

OPRAVA DVOJVLÁKNOVÝCH ZLOMOV DNA V PODMIENKACH DEFICITU VOĽNÉHO UBIKVITÍNU / PROTEOTOXICKÉHO STRESU

KATARÍNA CHROMÁ

*Ústav molekulárnej a translačnej medicíny, Lekárska fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Hněvotinská 5, 779 00 Olomouc
katarina.chroma@upol.cz*

Došlo 9.5.17, prijaté 7.7.17.

Kľúčové slová: dvojvláknový zlom DNA, ubikvitín, proteazóm, RNF168, 53BP1

Obsah

1. Úvod
2. Dvojvláknové zlomy DNA a ich oprava
 - 2.1. Homologická rekombinácia
 - 2.2. Spájanie nehomologických koncov
3. Systém ubikvitín-proteazóm ako funkčný komponent opravy dvojvláknových zlomov DNA
 - 3.1. Ubikvitinácia a ubikvitinačný kód
 - 3.2. Ubikvitín-závislá signalizácia dvojvláknových zlomov DNA
 - 3.3. Úloha proteazómu v bunkovej odpovedi na dvojvláknové zlomy DNA
4. Zvýšená aktivita E3 ligázy RNF168 a jej vplyv na opravu dvojvláknových zlomov DNA v podmienkach indukovaného proteotoxického stresu
5. Záver

1. Úvod

Dvojvláknové zlomy DNA (double-strand breaks, DSB) sú považované za jedno z najzávažnejších poškodení DNA, ktoré môže byť indukované rôznymi endogénnymi a exogénnymi faktormi. Keďže neopravené alebo chybné opravené DSB môžu iniciovať procesy vedúce k mutagenéze, karcinogenéze prípadne bunkovej smrti, oprava tohto typu poškodenia DNA je významná predovšetkým z hľadiska udržiavania stability genómu a životaschopnosti buniek¹. V cicavčích bunkách dominujú dve dráhy zodpovedné za opravu DSB: homologická rekombinácia (homologous recombination, HR) a spájanie nehomologických koncov DNA (non-homologous end joining, NHEJ).

Pre správne načasovanie a priebeh týchto opravných dráh je nevyhnutná aktivita širokého spektra špecifických

proteínov, ktoré zabezpečujú bunkovú odpoveď na poškodenie DNA. Spomínaná aktivita ale aj stabilita a lokalizácia proteínov zúčastňujúcich sa signalizácie a opravy poškodenej DNA je prísne kontrolovaná prostredníctvom mechanizmov posttranslačnej modifikácie proteínov, akými sú napr. fosforylácia, metylácia, acetylácia, parylácia a ubikvitinácia².

Posttranslačná modifikácia nazývaná „ubikvitinácia“, teda prenos signálu prostredníctvom signálnej molekuly „ubikvitín“, sa v posledných rokoch ukázala byť kľúčovou z hľadiska signalizácie a opravy DSB (cit.³). Konkrétne, ubikvitín-signalizačná kaskáda pozostávajúca z interagujúcich proteínov UBC13-RNF8-RNF168, ktorá je zodpovedná za prenos informácie z miesta DSB ku konečným proteínom spúšťajúcim opravu DSB, je stále predmetom mnohých experimentálnych štúdií⁴.

V podmienkach pretrvávajúceho nedostatku voľného ubikvitínu definovaného aj ako „proteotoxický“ stres dochádza k spomaleniu až úplnému utlmeniu ubikvitín-závislých procesov v bunke, vrátane signalizácie a opravy DSB (cit.⁵). V našej aktuálnej publikácii⁶ odhaľujeme mechanizmus, akým sú niektoré nádorové bunkové línie schopné deficit ubikvitínu prekonať a aj v podmienkach indukovaného proteotoxického stresu spúšťať opravu DSB preferenčne prostredníctvom NHEJ. Keďže je NHEJ považovaná za nedokonalý opravný mechanizmus DSBs, jedná sa zároveň o nový pohľad na proteotoxický stres a jeho vplyv na nestabilitu genómu nádorových buniek.

Detailnejšiemu popisu opravných dráh dvojvláknových zlomov DNA – HR a NHEJ; ubikvitín-závislej signalizácii poškodenia DNA v podmienkach proteotoxického stresu ako aj mechanizmu zodpovednému za spomínaný špecifický fenomén opravy DSB v podmienkach nedostatku ubikvitínu budú venované nasledujúce strany tohto prehľadného článku.

2. Dvojvláknové zlomy DNA a ich oprava

DNA je neustále vystavená pôsobeniu rôznych mutagénnych faktorov, ktoré môžu spôsobiť jej poškodenie. Frekvenciu, s akou k tomuto poškodeniu dochádza, možno kvantifikovať v rozsahu 1000 až 1 000 000 porúch v jednej bunke za deň. K poškodeniu DNA môže dôjsť vplyvom vnútorných ako aj vonkajších faktorov prostredia. K vnútorným faktorom patria predovšetkým reaktívne metabolity kyslíka, ktoré vznikajú ako vedľajšie produkty normálneho bunkového metabolizmu, ale patria sem aj chyby vznikajúce počas replikácie DNA. Najčastejšími vonkajšími faktormi spôsobujúcimi poškodenie DNA sú rôzne formy elektromagnetického žiarenia, predovšetkým ultrafialové žiarenie pochádzajúce zo slnka, gama žiarenie,

Röntgenové žiarenie, ale patria sem aj chemické mutagény, interkalačné činidlá, vírusy, rastlinné toxíny a mnohé ďalšie.

Poškodenia DNA predstavujú fyzické abnormality v štruktúre makromolekuly DNA, pričom jednotlivé lézie sa výrazne líšia v rozsahu ich biologických následkov. Tie najzávažnejšie, ku ktorým patria DSB, narušujú integritu oboch reťazcov DNA a predstavujú tak blok pre všetky procesy späté s metabolizmom tejto makromolekuly. V prípade, že takéto poškodenia nie sú opravené, sú pre bunku toxické, keďže spôsobujú blok transkripcie a následne translácie genetickej informácie do príslušného proteínu. V mnohých prípadoch dochádza aj k zastaveniu replikácie a v konečnom dôsledku smrti bunky. Chybné opravené DSB sú u mnohobunkových organizmov potenciálnym zdrojom mutácií, ktorých postupná akumulácia môže vyústiť do transformácie normálnej bunky na bunku nádorovú a ohroziť tak celý organizmus¹.

Z horeuvedených dôvodov hrá oprava poškodenej DNA kľúčovú úlohu pri udržiavaní stability genómu, životaschopnosti buniek a v konečnom dôsledku aj zachovaní bežných fyziologických funkcií organizmu. Ako odpoveď na potenciálnu hrozbu vyplývajúcu z neopraveného resp.

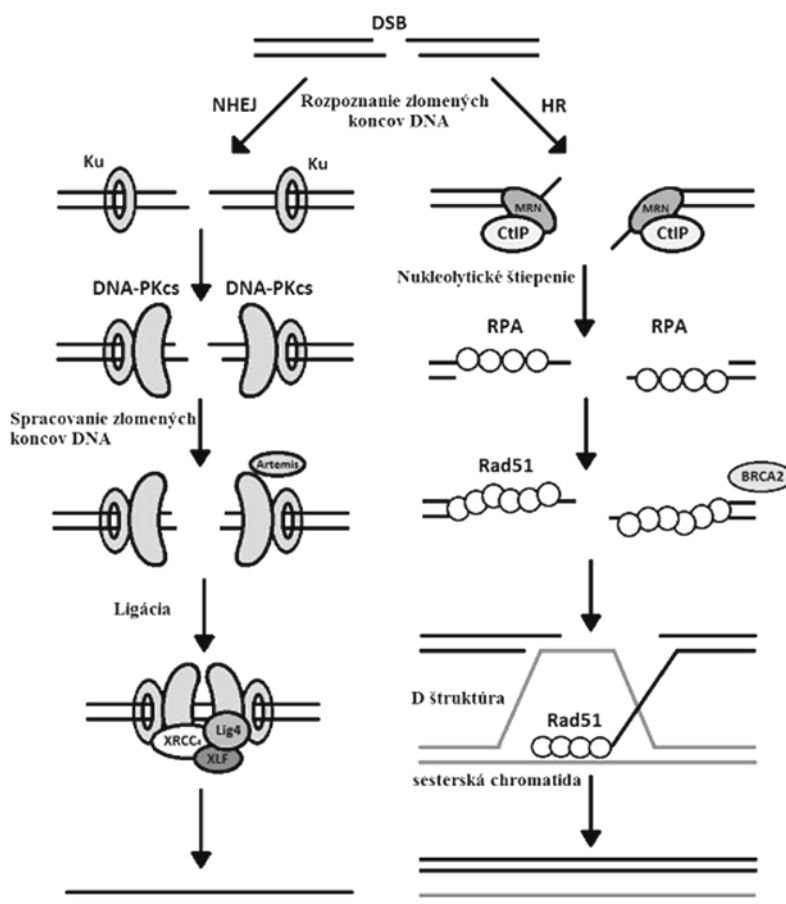
chybné opravených DSB sa bunkám počas evolúcie vyvinuli mechanizmy, pomocou ktorých monitorujú a opravujú porušené reťazce DNA.

Po tom, čo špecifické senzorké proteíny zaregistrujú abnormalitu v štruktúre reťazcov DNA, dochádza podobne ako u iných signálnych dráh k amplifikácii a postupnému prenosu signálu k terminálnym akceptorom, ktoré ho spracujú a v konečnej fáze posunú priamo ku komponentom zodpovedným za opravu poškodenia⁷.

Rozlišujeme dva základné mechanizmy opravy DSB označované ako HR a NHEJ (obr. 1)⁸. Oba opravné mechanizmy sú úzko späté s normálnou ľudskou fyziológiou, čoho dôkazom je existencia ochorení, ktorých molekulárnou podstatou je porucha v oprave DSB, a ktorých klinický prejav zahŕňa zvýšenú incidenciu onkologických ochorení⁹.

2.1. Homologická rekombinácia

HR bola prvýkrát popísaná v 40. rokoch Lederbergom (1947) a ešte mnoho rokov potom bola považovaná len za proces špecifický pre tvorbu gamét podobný eukaryotickej meióze¹⁰. Až v polovici 60. rokov keď boli obja-



Obr. 1. Model základných krokov hlavných opravných dráh dvojitých zlomov DNA: Spájanie nehomologických koncov DNA (NHEJ) versus homologická rekombinácia (HR); prevzaté z cit.⁸

vené prvé rekombinačné mutanty, ktoré boli zároveň citlivé na poškodenia DNA, sa objavila možná súvislosť rekombinácie s opravou DSBs prostredníctvom HR¹¹.

HR prebieha hlavne v S a G2 fáze bunkového cyklu, v prítomnosti novonasynthesized sesterskej molekuly DNA, ktorej podobná alebo úplne identická sekvencia slúži ako templát pre bezchybnú opravu DSB (cit.¹²). Iniciačným krokom pri HR je nukleolytické štiepenie na oboch koncoch zlomu koordinované proteínmi CTIP a MRN komplexom tak, aby na oboch stranách DSB vznikli 3'-OH prečnievajúce jednvláknové konce¹³. Po stabilizácii jednvláknovej DNA väzbou proteínu RPA dochádza k jeho nahradeniu rekombinázou RAD51 a vytvoreniu štruktúry nazývanej presynaptický nukleoproteínový filament. V nasledujúcom kroku RAD51 katalyzuje preniknutie jednvláknového konca poškodenej DNA k homologickej sekvencii sesterskej chromatidy druhej intaktnej DNA molekuly a vytvára tzv. D-štruktúru (D loop). Ďalšie kroky zahŕňajú syntézu poškodenej časti vlákna od 3'-OH konca pomocou enzýmu DNA polymeráza, následný rozpad D štruktúr a spojenie oboch koncov jednvláknovej DNA pomocou enzýmu DNA ligáza¹⁴ (obr. 1)⁸.

Najznámejšie proteíny HR sú tzv. regulátory funkcie proteínu RAD51, BRCA1 a BRCA2, ktoré sú zodpovedné za vytvorenie RAD51 filamentu esenciálneho pre migráciu jednvláknovej DNA a následnú reparačnú syntézu. Mutácie v génoch kódujúcich tieto dva proteíny limitujú ich funkcie a sú preto asociované s defektnou opravou DSB, akumuláciou poškodenej DNA a teda nestabilitou genómu, charakteristickým znakom nádorových buniek. Špecifické zdedené mutácie v génoch BRCA1 a BRCA2 sú preto asociované so zvýšeným rizikom rakoviny prsníka, vaječníkov a prostaty u mužov¹⁵. Súčasné štúdie poukazujú na možnú efektívnu terapiu nádorových ochorení charakteristických defektnou HR, teda deficitom BRCA1 a BRCA2, použitím inhibítora PARP1 – olaparibu¹⁶. Inhibíciou enzýmu PARP1 dochádza k bloku opravy endogénne indukovaných jednvláknových zlomov DNA, ktoré nasledovne prostredníctvom replikácie DNA generujú zlomy dvojvláknové. Tieto špecifické lézie sú v normálnych bunkách opravované preferenčne prostredníctvom HR, no v bunkách s absenciou BRCA1 a BRCA2 homologická rekombinácia neprebíha a neopravené dvojvláknové zlomy DNA indukujú proces programovanej bunkovej smrti¹⁷.

2.2. Spájanie nehomologických koncov

NHEJ bolo prvýkrát pozorované v bunkách cicavcov, u ktorých reprezentuje hlavný mechanizmus opravy DSB. Ide o relatívne jednoduchý a rýchly opravný proces, uskutocňujúci sa preferenčne v G1 a G0 fázach bunkového cyklu, t.j. bez prítomnosti homologického sesterského templátu DNA. Po vytvorení DSB sú zlomené konce DNA upravené tak, aby vytvorili vhodný substrát pre priamu ligáciu. Kľúčovým faktorom NHEJ je DNA-závislá proteínkináza (DNA-PK) a jej katalytická podjednotka (DNA-

PKcs), viažuca sa na zlomené konce DNA po ich detekcii dvoma DNA-viažúcich komponentmi (KU70 a KU80)¹³, a komplex pozostávajúci z DNA ligázy IV a proteínu XRCC4 (cit.¹⁸). DNA-PK sa viaže na voľné zlomené konce DNA a aktivuje komplex MRN (pozostávajúci z Mre11/Rad50/Nbs1 proteínov), ktorý pritiahne konce vlákien k sebe. Spojenie vlákien následne zabezpečuje DNA ligáza IV (obr. 1)⁸.

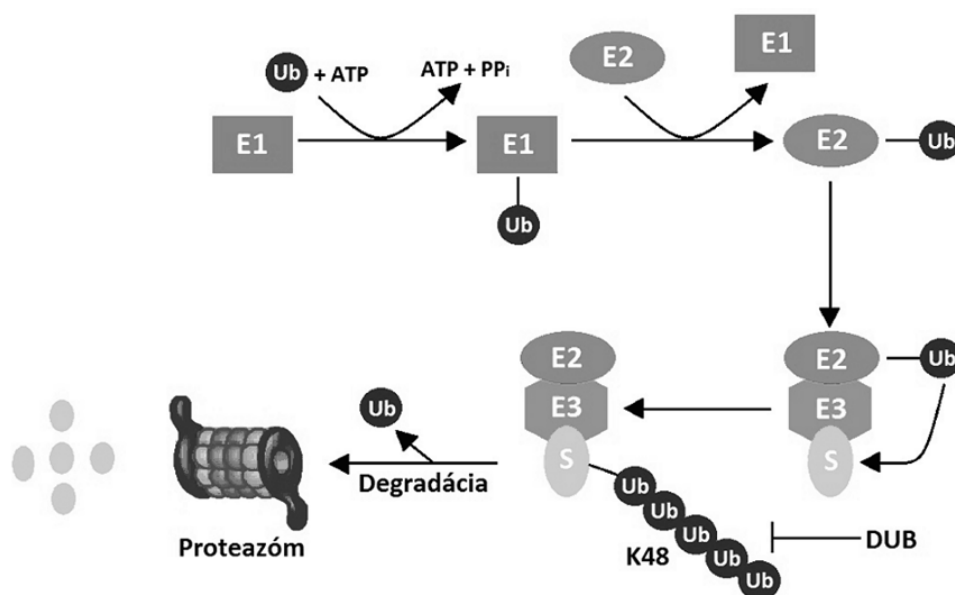
Hoci DSB môžu byť prostredníctvom NHEJ spojené presne, pomerne častým javom je vznik malých prestávok genetickej informácie ako napr. krátkych inzercí a delécií, ktoré môžu pri prevalencii tejto opravnej dráhy DSB prispieť ku genomickej nestabilite a nádorovej transformácii bunky¹⁹. V prípade už spomínanej defektnej HR/absencie BRCA1 dochádza k presmerovaniu opravy DSB prítomných v S fáze na chybnú NHEJ, ktorá vytvára mutagénne štruktúry DNA a prispieva tak k vzniku chromozomálnych prestávok²⁰. Bunky so zvýšenou aktivitou NHEJ by teda podobne ako bunky s nefunkčnou HR/absenciou BRCA1 mohli preukazovať citlivosť k inhibítora PARP1 – olaparibu.

3. Systém ubikvitín-proteazóm ako funkčný komponent opravy dvojvláknových zlomov DNA

Posttranslačné modifikácie proteínov sú účinnými nástrojmi, ktorými bunky regulujú funkcie proteínov. Ubikvitín a posttranslačná modifikácia využívajúca túto molekulu nazývaná ubikvitinácia sú kľúčové komponenty regulácie bunkovej odpovede na DSB. Význam, rozmanitosť a komplexný kontext mechanizmu ubikvitinácie dnes dosahuje úroveň najvýznamnejšej posttranslačnej modifikácie proteínov, ktorou je fosforylácia.

3.1. Ubikvitinácia a ubikvitináčny kód

Ubikvitín je malý polypeptid zložený zo 76 aminokyselín s celkovou molekulovou hmotnosťou 8,5 kDa (cit.²¹). Samotný proces ubikvitinácie predstavuje proces vedúci k označeniu substrátového proteínu jednou molekulou ubikvitínu (monoubikvitinácia), alebo naviazanie reťazca ubikvitínov (polyubikvitinácia). Ubikvitinácia pozostáva z troch základných krokov a vyžaduje prítomnosť troch rôznych tried enzýmov (E1 až E3)²² (obr. 2)²³. Počiatočným krokom je ATP-závislá aktivácia ubikvitínu ubikvitín-aktivujúcim enzýmom E1. Ubikvitín-aktivujúci enzým E1 následne prenáša ubikvitín k ubikvitín-konjugáčnemu enzýmu E2. Posledným krokom je naviazanie ubikvitínu na cieľový substrát pomocou ubikvitín-ligázy E3. Vzniká tak izopeptidová väzba medzi lyzínom substrátového proteínu a C-koncovým glycínom ubikvitínu²⁴. Zatiaľ čo E1 enzýmy sú málopočetné (cca 8 foriem), E2 enzýmov bolo identifikovaných niekoľko desiatok (cca 35 foriem) a E3 enzýmov až viac ako 1000. Substrátová špecificita ubikvitinácie je daná práve veľkým počtom E3 ubikvitín-ligáz, pričom každá z nich je špecifická pre limitovaný počet substrátových proteínov.



Obr. 2. Ubikvitinácia substrátového proteínu a jeho degradácia v proteazóme za súčasnej recyklácie molekúl ubikvitínu; Ub – ubikvitín, DUB – deubikvitináčny enzým, prevzaté z cit.²³

Kľúčovým faktorom rozhodujúcim o osude substrátového proteínu je aj typ ubikvitínových reťazcov, ktorým bude v procese ubikvitinácie označený. V sekvencii ubikvitínu sa nachádza sedem lyzínových zvyškov, medzi ktorými môže dochádzať k väzbe a teda tvorbe už spomínaných polyubikvitínových reťazcov. Najbežnejším spôsobom väzby dvoch molekúl ubikvitínu v polyubikvitínovom reťazci je prostredníctvom lyzínu 48 (tzv. K48 reťazce). Naviazanie K48 reťazca na cieľový proteín predstavuje signál pre degradáciu takto označeného proteínu v proteazóme²⁵. Druhé najčastejšie spojenie ubikvitínu cez lyzín 63 (tzv. K63 reťazce) hrá úlohu predovšetkým v bunkovej signalizácii²⁶. Existujú však aj reťazce ubikvitínu pospájané cez lyzíny 6, 11, 27, 29 a 33. V súčasnej dobe nepoznáme význam celej palety týchto signálov, no vo väčšine prípadov sa experimentálne dokázala ich spojitost' s degradáciou takto označených substrátových proteínov²⁷.

3.2. Ubikvitín-závislá signalizácia dvojvláknových zlomov DNA

Odpoveď bunky na DSB môže byť v experimentálnych *in vitro* podmienkach pozorovaná ako akumulácia množstva signálnych a opravných faktorov na chromatin v oblasti lézie. Väzbu proteínov na chromatin v mieste poškodenia je možné detekovať pomocou imunofluorescenčných techník. Po indukcii DNA poškodenia ionizujúcim žiarením je takto možné pozorovať zreteľné subnukleárne štruktúry nazývané fokusy indukované ionizujúcim žiarením (IRIF, Ionizing Radiation Induced Foci)²⁸ (obr. 3)⁶. Posledné roky výskumu v oblasti opravných dráh

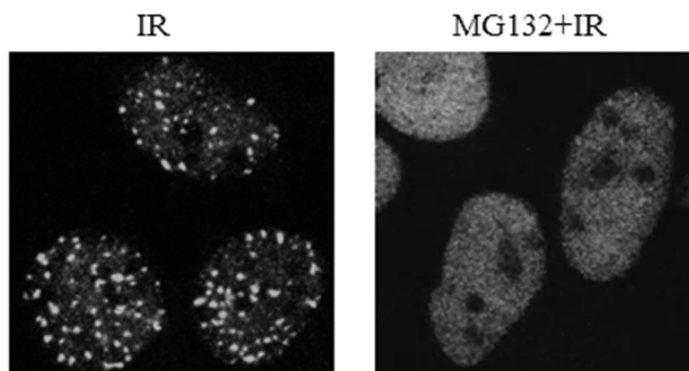
DNA poukazujú na kľúčovú úlohu ubikvitinácie pri tvorbe spomínaných fokusov a teda špecifickú funkciu tejto posttranslačnej modifikácie v signalizácii prítomnosti DSB²⁹.

Chromatin je v oblasti DSB obohatený o K63 reťazce ubikvitínu, ktoré sú využívané na aktiváciu cieľových proteínov HR ako aj NHEJ, predovšetkým BRCA1 a 53BP1. Za tento proces je zodpovedná hlavne ubikvitín-signalizačná kaskáda pozostávajúca z E2 ubikvitín konjugačného enzýmu UBC13 a dvoch E3 ubikvitín ligáz RNF8 a RNF168 (cit.³⁰). V kontraste k esenciálnej úlohe už spomínaného proteínu BRCA1 v HR, proteín 53BP1 je považovaný za kľúčový mediátor NHEJ, keďže v G1 fáze bunkového cyklu fyzicky blokuje väzbu HR proteínov zodpovedných za nukleolytické štiepenie koncov zlomu a tiež väzbu ďalších interagujúcich proteínov s podobnou funkciou³¹.

Sled signalizačných krokov vedúcich k naviazaniu proteínu 53BP1 na chromatin v oblasti DSB lézie možno rozdeliť do dvoch poddráh, pričom pre presný priebeh oboch z nich je esenciálna práve posttranslačná modifikácia – ubikvitinácia. E3 ligáza RNF8 najskôr pomocou E2 konjugačného enzýmu UBC13 ubikvitínuje histón H1, ktorý je špecifickým väzobným miestom pre druhú E3 ligázu RNF168 (cit.³²). RNF168 ako esenciálny komponent signálnej dráhy DSB ubikvitínuje histón H2A na lyzíne K15 (H2AK15ub), čím vytvára unikátnu štruktúru pre väzbu 53BP1 (cit.³³).

Okrem K63 reťazcov ubikvitínu sa pri signalizácii DSB aj samotnej aktivite proteínu 53BP1 uplatňuje aj proteín-degradačný signál vo forme K48 ubikvitínových reťazcov. Proteín 53BP1 sa viaže nielen na H2AK15ub, ale aj na histón H4 dimetylovaný na lyzíne 20 (H4K20me2),

Fokusy 53BP1



Obr. 3. Prítomnosť 53BP1 fokusov v jadrách nádorovej bunkovej línie U2OS po gama žiarení ($2 \text{ Gy} = 2 \text{ kg m}^2 \text{ s}^{-2}$) a ich absencia za podmienok nedostatku voľného ubikvitínu po aplikácii inhibítora proteazómu MG132, mierka $10 \mu\text{M}$; prevzaté z cit.⁶

ktorý je za normálnych fyziologických podmienok v bunke vo väzbe s dvoma histón demetylázami JMJD2A a L3MBTL1. Prítomnosť poškodenia DNA spúšťa aktiváciu RNF8-RNF168 signálnej dráhy, ktorá iniciuje K48 ubikvitináciu a následnú proteazomálnu degradáciu oboch kompetítorov 53BP1 – JMJD2A a L3MBTL1, čím umožňuje jeho väzbu na H4K20me2 (cit.³⁴).

3.3. Úloha proteazómu v bunkovej odpovedi na dvojvláknové zlomy DNA

Všetky intracelulárne a niektoré extracelulárne proteíny sú kontinuálne degradované a nahrádzané syntézou nových proteínov. Oba tieto deje musia zostať vo vzájomnej rovnováhe, pretože jej narušenie by mohlo potenciálne viesť k nahromadeniu nefunkčných alebo poškodených proteínov, čo má vážne dôsledky pre celkový metabolizmus bunky, prípadne celého organizmu. Bunky obsahujú niekoľko proteolytických systémov, ktoré zaisťujú vysoko špecifickú a kontrolovanú degradáciu proteínov. Jedným z týchto systémov je ubikvitín-proteazómový systém, zložitý molekulárny stroj slúžiaci k degradácii proteínov konjugovaných s K48 ubikvitínom.

Ubikvitín-proteazómový systém (UPS) je okrem jedinečnej úlohy v udržiavaní proteínovej homeostázy zapojený svojou činnosťou do mnohých ďalších biologických dejov v bunke. Ako funkčný komponent hrá úlohu v regulácii bunkového cyklu, kontrole novonasynthesized proteínov, regulácii transkripcie, génovej expresie a tiež imunitnej odpovede a procesu starnutia³⁵. Najnovšie experimentálne štúdie však poukazujú aj na významnú úlohu UPS v opravných procesoch DSB.

Úlohu UPS v oprave DSBs je možné vysvetliť dvoma základnými modelmi:

- proteazóm ako priamy funkčný komponent opravy DSB,

- proteazóm ako hlavný regulačný komponent, nepriamo koordinujúci ubikvitín-závislé deje signalizácie a opravy DSB, teda samotnú väzbu a funkciu proteínov opravy DSB.

Prvý predpoklad naznačujúci priamu funkciu proteazómu v procese opravy DSB pochádza zo štúdia kvasiniek, kde bol identifikovaný malý acidický proteazómový proteín DSS1, naviazaný na miesta poškodenia DNA³⁶. V cicavčích bunkách bol neskôr tento proteín popísaný ako mediátor HR, ktorý interakciou s proteínom BRCA2 reguluje väzbu rekombinázy RAD51 a teda tvorbu nukleoproteínového filamentu esenciálneho pre presnú reparačnú syntézu poškodeného reťazca DNA³⁷. DSS1 podobne ako už spomínané opravné proteíny BRCA1 a 53BP1 rozpoznáva oblasti DSB, čo opätovne potvrdzuje jeho funkciu v signalizácii a oprave DSB.

Druhým proteazómovým proteínom, ktorý sa priamo zúčastňuje opravy DSB, je deubikvitinačný enzým (DUB, deubiquitinating enzyme) POH1 (cit.³⁸). Ako DUB plní funkciu antagonistu E3 ubikvitín ligáz, tým že štiepi ubikvitín z miest jeho naviazania na substrát. Aktivity POH1 je zahrnutá v oboch opravných dráhach. V rámci homologickej rekombinácie proteín POH1 reguluje kvantitatívne zastúpenie už spomínaného proteínu DSS1 na chromatíne v oblasti lézie a teda nepriamo väzbu proteínu RAD51 (cit.³⁸). V oprave DSB spájaním nehomologických koncov POH1 ovplyvňuje väzbu proteínu 53BP1 prostredníctvom antagonizmu aktivity E3 ubikvitín ligázy RNF168. POH1 odstraňuje K63 ubikvitínové reťazce zo substrátov enzýmu RNF168 ako aj K48 degradačný signál z proteínu JMJD2A, ktorý následkom toho nie je degradovaný a fyzicky zabraňuje väzbe 53BP1 na poškodený chromatin³⁸.

Proteazóm figuruje v oprave DSB aj nepriamo prostredníctvom signalizácie cez ubikvitín. V experimentálnych podmienkach možno v bunkách pozorovať utlmenie alebo úplne zastavenie priebehu opravných dráh indu-

kovaných prostredníctvom DSB po aplikácii inhibitorov proteazómu, akými sú bortezomib a MG132. Inhibícia proteazómu vyvolá v bunke akumuláciu polyubikvitinovaných proteínov, ktoré mali byť pôvodne degradované za súčasnej recyklácie naviazaných molekúl ubikvitínu³⁹. Tento stav nadbytku polyubikvitinovaných proteínov v bunke so všetkými jeho následkami, akými sú nedostatok voľného ubikvitínu a sprievodný blok ubikvitín-závislých signálnych dráh, je definovaný aj ako „proteotoxický stres“ a môže v konečnom dôsledku vyústiť až k programovanej smrti bunky⁴⁰.

V podmienkach znefunkčenia proteazómu (resp. jeho zníženej funkcie) dochádza teda k vyčerpaniu zásob voľného ubikvitínu a pretrvávaním takéhoto stavu až k postupnému zastaveniu ubikvitín-závislých signálnych dráh. V súvislosti so signalizáciou a opravou DSB bola okrem iných komponentov opravných dráh experimentálne ukázaná absencia fokusov 53BP1 a teda ubikvitín-závislej väzby 53BP1 proteínu na poškodený chroma- tín v podmienkach inhibície proteazómu^{39,41} (obr. 3)⁶. Táto spojitosť efektívnej opravy DSB s aktivitou proteazómu vyzdvihuje esenciálnu úlohu recyklačnej kapacity UPS pre správny priebeh opravných dráh.

4. Zvýšená aktivita E3 ligázy RNF168 a jej vplyv na opravu DSB v podmienkach indukovaného proteotoxického stresu

Ako bolo spomenuté vyššie, odpoveď na DSB je na úrovni chromatinu regulovaná prostredníctvom E3 ubikvitín ligázy RNF168, ktorej výsledkom je ubikvitín-závislá väzba opravných proteínov BRCA1 a 53BP1 (cit.⁴²). Táto signalizácia sprostredkovaná ubikvitínom usmerňuje výber vhodnej opravnej dráhy DSB, toxických poškodení, ktorých početnosť v priebehu tumorigenézy narastá. Väzobná aktivita 53BP1 limituje proces HR – asociovaného nukleo- lytického štiepenia DNA tzv. DNA resekcia, tým pádom aj opravu DSB prostredníctvom HR a spúšťa chybovú oprav- nú dráhu DSB – NHEJ.

Za podmienok endogénneho alebo indukovaného deficitu ubikvitínu, ktorý je bežný v bunkách nádorov, dochádza k poklesu ubikvitín-závislej väzby alebo úplnej strate proteínov 53BP1 a BRCA1 v miestach poškodenia DNA.

Napriek tomuto všeobecne akceptovanému modelu sa nám v našej experimentálnej štúdií podarilo identifikovať niekoľko nádorových bunkových línií schopných uskutoč- niť väzbu proteínu 53BP1 do miest DSB aj v podmienkach proteotoxického stresu indukovaného inhibitorom a deficitu ubikvitínu. Vo výsledkoch našej práce predovšetkým poukazujem na kľúčový menovateľ pre daný fenotyp, ktorým je zvýšená hladina E3 ubikvitín ligázy RNF168 umož- ňujúca efektívne využitie reziduálneho ubikvitínu prítom- ného v bunke. Bunky so zvýšenou hladinou RNF168 sú rezistentnejšie na kombinovanú terapiu ionizujúcim žiarením a inhibitorom proteazómu, čo naznačuje možnú spoji- tosť deregulácie RNF168 s adaptáciou danej rakovinovej

bunky na endogénny proteotoxický stres, ktorému je taká- to bunka prirodzene vystavená.

Zvýšená hladina RNF168 podmieňujúca špecifickú väzbu 53BP1 má za následok posun rovnováhy opravných dráh k NHEJ, sprevádzanej zvýšenou nestabilitou chromo- zómov. Taktó vzniknutá nerovnováha môže mať za násle- dok zvýšenú citlivosť buniek k induktorom replikačného stresu, akými sú inhibitor poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP) a inhibitory topoizomeráz. Na základe získaných výsledkov možno konštatovať potenciálnu úlohu hyperak- tivovanej RNF168/53BP1 signálnej dráhy v procese tumo- rigenézy. Cez navrhovanú pozmenenú kapacitu opravy DNA, následnú nestabilitu genómu a heterogenitu nádoru môže dochádzať k bunkovej selekcii rezistentného a na stres adaptovaného nádorového fenotypu.

Vedeckým prínosom našej súčasnej práce je nielen detailný náhľad do (pato)biológie nádorovej bunky, ale aj nájdená zvýšená hladina proteínu RNF168 v klinických vzorkách materiálu získaného z nádoru kostnej drene. Ten- to objav môže viesť k zavedeniu nového diagnostického ako aj prognostického markeru odpovede na štandardnú a novovznikajúcu liečbu nádorového ochorenia – mnoho- početný myelóm⁶.

5. Záver

V tomto prehľadnom článku sú zahrnuté poznatky z oblasti signalizácie a opravy poškodenia DSB. Oba tieto úzko súvisiace mechanizmy sú považované za esenciálne z hľadiska udržiavania integrity genómu ako aj bunkovej homeostázy. V priebehu odpovede na poškodenie DNA dochádza ku kľúčovému momentu a to ubikvitinácii histón- ov prostredníctvom proteínu RNF168, ktorej výsledkom je väzba opravných proteínov BRCA1 a 53BP1 do miesta zlomu DNA. Zatiaľ čo proteín 53BP1 spúšťa opravu DSB DNA prostredníctvom NHEJ, proteín BRCA1 iniciuje resekciu DNA a HR.

V podmienkach proteotoxického stresu, ktorý je spre- vádzaný nedostatkom voľného ubikvitínu, dochádza k poklesu väzobnej schopnosti opravných proteínov k miestam poškodenia a teda k utlmeniu ubikvitín-závislej odpovede na poškodenie DNA. Všeobecným prejavom spomínanej inhibície priebehu reparačných mechanizmov je strata opravných proteínov 53BP1 a BRCA1 z fokusov indukovaných gama žiarením. Napriek tomuto všeobecne akceptovanému javu sa nám podarilo identifikovať niekoľ- ko nádorových bunkových línií s prítomnosťou 53BP1 v IRIF za podmienok deficitu ubikvitínu, teda indukovaného proteotoxického stresu prostredníctvom inhibitorov proteazómu (Bortezomib alebo MG132).

Objasnili sme rozhodujúci menovateľ pre daný feno- typ, ktorým je zvýšená hladina E3 ubikvitín ligázy RNF168 a spojitosť zvýšenej hladiny tejto E3 ligázy s prevalenciou NHEJ, sprevádzanou zvýšenou genomic- kou nestabilitou testovaných nádorových bunkových línií. Taktó vzniknutá nerovnováha opravných dráh DSB môže mať za následok zvýšenú citlivosť špecifických

HR-pozitívnych nádorových línií prsníka k inhibítorom PARP1 a topoizomeráz.

Výsledky našich štúdií poukazujú na esenciálnu úlohu regulačných mechanizmov ubikvitinácie pre správny priebeh a rovnováhu opravných procesov DSB – HR a NHEJ, ktoré tak zabezpečujú udržanie stability genómu a životaschopnosti buniek.

Zoznam skratiek

DSB	Double-Strand Break (dvojvláknový zlom DNA)
BRCA1	Breast Cancer susceptibility protein 1
BRCA2	Breast Cancer susceptibility protein 2
CTIP	C Terminal binding protein Interacting Protein
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase (DNA-závislá proteínkináza)
DNA-PKcs	Catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (katalytická podjednotka DNA-závislej proteínkinázy)
DSS1	Deleted in Split-hand/Split-foot protein
DUB	DeUbiquitylating enzyme (deubikvitinačný enzým)
E1	Ubiquitin-activating enzyme (ubikvitín aktivačný enzým)
E2	Ubiquitin-conjugating enzyme (ubikvitín konjugučný enzým)
E3	Ubiquitin ligase (ubikvitín ligáza)
H2AK15ub	ubiquitylated histone H2A on lysine 15 (histón H2A ubikvitinovaný na lyzíne 15)
H4K20me2	dimethylated histone H4 on lysine 20 (histón H4 dimetylovaný na lyzíne 20)
HR	Homologous Recombination (homologická rekombinácia)
IRIF	Ionizing Radiation Induced Foci (fokusy indukované ionizačným žiarením)
JMJD2A	JuMonJi Domain 2 protein A
K48	lysine number 48 (lyzín číslo 48)
K63	lysine number 63 (lyzín číslo 63)
KU70/KU80	subunits of KU heterodimeric protein (podjednotky heterodimerického proteínu KU)
L3MBTL1	Lethal (3) Malignant Brain Tumor-Like protein 1
MRE11	Meiotic Recombination protein 11
MRN	Mre11/Rad50/Nbs1 protein complex (komplex pozostávajúci z proteínov Mre11, RAD50, Nbs1)
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome protein 1
NHEJ	Non-Homologous End Joining (spájanie nehomologických koncov DNA)
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase (poly(ADP-riboza) polymeráza)
RAD50	DNA repair protein RAD50 (DNA opravný proteín RAD50)
RAD51	RAD51 recombinase (RAD51 rekombináza)

RNF8	RiNg Finger protein 8
RNF168	RiNg Finger protein 168
RPA	Replication Protein A (replikačný proteín A)
UBC13	UBiquitin Conjugating enzyme 13
UPS	Ubiquitin Proteasome System (ubikvitín proteazómový systém)
XRCC4	X-ray Cross-Complementation group 4

LITERATÚRA

- Jackson S. P., Bartek J.: *Nature* 461, 107 (2009).
- Polo S. E., Jackson S. P.: *Genes Dev.* 25, 409 (2011).
- Stewart G. S. a spol.: *Cell* 136, 420 (2009).
- 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.: *Cell* 136, 435 (2009).
- Dantuma N. P., Groothuis T. A. M., Salomons F. A., Neeffjes J.: *J. Cell Biol.* 173, 19 (2006).
- Chroma K., Mistrik M., Moudry P., Gursky J., Liptay M., Strauss R., Skrott Z., Vrtel R., Bartkova J., Kramara J., Bartek J.: *Oncogene* 36, 2405 (2016).
- Bekker-Jensen S., Mailand N.: *DNA Repair (Amst.)* 9, 1219 (2010).
- De Lorenzo S. B., Patel A. G., Hurley R. M., Kaufmann D. H.: *Front. Oncol.* 228, 1 (2013).
- Jeggo P. A., Löbrich M.: *Oncogene* 26, 7717 (2007).
- Tatum E. L., Lederberg J.: *J. Bacteriol.* 53, 673 (1947).
- Clark A. J., Margulies A. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 53, 451 (1965).
- Heyer W. D., Ehmsen K. T., Liu J.: *Annu. Rev. Genet.* 44, 113 (2010).
- Ciccio A., Elledge S. J.: *Mol. Cell* 40, 179 (2010).
- Pardo B., Gómez-González B., Aguilera A.: *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1039 (2009).
- Roy R., Chun J., Powell S. N.: *Nat. Rev. Cancer* 12, 68 (2011).
- Farmer H. a spol.: *Nature* 434, 917 (2005).
- De Vos M., Schreiber V., Dantzer F.: *Biochem. Pharmacol.* 84, 137 (2012).
- Lieber M. R.: *Annu. Rev. Biochem.* 79, 181 (2010).
- Bunting S. F., Callén E., Wong N., Chen H. T., Polato F., Gunn A., Bothmer A., Feldhahn N., Fernandez-Capetillo O., Cao L., Xu X., Deng C. X., Finkel T., Nussenzweig A.: *Cell* 141, 243 (2010).
- Stephens P. J. a spol.: *Cell* 144, 27 (2011).
- Ciechanover A., Hod Y., Hershko A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 1100 (1978).
- Dye B. T., Schulman B. A.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36, 131 (2007).
- Maupin-Furlow J.: *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 100 (2012).
- Ciechanover A., Elias S., Heller H., Hershko A.: *J. Biol. Chem.* 257, 2537 (1982).
- Hershko A., Ciechanover A.: *Annu. Rev. Biochem.*

- 67, 425 (1998).
26. Chen Z. J., Sun L. J.: *Mol. Cell* 33, 275 (2009).
 27. Xu P., Duong D. M., Seyfried N. T., Cheng D., Xie Y., Robert J., Rush J., Hochstrasser M., Finley D., Peng J.: *Cell* 137, 133 (2009).
 28. Lukas J., Bartek J.: *Cell* 118, 666 (2004).
 29. Panier S., Durocher D.: *DNA Repair* 8, 436 (2009).
 30. Smeenk G., Mailand N.: *Front. Genet.* 7, 122 (2016).
 31. Chapman J. R., Taylor M. R. G., Boulton S. J.: *Mol. Cell* 47, 497 (2012).
 32. Thorslund T., Ripplinger A., Hoffmann S., Wild T., Uckelmann M., Villumsen B., Narita T., Sixma T. K., Choudhary C., Bekker-Jensen S., Mailand N.: *Nature* 527, 389 (2015).
 33. Fradet-Turcotte A., Canny M. D., Escribano-Díaz C., Orthwein A., Leung C. C. Y., Huang H., Landry M. C., Kitevski-LeBlanc J., Noordermeer S. M., Sicheri F., Durocher D.: *Nature* 499, 50 (2013).
 34. Mallette F. A., Richard S.: *Cell Res.* 22, 1221 (2012).
 35. Jung T., Catalgol B., Grune T.: *Mol. Aspects Med.* 30, 191 (2009).
 36. Krogan N. J., Lam M. H. Y., Fillingham J., Keogh M. C., Gebbia M., Li J., Datta N., Cagney G., Buratowski S., Emili A., Greenblatt J. F.: *Mol. Cell* 16, 1027 (2004).
 37. Zhou Q., Kojic M., Cao Z., Lisby M., Mazloun N. A., Holloman W. K.: *Mol. Cell. Biol.* 27, 2512 (2007).
 38. Butler L. R., Densham R. M., Jia J., Garvin A. J., Stone H. R., Shah V., Weekes D., Festy F., Beesley J., Morris J. R.: *EMBO J.* 31, 3918 (2012).
 39. Dantuma N. P., Groothuis T. A. M., Salomons F. A., Neefjes J.: *J. Cell Biol.* 173, 19 (2006).
 40. Meister S., Schubert U., Neubert K., Herrmann K., Burger R., Gramatzki M., Hahn S., Schreiber S., Wilhelm S., Herrmann M., Jäck H. M., Voll R. E.: *Cancer Res.* 67, 1783 (2007).
 41. Gudmundsdottir K., Lord C. J., Ashworth A.: *Oncogene* 26, 7601 (2007).
 42. Bertocci B., De Smet A., Weill J. C., Reynaud C. A.: *Immunity* 25, 31 (2006).

K. Chromá (*Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc*): **Repair of Double-strand Breaks under Condition of Ubiquitin Deficiency / Proteotoxic Stress**

DNA double-strand breaks (DSBs) signaling and repair is crucial to preserve genomic integrity and maintain cellular homeostasis. During the response to DSBs, histone ubiquitylation by RNF168 is a critical event, which orchestrates the recruitment of downstream effectors, e.g. BRCA1 and 53BP1. While 53BP1 licenses the non-homologous end joining (NHEJ), BRCA1 initiates the DNA resection thus enabling homologous recombination (HR). Under conditions of ubiquitin starvation, mostly resulting from proteotoxic stress, the ubiquitin-dependent accumulation of DNA damage response proteins at the sites of DNA damage is impaired. Therefore, the proteotoxic stress is commonly manifested by an attenuation of ubiquitin-mediated DSBs response. However, we have identified several cancer cell lines that display recruitment of 53BP1 to the sites of DSBs under the conditions of proteasome inhibitor (Bortezomib or MG132) induced proteotoxic stress, i.e., under substantial depletion of nuclear free ubiquitin levels. This review brings a brief description of two major DSBs repair pathways: HR and NHEJ, their functional dependency on signaling through ubiquitin and a discussion of newly identified phenomenon of proteotoxic stress resistant response to DNA double-strand breaks.