochimica et biophysica acta* **1785**(2), 156–181.
- Kameshita I., Matsuda Z., Taniguchi T., Shizuta Y. (1984): Poly (ADP-Ribose) synthetase. Separation and identification of three proteolytic fragments as the substrate-binding domain, the DNA-binding domain, and the automodification domain. *The Journal of biological chemistry* **259**(8), 4770–4776.
- Khanna K. K., Jackson, S. P. (2001): DNA double-strand breaks: signalling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics* **27**, 247–254.
- Knauer S. K., Mann W., Stauber R. H. (2007): Survivin's dual role: an export's view. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **6**(5), 518–521.
- Kastan M. B., Bartek J. (2004): Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**(7015), 316–323.
- Kelland L. (2007a): Broadening the clinical use of platinum drug-based chemotherapy with new analogues. Satraplatin and picoplatin. *Expert opinion on investigational drugs* **16**(7), 1009–1021.
- Kelland L. (2007b): The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature reviews. Cancer* **7**(8), 573–584.

- Kellinger M. W., Park G. Y., Chong J., Lippard S. J., Wang, D. (2013): Effect of a monofunctional phenanthriplatin-DNA adduct on RNA polymerase II transcriptional fidelity and translesion synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **135**(35), 13054–13061.
- Kelly R. J., Thomas A., Rajan A., Chun G., Lopez-Chavez A., Szabo E., Spencer S., Carter C. A., Guha U., Khozin S., Poondru S., Van Sant C., Keating A., Steinberg S. M., Figg W., Giaccone G. (2013): A phase I/II study of sepantronium bromide (YM155, survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **24**(10), 2601–2606.
- Kennedy R. D., D'Andrea A. D. (2005): The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes & development* **19**(24), 2925–2940.
- Kent T., Chandramouly G., McDevitt S. M., Ozdemir A. Y., Pomerantz R. T. (2015): Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase θ . *Nature structural & molecular biology* **22**(3), 230–237.
- Kim H., D'Andrea A. D. (2012): Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes & development* **26**(13), 1393–1408.
- Kim J. S., Krasieva T. B., Kurumizaka H., Chen D. J., Taylor A. M., Yokomori K. (2005): Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *The Journal of cell biology* **170**(3), 341–347.
- Kim M., Kim, J. M. (2016): The role of USP1 autocleavage in DNA interstrand crosslink repair. *FEBS letters* **590**(3), 340–348.
- Klungland A., Lindahl T. (1997): Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *The EMBO journal* **16**(11), 3341–3348.
- Kozlov S. V., Graham M. E., Peng C., Chen P., Robinson P. J., Lavin M. F. (2006): Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *The EMBO Journal* **25**, 3504–3514.
- Kouzarides T. (2007): Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**(4):693-705.
- Krasikova Y. S., Rechkunova N. I., Maltseva E. A., Petrusheva I. O., Lavrik O. I. (2010): Localization of xeroderma pigmentosum group A protein and replication protein A on damaged DNA in nucleotide excision repair. *Nucleic acids research* **38**(22), 8083–8094.
- Kruhlik M., Crouch E. E., Orlov M., Montaña C., Gorski S. A., Nussenzweig A., Misteli T., Phair R. D., Casellas R. (2007): The ATM repair pathway inhibits RNA polymerase I transcription in response to chromosome breaks. *Nature* **447**(7145), 730–734.
- Kubota Y., Nash R. A., Klungland A., Schär P., Barnes D. E., Lindahl T. (1996): Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *The EMBO journal* **15**(23), 6662–6670.
- Kudchadkar R., Ernst S., Chmielowski B., Redman B. G., Steinberg J., Keating A., Jie F., Chen C., Gonzalez R., Weber J. (2015): A phase 2, multicenter, open-label study of sepantronium bromide (YM155) plus docetaxel in patients with stage III (unresectable) or stage IV melanoma. *Cancer medicine* **4**(5), 643–650.
- Kulis M., Esteller M. (2010): DNA methylation and cancer. *Advances in genetics* **70**, 27–56.
- Lan L., Nakajima S., Oohata Y., Takao M., Okano S., Masutani M., Wilson S. H., Yasui A. (2004): In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(38), 13738–13743.
- Lans H., Marteiijn J. A., Vermeulen W. (2012): ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics & Chromatin* **5**, 4.
- Larrea A. A., Lujan S. A., Nick McElhinny S. A., Mieczkowski P. A., Resnick M. A., Gordenin D. A., Kunkel T. A. (2010): Genome-wide model for the normal eukaryotic DNA replication fork. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(41), 17674–17679.
- Lavin M. F. (2007): ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* **26**(56):7749-58.
- Lavrik O. I., Prasad R., Sobol R. W., Horton J. K., Ackerman E. J., Wilson S. H. (2001): Photoaffinity labeling of mouse fibroblast enzymes by a base excision repair intermediate.

- Evidence for the role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in DNA repair. *The Journal of biological chemistry* **276**(27), 25541–25548.
- Lazzaro F., Giannattasio M., Puddu F., Granata M., Pelliccioli A., Plevani P., Muzi-Falconi M. (2009): Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA Repair (Amst)* **8**(9):1055–67.
- Lebwohl D., Canetta R. (1998): Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **34**(10), 1522–1534.
- Ledermann J., Harter P., Gourley C., Friedlander M., Vergote I., Rustin G., Scott C., Meier W., Shapira-Frommer R., Safra T., Matei D., Macpherson E., Watkins C., Carmichael J., Matulonis U. (2012): Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *The New England journal of medicine* **366**(15), 1382–1392.
- Lee J. H., Paull T. T. (2005): ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science (New York, N.Y.)* **308**(5721), 551–554.
- Liberti S. E., Larrea A. A., Kunkel T. A. (2013): Exonuclease 1 preferentially repairs mismatches generated by DNA polymerase α . *DNA repair* **12**(2), 92–96.
- Lieber M. R. (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry* **79**, 181–211.
- Limbo O., Chahwan C., Yamada Y., de Bruin R. A., Wittenberg C., Russell P. (2007): Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. *Molecular cell* **28**(1), 134–146.
- Lindahl T., Barnes D. E. (2000): Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **65**, 127–133.
- Lindahl T., Satoh M. S., Poirier G. G., Klungland A. (1995): Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends in biochemical sciences* **20**(10), 405–411.
- Lisby M., Barlow J. H., Burgess R. C., Rothstein R. (2004): Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* **118**(6), 699–713.
- Litton J. K., Rugo H. S., Ettl J., Hurvitz S. A., Gonçalves A., Lee K. H., Fehrenbacher L., Yerushalmi R., Mina L. A., Martin M., Roché H., Im Y. H., Quek R., Markova D., Tudor I. C., Hannah A. L., Eiermann W., Blum J. L. (2018): Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *The New England journal of medicine* **379**(8), 753–763.
- Lladser A., Sanhueza C., Kiessling R., Quest A. F. (2011): Is survivin the potential Achilles' heel of cancer?. *Advances in cancer research* **111**, 1–37.
- Loibl S., O'Shaughnessy J., Untch M., Sikov W. M., Rugo H. S., McKee M. D., Huober J., Golshan M., von Minckwitz G., Maag D., Sullivan D., Wolmark N., McIntyre K., Ponce Lorenzo J. J., Metzger Filho O., Rastogi P., Symmans W. F., Liu X., Geyer C. E. Jr (2018): Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrightNESS): a randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* **19**(4), 497–509.
- Longhese M. P., Bonetti D., Manfrini N., Clerici M. (2010): Mechanisms and regulation of DNA end resection. *The EMBO journal* **29**(17), 2864–2874.
- Maanen M. J., Smeets C. J., Beijnen J. H. (2000): Chemistry, pharmacology and pharmacokinetics of N,N',N''-triethylenethiophosphoramidate (ThioTEPA). *Cancer treatment reviews* **26**(4), 257–268.
- Majera D., Mistrik M. (2020): Effect of Sepatronicum Bromide (YM155) on DNA Double-Strand Breaks Repair in Cancer Cells. *International journal of molecular sciences* **21**(24), 9431.
- Malivert L., Ropars V., Nunez M., Drevet P., Miron S., Faure G., Guerois R., Mornon J. P., Revy P., Charbonnier J. B., Callebaut I., de Villartay J. P. (2010): Delineation of the Xrcc4-interacting region in the globular head domain of cernunnos/XLF. *The Journal of biological chemistry* **285**(34), 26475–26483.
- Manouchehri J. M., Kalafatis M. (2017): Sensitization of rhTRAIL-resistant Triple-negative Breast Carcinoma Through Silibinin Co-Treatment. *Anticancer research* **37**(12), 6593–6599.

- Mari P. O., Florea B. I., Persengiev S. P., Verkaik N. S., Brüggerwirth H. T., Modesti M., Giglia-Mari G., Bezstarosti K., Demmers J. A., Luidert T. M., Houtsmuller A. B., van Gent D. C. (2006): Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(49), 18597–18602.
- Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. (1998): XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Molecular and cellular biology* **18**(6), 3563–3571.
- Mateo J., Carreira S., Sandhu S., Miranda S., Mossop H., Perez-Lopez R., Nava Rodrigues D., Robinson D., Omlin A., Tunariu N., Boysen G., Porta N., Flohr P., Gillman A., Figueiredo I., Paulding C., Seed G., Jain S., Ralph C., Protheroe A., Hussain S., Jones R., Elliott T., McGovern U., Bianchini D., Goodall J., Zafeiriou Z., Williamson Ch. T. Ferraldeschi R., Riisnaes R., Ebbs B., Fowler G., Roda D., Yuan W., Wu Y. Cao X., Brought R., Pemberton H., A'Hern R., Swain A., Kunju L. P., Eeles R., Attard G., Lord Ch. J. Ashworth A., Rubin M. A., Kndsen K. E., Feng F. Y., Chinnaiyan A. M., Hall E., de Bono J. S. (2015): DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *The New England journal of medicine* **373**(18), 1697–1708.
- Mateos-Gomez P. A., Kent T., Deng S. K., McDevitt S., Kashkina E., Hoang T. M., Pomerantz R. T., Sfeir A. (2017): The helicase domain of Pol θ counteracts RPA to promote alt-NHEJ. *Nature structural & molecular biology* **24**(12), 1116–1123.
- Matsuoka S., Ballif B. A., Smogorzewska A., McDonald E. R. 3rd, 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 (New York, N.Y.)* **316**(5828), 1160–1166.
- Matzuk M. M., Lamb D. J. (2008): The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature medicine* **14**(11), 1197–1213.
- Mayer-Kuckuk P., Ullrich O., Ziegler M., Grune T., Schweiger M. (1999): Functional interaction of poly(ADP-ribose) with the 20S proteasome in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* **259**(3), 576–581.
- Mazón G., Mimitou E. P., Symington L. S. (2010): SnapShot: Homologous recombination in DNA double-strand break repair. *Cell* **142**(4), 646–646.e1.
- Mazzio E. A., Lewis C. A., Elhag R., Soliman K. F. (2018): Effects of Sepantronium Bromide (YM155) on the Whole Transcriptome of MDA-MB-231 Cells: Highlight on Impaired ATR/ATM Fanconi Anemia DNA Damage Response. *Cancer genomics & proteomics* **15**(4), 249–264.
- McCabe N., Turner N. C., Lord C. J., Kluzek K., Bialkowska A., Swift S., Giavara S., O'Connor M. J., Tutt A. N., Zdzienicka M. Z., Smith G. C., Ashworth A. (2006): Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer research* **66**(16), 8109–8115.
- McCormick A., Donoghue P., Dixon M., O'Sullivan R., O'Donnell R. L., Murray J., Kaufmann A., Curtin N. J., Edmondson R. J. (2017): Ovarian Cancers Harbor Defects in Nonhomologous End Joining Resulting in Resistance to Rucaparib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **23**(8), 2050–2060.
- McIntyre L. J., Kim Y. S. (1984): Effects of sodium butyrate and dimethylsulfoxide on human pancreatic tumor cell lines. *European journal of cancer & clinical oncology* **20**(2), 265–271.
- McKinnon P. J., Caldecott K. W. (2007): DNA strand break repair and human genetic disease. *Annual review of genomics and human genetics* **8**, 37–55.
- McVey M., Khodaverdian V. Y., Meyer D., Cerqueira P. G., Heyer W. D. (2016): Eukaryotic DNA Polymerases in Homologous Recombination. *Annual review of genetics* **50**, 393–421.
- Mediatly – Lynparza 100 mg potahovaná tableta, dostupné na: <https://mediately.co/cz/drugs/7EL3OP2JQwABbjd5GhTGeSMeq0q/lynparza-100mg-potahovana-tableta#indications> (26. 4. 2021).
- Ménissier-de Murcia J., Molinete M., Gradwohl G., Simonin F., de Murcia G. (1989): Zinc-binding domain of poly(ADP-ribose)polymerase participates in the recognition of single strand breaks on DNA. *Journal of Molecular Biology* **210**(1):229-33.

- Mimitou E. P., Symington L. S. (2009): Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends in biochemical sciences* **34**(5), 264–272.
- Mimitou E. P., Symington L. S. (2010): Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *The EMBO journal* **29**(19), 3358–3369.
- Mimori T., Hardin J. A. (1986): Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *Journal of Molecular Biology* **261**(22):10375-9.
- Mir R., Stanzani E., Martinez-Soler F., Villanueva A., Vidal A., Condom E., Ponce J., Gil J., Tortosa A., Giménez-Bonafé P. (2014): YM155 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin inducing apoptosis and tumor regression. *Gynecologic oncology* **132**(1), 211–220.
- Mirza M. R., Monk B. J., Herrstedt J., Oza A. M., Mahner S., Redondo A., Fabbro M., Ledermann J. A., Lorusso D., Vergote I., Ben-Baruch N. E., Marth C., Mądry R., Christensen R. D., Berek J. S., Dørum A., Tinker A. V., du Bois A., González-Martín A., Follana P., Benigmo B., Rosenberg P., Gilbert L., Rimel B. J., Buscema J., Balsler J. P., Agarwal S., Matulonis U. A., ENGOT-OV16/NOVA Investigators (2016). Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *The New England journal of medicine* **375**(22), 2154–2164.
- Modrich P., Lahue R. (1996): Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annual review of biochemistry* **65**, 101–133.
- Montoni A., Robu M., Pouliot E., Shah G. M. (2013): Resistance to PARP-Inhibitors in Cancer Therapy. *Frontiers in pharmacology* **4**, 18.
- Mortusewicz O., Rothbauer U., Cardoso M. C., Leonhardt H. (2006): Differential recruitment of DNA Ligase I and III to DNA repair sites. *Nucleic acids research* **34**(12), 3523–3532.
- Moser J., Kool H., Giakzidis I., Caldecott K., Mullenders L. H., Fousteri M. I. (2007): Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Molecular cell* **27**(2), 311–323.
- Moshous D., Callebaut I., de Chasseval R., Corneo B., Cavazzana-Calvo M., Le Deist F., Tezcan I., Sanal O., Bertrand Y., Philippe N., Fischer A., de Villartay J. P. (2001): Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* **105**(2), 177–186.
- Mullenders L. H., Berneburg M. (2001): Photoimmunology and nucleotide excision repair: impact of transcription coupled and global genome excision repair. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **65**(2-3), 97–100.
- Nakamura J., La D. K., Swenberg J. A. (2000): 5'-nicked apurinic/apyrimidinic sites are resistant to beta-elimination by beta-polymerase and are persistent in human cultured cells after oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **275**(8), 5323–5328.
- Nakamura N., Yamauchi T., Hiramoto M., Yuri M., Naito M., Takeuchi M., Yamanaka K., Kita A., Nakahara T., Kinoyama I., Matsuhisa A., Kaneko N., Koutoku H., Sasamata M., Yokota H., Kawabata S., Furuichi K. (2012): Interleukin enhancer-binding factor 3/NF110 is a target of YM155, a suppressant of survivin. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **11**(7), M111.013243.
- Natale V. (2011): A comprehensive description of the severity groups in Cockayne syndrome. *American journal of medical genetics. Part A* **155**(5), 1081–1095.
- Nimonkar A. V., Genschel J., Kinoshita E., Polaczek P., Campbell J. L., Wyman C., Modrich P., Kowalczykowski S. C. (2011): BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes & development* **25**(4), 350–362.
- O'Ceirbhail R. E. (2018): Using PARP Inhibitors in Advanced Ovarian Cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* **32**(7), 339–343.
- Ohgushi H., Yoshihara K., Kamiya T. (1980): Bovine thymus poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase. Physical properties and binding to DNA. *Journal of Molecular Biology* **255**(13):6205-11.
- Orii K. E., Lee Y., Kondo N., McKinnon P. J. (2006): Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system

- development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(26), 10017–10022.
- Ouchi T., Monteiro A. N., August A., Aaronson S. A., Hanafusa H. (1998): BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(5), 2302–2306.
- Owonikoko T. K., Dahlberg S. E., Sica G. L., Wagner L. I., Wade J. L. 3rd, Srkalovic G., Lash B. W., Leach J. W., Leal T. B., Aggarwal C., Ramalingam S. S. (2019): Randomized Phase II Trial of Cisplatin and Etoposide in Combination With Veliparib or Placebo for Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer: ECOG-ACRIN 2511 Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **37**(3), 222–229.
- Pabla N., Huang S., Mi Q. S., Daniel R., Dong Z. (2008): ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **283**(10), 6572–6583.
- Palombo F., Gallinari P., Iaccarino I., Lettieri T., Hughes M., D'Arrigo A., Truong O., Hsuan J. J., Jiricny J. (1995): GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science (New York, N.Y.)* **268**(5219), 1912–1914.
- Pang D., Yoo S., Dynan W. S., Jung M., Dritschilo A. (1997): Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy. *Cancer research* **57**(8), 1412–1415.
- Panier S., Boulton S. J. (2014): Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature reviews. Molecular cell biology* **15**(1), 7–18.
- Papadopoulos K. P., Lopez-Jimenez J., Smith S. E., Steinberg J., Keating A., Sasse C., Jie F., Thyss A. (2016): A multicenter phase II study of sepantronium bromide (YM155) plus rituximab in patients with relapsed aggressive B-cell Non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia & lymphoma* **57**(8), 1848–1855.
- Pardo B., Gómez-González B., Aguilera A. (2009): DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **66**(6), 1039–1056.
- Park C. M., Park M. J., Kwak H. J., Lee H. C., Kim M. S., Lee S. H., Park I. C., Rhee C. H., Hong S. I. (2006): Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Cancer research* **66**(17), 8511–8519.
- Park G. Y., Wilson J. J., Song Y., Lippard S. J. (2012): Phenanthriplatin, a monofunctional DNA-binding platinum anticancer drug candidate with unusual potency and cellular activity profile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(30), 11987–11992.
- Pâques F., Haber J. E. (1999): Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **63**(2), 349–404.
- Pavlov Y. I., Mian I. M., Kunkel T. A. (2003): Evidence for preferential mismatch repair of lagging strand DNA replication errors in yeast. *Current biology : CB* **13**(9), 744–748.
- Pegg A. E., Dolan M. E., Moschel R. C. (1995): Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **51**, 167–223.
- Pleschke J. M., Kleczkowska H. E., Strohm M., Althaus F. R. (2000): Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *The Journal of biological chemistry* **275**(52), 40974–40980.
- Plunkett W., Huang P., Xu Y. Z., Heinemann V., Grunewald R., Gandhi V. (1995): Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potentialiation. *Seminars in oncology* **22**(4, Suppl 11), 3–10.
- Podlutzky A. J., Dianova I. I., Wilson S. H., Bohr V. A., Dianov G. L. (2001): DNA synthesis and dRPase activities of polymerase beta are both essential for single-nucleotide patch base excision repair in mammalian cell extracts. *Biochemistry* **40**(3), 809–813.
- 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.

- Pommier Y. (2006): Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature reviews. Cancer* **6**(10), 789–802.
- Pouliot J. J., Yao K. C., Robertson C. A., Nash H. A. (1999): Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. *Science (New York, N.Y.)* **286**(5439), 552–555.
- Prasad R., Lavrik O. I., Kim S. J., Kedar P., Yang X. P., Vande Berg B. J., Wilson S. H. (2001): DNA polymerase beta -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry* **276**(35), 32411–32414.
- Prasad R., Singhal R. K., Srivastava D. K., Molina J. T., Tomkinson A. E., Wilson S. H. (1996): Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. *The Journal of biological chemistry* **271**(27), 16000–16007.
- Pujade-Lauraine E., Ledermann J. A., Selle F., Gebski V., Penson R. T., Oza A. M., Korach J., Huzarski T., Poveda A., Pignata S., Friedlander M., Colombo N., Harter P., Fujiwara K., Ray-Coquard I., Banerjee S., Liu J., Lowe E. S., Bloomfield R., Pautier P., SOLO2/ENGOT-Ov21 investigators (2017): Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* **18**(9), 1274–1284.
- Qin Q., Cheng H., Lu J., Zhan L., Zheng J., Cai J., Yang X., Xu L., Zhu H., Zhang C., Liu J., Ma J., Zhang X., Dai S., Sun X. (2014): Small-molecule survivin inhibitor YM155 enhances radiosensitization in esophageal squamous cell carcinoma by the abrogation of G2 checkpoint and suppression of homologous recombination repair. *Journal of hematology & oncology* **7**, 62.
- Ramadan K., Shevelev I. V., Maga G., Hübscher U. (2004): De novo DNA synthesis by human DNA polymerase lambda, DNA polymerase mu and terminal deoxyribonucleotidyl transferase. *Journal of molecular biology* **339**(2), 395–404.
- Rauch A., Hennig D., Schäfer C., Wirth M., Marx C., Heinzl T., Schneider G., Krämer O. H. (2014): Survivin and YM155: how faithful is the liaison?. *Biochimica et biophysica acta* **1845**(2), 202–220.
- Ray Chaudhuri A., Callen E., Ding X., Gogola E., Duarte A. A., Lee J. E., Wong N., Lafarga V., Calvo J. A., Panzarino N. J., John S., Day A., Crespo A. V., Shen B., Starnes L. M., de Ruiter J. R., Daniel J. A., Konstantinopoulos P. A., Cortez D., Cantor S. B., Fernandez-Capetillo O., Ge K., Jonkers J., Rottenberg S., Sharan S. K., Nussenzweig, A. (2016): Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature* **535**(7612), 382–387.
- Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A. (2017): The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **18**(10), 610–621.
- Raymond E., Faivre S., Chaney S., Woynarowski J., Cvitkovic E. (2002): Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Molecular cancer therapeutics* **1**(3), 227–235.
- Risbridger G. P., Davis I. D., Birrell S. N., Tilley W. D. (2010): Breast and prostate cancer: more similar than different. *Nature reviews. Cancer* **10**(3), 205–212.
- Roberts S. A., Strande N., Burkhalter M. D., Strom C., Havener J. M., Hasty P., Ramsden D. A. (2010): Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. *Nature*, **464**(7292), 1214–1217.
- Roehm N. W., Rodgers G. H., Hatfield S. M., Glasebrook A. L. (1991): An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of immunological methods* **142**(2), 257–265.
- Rogakou E. P., Pilch D. R., Orr A. H., Ivanova V. S., Bonner W. M. (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry* **273**(10):5858–68.
- Ross D. D., Chen S. R., Cuddy D. P. (1990): Effects of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine on DNA replication intermediates monitored by pH-step alkaline elution. *Cancer research* **50**(9), 2658–2666.
- Rouleau M., Patel A., Hendzel M. J., Kaufmann S. H., Poirier G. G. (2010): PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature Reviews Cancer* **10**(4), 293–301.

- Rouse J., Jackson S. P. (2002a): Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science (New York, N.Y.)* **297**(5581), 547–551.
- Rouse J., Jackson S. P. (2002b): Lcd1p recruits Mec1p to DNA lesions in vitro and in vivo. *Molecular cell* **9**(4), 857–869.
- Roy R., Chun J., Powell S. N. (2011): BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature reviews. Cancer* **12**(1), 68–78.
- Rupnik A., Lowndes N. F., Grenon M. (2010): MRN and the race to the break. *Chromosoma* **119**(2), 115–135.
- Ryan B. M., O'Donovan N., Duffy M. J. (2009): Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer treatment reviews* **35**(7), 553–562.
- Sah N. K., Khan Z., Khan G. J., Bisen P. S. (2006): Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer letters* **244**(2), 164–171.
- Shanbhag N. M., Rafalska-Metcalf I. U., Balane-Bolivar C., Janicki S. M., Greenberg R. A. (2010): ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell* **141**(6), 970–981.
- Sakai W., Swisher E. M., Karlan B. Y., Agarwal M. K., Higgins J., Friedman C., Villegas E., Jacquemont C., Farrugia D. J., Couch F. J., Urban N., Taniguchi T. (2008): Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* **451**(7182), 1116–1120.
- Sanderson R. J., Lindahl T. (2002): Down-regulation of DNA repair synthesis at DNA single-strand interruptions in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient murine cell extracts. *DNA repair* **1**(7), 547–558.
- San Filippo J., Sung P., Klein H. (2008): Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual review of biochemistry* **77**, 229–257.
- Smits V. A. J., Warmerdam D. O., Martin Y., Freire R. (2010): Mechanisms of ATR-mediated checkpoint signalling. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed.)* **15**, 840–853.
- Sarbajna S., West S. C. (2014): Holliday junction processing enzymes as guardians of genome stability. *Trends in biochemical sciences* **39**(9), 409–419.
- Sartori A. A., Lukas C., Coates J., Mistrik M., Fu S., Bartek J., Baer R., Lukas J., Jackson S. P. (2007): Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**(7169), 509–514.
- Scully R. (2000): Role of BRCA gene dysfunction in breast and ovarian cancer predisposition. *Breast cancer research : BCR* **2**(5), 324–330.
- Scully R., Panday A., Elango R., Willis N. A. (2019): DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **20**, 698–714.
- Sessa C. (2011): Update on PARP1 inhibitors in ovarian cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **22** Suppl 8, viii72–viii76.
- Shao G., Patterson-Fortin J., Messick T. E., Feng D., Shanbhag N., Wang Y., Greenberg R. A. (2009): MERIT40 controls BRCA1-Rap80 complex integrity and recruitment to DNA double-strand breaks. *Genes & development* **23**(6), 740–754.
- Sherr C. J. (2004): Principles of tumor suppression. *Cell* **116**(2), 235–246.
- Shiel (n.d.): MedicineNet, radiomimetic definition, dostupné na: <https://www.medicinenet.com/script/main/hp.asp> (2. 11. 2020).
- Schärer O. D., Jiricny J. (2001): Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **23**(3), 270–281.
- Schneider G., Krämer O. H. (2011): NFκB/p53 crosstalk-a promising new therapeutic target. *Biochimica et biophysica acta* **1815**(1), 90–103.
- Schreiber V., Amé J. C., Dollé P., Schultz I., Rinaldi B., Fraulob V., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G. (2002): Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *The Journal of biological chemistry* **277**(25), 23028–23036.
- Sigma Aldrich products U2OS Cells GFP-NUP98, dostupné na: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cll1136?lang=en®ion=CZ> (23. 4. 2021).

- Slaninová I. (n. d.): ‘Onkogeny, nádorové supresory, onkogenní viry‘ [Power Point prezentace], dostupné na: https://is.muni.cz/do/1499/el/estud/lf/js06/bltm0111p/p25_Onkogeny06.pdf (2.11.2020, str 18).
- Sobol R. W., Horton J. K., Kühn R., Gu H., Singhal R. K., Prasad R., Rajewsky K., Wilson S. H. (1996): Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature* **379**(6561), 183–186.
- Soutoglou E., Dorn J. F., Sengupta K., Jasin M., Nussenzweig A., Ried T., Danuser G., Misteli T. (2007): Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nature cell biology* **9**(6), 675–682.
- Srivastava D. K., Berg B. J., Prasad R., Molina J. T., Beard W. A., Tomkinson A. E., Wilson S. H. (1998): Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *The Journal of biological chemistry* **273**(33), 21203–21209.
- Stewart G. S., Panier S., Townsend K., Al-Hakim A. K., Kolas N. K., Miller E. S., Nakada S., Ylanko J., Olivarius S., Mendez M., Oldreive C., Wildenhain J., Tagliaferro A., Pelletier L., Taubenheim N., Durandy A., Byrd P. J., Stankovic T., Taylor A. M., Durocher D. (2009): The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* **136**(3), 420–434.
- Stone M. P., Cho Y. J., Huang H., Kim H. Y., Kozekov I. D., Kozekova A., Wang H., Minko I. G., Lloyd R. S., Harris T. M., Rizzo C. J. (2008): Interstrand DNA cross-links induced by alpha,beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources. *Accounts of chemical research* **41**(7), 793–804.
- Stracker T. H., Petrini J. H. (2011): The MRE11 complex: starting from the ends. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**(2), 90–103.
- Stratton M. R., Campbell P. J., Futreal P. A. (2009): The cancer genome. *Nature* **458**(7239), 719–724.
- Stucki M., Pascucci B., Parlanti E., Fortini P., Wilson S. H., Hübscher U., Dogliotti E. (1998): Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene* **17**(7), 835–843.
- Stupp R., Mason W. P., van den Bent M. J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M. J., Belanger K., Brandes A. A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R. C., Ludwin S. K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J. G., Eisenhauer E., Mirimanoff R. O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, ... National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* **352**(10), 987–996.
- Swords R., Giles F. (2007): Troxacitabine in acute leukemia. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* **12**(3), 219–227.
- Sun Y., Jiang X., Chen S., Fernandes N., Price B. D. (2005): A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(37), 13182–13187.
- Takeda H., Okada M., Suzuki S., Kuramoto K., Sakaki H., Watarai H., Sanomachi T., Seino S., Yoshioka T., Kitanaka C. (2016): Rho-Associated Protein Kinase (ROCK) Inhibitors Inhibit Survivin Expression and Sensitize Pancreatic Cancer Stem Cells to Gemcitabine. *Anticancer research* **36**(12), 6311–6318.
- Tangutoori S., Baldwin P., Sridhar S. (2015): PARP inhibitors: A new era of targeted therapy. *Maturitas* **81**(1), 5–9.
- [“The cell cycle: Figure 1”, OpenStax College, Biology (CC BY 3.0)], dostupné na: <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-reproduction-and-cell-division/hs-the-cell-cycle-and-mitosis/a/hs-the-cell-cycle-and-mitosis-review> (16. 2. 2021).
- Thomassin H., Ménard L., Hengartner C., Kirkland J. B., Poirier G. G. (1992): Poly(ADP-ribosyl)ation of chromatin in an in-vitro poly(ADP-ribose)-turnover system. *Biochimica et biophysica acta* **1137**(2), 171–181.
- Tomkinson A. E., Chen L., Dong Z., Leppard J. B., Levin D. S., Mackey Z. B., Motycka T. A. (2001): Completion of base excision repair by mammalian DNA ligases. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **68**, 151–164.

- Tong D., Liu Q., Liu G., Xu J., Lan W., Jiang Y., Xiao H., Zhang D., Jiang, J. (2017): Metformin inhibits castration-induced EMT in prostate cancer by repressing COX2/PGE2/STAT3 axis. *Cancer letters* **389**, 23–32.
- Torgovnick A., Schumacher B. (2015): DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Frontiers in Genetics* **6**, 157.
- Umar A., Kunkel T. A. (1996): DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *European journal of biochemistry* **238**(2), 297–307.
- Uziel T., Lerenthal Y., Moyal L., Andegeko Y., Mittelman L., Shiloh Y. (2003): Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *The EMBO journal* **22**(20), 5612–5621.
- Valdiglesias V., Giunta S., Fenech M., Neri M., Bonassi S. (2013): γ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutation research* **753**(1), 24–40.
- van der Heijden M. S., Brody J. R., Gallmeier E., Cunningham S. C., Dezentje D. A., Shen D., Hruban R. H., Kern S. E. (2004): Functional defects in the fanconi anemia pathway in pancreatic cancer cells. *The American journal of pathology* **165**(2), 651–657.
- van der Heijden T., Modesti M., Hage S., Kanaar R., Wyman C., Dekker C. (2008): Homologous recombination in real time: DNA strand exchange by RecA. *Molecular cell* **30**(4), 530–538.
- van Moorsel C. J., Pinedo H. M., Smid K., Comijn E. M., Voorn D. A., Veerman G., Lakerveld B., Van der Vijgh W. J., Giaccone G., Postmus P. E., Peters G. J. (2000): Schedule-dependent pharmacodynamic effects of gemcitabine and cisplatin in mice bearing Lewis lung murine non-small cell lung tumours. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **36**(18), 2420–2429.
- Véquaud E., Desplanques G., Jézéquel P., Juin P., Barillé-Nion S. (2016): Survivin contributes to DNA repair by homologous recombination in breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* **155**(1), 53–63.
- Vidal A. E., Boiteux S., Hickson I. D., Radicella J. P. (2001): XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *The EMBO journal* **20**(22), 6530–6539.
- Wagner R. Jr, Meselson M. (1976): Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**(11), 4135–4139.
- Walden H., Deans A. J. (2014): The Fanconi anemia DNA repair pathway: structural and functional insights into a complex disorder. *Annual review of biophysics* **43**, 257–278.
- 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.
- Wang J. C. (2002): Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**(6), 430–440.
- Wang J., Lohman G. J., Stubbe J. (2007): Enhanced subunit interactions with gemcitabine-5'-diphosphate inhibit ribonucleotide reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(36), 14324–14329.
- Wang Q., Chen Z., Diao X., Huang S. (2011): Induction of autophagy-dependent apoptosis by the survivin suppressant YM155 in prostate cancer cells. *Cancer letters* **302**(1), 29–36.
- Wang Y., Liu X., Matsuda A., Plunkett W. (2008): Repair of 2'-C-cyano-2'-deoxy-1-beta-D-arabino-pentofuranosylcytosine-induced DNA single-strand breaks by transcription-coupled nucleotide excision repair. *Cancer research* **68**(10), 3881–3889.
- Wani T. H., Surendran S., Jana A., Chakrabarty A., Chowdhury G. (2018): Quinone-Based Antitumor Agent Sepantronium Bromide (YM155) Causes Oxygen-Independent Redox-Activated Oxidative DNA Damage. *Chemical research in toxicology* **31**(7), 612–618.
- Weinstein I. B., Joe A. K. (2006): Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature clinical practice. Oncology* **3**(8), 448–457.
- Weterings E., Chen D. J. (2008): The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell research* **18**(1), 114–124.
- Wheatley S. P., Altieri D. C. (2019): Survivin at a glance. *Journal of cell science* **132**(7), jcs223826.

- Wheatley S. P., McNeish I. A. (2005): Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *International review of cytology* **247**, 35–88.
- Wiebauer K., Jiricny J. (1990): Mismatch-specific thymine DNA glycosylase and DNA polymerase beta mediate the correction of G.T mispairs in nuclear extracts from human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(15), 5842–5845.
- Williams R. S., Moncalian G., Williams J. S., Yamada Y., Limbo O., Shin D. S., Grocock L. M., Cahill D., Hitomi C., Guenther G., Moiani D., Carney J. P., Russell P., Tainer J. A. (2008): Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair. *Cell* **135**(1), 97–109.
- Wilson D. M. 3rd, Barsky D. (2001): The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutation research* **485**(4), 283–307.
- Winter G. E., Radic B., Mayor-Ruiz C., Blomen V. A., Trefzer C., Kandasamy R. K., Huber K., Gridling M., Chen D., Klampfl T., Kralovics R., Kubicek S., Fernandez-Capetillo O., Brummelkamp T. R., Superti-Furga G. (2014): The solute carrier SLC35F2 enables YM155-mediated DNA damage toxicity. *Nature chemical biology* **10**(9), 768–773.
- Yamamoto H., Ngan C. Y., Monden M. (2008): Cancer cells survive with survivin. *Cancer science* **99**(9), 1709–1714.
- Yamauchi T., Nakamura N., Hiramoto M., Yuri M., Yokota H., Naitou M., Takeuchi M., Yamanaka K., Kita A., Nakahara T., Kinoyama I., Matsuhisa A., Kaneko N., Koutoku H., Sasamata M., Kobori M., Katou M., Tawara S., Kawabata S., Furuichi K. (2012): Sepantronium bromide (YM155) induces disruption of the ILF3/p54(nrb) complex, which is required for survivin expression. *Biochemical and biophysical research communications* **425**(4), 711–716.
- Yang S. W., Burgin A. B. Jr, Huizenga B. N., Robertson C. A., Yao K. C., Nash H. A. (1996): A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(21), 11534–11539.
- Yoo S., Dynan W. S. (1999): Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic acids research* **27**(24), 4679–4686.
- Yoon D. H., Shin J. S., Jin D. H., Hong S. W., Jung K. A., Kim S. M., Hong Y. S., Kim K. P., Lee J. L., Suh C., Lee J. S., Kim T. W. (2012): The survivin suppressant YM155 potentiates chemosensitivity to gemcitabine in the human pancreatic cancer cell line MiaPaCa-2. *Anticancer research* **32**(5), 1681–1688.
- You Z., Bailis J. M. (2010): DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends in cell biology* **20**(7), 402–409.
- Yu X., Fu S., Lai M., Baer R., Chen J. (2006): BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes & development* **20**(13), 1721–1726.
- Zhang J., Visser F., King K. M., Baldwin S. A., Young J. D., Cass C. E. (2007): The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. *Cancer metastasis reviews* **26**(1), 85–110.
- Zhang X., Wang X., Xu R., Ji J., Xu Y., Han M., Wei Y., Huang B., Chen A., Zhang Q., Li W., Wang J., Li X., Qiu C. (2018): YM155 decreases radiation-induced invasion and reverses epithelial-mesenchymal transition by targeting STAT3 in glioblastoma. *Journal of translational medicine* **16**(1), 79.
- Zhang Y., Yuan F., Presnell S. R., Tian K., Gao Y., Tomkinson A. E., Gu L., Li G. M. (2005): Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system. *Cell* **122**(5), 693–705.
- Zheng F., Zhang Y., Chen S., Weng X., Rao Y., Fang H. (2020): Mechanism and current progress of Poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors in the treatment of ovarian cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **123**.
- Zhou J., Ahn J., Wilson S. H., Prives C. (2001): A role for p53 in base excision repair. *The EMBO journal* **20**(4), 914–923.

Zou L., Elledge S. J. (2003): Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science (New York, N.Y.)* **300**(5625), 1542–1548.

8 SEZNAM ZKRATEK

20S	základní část proteasomu
5'dRP	5'-deoxyribosa fosfát
53BP1	P53-vázající protein 1
6-4PP	pyrimidin (6-4) pyrimidonový fotoprodukt
8-OxoG	8-oxo-7,8-dihydroguanin
9-1-1	komplex RAD9-RAD1-HUS1
ABC ATPasa	ATP vázající kazeta
ABD	médium pro ředění protilátek
aEJ	alternativní spojování konců
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
AP	apurinový/apyrimidinový
APAF1	aktivační faktor 1 apoptické proteasy
APE1	apurinická-apyrimidická endonukleasa 1
APTX	aprataxin
Ara-C	cytarabin
ara-CTP	arabinofuranosylecytosin trifosfát
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP7A, 7B	ATPasa typu 7A, 7B
ATR	ATM a RAD3-spřízněná kinasa
ATRIP	ATR-interakční protein
BARD1	BRCA1-associated RING domain protein 1
BER	excizní reparace bází

<i>BIRC5</i>	gen kódující survivin
BLM	Bloom syndrome protein
BMN-673	PARP inhibitor
bp	komplementární pár bází
<i>BRCA1, 2</i>	tumor supresorový gen rakoviny prsu typu 1, 2
BTR	komplex proteinů BLM, TOP3 α a RMI1/RMI2
γ H2AX	fosforilovaný histon skupiny H2A
Capan-1	buněčná linie
CCNH	cyklin H
DDB2	poškození DNA vázající protein 2
CDDP	<i>cis</i> -diamindichlorplatina
CDK	cyklin-dependentní kinasa
CFA	Colony Formation Assay
dH ₂ O	destilovaná voda
CLL	chronická lymfatická leukémie
CNDAC	nukleosidový analog, cytotoxické léčivo
cNHEJ	klasické nehomologní spojování konců
CNT	koncentrační nukleosidový transportér
CO ₂	oxid uhličitý
CPD	cyklobutanový pyrimidinový dimer
CS	Cockaynův syndrom
CSA, B	protein Cockaynova syndromu skupiny A, B
CTR1	měďný transportér 1
D-smyčka	dislokační smyčka

DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
dCK	deoxycitidin kinasa
dCTP	deoxycytidin trifosfát
DDR	DNA Damage Response
dGK	deoxyguanosin kinasa
dHJ	dvojité Hollidayovo překřížení
DNA2	DNA replikační helikasa/nukleasa 2
DNA-PK	DNA-dependentní protein kinasa
DNA-PKcs	katalytická podjednotka DNA-PK
dNTP	nukleosidtrifosfát
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DSB	dvouřetězcový zlom DNA
DSBR	systemy pro opravu dvouřetězcových zlomů DNA
Eca109	buněčná linie
EMT	epitelo-mezenchimální přechod
ENT	rovnovážný nukleosidový transportér
ERCC1	protein 1 pro excisní opravu DNA
ETAA1	Ewingův s tumorem asociovaný antigen 1
EXO1	exonukleasa 1
FA	Fanconiho anémie
FAAP24	FA-asociovaný protein 24 kDa
FANCA, ...	protein Fanconiho anémie skupiny A,
FAT a FATC	podjednotky obklopující C-koncovou kinasovou doménu PIKK proteinů

FBS	fetální bovinní sérum
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, USA
FEN1	klapková endonukleasa 1
FITC	fluorescenční kanál použitý pro Alexa Fluor 488
G1, S, G2, M	fáze buněčného cyklu
GG-NER	GGR, globální genomové NER
GSH	redukováný glutathion
GTBP	G/T-vázající protein
GTF2H1, ...	Všeobecný transkripční faktor IIH podjednotka 1, ...
HR23B	opravný protein RAD23 homolog B
HUS1	hemolyticko-uremický syndrom 1
H1299	buněčná linie
H2AX	histon patřící do skupiny H2A
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
H2AK15Ub	histon H2A s monoubikvitinovaným lysinem K15
H4K20me1	histon H4 s monoethylovaným lysinem K20
HER2	receptor 2 lidského epidermálního růstového faktoru
HNPCC	hereditární nepolyposní kolorektální karcinom
HP1	heterochromatinový protein
HR	homologní rekombinace
HRPC	hormon-rezistentní rakovina prostaty
CHK1, 2	checkpoint kinasa 1, 2
IAP	inhibitor apoptosy
IDL	deleční či inzerční smyčka

I-D2	FANCD2 a FANCI heterodimer
ILF3	vazebný faktor 3 zesilovače interleukinu
kDa	kilodalton
Ku70/Ku80	heterodimer XRCC6 a XRCC5
LigI, ...	ligasa I, ...
MDC1	mediátor kontrolního bodu poškození DNA 1
MDS	myelodisplastický syndrom
MGMT	O ⁶ -methylguanin-DNA methyltransferasa
MLH1, 3	lidský MutL homolog 1, 3
MMR	reparace chybného párování bází
MNAT1	faktor aktivace 1 CDK-aktivační kinasy
MRE11	protein meiotické rekombinace 11
MRN	komplex MRE11-RAD50.NBS1
MRP	protein spojený s rezistencí na více léčiv
MSH	MutS homolog
MT	metalothionein
MYC	skupina protonkogenů
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1
NER	excizní reparace nukleotidů
NF110	jaderný faktor 110
NF-κB	jaderný faktor κB
NHEJ	nehomologní spojování konců
NT	nukleosidový transportér
OCT	transportér organických kationtů

P53	tumor supresor
P54NRB	jadernou RNA-vázající protein 54 kilodaltonů
PARylace	poly(ADP) ribosylace
PARP	poly(ADP-ribosa) polymeráza
PBS	fosfátový pufr
PCNA	proliferační jaderný antigen
PIKK	fosfatidylinositol-3-kinasové proteiny
PMS2	MMR endonukleasa 2
PNKP	polynukleotid kinasa 3'-fosfatasa
Pol	polymerasa
Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂	cisplatina, Peyronův chlorid
RAD3, ...	skupina opravných proteinů
RAP80	s receptorem spojený protein 80
RB	retinoblastomový protein
RBBP8	retinoblastom-vázající protein 8
RCF	relativní centrifugační síla
RECQ	skupina helikas
RF-C	replikační faktor C
RING	Really Interesting New Gene
RMI1	methylthioribosa-1-fosfát isomerasa
RNAPI, II	RNA polymerasa I, II
RNF8, 168	RING Finger protein 8, 168
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
RPA	replikační protein A

RPMI	růstové médium (Roswell Park Memorial Institute)
RTEL1	helikasa 1 regulující elongaci telomer
SDSA	na syntéze závislé žíhání vlákna
Ser	serin
SLC35F2	přenašeč rozpuštěné látky z rodiny 35, člen F2
SP1	specifický protein 1
SSA	žíhání jednoho vlákna DNA
SSB	jednořetězcový zlom DNA
SSBR	reparace jednovláknového zlomu
ssDNA	jednovláknová DNA
TC-NER	NER spojený s transkripcí (TCR)
TDP1	tyrosyl-DNA fosfodiesterasa 1
TE13	buněčná linie
TFIIH	lidský transkripční faktor II
TIP60	histonová acetyltransferasa
TK1, 2	thymidin kinasa 1, 2
TOP	topoisomerasa
TOP1cc	TOP1-DNA štěpné komplexy
TOPBP1	topoisomerasu-vázající protein 1
TTD	trichothiodystrofie
Tx-100	Triton X-100
TxRED	fluorescenční kanál použitý pro Alexa Fluor 568
USP1	ubikvitin-specifická peptidasa 1
UV	ultrafialový

VHL	Von Hippel-Lindau tumor-supresor
Waf1	CDKN1A = inhibitor A1 cyklin-dependentní kinasy
WRN	ATP-dependentní helikasa Wernerova syndromu
XP	Xeroderma pigmentosum
XPA, B...	Xeroderma pigmentosum protein skupiny A, B, ...
XLF	XRCC4 podobný faktor
XRCC	X-ray repair cross-complementing protein
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid
YM155	sepantronium bromid