



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**  

---

**FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**  
**Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

## **ADP-ribosylace histonů během oprav poškozené DNA**

### **Histone ADP-ribosylation in DNA damage signalling and repair**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor bakalářské práce: Barbora Kuttichová

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Hana Hanzlíková, Ph.D.



# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Kuttichová** Jméno: **Barbora** Osobní číslo: **483012**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**  
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

## II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**ADP-ribosylace histonů během oprav poškozené DNA**

Název bakalářské práce anglicky:

**Histone ADP-ribosylation in DNA damage signalling and repair**

Pokyny pro vypracování:

ADP-ribosylace je běžná posttranslační úprava proteinů, která je nezbytná k fungování mnoha fyziologických procesů jako např. replikace a oprava DNA. Studie ukázaly, že dědičné poruchy v opravě DNA a metabolismu ADP-ribózy u lidí často vyvolávají defekty ve vývoji mozku a neurodegenerace. Předmětem této bakalářské práce bude shrnutí poznatků o ADP-ribosylaci histonů při poškození DNA, funkci této posttranslační modifikace a případné propojení s lidskou neurodegenerativní chorobou. V praktické části práce by se studentka měla naučit kultivovat a manipulovat s lidskými buňkami a detekovat v nich ADP-ribosylace histonů pomocí laboratorních molekulárních metod jako jsou imunofluorescence, Western blot či imunoprecipitace. Dále by se měla alespoň teoreticky seznámit s metodou hmotnostní spektrometrie.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Hanzlikova H, Prokhorova E, Krejčíková K, Cihlarova Z, Kalasova I, Kubovciak J, Sachova J, Hailstone R, Brazina J, Ghosh S, Cirak S, Gleeson JG, Ahel I, Caldecott KW, Pathogenic ARH3 Mutations Result in ADP-ribose Chromatin Scars during DNA Strand Break Repair, Nat Commun, 2020, in press
- [2] Suskiewicz MJ, Zobel F, Ogden TEH, Fontana P, Ariza A, Yang JC, Zhu K, Bracken L, Hawthorne WJ, Ahel D, Neuhaus D, Ahel I, HPF1 completes the PARP active site for DNA damage-induced ADP-ribosylation, Nature, 2020, Mar;579(7800):598-602. doi: 10.1038/s41586-020-2013-6
- [3] Palazzo L, Mikolčević P, Mikoč A, Ahel I., ADP-ribosylation signalling and human disease, Open Biol. , číslo Apr 26, 2019, 9(4):190041. doi: 10.1098/rsob.190041
- [4] Bartlett E, Bonfiglio J, Prokhorova E, Colby T, Zobel F, Ahel I, Matic I., Interplay of Histone Marks with Serine ADP-Ribosylation, Cell Rep. , číslo Sep 25, 2018, 24(13):3488-3502.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.08.092

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

**Mgr. Hana Hanzlíková, PhD.**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **21.9.2020**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2022**

  
prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.  
podpis vedoucí(ho) katedry

  
prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA  
podpis děkana(ky)

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem ADP-ribosylace histonů během oprav poškozené DNA vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 13.05.2021

.....  
Barbora Kuttichová

## **PODĚKOVÁNÍ**

V první řadě bych chtěla velmi poděkovat vedoucí své práce Mgr. Haně Hanzlíkové, Ph.D. za její trpělivost, cenné rady a konstruktivní připomínky. Dále patří velké poděkování celému týmu oddělení dynamiky genomu za jejich ochotu a pomoc při práci na experimentální části práce. Také bych chtěla poděkovat Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky za poskytnutí laboratoří, pomůcek a přístrojů pro provedení této práce. Na závěr děkuji rodině a přátelům za podporu během celého studia.

## **ABSTRAKT**

ADP-ribosylace je reverzibilní posttranslační modifikace, která reguluje nespočet procesů v buňce, včetně oprav poškozené DNA. Teoretická část bakalářské práce je věnována podrobnému popisu ADP-ribosylace. Je zde charakteristika jednotlivých ADP-ribosyl transferáz, ADP-ribosyl hydroláz, proteinových domén a motivů vázajících ADP-ribózu. Část práce se zabývá popisem jednovláknového poškození DNA a mechanismem jeho opravy, na kterém se ADP-ribosylace podílí. Jsou zde popsána neurodegenerativní poškození, která mohou vznikat jako důsledek mutací v procesu jednovláknových oprav poškozené DNA nebo vlivem chyb v metabolismu ADP-ribosylace.

Praktická část práce se zabývá charakterizací ARH3 deficientních buněk, průkazem mono-ADP-ribosylace jako posttranslační modifikace, a detekcí konkrétních ADP-ribosylovaných histonů a dalších proteinů.

Podarilo se prokázat, že ARH3 deficientní buňky upravené metodou CRISPR/Cas9 netvoří protein ARH3, který je zodpovědný za odstraňování terminálních ADP-ribóz ze substrátů. Nahromaděné mono-ADP-ribosylace uvnitř jader ARH3 deficientních buněk byly detekovány imunofluorescencí a analyzovány s použitím speciálního fluorescenčního mikroskopu. Testován byl nový inhibitor ARH3 (AI26), jehož účinnost v buňkách se nepotvrdila. Pomocí imunoprecipitace s glutathion-sepharosovými kuličkami s navázanou makro doménou Af1521 se podařilo získat ADP-ribosylované proteiny, které byly dále detekovány na hmotnostním spektrometru. Hmotnostní spektrometrie určila jako ADP-ribosylované histony H2B a H3, čímž se potvrdily dřívější hypotézy.

### **Klíčová slova**

ADP-ribosylace; ARH3; poškození DNA; oprava jednovláknového poškození DNA; histony; neurodegenerativní onemocnění.

## **ABSTRACT**

ADP-ribosylation is a reversible posttranslational modification that regulates numerous processes in the cell including the repair of DNA strand breaks. A theoretical part of this bachelor thesis focuses on a detailed description of ADP-ribosylation. Specific ADP-ribosyl transferases, ADP-ribosyl glycohydrolases, protein domains and ADP-ribose binding motifs are described in the first part. The second part of the thesis deals with the description of DNA single-strand breaks and mechanisms of its repair in which ADP-ribosylation is involved. The thesis also introduces neurodegenerative diseases that are associated with mutations in DNA single-strand break repair proteins or in enzymes regulating ADP-ribose metabolism.

The experimental part of the thesis deals with the characterization of ARH3 deficient cells, the detection of mono-ADP-ribosylation, and the identification of specific ADP-ribosylated histones and other proteins.

Here, it is shown that ARH3 deficient cells in which *ARH3* was deleted using CRISPR/Cas9-mediated genome editing do not express an ARH3 protein which is responsible for the removal of terminal ADP-ribose from substrates. The accumulation of mono-ADP-ribosylation in nuclei of ARH3 deficient cells was detected by immunofluorescence and analyzed on a high-content fluorescence microscope. A new inhibitor of ARH3 (AI26) was tested, however in conclusion it is not suitable for use in cell culture. ADP-ribosylated proteins were obtained by immunoprecipitation with glutathione-sepharose beads with Afl521 macrodomain and identified by mass spectrometry. Histones H2B and H3 were detected as major hits thus confirming earlier hypotheses.

## **Keywords**

ADP-ribosylation; ARH3; DNA damage; single-strand break repair; histones; neurodegenerative disease.

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíle práce .....	10
3	Přehled současného stavu.....	11
3.1	ADP-ribosylace.....	11
3.1.1	ADP-ribosyl transferázy .....	12
3.1.2	ADP-ribózu-vázající proteinové domény a motivy .....	16
3.1.3	ADP-ribosyl hydrolázy .....	18
3.1.4	ADP-ribosylace histonů .....	20
3.2	ADP-ribosylace při DNA poškození.....	23
3.2.1	Detekce jednovláknových poškození DNA .....	24
3.2.2	Zpracování DNA konce.....	25
3.2.3	Vyplnění mezery a ligace DNA .....	26
3.3	ADP-ribosylace a neurodegenerativní onemocnění .....	27
4	Metodika .....	29
4.1	Použité chemikálie, protilátky, pufrý, inhibitory .....	29
4.2	Použité komerční kity .....	32
4.3	Buněčné kultury .....	32
4.4	Příprava buněčných lyzátů a BCA esej.....	33
4.5	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	34
4.6	Western Blot, barvení pomocí protilátek a detekce proteinů .....	34
4.7	Preextrakce a fixace buněk .....	35
4.8	Imunofluorescence.....	36
4.9	Mikroskopie a ScanR.....	36
4.10	Vyhodnocení dat a statistika .....	37
4.11	Příprava kuliček vázajících ADP-ribózu.....	37
4.11.1	Expese proteinové domény.....	37

4.11.2	Příprava konjugovaných kuliček .....	39
4.12	Imunoprecipitace .....	40
4.13	Hmotnostní spektrometrie.....	41
5	Výsledky .....	42
5.1	Charakterizace ARH3 deficientních RPE-1 buněk.....	42
5.2	Testování nově popsaného ARH3 inhibitoru .....	48
5.3	Identifikace ADP-ribosylovaných proteinů u ARH3 deficientních buněk..	52
6	Diskuze.....	57
7	Závěr .....	62
8	Seznam použitých zkratk .....	63
9	Seznam použité literatury.....	67
10	Seznam použitých obrázků .....	87
11	Seznam použitých tabulek .....	88



# 1 ÚVOD

DNA je reaktivní nestabilní molekula, která je velmi náchylná k vnitřním a vnějším zdrojům poškození. Jednovláknová poškození DNA jsou nejčastější léze DNA, k nimž v buňkách dochází, a jsou tak největší hrozbou pro přežití buněk a zachování genetické integrity. Pokud nejsou tyto zlomy zavčas opraveny, může docházet ke zvýšeným genetickým delecím, mutacím nebo chromozomálními aberacím, vedoucím k embryonální letalitě nebo ke vzniku neurologických onemocnění.

Dílčím procesem, který se na opravách jednovláknových poškození DNA podílí, je ADP-ribosylace. Ačkoliv je to běžná reverzibilní posttranslační modifikace objevená před více jak padesáti lety, stále se toho o ní mnoho neví. V buňkách se vyskytují ADP-ribosyl transferázy (nejznámější je PARP1), které detekují jednovláknová poškození DNA a signalizují jeho přítomnost katalýzou autoribosylace a transribosylace proteinů, pomocí mono(ADP-ribózy) a/nebo poly(ADP-ribózy). ADP-ribosylace jsou však vzápětí odstraňovány glykohydrolázami, a umožňují tak přístup dalších reparačních proteinů k poškozené DNA. Díky detekci poškozené DNA a aktivaci pomocí ADP-ribosylace následuje sled reakcí, které vedou k úspěšnému opravení DNA. Jelikož je však tento proces velmi komplexní a složitý, může v něm snadno dojít k poruchám, které často vedou k lidským neurodegenerativním onemocněním.

Aby bylo možné studovat přesný mechanismus toho, jak endogenní jednovláknová poškození DNA způsobují neurologická onemocnění, je žádoucí zjistit, na jakých přesných místech uvnitř genomu k poškození DNA dochází. Toho lze docílit pozorováním ADP-ribosylace histonů, jakožto značek proběhlých jednovláknových zlomů DNA. Proto se tato práce věnuje detekci ADP-ribosylace na histonech v lidských buňkách. Pokračováním ve výzkumu tak do budoucna může dojít k objasnění mechanismu vzniku i takových onemocnění jako je Parkinsonova nebo Alzheimerova choroba.

## 2 CÍLE PRÁCE

Předmětem teoretické části této bakalářské práce je shrnutí dosavadních poznatků o ADP-ribosylaci při poškození DNA, funkci této posttranslační modifikace a popisu poruch podílejících se na vzniku neurodegenerativních onemocnění.

Cílem praktické části je charakterizace ARH3 deficientních RPE-1 buněk a detekce ADP-ribosylace histonů pomocí laboratorních molekulárních metod jako jsou imunofluorescence a Western blot. Dílčím úkolem je otestovat funkci inhibitoru AI26, který by měl inhibovat ADP-ribosyl hydrolázu ARH3, a mohl by tak v budoucnu být silným nástrojem ke studování ADP-ribosylace. Cílem je ověřit, jestli má AI26 podobný efekt v RPE-1 buňkách jako delece genu pro protein ARH3. Dalším cílem je pomocí imunoprecipitace a následné hmotnostní spektrometrie zjistit, které histony, případně další proteiny jsou v buňkách ADP-ribosylované.

## 3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

### 3.1 ADP-ribosylace

ADP-ribosylace je známá posttranslační modifikace proteinů. Dochází při ní k přenosu jedné nebo více ADP-ribóz z redoxního kofaktoru  $\beta$ -nikotinamidu adenin dinukleotidu ( $\beta$ -NAD<sup>+</sup>) na různé akceptorové zbytky na cílovém proteinu (Lüscher et al. 2017; Palazzo et al. 2017). Modifikuje proteiny na specifických aminokyselinových zbytcích, nejčastěji glutamátu (Glu) a aspartátu (Asp), ale také argininu (Arg), lysinu (Lys), cysteinu (Cys), serinu (Ser) nebo tyrosinu (Tyr) (Bartlett et al. 2018; Crawford et al. 2018; Leidecker et al. 2016; Vivello a Leung 2015; Vyas et al. 2014). ADP-ribosylace kontroluje širokou škálu buněčných procesů jako je oprava a degradace DNA, transkripce či buněčné dělení (Bock a Chang 2016; Palazzo et al. 2017; Rechkunova et al. 2019). Dříve se předpokládalo, že má tato modifikace akceptorová místa jen na proteinech, avšak několik *in vitro* pozorování ukázalo, že obě nukleové kyseliny, RNA i DNA, mohou být taktéž cílem ADP-ribosylace (Munnur et al. 2019; Nakano et al. 2015; Talhaoui et al. 2016). ADP-ribóza (ADPr) může být také přenesena na malé molekuly, jako jsou acetylové chemické skupiny, čímž dochází ke vzniku *O*-acetyl-ADP-ribózy během deacetylačních reakcí (Ringel et al. 2018).

ADP-ribosylace způsobuje strukturální omezení a přivádí negativní náboj na akceptorové proteiny, čímž mění jejich lokalizaci a funkci, a také interakci s jinými proteiny a DNA (Ray Chaudhuri a Nussenzweig 2017). ADP-ribóza funguje jako lešení pro přijímání efektorových proteinů, které jsou schopné rozpoznat a vázat tuto modifikaci pomocí specializovaných proteinových domén, jako je makro doména, poly(ADP-ribóza)-vázající zinkový prst (PBZ) nebo WWE doména, pojmenovaná podle aminokyselin tryptofanu a glutamátu (Palazzo a Ahel 2018; Teloni a Altmeyer 2016).

ADP-ribosylace je reverzibilní proces. Pomocí ADP-ribosyl transferáz se na cílový substrát přenese jedna nebo více ADP-ribózových jednotek, avšak specifickými hydrolázami jsou tyto jednotky vzápětí odstraňovány (Palazzo a Ahel 2018).

Pokud se přenáší pouze jedna ADP-ribózová jednotka z NAD<sup>+</sup> na specifický aminokyselinový zbytek, hovoří se o mono-ADP-ribosylaci. Pokud se následně řetězec prodlužuje a připojují se další ADP-ribózové jednotky, vytváří se poly-ADP-ribosylace. Mono-ADP-ribosylace je v buňkách mnohem častější (Wielckens et al. 1981).

### 3.1.1 ADP-ribosyl transferázy

ADP-ribosylace je katalyzována velkým množstvím ADP-ribosyl transferáz, které přenášejí jednu nebo více ADP-ribózových jednotek z  $\text{NAD}^+$  na cílové substráty. Transferázové enzymy jsou rozděleny do 2 enzymových superrodin – cholera toxin-like ADP-ribosyl transferázy (ARTCs) a diphtheria toxin-like ADP ribosyl transferázy (ARTDs). Tyto dvě třídy enzymů sdílí evolučně konzervovanou doménu nazývanou ADP-ribosyl transferázová doména (ART). Tato doména je charakterizována dvěma centrálními  $\beta$ -listy, jedním antiparalelním obsahujícím tři až pět  $\beta$  řetězců, a jedním složeným ze čtyř až pěti  $\beta$  řetězců. Díky třem zásadním aminokyselinám uvnitř ART domény lze určit zařazení buď do cholera, nebo diphtheria toxin-like superrodiny, tedy podle R-S-E nebo H-Y-E triád. První dvě aminokyseliny v triádě jsou důležité pro vazbu  $\text{NAD}^+$ , zatímco kyselina glutamová (E) hraje roli při katalýze. ARTC a ARTD se také liší svou specifitou cílit na odlišné aminokyseliny. Většina ARTCs cílí na argininové zbytky v proteinech, a pomocí *N*-glykosidové vazby vzniká arginin-ADPr. Skupina ARTD transferáz nejčastěji modifikuje acidické skupiny (Barkauskaite et al. 2015; Cohen a Chang 2018; Hottiger et al. 2010; Palazzo et al. 2019).

U člověka existují 4 zástupci z ARTC skupiny – ARTC1, ARTC3, ARTC4, ARTC5. Kromě ARTC5 jsou tyto enzymy vázány na cytoplazmatickou membránu pomocí GPI (glykofosfatidylinositol) kotvy. ARTC5 je extracelulární sekretovaný enzym. ARTC1 a ARTC5 prokazují mono-ADP-ribosyl transferázovou aktivitu a modifikují argininové postranní řetězce proteinových substrátů. Naopak ARTC3 a ARTC4 postrádají R-S-E triádu v aktivním centru, a z toho důvodu jsou pravděpodobně neaktivními enzymy (Koch-Nolte et al. 2008; Laing et al. 2011).

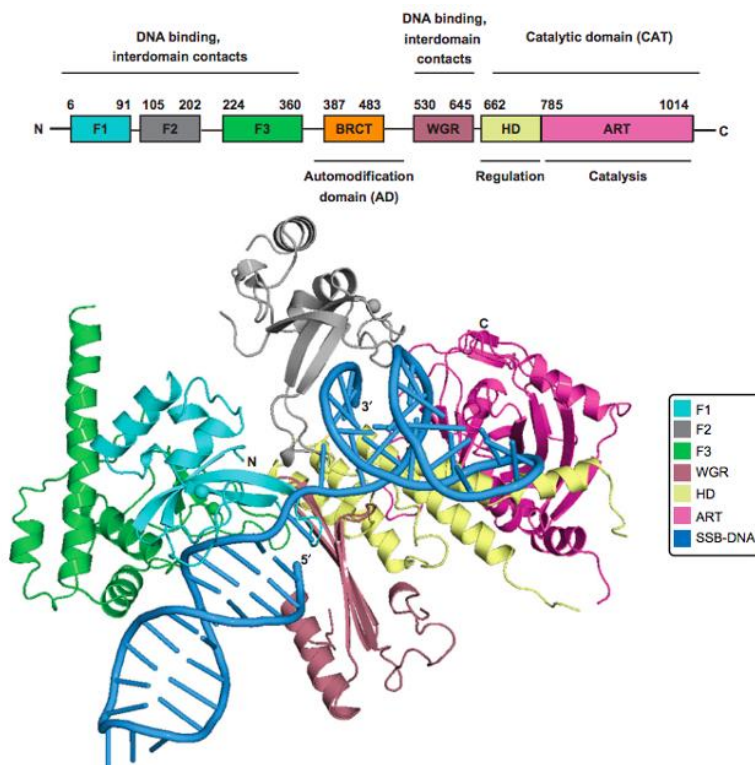
Ze skupiny ARTD transferáz je známo 17 zástupců vyskytujících se u savců. Jsou nazývány jako poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARPs) (Cohen a Chang 2018; Gibson a Kraus 2012; Lüscher et al. 2017). PARPs nejčastěji přenášejí ADP-ribózu (ADPr) na kyselinu asparagovou nebo glutamovou (Asp/Glu-ADPr) prostřednictvím esterových vazeb a na serinové zbytky (Ser-ADPr) prostřednictvím *O*-glykosylace (Crawford et al. 2018; Leidecker et al. 2016). Několik PARPs může produkovat řetězce polymerů ADP-ribózy (PAR). V těchto řetězcích se opakují jednotlivé ADP-ribózové jednotky (až 200 jednotek) a jsou spojeny prostřednictvím *O*-glykosidových vazeb ribóza-ribóza (D'Amours et al. 1999; De Murcia G. a de Murcia J. 1994; Rippmann et al. 2002; Vyas et

al. 2014). Tento typ modifikace je všeobecně pojmenován poly-ADP-ribosylace (PARylace). Dobře charakterizované PARPs schopné vyvolat PARylaci jsou PARP1, PARP2, Tankyráza-1 a Tankyráza-2 (Vyas et al. 2014). Tankyrázy syntetizují PAR s průměrnou délkou 20 jednotek bez pozorovatelného větvení (Rippmann et al. 2002; Vyas et al. 2014). Zapojují se do vícero buněčných procesů, jako je udržování délky telomer nebo mitóza (Cohen a Chang 2018; Lüscher et al. 2017). Na rozdíl od tankyráz, PARP1 a PARP2 tvoří PAR i s rozvětvenými řetězci. Zbývající zástupci PARP superrodiny jsou schopni přenášet pouze jednu skupinu ADP-ribózy na cílové proteiny, čímž vytvářejí mono-ADP-ribosylace (MARylace). Z nich stojí za zmínku především PARP3 (Bütepage et al. 2015; Vyas et al. 2014).

PARP1 je zatím nejlépe prostudovaný enzym ze skupiny PARP enzymů. Spolu s PARP2 a PARP3 patří ke skupině DNA-dependentních jaderných PARPs, jejichž katalytická aktivita je stimulována poškozením DNA (Gupte et al. 2017; Palazzo a Ahel 2018). PARP1 hraje podstatnou roli při opravách poškození DNA, transkripci, metabolismu a formování struktury chromatinu (Bai a Cantó 2012; Gupte et al. 2017; Luo a Kraus 2012; Posavec Marjanović et al. 2017). 80–90 % detekovatelné syntézy poly(ADP-ribózy) při poškození DNA je způsobeno právě PARP1 (Caldecott 2014a).

PARP1 autoribosyluje sám sebe a v menší míře transribosyluje řadu dalších akceptorových proteinů, včetně histonů a proteinů potřebných k opravě DNA poškození (Caldecott 2014a). Skládá se z šesti domén. Obsahuje tři zinkové prsty (Zn1, Zn2, Zn3), jednu doménu pro auto-poly-ADP-ribosylaci (AD), která obsahuje BRCA1 C-terminální motiv (BRCT), doménu interagující s otevřeným chromatinem (WGR) (Altmeyer et al. 2009) a doménu, která souvisí s katalytickou aktivitou enzymu (CAT). CAT se skládá z helikální subdomény (HD) a z konzervované ADP-ribosyl transferázové subdomény (ART) (Langelier et al. 2012). Tyto popsání domény společně zprostředkovávají odezvu PARP1 na různé druhy poškození DNA. Celá struktura enzymu je znázorněn na obrázku 1 (Obr. 1). Zn1 a Zn2 jsou homologní domény, které rozpoznávají a váží DNA, i když se ukázalo, že PARP1 může vázat DNA jen jednou z těchto domén (Langelier et al. 2011). Zn1 je důležitý pro aktivaci PARP1, přesná role Zn2 zatím není známá, ale nejspíše je tato doména důležitá při rozpoznávání jednovláknových poškození DNA (Ikejima et al. 1990). Zn3 má odlišnou strukturu, neváže se přímo na DNA a hraje důležitou roli u protein-proteinových interakcí během DNA-dependentní autoPARylace, protože zahajuje hydrolýzu NAD<sup>+</sup> (Langelier et al. 2008). Při připojení PARP1 na DNA poškození dochází

k rozvolnění HD domény, a to zajistí přístup  $\text{NAD}^+$  ke katalycky aktivnímu místu, což vede k masivní aktivaci PARP1. Když není přítomno poškození DNA, složená HD doména blokuje přístup  $\text{NAD}^+$  k aktivnímu místu (Langelier et al. 2018).

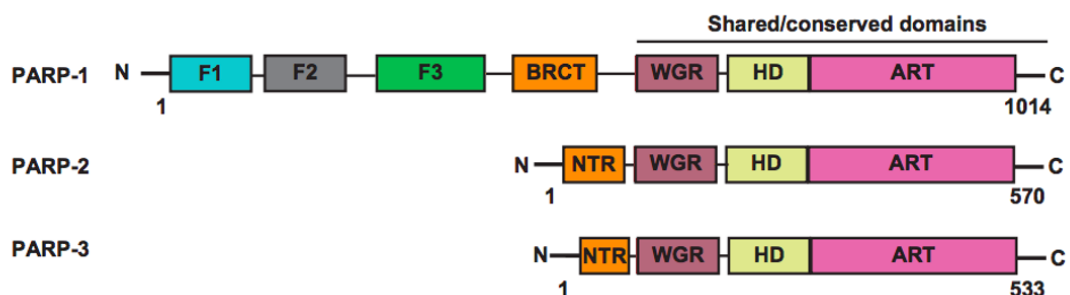


Obrázek 1 - Struktura PARP1 domén a subdomén (F1, F2, F3 = Zn1, Zn2, Zn3) (Pandey a Black 2021)

Regulace PARP1 je nezbytná pro přechod z normálních fyziologických podmínek na stresovou reakci. Jedním z nejlépe charakterizovaných PARP1 přídatných proteinů je Histonový PARylační Faktor 1 (HPF1), který v tomto přechodu hraje důležitou roli (Gibbs-Seymour et al. 2016). HPF1 moduluje katalyckou aktivitu PARP1 nebo PARP2 způsobem, který usnadňuje katalýzu a mění substrátovou specifitu. Hraje hlavní roli při spouštění PARP1-dependenční ADP-ribosylace histonů a jiných proteinů, které souvisejí s poškozením DNA po genotoxických stresech (Bonfiglio et al. 2017; Gibbs-Seymour et al. 2016). PARP1 a PARP2 katalyzují převážně modifikace na acidických zbytcích prostřednictvím *O*-glykosidové vazby esterového typu *in vitro*. Avšak hlavní typ ADP-ribosylace produkované PARP1/2 jako odpověď na DNA poškození je modifikace na serinových zbytcích přes etherový typ *O*-glykosidové vazby (Fontana et al. 2017; Larsen et al. 2018; Leidecker et al. 2016; Palazzo et al. 2018). Tyto serinové zbytky se

obvykle nacházejí uvnitř konzervovaných motivů, kterým obvykle předcházejí lysinové zbytky (KS motivy) (Bonfiglio et al. 2017; Leidecker et al. 2016; Palazzo et al. 2018). HPF1 tedy přeměňuje aminokyselinovou specifitu PARP1 a PARP2 z aspartátu nebo glutamátu na serinové zbytky (Bonfiglio et al. 2017; Suskiewicz et al. 2020).

PARP1, 2 a 3 sdílí konzervované C-terminální domény WGR a CAT (Obr. 2). Největší strukturální rozdíl je v N-terminálním konci (NTR). U PARP1 je NTR dlouhý (i více než 500 zbytků), u PARP2 je pouze 70 zbytků a u PARP 3 je jich 40 (Langelier et al. 2014). Jak PARP1, tak i PARP2 je především spojován s akutní reakcí na poškození DNA, které vede k velkému zvýšení jejich PARylační aktivity. PARP2 ukazuje větší selektivní aktivitu než PARP1, a aktivují ho především poškození DNA obsahující 5'-fosfát. Při aktivaci PARP2 se WGR doména váže na 5'-fosforylované místo, což vyvolá konformační změny v regulační HD doméně a uvolní enzym z jeho autoinhibičního stavu. PARP1 i PARP2 interaguje s reparačním proteinem XRCC1, který aktivuje další proteiny jako je DNA polymeráza  $\beta$  a DNA ligáza 3 (Nakamoto et al. 2019; Pandey a Black 2021).



Obrázek 2 - Rozdíl DNA-vázajících domén u PARP1, PARP2 a PARP3 (F1, F2, F3 = Zn1, Zn2, Zn3) (Pandey a Black 2021)

PARP3 je velice podobný PARP2, ale na rozdíl od něho disponuje mono-ADP-ribosylační aktivitou. Obsahuje N-terminální WGR doménu a C-terminální katalytickou doménu, která je velice podobná katalytickým doménám PARP1 a PARP2. WGR doména obsahuje konzervovaný tryptofan, glycin a argininové zbytky. PARP3 je schopen ADP-ribosylovat sebe nebo i histon H1. Interaguje s PARP1 a může ho aktivovat, na čemž se podílí jeho WGR doména (Loseva et al. 2010).

### 3.1.2 ADP-ribózu-vázající proteinové domény a motivy

Je popsáno několik PAR-vázajících domén a motivů, jejichž strukturní vlastnosti se pohybují v rozmezí od kompletně složených PAR-vázajících domén až po neuspořádané sekvenční úseky, které mohou s PAR vytvářet multivalentní interakce. Znalost těchto domén je důležitá pro pochopení, jak proteiny rozeznávají a váží ADP-ribosylace (Teloni a Altmeyer 2016).

Prvním takový motivem je základní PAR-vázající motiv (PBM). Afinita tohoto motivu k PAR je dána díky elektrostatickým interakcím mezi pozitivně nabitými aminokyselinami uvnitř PBM motivu a negativně nabitými PAR řetězci. Nicméně tyto interakce mohou dosáhnout velké afinity, když spolu spolupracuje více PBM uvnitř stejného proteinu, čímž utvoří dlouhý PAR řetězec (Teloni a Altmeyer 2016).

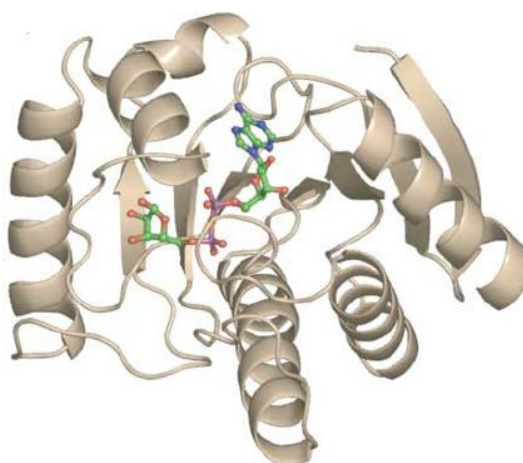
Dalším motivem je PAR-vázající zinkový prst (PBZ). Je to relativně malý motiv skládající se z méně než 30 aminokyselin, který se váže na dvě po sobě jdoucí ADP-ribózové skupiny uvnitř PAR řetězce (Eustermann et al. 2010; Li et al. 2010). Vyskytuje se ve velmi málo proteinech a specificky reguluje jejich funkce při poškození DNA a regulaci buněčného cyklu (Teloni a Altmeyer 2016).

Makro domény jsou na rozdíl od PBM a PBZ velké globulární čtecí moduly obsahující 130–190 aminokyselin, které zaujímají zřetelný záhyb skládající se z centrálního beta listu obklopeného čtyřmi až šesti helixy (Leung et al. 2018; Teloni a Altmeyer 2016). Makro doména je konzervovaný proteinový záhyb, který existuje buď jako protein s jednou doménou, nebo jako část většího proteinu, který byl identifikován u bakterií, virů, archeí a eukaryot (Feijs et al. 2013; Rack et al. 2016). Tyto konzervované regiony byly pojmenovány jako makro domény kvůli své podobnosti s C-terminální doménou histonu H2A, nazývanou makroH2A (Pehrson a Fuji 1998). Makro domény mohou rozpoznávat poslední ADP-ribózovou jednotku a vázat se na mono(ADP-ribózu) (MAR) a k jejím derivátům, včetně ADP-ribóza-1'-fosfátu a *O*-acetyl-ADP-ribózy. Také se mohou vázat na poslední ADP-ribózu z PAR nebo na protein-konjugované MAR, PAR (MARylované nebo PARylované proteiny) (Nowak et al. 2020). Tyto skutečnosti značí, že mohou být považovány za mono(ADP-ribózu)-vázající domény. Lidským genomem je kódováno 12 makro doménu obsahujících proteinů. Je jím například PARP9, PARP14, PARP15 nebo histonové varianty makroH2A1.1, makroH2A1.2 a makroH2A2 (Nowak et al. 2020;



Teloni a Altmeyer 2016). Ne všechny identifikované makro domény jsou schopny vázat PAR. Avšak některé, jež jsou toho schopny, mají dokonce katalytickou aktivitu a účastní se degradace PAR, což je například TARG1 nebo PARG (Barkauskaite et al. 2015).

Strukturálně známá makro doména Afl521 (Obr. 3) je používána pro afinitní čištění ADP-ribosylovaných proteinů nebo k obohacení ADP-ribosylovaných peptidů pro následnou analýzu hmotnostní spektrometrií (MS) k identifikaci ADP-ribosylovaných proteinů a lokalizaci ADP-ribóza akceptorových míst. Pomocí této domény lze vázat mono- i poly-ADP-ribosylace (Dani et al. 2009; Karras et al. 2005; Martello et al. 2016). Účinnost obohacování je však limitována nízkou afinitou makro domény k ADP-ribosylovaným peptidům. Afinitu makro domény Afl521 k ADPr lze však zvýšit použitím mutagenese. Jako nejvíce účinná se ukazuje kombinace Y145R a K35E aminokyselinové substituce v Afl521 doméně (Nowak et al. 2020).



*Obrázek 3 - Struktura komplexu makro domény Afl521 s ADP-ribózou; Makro doména zobrazena šedivě, ADP-ribóza červenozeleně (Karras et al. 2005)*

Další známou ADPr-vázající doménou je WWE doména, pojmenovaná podle svých nejvíce konzervovaných aminokyselin tryptofanu (W) a glutamátu (E). Nachází se u dvanácti lidských proteinů. Tyto PAR „čtečky“ se vyskytují pouze u dvou tříd proteinů, u členů PARP skupiny a ubikvitin ligáz (Wang et al. 2012). Přítomnost WWE i makro domény u některých členů PARP skupiny poukazuje do značné míry na neprozkoumanou souhru mezi zápisem a čtením signálu PAR. V tomto ohledu je zajímavé, že uvnitř PARP skupiny je jasné rozdělení mezi zápisem a čtením signálu PAR, protože jsou makro a WWE domény pouze u těch členů PARP skupiny, kteří nesyntetizují PAR. Nejsou tedy

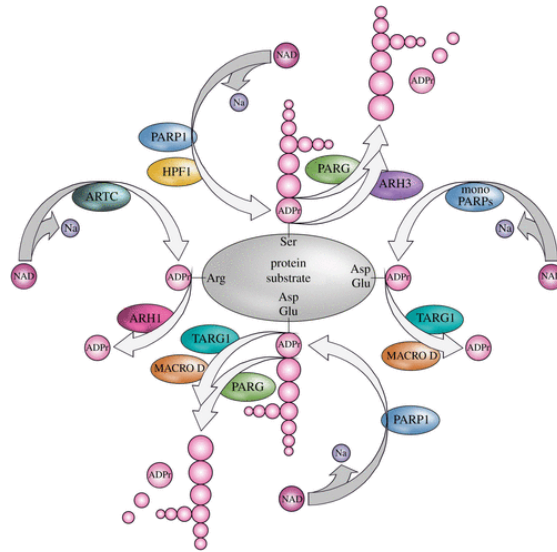
u PARP1, PARP2, PARP5A a PARP5B. Na rozdíl od makro domén interaguje WWE doména s *iso*-ADP-ribózou, která se skládá ze dvou po sobě jdoucích ADP-ribosylových jednotek uvnitř PAR řetězce (Teloni a Altmeyer 2016; Wang et al. 2012).

FHA (Forkhead-associated) a BRCT (BRCA1 C-terminal) domény byly převážně studovány jako čtecí domény u fosforylace, a jako modulátory protein-proteinových interakcí (Reinhardt a Yaffe 2013). Podobně jakou u fosforylace je PAR signál negativně nabitý, a může tak zprostředkovat elektrostatické interakce s fosfát-vázajícími místy FHA a BRCT domén. FHA doména DNA opravných enzymů Aprataxinu a PNKP (Polynukleotid kináza/fosfatáza) interaguje s *iso*-ADP-ribózou, zatímco BRCT doména DNA opravných proteinů – DNA Ligázy IV, XRCC1 a NBS1 rozpoznává ADP-ribosylovou skupinu uvnitř PAR (Breslin et al. 2015; Li et al. 2013).

### 3.1.3 ADP-ribosyl hydrolázy

ADP-ribosylace je plně reverzibilní modifikace. Dvě spolu nesouvisející proteinové skupiny mají ADP-hydrolázovou aktivitu – ADP-ribosyl hydrolázy (ARHs) a skupina enzymů obsahujících makro doménu (Rack et al. 2020). Na obrázku 4 je spolu s transferázami schéma těchto hydroláz a cíle jejich působení (Obr. 4).

Skupina enzymů obsahující makro doménu sdílí společnou ADP-ribóza (ADPr) rozpoznávací doménu. Tato makro doména je ADPr vázající jednotka, která hraje zásadní roli ve vyhledání a hydrolýze ADPr v různých buněčných kontextech (Feijs et al. 2013). Makro domény mohou podle svého typu vázat buď mono(ADP-ribózu), poly(ADP-ribózu) nebo OAADPr (metabolit, který je uvolněný ze sirtuinem zprostředkované NAD<sup>+</sup>-dependentní deacetylační reakce). Kromě toho se některé makro domény mohou chovat jako ADPr hydrolázy (Barkauskaite et al. 2015; Feijs et al. 2013; Karras et al. 2005; Rack et al. 2016; Tong a Denu 2010). Z 12 proteinů kódovaných lidským genomem obsahujících makro doménu mají pouze čtyři hydrolytickou aktivitu (Feijs et al. 2013; Lüscher et al. 2017; Palazzo et al. 2017; Rack et al. 2016). Je to MacroD1, MacroD2, TARG1 a PARG. MacroD1, MacroD2 a TARG1 hydrolyzují *O*-glykosidovou esterovou vazbu aspartátů, glutamátů a *O*-acetyl-ADPr (OAADPr), reakční produkty NAD<sup>+</sup>-dependentních sirtuinových deacetyláz, a také fosfátový ester na koncích nukleové kyseliny (Munnur et al. 2019; Rack et al. 2016; Sauve a Youn 2012). Poly(ADP-ribosyl) glykohydroláza (PARG) degraduje polymery hydrolýzou ribóza-ribóza etherových vazeb, ale nemůže odstraňovat terminální protein-ADP-ribóza vazbu (Slade et al. 2011).



Obrázek 4 - Enzymy podílející se na metabolismu ADP ribózy (Palazzo et al. 2019)

Poly(ADP-ribosyl) glykohydrolázy (PARGs) mají důležité místo mezi hydrolázami s makrodoménami, protože jako jediné disponují poly(ADP-ribóza)-degradující aktivitou (Feng a Koh 2013). PARG obsahuje vysoce odlišný záhyb makro domény. Má inserci jedinečné katalytické smyčky v konzervovaném globulárním makro doménovém záhybu, který obsahuje katalytické zbytky, a je nezbytný pro degradaci PAR řetězců (Palazzo et al. 2019). PARG váže PAR převážně na konci řetězců a postupně degraduje ADP-ribózové jednotky. Evolučně se PARG-like třída může rozdělit do kanonických PARGs, nacházejících se primárně u vyšších živočichů, a na mikrobiální PARGs (Slade et al. 2011). Zatímco mikrobiální PARGs se strukturálně velmi podobají klasickým makro doménám, kanonické PARGs se vyskytují společně s převážně  $\alpha$ -helikální přídatnou doménou, která rozšiřuje hlavní motiv do typicky deseti vláknových  $\beta$ -listů (Rack et al. 2020).

Terminální ADP-ribóza glykohydroláza 1 (TARG1) je protein obsahující makro doménu, který může štěpit ADPr vázané na glutamát, OAADPr a fosfátem vázané ADPr na nukleových kyselinách (Obr. 4) (Palazzo et al. 2019). Tato doména je však u TARG1 velmi odlišná od těch vyskytujících se v PARG, MakroD1 a MakroD2 proteinech a liší se i katalytický mechanismus. Nachází se v jádře a cytoplasmě (Sharifi et al. 2013). V reakci

na DNA poškození se TARG1 přemísťuje do nukleoplazmy, kde může přispívat k odstranění ADP-ribosylace (Bütepage et al. 2018).

Mg<sup>2+</sup>-dependentní ARHs jsou klasifikovány jako DraG-like záhyb-obsahující proteiny, kvůli homologii s bakteriální dinitrogenázovou reduktázo-aktivující glykohydrolázou (DraG). U savců se vyskytují tři – ARH1, ARH2 a ARH3. ARH1 a ARH3 mají odlišné substrátové specifity a u ARH2 zatím nebyla popsána enzymatická aktivita (Bu et al. 2019; Palazzo et al. 2019; Rack et al. 2018).

ADP-ribosyl hydroláza 1 (ARH1) je cytosolický protein, který se v lidském organismu exprimuje ve všech buněčných typech. Ačkoliv je svou strukturou a mechanismem vysoce podobný proteinu ARH3, má ARH1 silnou mono-ADP-ribosyl hydrolytickou aktivitu směrem k N-glykosidickým vazbám na argininových zbytcích (Laing et al. 2011; Palazzo et al. 2019; Rack et al. 2020).

ADP-ribosyl hydroláza 3 (ARH3) byla původně identifikována jako záložní PAR-degradující enzym. Podobně jako PARG štěpí primárně řetězce jako exo-glykohydroláza, avšak jeho specifická aktivita na dlouhé PAR řetězce je skoro o dvě úrovně nižší než u PARG (Fontana et al. 2017; Mueller-Dieckman et al. 2006; Oka et al. 2006; Rack et al. 2018). ARH3 je hlavní hydroláza zodpovědná za štěpení ADP-ribóz z modifikovaných serinových zbytků (Abplanalp et al. 2017; Fontana et al. 2017). Tento enzym je schopen štěpit terminální *O*-glykosidovou vazbu spojující ADP-ribózu a serin na modifikovaných proteinových substrátech (Fontana et al. 2017; Palazzo et al. 2018). Katalytický záhyb je zcela odlišný od PARG, který obsahuje makro doménu. Strukturální rozdílnost se odráží v jiné konformaci ADP-ribózy uvnitř katalytické kapsy, a taktéž v odlišném katalytickém mechanismu (Pourfarjam et al. 2018; Rack et al. 2018; Voorneveld et al. 2018; Wang et al. 2018). Většina ARH3 v buňkách se nachází v cytoplasmě, jádře a mitochondriích (Palazzo et al. 2019).

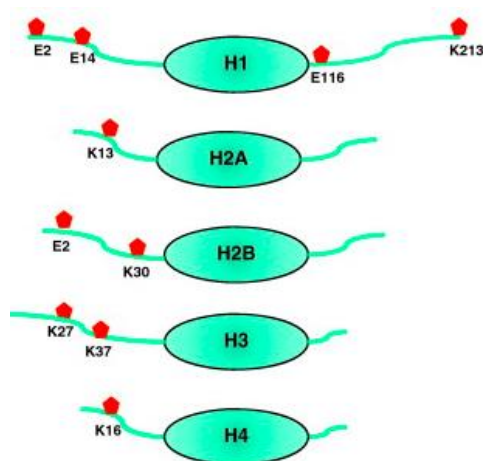
### 3.1.4 ADP-ribosylace histonů

Histonové proteiny jsou předmětem pro rozmanité posttranslační modifikace, které se přímo podílejí na regulaci chromatinové struktury, transkripci, a hrají důležitou roli při replikaci a opravách DNA. Nejlépe popsané posttranslační modifikace histonů jsou acetylace, methylace a fosforylace. Na histonech však také může probíhat jak mono-ADP-ribosylace, tak poly-ADP-ribosylace (Messner a Hottiger 2011).

Mono- nebo poly-ADP-ribosylace histonů vyžadují, aby se proteiny katalyzující tyto reakce vyskytovaly uvnitř stejného buněčného kompartmentu. Na rozdíl od PARPs a sirtuinů, jsou ARTCs exprimovány na povrchu buňky nebo sekretovány do extracelulárního prostoru, a tyto prostory neumožňují ADP-ribosylaci histonů. Ze 7 lidských sirtuinů dokáže mono-ADP-ribosylovat proteiny pouze mitochondriální SIRT4 a jaderný SIRT6 (Milne a Denu 2008; Sauve 2010). SIRT4 se však nenachází ve stejném buněčném kompartmentu jako histony a SIRT6 je spíše NAD<sup>+</sup>-dependentní deacetyláza nežli ADP-ribosyl transferáza (Pan et al. 2011). Z tohoto důvodu jsou členové PARP/ARTD rodiny nejpravděpodobněji jedinými enzymy, které ADP-ribosylují histony. Zatím byly popsány enzymy PARP 1, 3 a 10, které jsou schopny mono- nebo poly-ADP-ribosylace histonů (Messner a Hottiger 2011).

Inkubace histonů izolovaných z jader krysích jater a HeLa buněk s radioaktivně značeným NAD<sup>+</sup> odhalila, že všechny histony (H1, H2A, H2B, H3, H4) mohou být modifikovány přečištěnými PARPs (Burzio et al. 1979; Jump et al. 1979). Oddělené testování ukázalo, že histon H1 je nejlepší PAR akceptor *in vitro*, po něm následuje histon H2B, zatímco H2A, H3 a H4 jsou modifikovány pouze slabě (Kawaichi et al. 1980). I v nativním chromatinu je histon H1 hlavní akceptor PAR. Hlavní jaderné histony jsou především poly-ADP-ribosylovány krátkými oligomery než delšími polymery, zatímco u histonu H1 se vyskytují řetězce dlouhé až 15 ADP-ribózových jednotek za sebou (Messner a Hottiger 2011).

K identifikaci ADP-ribosylovaných histonů je zapotřebí detekovat specifická akceptorová místa. Určení těchto míst je nezbytné pro studium biologických funkcí ADP-ribosylace, protože umožňuje vývoj specifických nástrojů (např. protilátek) pro cílenou analýzu každé modifikace. Je popsáno, že histony jsou převážně kovalentně ADP-ribosylovány v bazických amino-terminálních oblastech na glutamátu na pozici 2 histonu H2B (Burzio et al. 1979), a na pozicích 2, 14, 116 histonu H1, stejně jako na karboxyl-terminální COOH skupině lysinového zbytku na pozici 213 histonu H1, jak je vidět na obrázku 5 (Obr. 5) (Ogata et al. 1980a; Ogata et al. 1980b). *In vitro* experimenty s PARP1 a histonovými peptidy jako akceptory identifikovaly také specifické lysinové zbytky na koncích histonů H2A (K13), H2B (K30), H3 (K27 a K37) a H4 (K16) jako PAR akceptorová místa (Messner et al. 2010).



Obrázek 5 - Schéma ADP-ribosylovaných míst v histonech; Kyselina glutamová (E), Lysin (K) (Messner a Hottiger 2011)

Také serin je podstatný akceptorový zbytek na histonech pro ADP-ribosylaci, která následuje po poškození DNA uvnitř buněk. Velká většina Ser-ADPr cílí na lysin-serin (KS) motiv, což jsou konzervované motivy se serinovými zbytky, kterým předcházejí lysinové zbytky (Bartlett et al. 2018). Ser-ADPr je katalyzovaná pomocí PARP1 a PARP2 v komplexu s Histonovým PARylačným Faktorem 1 (HPF1), který uděluje specifitu vůči serinovým zbytkům (Bonfiglio et al. 2017). Ser-ADPr jsou lokalizovány na N-terminálních koncích, na kterých je množství dynamických, kovalentních modifikací, včetně fosforylace, metylace a ubikvitinylatione. Specifické kombinace těchto značek společně regulují řadu důležitých jaderných funkcí jako kompaktnost a dynamiku chromatinu, transkripci, replikaci a opravu DNA (Bartlett et al. 2018; Huang et al. 2015).

Podle Ser-ADPr bylo usuzováno, že pro ADPr je důležitá hydroxylová skupina na cílové aminokyselině, avšak u threoninu nebyla ribosylace prokázána. I když je threonin chemicky podobný serinu, methylová skupina narušuje ADP-ribosylaci zprostředkovanou PARP1/HPF1. U tyrosinu je však situace jiná. Byla identifikována Tyr-ADPr katalyzovaná pomocí PARP1/HPF1 (Bartlett et al. 2018).

Při DNA poškození podléhají ADP-ribosylaci nejvíce histony H2B a H3 (Boulikas 1988; Kreimeyer et al. 1984). Menší množství ostatních histonů, zvláště H1 a H4 jsou při poškození také modifikovány (Adamietz a Rudolph 1984; Kreimeyer et al. 1984). Výhodná modifikace histonu H2B po fragmentaci DNA nemusí být způsobena díky výrazné akceptorové specifitě, ale je pravděpodobnější, že je to způsobeno změnou

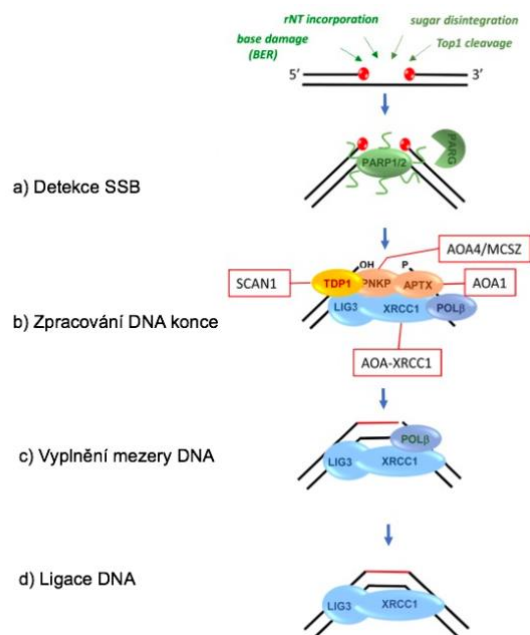
struktury chromatinu a lepší dostupností H2B, k čemuž dochází na základě poškození DNA. Přesné akceptorové místo nebylo zatím identifikováno (Messner a Hottiger 2011).

### **3.2 ADP-ribosylace při DNA poškození**

Poškození DNA vzniká v buňkách nepřetržitě, a může vést ke chromozomovým aberacím, genomové nestabilitě a buněčné smrti. Nejčastěji dochází k jednovláknovému poškození DNA, které vzniká s frekvencí desítek tisíc poškození na buňku za den, může blokovat postup RNA/DNA polymeráz, a tím narušit transkripci genů a duplikaci genomu. Pokud není tento zlom okamžitě opraven, může se během replikace DNA přeměnit na dvouvláknové poškození. Ukazuje se, že při opravách těchto poškození je využíváno signalizace právě pomocí již zmíněných ADP-ribosyl transferáz (Caldecott 2014a).

Jednou z nejčastějších příčin jednovláknového poškození DNA (SSB) je oxidativní útok endogenních reaktivních forem kyslíku (ROS). V případě ROS dochází k jednovláknovým zlomům třikrát častěji než ke dvouvláknovým zlomům (Bradley a Kohn 1979). Může k nim dojít přímo, rozpadem oxidovaného cukru, nebo nepřímo během básové excizní opravy DNA (BER) (Caldecott 2014b; Demple a DeMott 2002). K SSB může také docházet kvůli chybným nebo neúspěšným aktivitám buněčných enzymů, jako je DNA topoizomeráza 1 (TOP1) (Pommier 2003; Wang 2002). V poslední době se také zjistilo, že chybné začlenění ribonukleotidů do DNA je významným a velmi častým zdrojem endogenního jednovláknového poškození DNA (Caldecott 2014c; Williams a Kunkel 2014).

Opravy poškození DNA jsou důležité, protože jejich defekty vedou k mnoha lidským genetickým chorobám (Caldecott 2008). Jednovláknové zlomy se opravují pomocí nukleotidové excizní opravy (NER), báze excizní opravy (BER), opravy chybného párování bází (MMR) nebo přímé reverzní opravy. Zatímco jednovláknové DNA zlomy mohou vznikat z různých zdrojů, na jejich opravách se podílejí podobné enzymy. Většina jednovláknových poškození je opravena rychlým procesem oprav, který lze obecně rozdělit do čtyř základních kroků: detekce SSB, zpracování konce DNA, vyplnění mezery DNA a ligace DNA (Obr. 6) (Caldecott 2014b).



Obrázek 6 - Schéma opravy jednovláknového poškození DNA (Caldecott 2019; upraveno)

### 3.2.1 Detekce jednovláknových poškození DNA

Jednovláknové zlomy, které vznikají nepřímo rozpadem oxidované deoxyribózy nebo nepřímo během báze excizní opravy (BER) jsou primárně detekovány poly(ADP-ribóza) polymerázou 1 (PARP1) (Obr. 6 a) (Caldecott 2014a). PARP1 se rychle naváže na poškozené vlákno DNA, je aktivována, a následně modifikuje sebe a další cílové proteiny rozvětvenými řetězci poly(ADP-ribózy). Vzápětí jsou však tyto řetězce degradovány pomocí poly(ADP-ribóza) glykohydrolázy (PARG) a dalších hydroláz, PARP1 (a ostatní poly-ADP-ribosylované proteiny) se dostává zpět do de-ribosylovaného stavu (Caldecott 2014b; Davidovic et al. 2001).

Hlavní rolí, kterou PARP1 v tomto procesu hraje je, že podporuje vazbu a nahromadění proteinu XRCC1. XRCC1 je velice podstatný scaffoldový protein, který nemá



enzymatickou aktivitu, do míst poškození váže, v některých případech stabilizuje a/nebo stimuluje několik enzymatických složek jednovláknové opravy DNA, čímž urychluje opravný proces (Caldecott 2008; Caldecott 2003). XRCC1 přímo interaguje s PARP1 a PARP2, a přednostně pokud jsou tyto proteiny autoribosylované (Caldecott et al. 1996; Masson et al. 1998; Schreiber et al. 2002). Schopnost XRCC1 vázat se na ribosylované PARPs a případně na ostatní ribosylované proteiny je umožněna díky konzervované BRCT doméně, která se nachází v centrální oblasti XRCC1 (El-Khamisy et al. 2003; Masson et al. 1998; Okano et al. 2003). Aktivace PARP1 tudíž dovoluje nahromadění proteinu XRCC1, který urychluje vazbu dalších DNA opravných proteinů v místech chromosomálního poškození (Caldecott 2014b).

### 3.2.2 Zpracování DNA konce

Jednovláknové zlomy DNA (SSBs) jsou obvykle doprovázeny ztrátou jednoho nukleotidu a poškozeným 5'- a/nebo 3'- koncem v místě poškození. Tyto konce musí být přestaveny na obvyklé 3'-hydroxyl (3'-OH) a 5'-fosfát (5'-P) konce, aby mohlo dojít k vyplnění mezery a ligaci DNA (Obr. 6 b). Zvláštní pozornost musí být věnována 3'-fosfát a 3'-fosfoglykolát koncům, protože vznikají jako důsledek přímých jednovláknových zlomů způsobených reaktivními formami kyslíku. 3'-fosfát je hlavním substrátem pro polynukleotid kinázu/fosfatázu (PNKP) a 3'-fosfoglykolát je substrát pro AP endonukleázu 1 (APE1) (Caldecott 2008; Winters et al. 1994). Naproti tomu SSBs, které vznikají nepřímo během BER obvykle vytváří 5'-deoxyribóza fosfát (dRP) konec vznikající štěpením abasických míst APE 1. 5'-dRP konce jsou substrátem pro AP lyázovou aktivitu DNA polymerázy  $\beta$  (POL  $\beta$ ). Pokud POL  $\beta$  nedokáže odstranit 5'-dRP skupinu (je-li dRP oxidován), 5'-konec může být přemístěn během tzv. long-patch vyplňování mezery a odstraněn pomocí flap endonukleázy-1 (FEN-1). SSBs, které vznikají během BER, mohou taktéž tvořit 3'-fosfát nebo 3'- $\alpha,\beta$ -nenasycený aldehydový konec místo 5'-dRP konce, a to, když jsou vytvořeny štěpením abasického místa AP lyázovou aktivitou DNA glykosylázy, místo pomocí APE1. Tyto konce jsou substrátem pro PNKP a APE1. Další dva typy poškozeného konce jsou 3'- a 5'-konce kovalentně spojené s topoizomerázou 1 (TOP1) a adenosin monofosfátem (AMP). SSBs způsobené TOP1 vznikají na základě neúspěšné aktivity tohoto enzymu, a jsou zpracovány tyrosyl DNA fosfodiesterázou 1 (TDPI). K SSBs s 5'-AMP koncem dochází neúspěšnou aktivitou

DNA ligázy na již stávajících jednovláknových zlomech, a jsou zpracovány aprataxinem (APTX). SSBs také mohou vznikat v důsledku chybného začlenění ribonukleotidu (Caldecott 2014b).

Tyto léze jsou opravovány pomocí ribonukleotidové excizní opravy (RER), tedy procesem, který je analogický k BER, ale v počátečním kroku incize využívá RNaseH2 (Sparks et al. 2012). 5'-ribonukleotid konce, které jsou výsledkem štěpení RNaseH2 mohou být běžnými substráty pro aktivitu APTX, jelikož se jeví jako vysoce náchylné k neúspěšné adenylaci DNA ligázami (Tumbale et al. 2014). Může také dojít k chybnému štěpení TOP1 na včleněných ribonukleotidech, což vede ke vzniku 2',3'-cyklických fosfátových konců, které k odstranění vyžadují zatím neidentifikovaný protein (Williams et al. 2013).

Scaffoldový protein XRCC1 má mimořádný význam během zpracování DNA konce. Interaguje přímo s PNKP, APTX, POL  $\beta$  a nepřímo s TDP1. V případě PNKP je očividné, že interakce s XRCC1 stimuluje aktivitu DNA kinázy a DNA fosfatázy. Interakce XRCC1 s PNKP, APTX a POL  $\beta$  také podporuje hromadění těchto enzymů v místě DNA poškození a zrychlení opravy DNA (Caldecott 2014b).

### 3.2.3 Vyplnění mezery a ligace DNA

Jakmile jsou poškozené 3'-konce na SSB obnoveny do své konvenční hydroxylové konfigurace, může nastat vyplnění mezery (Obr. 6 c). Tento proces často vyžaduje vsunutí jednoho nukleotidu, který chybí (short-patch repair), tak je tomu u většiny SSBs. U některých SSBs je však pro zaplnění mezery potřeba vícero nukleotidů (long-patch repair) za účasti FEN-1, který odstraňuje nahrazené 5'-nukleotidy. Biochemické experimenty ukazují, že mezeru vyplňuje DNA POL  $\beta$  u short-patch opravy, a DNA polymeráza  $\delta$  a DNA polymeráza  $\epsilon$  v případě, že se jedná o long-patch opravu. Na short-patch vyplnění mezery se tedy podílí XRCC1 a POL  $\beta$ , pokud nemůže proběhnout tento proces, nastane long-patch, na kterém se podílí proteiny FEN-1 a PCNA (Caldecott 2014b).

Konečným krokem opravy jednovláknového poškození DNA je DNA ligace (Obr. 6 d). V tomto procesu jsou důležité dva enzymy – LIG1 a LIG3 $\alpha$ . LIG3 $\alpha$  je stabilní a aktivní jako rekombinantní protein *in vitro*, ale jaderný enzym vyžaduje ustavující

interakci s XRCC1 pro zajištění stability a akumulaci v místech poškození DNA. Také se podílí na short-patch opravě. LIG1 naopak k akumulaci na poškozených místech potřebuje interakci s PCNA a podílí se na long-patch opravě (Caldecott 2014b; Caldecott 2019).

### 3.3 ADP-ribosylace a neurodegenerativní onemocnění

Mutace spojené s opravou jednovláknových poškození DNA postihují postmitotické dlouhožijící neurony a vedou ke vzniku dědičných neurodegenerativních onemocnění (Caldecott 2008). Stejně jako poruchy v opravách jednovláknového poškození DNA, tak i mutace ve složkách, které se podílejí na metabolismu ADP-ribosylace, jsou spojeny s dědičnými neurodegenerativními onemocněními (Danhauser et al. 2018; Ghosh et al. 2018).

Chorobou spojenou s poruchami oprav SSBs je *ataxia-oculomotor apraxia 1* (AOA1), která vzniká mutací genu *APTX* pro aprataxin (Date et al. 2001). Je to autosomální recesivní spinocerebelární syndrom s ataxií, který se neurologicky podobá Friedreichově ataxii a Ataxii telangiectasii (AT), ale postrádá jiné než neurologické znaky jako třeba imunodeficienci a telangiectasii (Aicardi et al. 1988). Charakteristickými znaky AOA1 je variabilní nástup (mezi 1.-16. rokem života), cerebelární atrofie a ataxie (nekoordinovaný pohyb, držení těla), pozdní axonální periferní neuropatie a okulomotorická apraxie (omezený pohyb očí) (Caldecott 2008).

Mutace v *TDPI* způsobují chorobu zvanou *spinocerebelární ataxie s axonální neuropatií 1* (SCAN1) (Takashima et al. 2002). Podobně jako u AOA1 nemají pacienti se SCAN1 chromozomální nestabilitu a predispozice k nádorovým onemocněním, ale mají atrofii mozečku a periferní neuropatii. Je u nich přítomná mírná hypercholesterolemie a hypoalbuminémie (Caldecott 2008).

Dědičné mutace v *PNKP* vedou ke spektru neurologických patologií od mírných neurodegenerací jako je *ataxie s okulomotorickou apraxií 4* (AOA4) (Bras et al. 2015) nebo *Charcot-Marie-Tooth onemocnění 2 B2* (CMT2B2) (Leal et al. 2018), až po těžké neurodevelopmentální dysfunkce jako je *mikrocefalie s časnými záchvaty* (MCSZ) (Shen et al. 2010). MCSZ je onemocnění spojené s opožděným vývojem, mikrocefalií a záchvaty. Molekulárním znakem této choroby je hyperaktivace PARP1 u neopravených jednovláknových poškození (Shen et al. 2010). AOA4 je degenerativní choroba spojená

s cerebelární atrofií, ataxií a okulomotorickou apraxií (Bras et al. 2015). *Charcot-Marie-Tooth onemocnění 2 B2* představuje heterogenní skupinu dědičných periferních neuropatií s relativně pozdním nástupem cerebelární ataxie (Leal et al. 2018).

Patologie u XRCC1 pacientů kombinují znaky všech výše popsaných onemocnění, což odpovídá úloze, kterou XRCC1 při opravě poškozené DNA hraje. Mutace v *XRCC1* způsobují *okulární motorickou apraxii, axonální neuropatii a progresivní cerebelární ataxii*. Mutantní XRCC1 pacientské buňky mají nejenom sníženou schopnost opravy poškozené DNA, ale také zvýšené hladiny ADP-ribosylace (Hoch et al. 2017).

Trvale neopravené SSBs mohou vést k prodloužené aktivitě PARP1. Tato hypotéza vychází z toho, že nadměrná syntéza poly(ADP-ribózy) nebo nadměrné snížení NAD<sup>+</sup> kvůli aktivitě PARP1, jsou neurotoxické a spojené s ischemicko-reperfuzním onemocněním (Eliasson et al. 1997). Ztráta XRCC1 může spustit hyperaktivaci PARP1 v mozku při endogenním poškození DNA, což vede ke ztrátě nebo dysfunkci cerebelárních neuronů (Hoch et al. 2017). Genetická a enzymatická modulace PARP1 je zodpovědná i za jiná běžná neurodegenerativní onemocnění jako je Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza nebo Alzheimerova choroba. Tyto nemoci mají společný patogenní mechanismus, který je charakteristický nahromaděním cytotoxických proteinů, zvýšenými hladinami oxidativního stresu následovanými DNA poškozením, aktivací PARP1 a nadbytkem PAR (Palazzo et al. 2019).

Mutace ve složkách, které se podílejí na metabolismu ADP-ribosylace, jsou taktéž spojeny s dědičnými neurodegenerativními onemocněními. Jedná se například o genetickou poruchu zvanou *těžká progresivní neurodegenerativní porucha se záchvaty*, která je způsobena mutací v proteinu TARG1 (Sharifi et al. 2013). Mutace v genu *ADPRHL2* kódující protein ARH3 způsobuje *genetické onemocnění s nástupem v dětství, vyvolané stresem s variabilní ataxií a záchvaty* (CONDSIAS) (Danhauser et al. 2018; Ghosh et al. 2018). Je zajímavé, že deficit nebo mutace v *ARH3* nezabraňuje opravám jednovláknového poškození DNA, ale vede k akumulaci ADP-ribosylací na histonech (Hanzlíková et al. 2020).

U neurodegenerativních onemocnění je žádoucí, aby se začalo s léčbou co nejdříve. Cílem studia metabolismu ADP-ribosylace a mutací složek v tomto procesu je vyvinout markery neurodegenerací, a detekovat tak onemocnění ještě dříve, než dojde k jeho fenotypovým projevům.

## 4 METODIKA

### 4.1 Použité chemikálie, protilátky, pufrý, inhibitory

Tabulka 1 - Seznam použitých chemikálií

Chemikálie	Společnost (katalogové číslo)	Zkratka	Skladování
Aceton	Lach-ner s. r. o. (20001-AT0-M10001)	-	RT
Akrylamid 30%	Serva Electrophoresis (10687,01)	-	4 °C
2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol hydrochlorid	Fisher BioReagents (BP152-1)	Tris	RT
Ampicilin	Fisher (BP1760-25)	-	- 20 °C
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, s.r.o. (B0126)	-	RT
Butanol	Lach-ner s. r. o. (20010-CT0-M1000-1)	-	RT
Chlorid sodný	Lach-ner s. r. o.	NaCl	RT
Chlorovodíková kyselina 37%	VWR International s. r. o. (20252.290)	HCl	RT
Coomassie (Brilliant Blue G-250)	Fisher Scientific s. r. o. (BP100)	-	RT
Destilovaná voda	-	dH <sub>2</sub> O	RT
4', 6-diamidino-2-fenylindol	Fisher Scientific s. r. o. (A202710100)	DAPI	- 20 °C
Dimethyl pimelimidát dihydrochlorid	Sigma-Aldrich s. r. o. (D8388)	DMP	- 20 °C
Dimethylsulfoxid	Serva (20385.02)	DMSO	RT
Dithiothreitol	Fisher Scientific s. r. o. (B172/5)	DTT	- 20 °C
Dodecylsírán sodný	Sigma-Aldrich s. r. o. (L3771)	SDS	RT
Ethanolamin	Sigma-Aldrich s. r. o. (E9508)	-	RT
Ethylendiamintetraoctová kyselina	Sigma-Aldrich s. r. o. (E5134)	EDTA	RT
Fenylmetansulfonyl fluorid	Sigma-Aldrich s. r. o. (P7626)	PMSF	RT
4% formaldehyd	VWR International s. r. o. (9713-1000)	FA	4 °C
Glycerol	Lach-ner s. r. o. (40058-AT0-M1000-1)	-	RT
Glycin	Fisher Scientific, s.r.o. (G/0800/600)	-	RT
Hygromycin B	Invitrogen (10687-010)	-	4 °C
Methanol	VWR International s. r. o. (20847.318)	-	RT
Peroxodisírán amonný	Fisher Scientific, s. r. o. (A/P470/46)	APS	4 °C
Polysorbát 20	Sigma-Aldrich, s.r.o. (P1379)	Tween-20	RT
Ponceau S	Sigma-Aldrich s. r. o. (141194)	-	RT
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid	Fisher (BP1755-10)	IPTG	- 20 °C
Tetramethylethylendiamin	Sigma-Aldrich s.r.o. (T9281)	TEMED	4 °C
Triethanolamin	Sigma-Aldrich s.r.o.	-	RT
Triton X-100	Sigma-Aldrich s. r. o. (X100-1L)	Triton-X	RT
Trypsin	Sigma-Aldrich s. r. o.	T/E (1:1 trypsin:EDTA)	- 20 °C
Vectashield antifade montovací médium	Vector Laboratories (H-1000)	Vectashield	4 °C

Tabulka 2 – Seznam použitých pufrů a jejich složení a použítá média

Název	Složení, společnost	Zkratka	Skladování
Diluční pufr (pro IP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>10 mM Tris-HCl, pH 8,0</li> <li>150 mM NaCl</li> <li>2 mM EDTA</li> <li>1% Triton X-100</li> </ul>	-	4 °C
Diluční pufr s inhibitory (pro IP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>10 mM Tris-HCl, pH 8,0</li> <li>150 mM NaCl</li> <li>2 mM EDTA</li> <li>1% Triton X-100</li> <li>100 μM PARGi</li> <li>40 μM PARPi</li> <li>COMPLETE (50x ředit s dH<sub>2</sub>O)</li> <li>PhosStop (20x ředit s dH<sub>2</sub>O)</li> </ul>	-	4 °C
Dumbecco's Modified Eagle Médium: Nutrient mixture F-12	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sigma-Aldrich, s. r. o. (D6429-500ML)</li> </ul>	DMEM/ F12	4 °C
Fetální bovinní sérum	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gibco (10270)</li> </ul>	FBS	- 20 °C
Fosfátový pufr	<ul style="list-style-type: none"> <li>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (nebo Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O) + dH<sub>2</sub>O</li> <li>Gibco (1001003)</li> </ul>	PBS	4 °C
LB médium	<ul style="list-style-type: none"> <li>1% trypton</li> <li>0,5% kvasnicový extrakt</li> <li>1% NaCl</li> <li>dH<sub>2</sub>O</li> </ul>	-	4 °C
Lyzační pufr (pro IP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>10 mM Tris-HCl, pH 8,0</li> <li>2% SDS</li> <li>150 mM NaCl</li> </ul>	-	4 °C
Lyzační pufr s inhibitory (pro IP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>10 mM Tris-HCl, pH 8,0</li> <li>2% SDS</li> <li>150 mM NaCl</li> <li>100 μM PARGi</li> <li>40 μM PARPi</li> <li>COMPLETE (50x ředit s dH<sub>2</sub>O)</li> <li>PhosStop (20x ředit s dH<sub>2</sub>O)</li> </ul>	-	4 °C
Pufr A (separační gel)	<ul style="list-style-type: none"> <li>1,5 M Tris, pH 8,8</li> <li>0,4% SDS</li> </ul>	-	RT
Roztok DTT 1 M	<ul style="list-style-type: none"> <li>10 ml DTT + 0,04 g bromfenolové modři</li> </ul>	-	- 20 °C
Pufr B (zaostřovací gel)	<ul style="list-style-type: none"> <li>1,5 M Tris, pH 6,8</li> <li>0,4% SDS</li> </ul>	-	RT
Running pufr 10x	<ul style="list-style-type: none"> <li>30,3 g Tris</li> <li>144 g Glycin</li> <li>10 g SDS</li> <li>1 l dH<sub>2</sub>O</li> </ul>	-	RT
SDS pufr	<ul style="list-style-type: none"> <li>2,0 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8</li> <li>0,8 g SDS</li> <li>4,0 ml 100% glycerolu</li> <li>1,0 ml 0,5 M EDTA</li> </ul>	-	4 °C
SOC médium	<ul style="list-style-type: none"> <li>Invitrogen (15544-034)</li> </ul>	-	4 °C
Transferový pufr 10x	<ul style="list-style-type: none"> <li>30,3 g Tris</li> <li>144 g Glycin</li> <li>1 l dH<sub>2</sub>O</li> </ul>	-	RT

Tabulka 3 – Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek

<b>Primární protilátka</b>	<b>Použitá metoda</b>	<b>Společnost (katalogové číslo)</b>	<b>Zkratka</b>	<b>Skladování</b>
Anti-ADPRHL2 protilátka (rabbit poly)	WB	Sigma (HPA027104)	ARH3	4 °C
Anti-HPF1 protilátka (rabbit / poly)	WB	NBPI-93973	HPF1	4 °C
Anti-PAN protilátka (mono + poly ADPR) (rabbit)	WB, IF	Millipore (MABE1016)	PAN	- 20 °C
Anti-PAN protilátka (mono + poly ADPR) (rabbit)	WB, IF	Cell Signaling (83732)	PAN	- 20 °C
Anti- poly(ADP-ribóza) protilátka (rabbit)	IF	Trevigen (4336-BPC-100)	PAR	4 °C
$\alpha$ -Tubulin (mouse)	WB	Santa Cruz (sc-23948)	-	4 °C
Anti-mono(ADP-ribóza) protilátka (rabbit)	IF	Spolupráce s Matic Ivan lab (33204)	MAR	4 °C
Anti-gamma H2AX protilátka (phospho Ser139) (mouse)	IF	Millipore (05-636)	$\gamma$ H2AX	4 °C
<b>Sekundární protilátka</b>	<b>Použitá metoda</b>	<b>Společnost (katalogové číslo)</b>	<b>Zkratka</b>	<b>Skladování</b>
Alexa Fluor 488 (goat anti rabbit)	IF	Invitrogen (A11008)	GAR 488	4 °C
Alexa Fluor 568 (donkey anti mouse)	IF	Invitrogen (A10037)	DAM 568	4 °C
Goat anti mouse IgG HRP	WB	BioRad (170-6516)	GAM	4 °C
Goat anti rabbit IgG HRP	WB	BioRad (170-6516)	GAR	4 °C
<b>Protein ladder</b>	<b>Použitá metoda</b>	<b>Společnost (katalogové číslo)</b>	<b>Zkratka</b>	<b>Skladování</b>
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	WB	Thermo Fisher (26616)	-	- 20 °C

Tabulka 4 – Seznam použitých inhibitorů

Inhibitor	Společnost (katalogové číslo)	Zkratka	Skladování
ARH3 inhibitor 26	National Cancer Institute - Chemotherapeutic Agents Repository, Fisher BioServices, Germantown, MD (357754-V/1)	AI26	- 80 °C
COMPLETE	Sigma (04693132001)	-	4 °C
Poly(ADP-ribóza) glykohydroláza inhibitor	Sigma (SML1781-25MG)	PARGi	- 80 °C
Poly(ADP-ribóza) polymeráza inhibitor	Axon (2001)	PARPi	- 80 °C
PhosStop	Roche (4906837001 - 20 tabs)	-	4 °C

## 4.2 Použité komerční kity

Tabulka 5 – Seznam použitých kitů

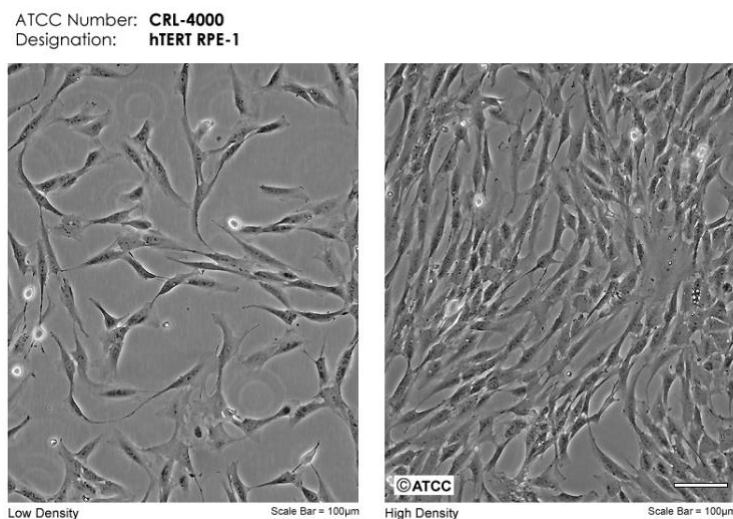
Kit	Společnost (katalogové číslo)	Metoda
Pierce™ BCA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (23227)	Kvantifikace proteinů
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences (RPN2232)	Western blot
SilverQuest staining kit	Thermo Fisher Scientific (LC6070)	Barvení gelu

## 4.3 Buněčné kultury

K experimentům byly využity epitelové buňky hTERT RPE-1 (dále jako RPE-1) získané z ATCC (ATCC® CRL-4000™) a buňky *ARH3*<sup>-/-</sup> RPE-1 (klon #1), které byly obdrženy z laboratoře Keitha W. Caldecotta (Genome Damage and Stability Centre, University of Sussex, UK), kde byly připraveny pomocí metody CRISPR/Cas9. RPE-1 jsou adherentní buňky z epitelu sítnice imortalizované metodou hTERT. Tyto buněčné kultury byly kultivovány v růstovém médiu DMEM:F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium), do kterého bylo přidáno 10% fetální bovinní sérum (FBS) a 0,01 mg/ml hygromycinu B. Buňky byly pěstovány v kultivačních lahvích o rozměru 75 cm<sup>2</sup> a pasážovány 2x týdně v poměru 1:4 až 1:10, dle konfluence. Konfluentní buňky určené k pasážování lze vidět na obrázku 7 vpravo (Obr. 7). Při pasážování se nejprve odstranilo



kultivační médium, poté se láhev promyla 5 ml PBS (Fosfátového pufru). Dále byl přidán 1 ml roztoku Trypsin/EDTA, který způsobil odlepení buněk od povrchu lahve. Trypsin/EDTA se nechal působit 5 minut v inkubátoru při 37°C. Poté bylo přidáno čerstvé růstové médium (množství dle konfluence), ve kterém byly buňky řádně resuspendovány. Z této směsi se odebral 1 ml do nové lahve a k němu bylo přidáno 9 ml čerstvého média. Kultivace probíhala při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.



Obrázek 7 - Buňky hTERT RPE-1; vlevo nízká konfluence, vpravo vysoká (HTERT 2016)

#### 4.4 Příprava buněčných lyzátů a BCA esej

Pro získání proteinů bylo potřeba buňky lyzovat, tedy dezintegrovat membránové struktury. Buňky byly promyty v PBS, poté k nim byl přidán SDS pufr vyhřátý na teplotu 95 °C. Dále byly buněčné lyzáty seškrabány do mikrozkušavek, 10 minut inkubovány při 95 °C, centrifugovány na maximum dvě minuty a sonikovány 3 x 30 sekund ON/OFF (Bioruptor Sonicator System, verze 2.1.). Po sonikaci byly lyzáty centrifugovány 5 minut na maximum otáček. Koncentrace proteinů v buněčných lyzátech byla měřena pomocí BCA esej (Pierce<sup>TM</sup> BCA Assay Kit, ThermoFisher Scientific; katalogové číslo 23227). Tento kit funguje na principu kombinace biuretové reakce s vysoce citlivou a selektivní kolorimetrickou detekcí kationtu Cu<sup>+</sup> s kyselinou bicinchoninovou (BCA), vzniklé zabarvení je přímo úměrné počtu peptidových vazeb účastnících se reakce. Poté byla na spektrofotometru při vlnové délce 560 nm změřena absorbance. Pomocí Microsoft Excel

byl vytvořen graf závislosti absorbance na koncentraci, a z toho vypočítána koncentrace jednotlivých lyzátů. Lyzáty byly do gelu aplikovány v koncentraci 30 µg protein/jamka.

#### **4.5 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

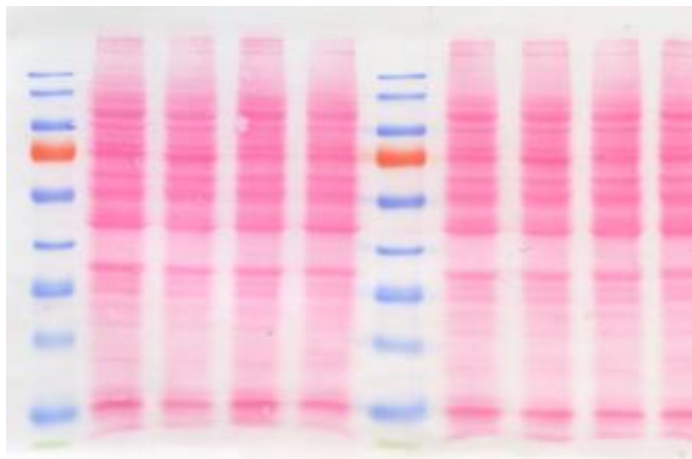
SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu je založena na principu separace proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Dodecylsulfát sodný (SDS) udělí proteinům záporný náboj, a ty pak migrují ke kladné elektrodě (anodě). Proteiny jsou tak oddělovány podle molekulové hmotnosti v polyakrylamidovém gelu.

Pro elektroforézu byl použit 10% nebo 14% gel. Nejprve byl připraven separační gel (dH<sub>2</sub>O, 30% akrylamid, pufr A, 10% APS, TEMED), který byl napipetován mezi skla v elektroforetické aparatuře. Ihned poté byl přelit isobutanolem. Po ztuhnutí gelu byl isobutanol vylit a gel promyt destilovanou vodou. Dále byl přidán zaostřovací gel (dH<sub>2</sub>O, 30% akrylamid, pufr B, 10% APS, TEMED), do kterého byl vsazen hřebínek pro vytvoření jamek. Po zatuhnutí gelu byl hřebínek opatrně vytažen, aby nedošlo k poškození jamek. K lyzátům byl přidán SDS pufr, podle vypočteného množství z BCA eseje. Také byl přidán dithiotreitol (10x DTT) obsahující bromfenolovou modř. DTT je redukční činidlo, které způsobí rozpad disulfidických můstků. Vzorky byly před nanesením denaturovány 10 minut při 95 °C. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 25 mA/gel po dobu 60–90 minut.

#### **4.6 Western Blot, barvení pomocí protilátek a detekce proteinů**

Po proběhnutí gelové elektroforézy byly proteiny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu pomocí Western blotového zařízení při konstantním napětí 400 mA, proudu 150 V, po dobu 90 minut za přítomnosti transferového pufru. K důkazu úspěšného přenosu proteinu a rovnoměrně naneseného množství lyzátu byla membrána barvena roztokem Ponceau S. Membrána byla 1 minutu inkubována v roztoku Ponceau S, poté byla promyta

dH<sub>2</sub>O, vysušena a oskenována. Na obrázku 8 je ilustrativní foto obarvené membrány (Obr. 8). Poté byla membrána odbarvena pomocí PBS-Tween 20 a blokována 1 hodinu



Obrázek 8 - Detekce proteinů na membráně, obarvené pomocí Ponceau S (vlastní zdroj)

v 10% mléce. Dále byla promyta v PBS-Tween 20 3x 5 minut. Následovala inkubace v primární protilátce (naředěné v 5% mléce) 1 hodinu při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C na rotátoru. Po inkubaci byla membrána 3x 5 minut promyta v PBS-Tween 20 a inkubována v sekundární protilátce (naředěné v 5% mléce) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě na rotátoru. Dále byla membrána znovu 3x promyta v PBS-Tween 20. K následné detekci proteinů musela být membrána nejprve dobře vysušena, poté na ni byl přidán ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents kit (GE Healthcare, kat. č. RPN2209), který byl smíchan podle přiloženého protokolu od výrobce (1:1 – reagent A:B). Dále byla membrána umístěna do kazety, na ni byl přiložen film, a po různě dlouhé době expozice (zvolené podle typu protilátek) byl film vyvolán pomocí automatizovaného rentgenového filmového procesoru OPTIMAX 2010 (PROTEC GmbH & Co. KG).

#### 4.7 Preextrakce a fixace buněk

Buňky narostlé na imunofluorescenčních sklíčkách ve 24 jamkové destičce byly promyty 500 µl/jamka PBS. Preextrakce probíhala na ledu a do jamek bylo přidáno 400 µl 0,2% roztoku Triton-X-100, který se nechal působit 2 minuty. Po důkladném odsátí se do jamek přidal 1 ml 4% formaldehydu a nechal se působit 10 minut na kývačce. Poté byly jamky se sklíčky důkladně promyty 500 µl/jamka PBS 2x 5 minut.

## 4.8 Imunofluorescence

K buňkám fixovaným na sklíčkách bylo přidáno 300  $\mu$ l roztoku methanol:aceton (1:1) na 5–10 minut při laboratorní teplotě na kývačce (11 osc/min). Poté byla sklíčka promyta 500  $\mu$ l/jamka PBS (2x 5 min) a blokována v 10% filtrovaném séru (FBS) 200  $\mu$ l/sklíčko při laboratorní teplotě. Po 30 minutách byla přidána naředěná primární protilátka v 10% FBS 200  $\mu$ l/sklíčko a inkubace probíhala jednu hodinu při laboratorní teplotě. Poté byla sklíčka promyta 300  $\mu$ l/sklíčko PBS s opakováním 3x 5 minut. Dále bylo přidáno 100  $\mu$ l naředěné sekundární protilátky v 10% FBS a inkubováno jednu hodinu při laboratorní teplotě. Po uplynutí jedné hodiny byla sklíčka promyta 3x 5 minut 300  $\mu$ l/sklíčko PBS. Jádra byla obarvena DAPI roztokem, koncentrace 1  $\mu$ g/ml v dH<sub>2</sub>O – 100  $\mu$ l/sklíčko, působení 2 minuty. Skla byla poté montována v montovacím médiu VECTASHIELD (Vector Laboratories, SKU: H-1000-10). Byly přidány 3  $\mu$ l montovacího média na sklo. Výsledky byly pozorovány na fluorescenčním mikroskopu (Eclipse E400 Microscope, Nikon) a foceny a analyzovány na mikroskopu ScanR.

## 4.9 Mikroskopie a ScanR

K pozorování živých buněk byla využita světelná mikroskopie (mikroskop Primovert, Zeiss). Fluorescenční mikroskopie (mikroskop Eclipse E400, Nikon) byla využita k pozorování nabarvených zafixovaných buněk.

Pozorování fixovaného materiálu bylo prováděno na invertovaném fluorescenčním mikroskopu Olympus ScanR 3.1., OLYMPUS. Fotografie ve vysokém rozlišení byly získány pomocí automatického širokouhlého screeningového zařízení ScanR s motorickým stolcem, UPLSAPO 40x/0.95 DRY CORR; FWD 0.18 (CG 0.11 – 0.2) objektivem a sCMOS kamerou Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V2 – 6,5  $\mu$ m pixel. Z každého vzorku bylo nasnímáno přibližně 144 obrázků v různých pozicích ve 3 kanálech. Pomocí dot blotu a histogramu byla na základě velikosti a cirkularity zagetována pouze hezká odpovídající jádra. V každém vzorku bylo vybráno nejméně 450 jader, na kterých se pozorovala intenzita ADP-ribosylace. Data z analýzy byla zpracována v Microsoft Excel a v programu Prism GraphPad.

## 4.10 Vyhodnocení dat a statistika

Data byla vyhodnocena pomocí analyzačního softwaru ScanR, programu Microsoft Excel. Statistické zpracování bylo provedeno v programu Prism GraphPad a Microsoft Excel.

U grafu zpracovaného ze tří experimentů byla standardní chyba průměru (SEM) vypočtena takto:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$n$  = počet vzorků;  $SD$  = směrodatná odchylka;  $x$  = hodnota;  $\bar{x}$  = průměrná hodnota

Statistický test byl proveden v programu GraphPad Prism. Pro srovnání dvou nezávislých vzorků byl použit Studentův nepárový t-test, kde se počítala p-hodnota.

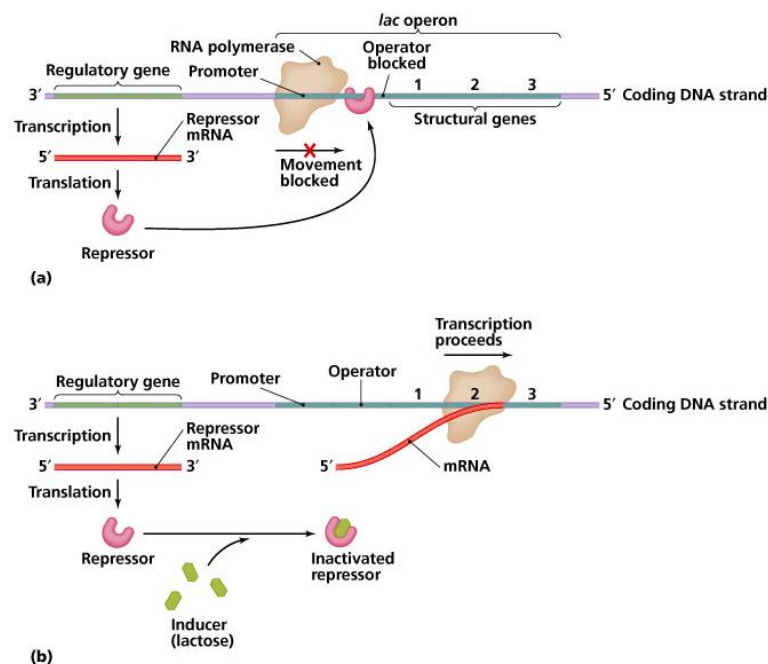
## 4.11 Příprava kuliček vázajících ADP-ribózu

### 4.11.1 Expres proteinové domény

K expresi proteinové domény byly využity plasmidy pGEX Af1521 WT/MUT, kódující gen pro makro doménu Af1521 WT nebo MUT. Tato makro doména je schopna vázat ADP-ribosylace (WT), avšak pokud dojde k mutaci v G42E přestane toho být schopna (MUT), a může tak být použita k přečištění od nespecifických proteinů. Makro doména je fúzována s glutathion S-transferázou (GST), díky které se může připojit na glutathion-sepharosové kuličky. Plasmidy byly transformovány do bakterie *E. coli* BL21(DE3)pLys následujícím způsobem. K 50  $\mu$ l bakterií byl přidán 1  $\mu$ l plasmidu a následovala inkubace 15 minut na ledu. Poté byl proveden tepelný šok 50 sekund při 42 °C. Následně byly bakterie ochlazeny 2 minuty na ledu, bylo přidáno 450  $\mu$ l SOC média a bylo třepáno 500 rpm při 37 °C 1 hodinu.

Dále bylo 50  $\mu$ l bakterií naočkováno na agarové misky s ampicilinem a necháno růst v inkubátoru při 37 °C přes noc. Druhý den se vybrala jedna kolonie a byla inokulována do 50 ml přehřátého LB média s ampicilinem v Erlenmeyerově baňce, a inkubována

při 37 °C na třepačce několik hodin, dokud nebylo OD (optical density) mezi 0,4–0,6. Poté se směs ochladila na ledu a nechala v lednici přes noc. Další den byla kultura centrifugována 5 minut na 3000 g při 4 °C a peleta byla resuspendována v 50 ml média s 50 µl ampicilinu. Dále bylo 10 ml (OD 0,01) resuspendované kultury inokulováno do 0,5 l LB média s ampicilinem, vše bylo promícháno a inkubováno za neustálého míchání při 37 °C dokud nebylo OD 0,8 (přibližně 4 hodiny). Poté byla kultura ochlazená 10 minut na ledu, a bylo z ní odebráno 0,5 ml jako preindukční vzorek na SDS elektroforézu. Ke zbytku byl přidán 1 mM IPTG (Isopropyl β-D-1 thiogalaktopyranosid), který spouští transkripci *lac* operonu, a je proto využíván k indukci proteinové exprese. Tato sloučenina je molekulární napodobeninou allolaktózy, tedy metabolitu laktózy, který spouští transkripci *lac* operonu. IPTG se stejně jako allolaktóza váže na *lac* represor a uvolní tak represor z *lac* operátoru, což umožní transkripci genů v *lac* operonu. Schéma funkce je znázorněno na obrázku 9 (Obr. 9). Jeho výhodou je, že není buňkou nijak metabolizován nebo degradován, a jeho koncentrace je tedy konstantní v průběhu celé reakce.



Obrázek 9 - Schéma funkce IPTG (IPTG induction 2004)

Dále byla kultura inkubována při 20 °C na třepačce po dobu 2–3 hodin. Po inkubaci se z kultury odebralo 0,2 ml jako postindukční vzorek na SDS elektroforézu, a zbytek kultury byl centrifugován na 3000 g, 5 minut při 4 °C. Byl odstraněn supernatant, peleta byla rozdělena do dvou zkumavek, promyta v PBS, a vzorek byl znovu centrifugován. Po odstranění supernatantu byla peleta zmrazena při 20 °C.

#### **4.11.2 Příprava konjugovaných kuliček**

Pelety z 250 ml bakteriální kultury exprimující buď Af1521 WT nebo MUT, byly lyzovány 15 ml lyzačního pufru (PBS + 0,5% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) a směs byla sonikována po 10 cyklech, 30 s ON/OFF s amplitudou 10 (Biruptor Sonicator systém, verze 2.1.). Poté byl lyzát centrifugován 20 minut na 16 000 g při 4 °C. Byl odebrán supernatant z něho bylo odebráno 15 µl jako input na SDS elektroforézu, a do zbytku se přidalo 500 µl glutathion-sepharosových kuliček. Výsledná směs se nechala se inkubovat na rotátoru při 4 °C 4 hodiny. V této fázi docházelo k navázání proteinu na kuličky. Po 4 hodinách se směs 2 minuty centrifugovala na 500 g. Odebralo se 15 µl supernatantu jako flow through na SDS elektroforézu, tedy jako to, co se nenavázalo na kuličky. Kuličky s navázaným proteinem v peletě byly promývány 5x 1 ml PBS-0,5% Triton, 1x s 0,5 M NaCl a 2x s PBS Gibco, tím se odstranily nenavázané nespecifické proteiny. Dále bylo ke kuličkám přidáno 500 µl PBS Gibco a vytvořilo se tak 50% slurry (což je roztok kuliček a PBS). Z toho bylo odebráno 5 µl na SDS elektroforézu. Poté bylo PBS odstraněno a kuličky byly promyty 1 ml cross-linking pufru (0,2 M triethanolamin, pH 8,2). Následně byly stočeny, supernatant byl odebrán a kuličky byly resuspendovány v 1,5 ml cross-linking pufru doplněným o 6,5 mg/ml DMP (Dimethyl pimelimidát dihydrochlorid). Crosslinking je proces, během něhož mezi vytvořeným proteinem a kuličkami vzniká kovalentní vazba pomocí činidla DMP, které obsahuje reaktivní koncové skupiny, jež reagují s funkčními skupinami, jako jsou primární aminy. Crosslinking proto probíhá v pufru neobsahujícím primární aminy. Vše bylo důkladně promícháno a inkubováno při pokojové teplotě 45 minut na rotátoru. Po 45 minutách byly kuličky stočeny, promyty v 1 ml blokovacího pufru (0,1 M ethanolamin, pH 8,2). Ethanolamin (primární amin) deaktivuje DMP. Dále byly zvortexovány, a bylo odebráno 5 µl na SDS elektroforézu. Poté byl přidán 1 ml blokovacího pufru, směs byla zvortexována a inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě na rotátoru. Směs byla stočena a třikrát promyta s PBS-0,5% Triton a nakonec resuspendována v 500 µl

PBS-0,5% Triton jako 50% slurry. Z toho bylo 5  $\mu$ l odebráno na SDS elektroforézu. Vytvořený roztok kuliček s navázaným proteinem byl uchováván zaparafilmovaný v lednici ve 4 °C.

#### 4.12 Imunoprecipitace

Buňky RPE-1 (WT) a buňky *ARH3*<sup>-/-</sup> RPE-1 narostlé na 10 cm miskách byly promyty vychlazeným Gibco PBS a následně k nim bylo přidáno 0,5 ml/miska vychlazeného Gibco PBS s inhibitory PARGi, PARPi, COMPLETE, PhosStop. COMPLETE inhibuje proteázy a PhosStop fosfatázy. Buňky byly seškrabány do mikrozkuvek a centrifugovány (400 g, 4 min, 4 °C). Poté byl odsán supernatant, a pelety byly resuspendovány v 200  $\mu$ l kompletního lyzačního pufru s inhibitory. Směs byla zvortexována a 10 minut zahřívána v suchém bloku na 95 °C. Po 10 minutách byly lyzáty sonikovány (3x 10 s ON/OFF s amplitudou 20). Dále bylo přidáno 1800  $\mu$ l kompletního dilučního pufru s inhibitory a vzorky byly inkubovány ve 4 °C 60 minut na rotátoru. Po uplynutí 60 minut byly vzorky zcentrifugovány při 20 000 g, 30 minut ve 4 °C a supernatant byl přenesen do nové zkumavky. Nakonec byla změřena koncentrace lyzátů pomocí BCA eseje.

Na samotnou imunoprecipitaci bylo použito 1,2 mg lyzátu, ke kterému se přidalo 10  $\mu$ l připravených glutathion-sepharosových kuliček spojených s mutantní doménou (Afl521-Macro-MUT konjugované kuličky), aby došlo k přečistění od nespecifických proteinů. Lyzát s kuličkami se nechal inkubovat 1 hodinu při 4 °C na rotátoru. Poté se opatrně odsál supernatant, ke kterému bylo přidáno 10  $\mu$ l Afl521-Macro-WT konjugovaných kuliček a nechalo se inkubovat 2 hodiny při 4 °C na rotátoru. Po inkubaci se odsál supernatant a kuličky byly promývány 4 x 0,5 ml dilučního pufru a poté jednou 0,5 ml studeným Gibco PBS.

Pro vyhodnocení byly vzorky (0,25 % z celkového objemu) nanášeny do gelu na elektroforézu. Nanášel se input, tedy počáteční vzorek před provedením imunoprecipitace, poté finální vzorek získaný imunoprecipitací, flow-through (tedy to, co se nechytlo na kuličky) a nakonec nespecifické proteiny nachytané na mutovaných kuličkách. Ke všemu se přidal 2x ředěný SDS pufr a 10x DTT. Následně byl gel obarven stříbrem podle návodu v SilverQuest staining kitu (Thermo Fisher Scientific, kat. č. LC6070) a zbytek vzorku byl poslán na vyhodnocení hmotnostní spektrometrií.



### 4.13 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda, která slouží k určení hmotnosti částic, stanovení složení vzorku a k objasnění chemické struktury molekul. Principem je ionizace vzorku a rozlišení těchto iontů podle hmotnosti ( $m$ ) a náboje ( $z$ ). Hmotnostní spektrometr se skládá ze 3 částí, jimiž jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor.

Měření vzorků probíhalo v Laboratoři hmotnostní spektrometrie BIOCEV dle následujícího protokolu (zkráceno). Nejprve bylo provedeno rozštěpení proteinů. IP vzorky byly nejdříve resuspendovány ve 100 mM TEAB pufru (triethylamonium-hydrogenuhličitanový pufr) obsahujícím 2% sodium-deoxycholát (SDC). Cysteiny byly redukovány s 10 mM finální koncentrací TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine), a blokovány s 40 mM koncentrací chloracetamidu (60 °C, 30 min). Vzorky byly štěpeny na kuličkách s 1 µg GluC při 37 °C přes noc. Poté byly vzorky centrifugovány a acidifikovány, SDC bylo odstraněno a peptidy byly vysoleny.

Pro analýzu byla využita nano kolona s obrácenou fází. Mobilní fáze A byla složena z vody a z 0,1% kyseliny mravenčí. Mobilní fáze B se skládala z acetonitrilu a z 0,1% kyseliny mravenčí. Vzorky byly nanášeny na trap kolonu na 4 minuty v 15 µl/min. Nanášecí pufr se skládal z vody, 2% acetonitrilu a 0,1% kyseliny trifluoroctové. Peptidy byly eluovány v gradientu mobilní fáze B od 4% do 35% v 60 minutách. Eluované peptidové kationty byly převedeny na ionty v plynné fázi ionizací elektrosprejem a analyzovány na Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo). Tandemová MS byla provedena izolací při 1,5 Th s kvadrupólem, fragmentací HCD s normalizovanou kolizní energií 30 a rychlou skenovací MS analýzou v iontové pasti.

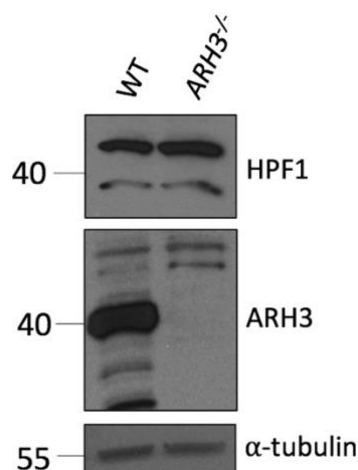
Všechna data z hmotnostního spektrometru byla analyzována a kvantifikována v MaxQuant softwaru (verze 1.6.10.43). Míra falešné detekce (FDR) byla nastavena na 1% pro proteiny i peptidy, a minimální peptidová délka byla specifikována na 7 aminokyselin. Vyhledávací zařízení Andromeda bylo využito pro vyhledávání MS/MS spekter proti Lidské databázi. Analýza dat byla provedena pomocí softwaru Perseus 1.6.15.0.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Charakterizace ARH3 deficientních RPE-1 buněk

Prvním cílem této práce bylo ověřit a charakterizovat hTERT RPE-1 buňky (RPE-1) s inaktivovaným genem pro protein ARH3 (*ARH3*<sup>-/-</sup>). Tato inaktivace byla provedena Janem Brazinou pomocí genové editace CRISPR/Cas9 na univerzitě v Sussexu.

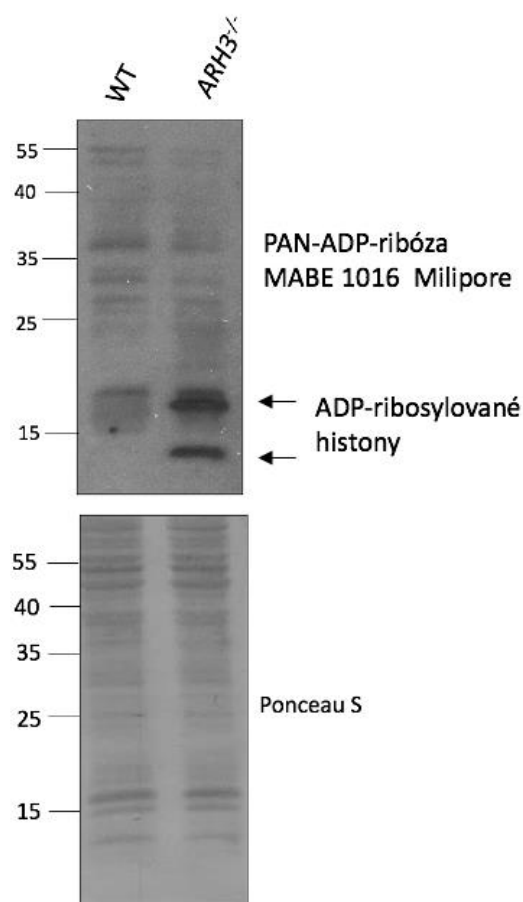
Z inaktivovaných *ARH3*<sup>-/-</sup> a nezměněných kontrolních wild type (WT) RPE-1 buněk byly nejdříve připraveny buněčné lyzáty a proveden Western blot. Tento experiment ukázal, že *ARH3*<sup>-/-</sup> buňky opravdu postrádají protein ARH3, což bylo ověřeno pomocí anti-ARH3 protilátkou (Obr. 10). Ukázalo se, že hladina Histonového PARylačního Faktoru 1 (HPF1), který je nezbytný pro zacílení PARP1 na serinové zbytky, zůstává stejná, takže ho ztráta proteinu ARH3 nijak neovlivňuje (Obr. 10).



*Obrázek 10 – Hladina HPF1 a ARH3 proteinu ve WT a ARH3<sup>-/-</sup> RPE-1 buňkách. Buňky byly lyzovány, nanášeny na gel a obarveny protilátkami anti-HPF1 a anti-ARH3; jako kontrola nanášení proteinů byl použit  $\alpha$ -tubulin*

Z tohoto experimentu je patrné, že se díky genové editaci podařilo připravit linii RPE-1 buněk, které netvoří protein ARH3. Glykohydroláza ARH3 je známá tím, že je schopna z ADP-ribosylovaných proteinů odstranit poslední navázanou mono(ADP-ribózu). K potvrzení této skutečnosti byly provedeny další experimenty. Za použití anti-PAN-ADP-ribóza protilátky na Western blotu, která barví poly- i mono-ADP-

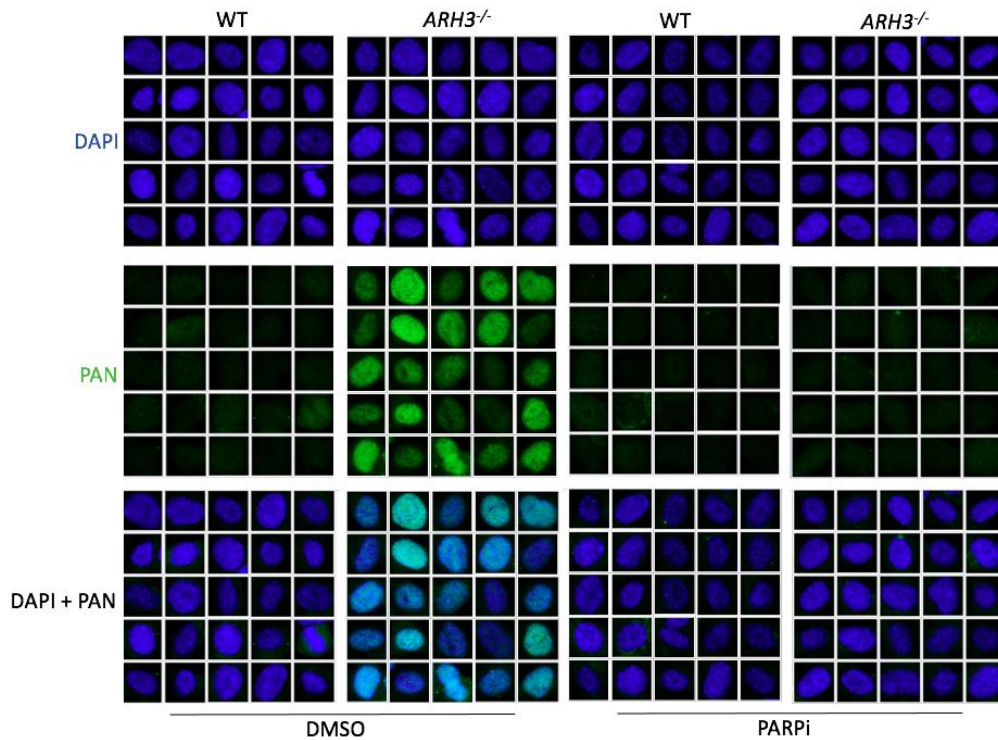
ribosylace, se dokázalo, že u ARH3 deficientních RPE-1 buněk se hromadí ADP-ribosylace (Obr. 11).



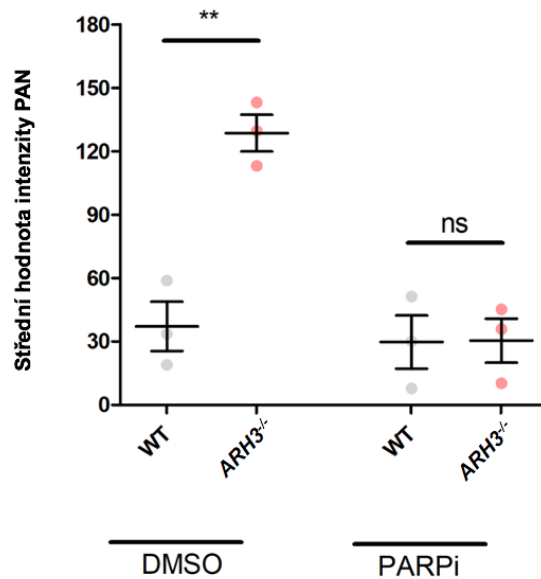
Obrázek 11 - **Množství PAN-ADP-ribosylace u ARH3<sup>-/-</sup> a WT RPE-1 buněk.** Buňky byly lyzovány, proteiny naneseny na gel a detekovány pomocí protilátky anti-PAN Milipore MABE 1016 na Western blotu; ke kontrole nanesení proteinů bylo použito Ponceau S

Hladiny ADP-ribosylace v těchto buňkách byly následně měřeny imunofluorescencí, barveny stejnou anti-PAN-ADP-ribóza protilátkou, a analyzovány na ScanR mikroskopu (Obr. 12). K dokázání toho, že se jedná o ADP-ribosylace byla stejná sada buněk inkubována s PARP inhibitorem (PARPi), který blokuje katalytickou aktivitu PARP1, a tím nedochází k ADP-ribosylaci, a signál mizí. Kvantifikace byla provedena s použitím ScanR softwaru. Data jsou průměr ± SEM z n = 3 na sobě nezávislých experimentů. Statistická analýza byla provedena jako Studentův nepárový t-test (Obr. 12 b). Tímto experimentem se ukázalo, že se u ARH3<sup>-/-</sup> RPE-1 buněk akumulují ADP-ribosylace.

a)

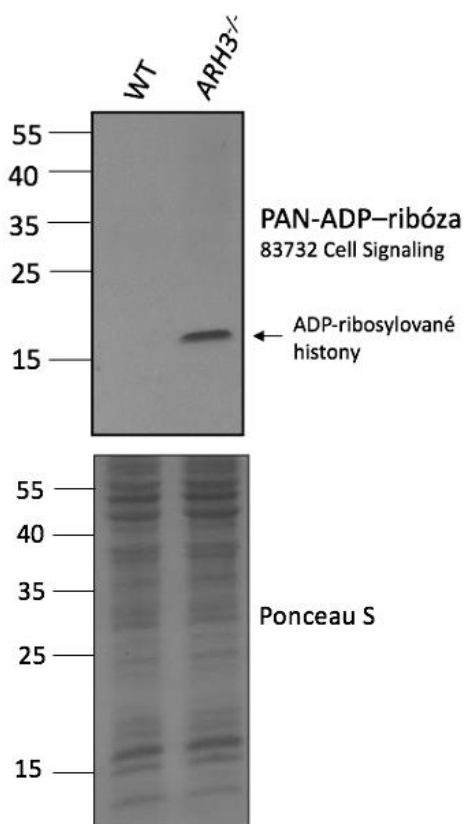


b)



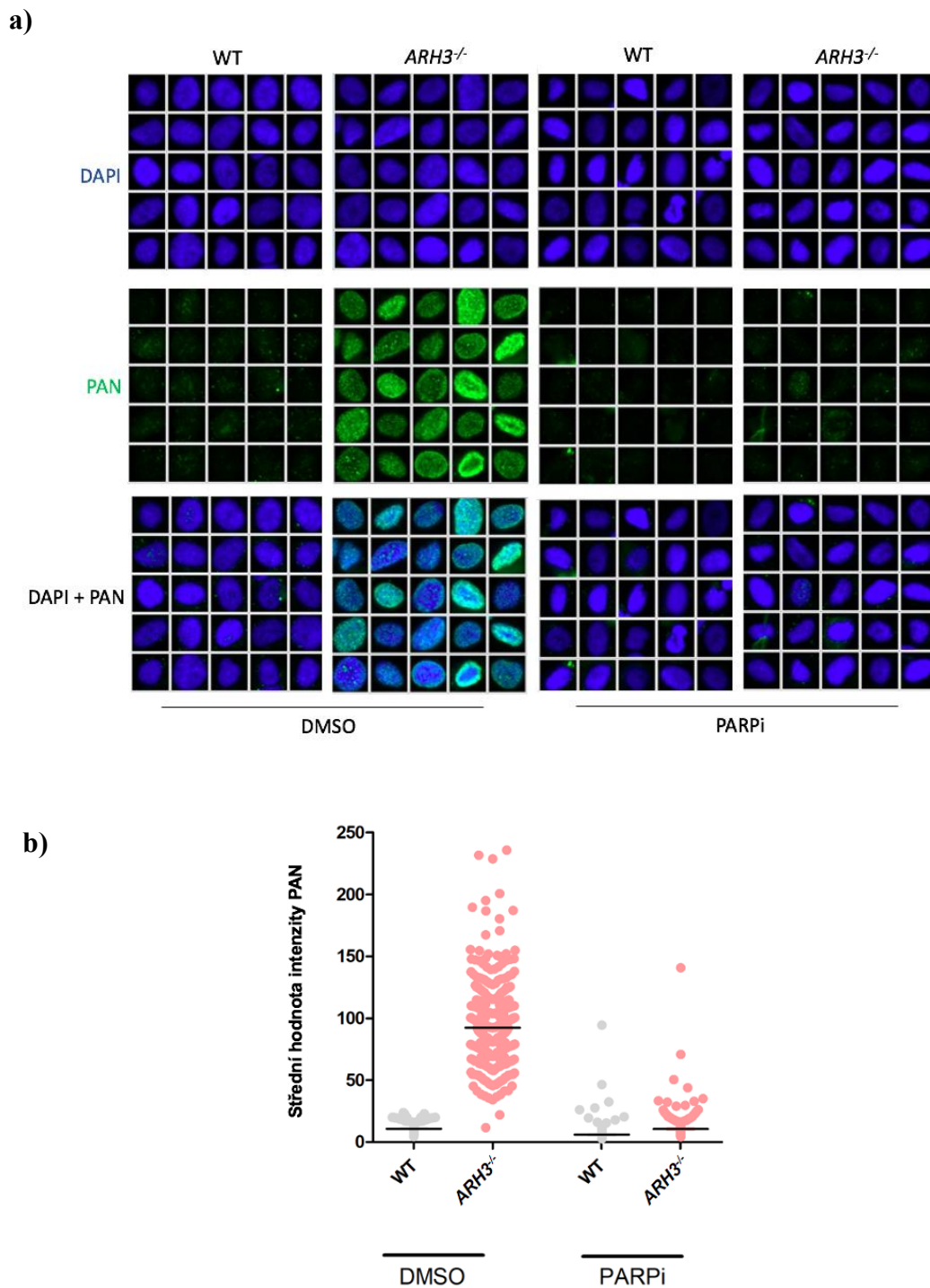
Obrázek 12 - *ARH3*<sup>-/-</sup> RPE-1 buňky akumulující poly-/mono-ADP-ribosylace (PAN). Buňky byly inkubovány v přítomnosti rozpouštědla DMSO a PARPi inhibitoru po dobu 24 h, a poté barveny na imunofluorescenci; a) Repräsentativní obrázek ze ScanR mikroskopu, modře – jádra obarvena DAPI barvou, zeleně – ADP-ribosylace barveny protilátkou proti PAN (Milipore - MABE 1016); b) Kvantifikace signálu ADP-ribózy v jádře ze tří experimentů (\*\**P* < 0,01; ns = není signifikantní)

Pro potvrzení tohoto výsledku byl proveden podobný experiment s protilátkou od jiného výrobce (Cell Signaling), která detekuje poly- i mono-ADP-ribosylace (Obr. 13).



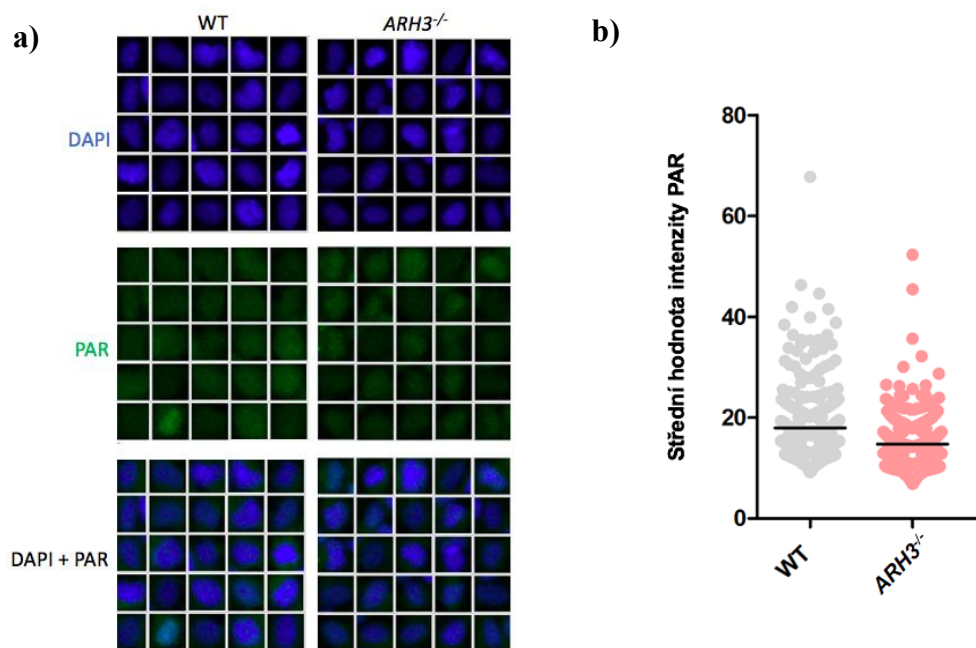
*Obrázek 13 - Množství PAN-ADP-ribosylace u ARH3<sup>-/-</sup> a WT RPE-1 buněk. Buňky byly lyzovány, proteiny naneseny na gel a detekovány pomocí protilátky anti-PAN Cell Signaling 83732 na Western blotu; ke kontrole nanesení proteinů bylo použito Ponceau S*

Buňky byly obarveny touto anti-PAN-ADP-ribóza protilátkou na imunofluorescenci, znovu pro kontrolu inkubovány s PARPi inhibitorem, a opět byl jako v předchozím experimentu pozorován silný signál ADP-ribosylací u ARH3 deficientních buněk (Obr. 14). Tento druhý experiment potvrdil, že se u ARH3<sup>-/-</sup> buněk opravdu akumulují ADP-ribosylace.



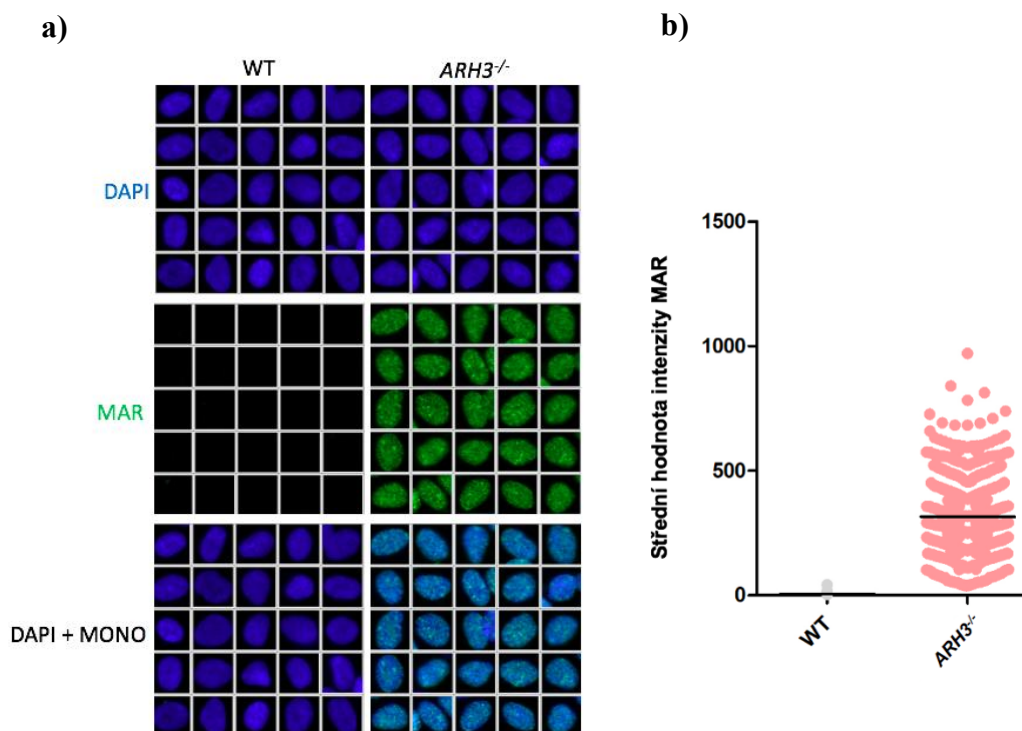
Obrázek 14 -  $ARH3^{-/-}$  RPE-1 buňky akumulující poly-/mono-ADP-ribosylace (PAN). Buňky byly inkubovány v přítomnosti rozpouštědla DMSO a PARPi inhibitoru po dobu 24 h, a poté barveny na imunofluorescenci; a) Reprezentativní obrázek ze ScanR mikroskopu; modře – jádra obarvena DAPI barvou, zeleně – ADP-ribosylace barveny protilátkou proti PAN (Cell Signaling – 83732); b) Kvantifikace signálu ADP-ribózy v jádře z 450 buněk z jednoho experimentu

Jelikož je anti-PAN protilátka schopna vázat jak poly-, tak mono(ADP-ribózu), není zřejmé, jestli signál pozorovaný u *ARH3*<sup>-/-</sup> RPE-1 buněk značí pouze mono-ADP-ribosylace histonů. Proto byl k této identifikaci proveden další experiment s anti-poly-ADP-ribóza (PAR) protilátkou. Tato anti-PAR protilátka barví pouze poly-ADP-ribosylace. U *ARH3*<sup>-/-</sup> deficientních buněk byl pozorován stejný signál jako u WT RPE-1 buněk (Obr. 15). Lze tedy říci, že ribosylace pozorované v předchozích experimentech jsou pravděpodobně mono-ADP-ribosylace.



**Obrázek 15 - Množství poly-ADP-ribosylace (PAR) u WT a *ARH3*<sup>-/-</sup> RPE-1 buněk.** Buňky byly lyzovány a barveny na imunofluorescenci; a) Reprezentativní obrázek ze ScanR mikroskopu, modře – jádra obarvena DAPI barvou, zeleně – ADP-ribosylace barveny protilátkou proti PAR; b) Kvantifikace signálu poly(ADP-ribózy) v jádře z 450 buněk z jednoho experimentu

K definitivnímu potvrzení, že se u *ARH3* deficientních buněk akumulují právě mono-ADP-ribosylace byla provedena imunofluorescence s novou anti-mono-ADP-ribóza protilátkou. Na snímku ze ScanR mikroskopu jsou jasně pozorovatelné mono-ADP-ribosylace v *ARH3*<sup>-/-</sup> RPE-1 buňkách (Obr. 16).



Obrázek 16 - *ARH3*<sup>-/-</sup> RPE-1 buňky akumulující mono-ADP-ribosylace (MAR) na chromatinu. Buňky byly lyzovány a barveny na imunofluorescenci; a) Reprezentativní obrázek ze ScanR mikroskopu, modře – jádra obarvena DAPI barvou, zeleně – mono-ADP-ribosylace barveny protilátkou proti MAR; b) Kvantifikace signálu mono(ADP-ribózy) v jádře z 650 buněk z jednoho experimentu

Pomocí Western blotů a imunofluorescence se podařilo detekovat mono-ADP-ribosylace u ARH3 deficientních buněk. Podle velikosti na Western blotu lze usuzovat, že se jedná o histony.

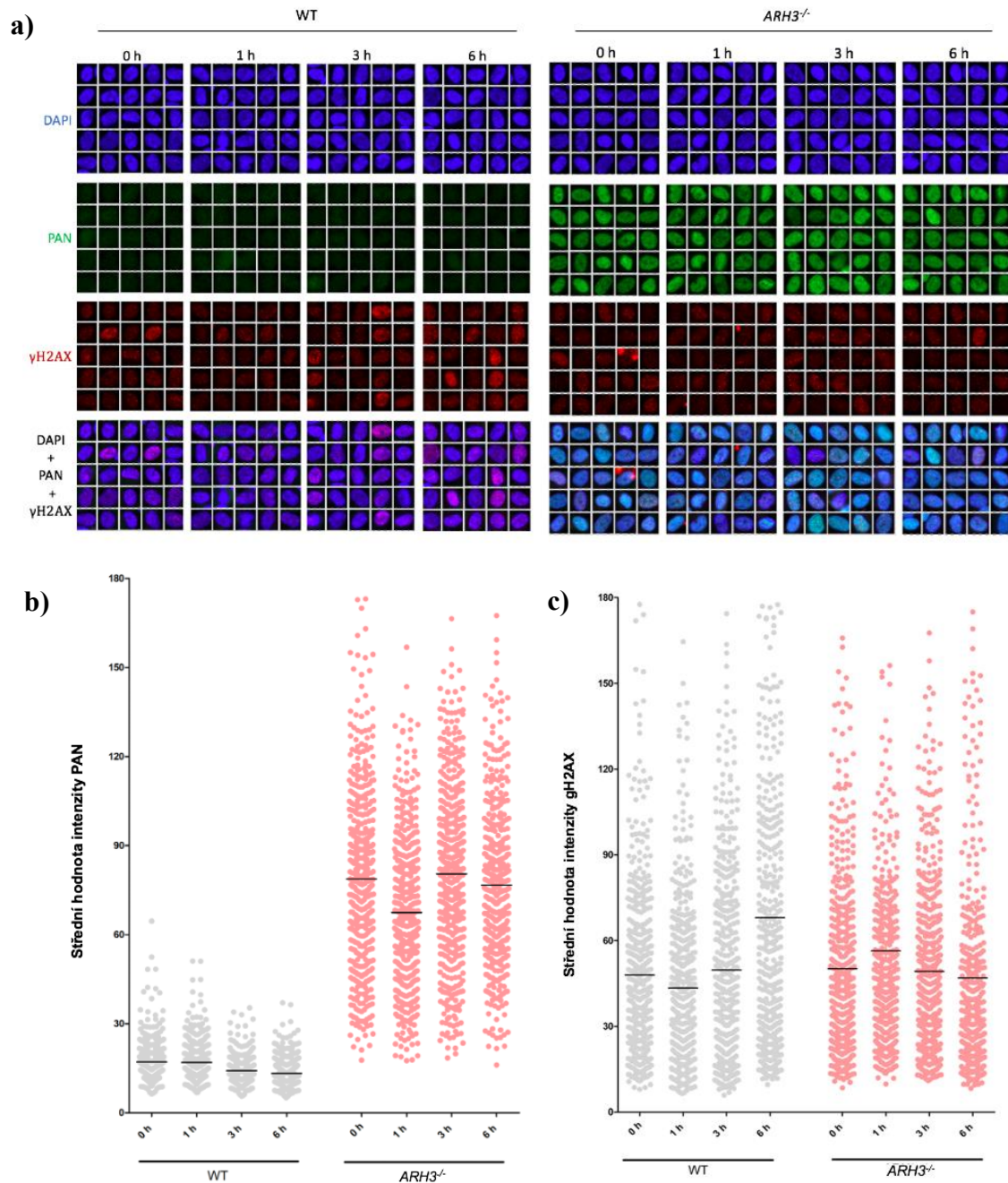
## 5.2 Testování nově popsaného ARH3 inhibitoru

Dílčím úkolem mé práce bylo otestovat funkci nového inhibitoru ARH3 (AI26). Podle článku Xiuhua Liu (2020) má AI26 inhibovat katalytickou funkci proteinu ARH3, a tudíž se předpokládá, že by se u buněk po jeho působení měly akumulovat mono-ADP-ribosylace. Proto by se měl u kontrolních WT RPE-1 buněk ukázat podobný signál jako u *ARH3*<sup>-/-</sup> RPE-1 buněk.

Nejprve byla funkce inhibitoru testována v kratších časových intervalech. K RPE-1 WT i *ARH3*<sup>-/-</sup> buňkám byl přidán inhibitor v koncentraci 10  $\mu$ M a nechal se působit po



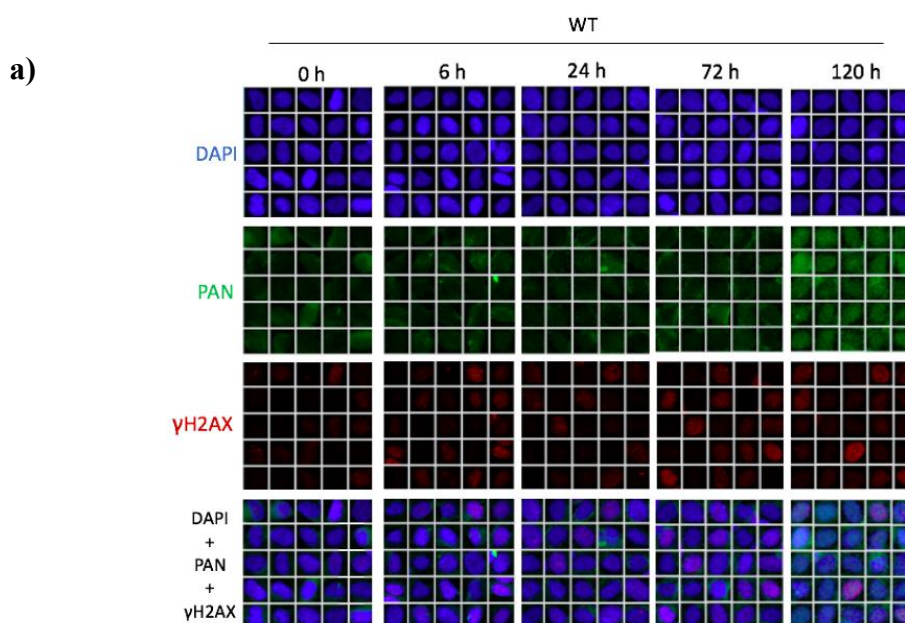
dobu 1 hodiny, 3 hodin a 6 hodin. Buňky byly poté analyzovány imunofluorescencí a barveny anti-PAN-ADP protilátkou (Obr. 17 a). Dále byly barveny phospho-gamma-H2AX protilátkou, což je zavedený marker, který značí dvouvláknová DNA poškození.



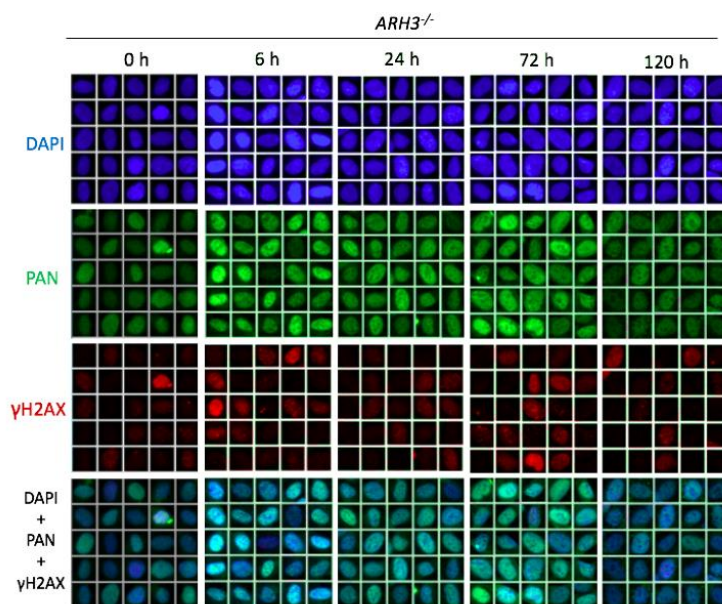
**Obrázek 17 - Působení AI26 inhibitoru na RPE-1 buňky po inkubaci v kratších časových intervalech.** Buňky byly inkubovány s inhibitorem v různých časových intervalech, a poté lyzovány a barveny na imunofluorescenci; a) Reprezentativní obrázek ze ScanR mikroskopu, modře – jádra obarvena DAPI barvou, zeleně – ADP-ribosylace barveny protilátkou proti PAN, červeně – poškození DNA barveno protilátkou  $\gamma$ H2AX; b) Kvantifikace signálu ADP-ribózy v jádře z 500 buněk z jednoho experimentu; c) Kvantifikace signálu  $\gamma$ H2AX z 500 buněk z jednoho experimentu

Bohužel, inkubace RPE-1 buněk s AI26 v kratších časových intervalech se ukázala jako nedostačující, a u kontrolních WT RPE-1 buněk se neakumulovaly ADP-ribosylace. Střední hodnota intenzity PAN, která je vytvořena na základě ScanR a GraphPad Prism analýzy z 500 buněk není u WT RPE-1 buněk zvýšená (Obr. 17). Střední hodnota intenzity  $\gamma$ H2AX zůstává poměrně konstantní, na ScanR mikroskopu taktéž nebyl pozorován žádný rozdíl v signálu (Obr. 17), tudíž inhibitor nezpůsobuje žádné specifické dvouvláknové DNA poškození.

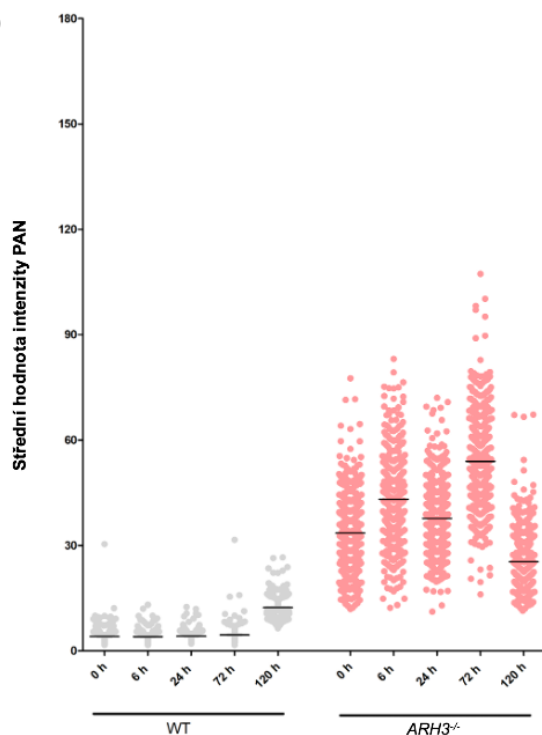
Jelikož se v předchozím experimentu po působení inhibitoru ADP-ribosylace neakumulovaly, bylo usuzováno, že je nejspíše potřeba delší doba působení inhibitoru v závislosti na dělení buněk a tvoření nových ADP-ribosylací na histonech. Byl proto proveden další experiment, ve kterém byla prodloužena doba působení AI26. RPE-1 buňky byly s inhibitorem v koncentraci 10  $\mu$ M inkubovány po dobu 6 h, 24 h, 72 h a 120 hodin. Buňky byly na imunofluorescenci barveny stejným způsobem. Na ScanR mikroskopu nebyl opět pozorován žádný signál, ani po působení inhibitoru několik dní. Byla provedena kvantifikace signálu ADP-ribózy v jádře, a u kontrolních WT buněk nebyl pozorován nárůst intenzity, tak jako je tomu u *ARH3*<sup>-/-</sup> buněk (Obr. 18). U signálu  $\gamma$ H2AX nebylo pozorováno žádné velké zvýšení intenzity (Obr. 18). Nakonec byl proveden Western blot s anti-PAN-ADP-ribóza protilátkou, kde není pozorovatelný žádný signál v oblasti ADP-ribosylací u kontrolních WT RPE-1 buněk (Obr. 19). Tím se ukázalo, že působením popsaného inhibitoru při našich podmínkách nedochází k akumulaci ADP-ribózy na histonech v RPE-1 buňkách.



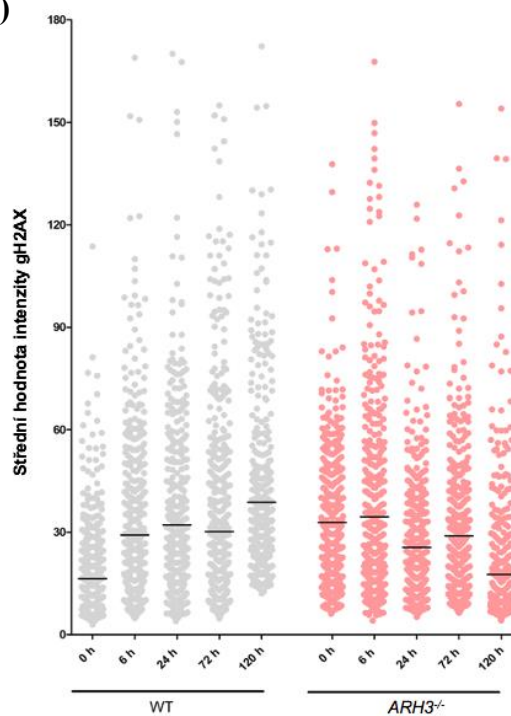
b)



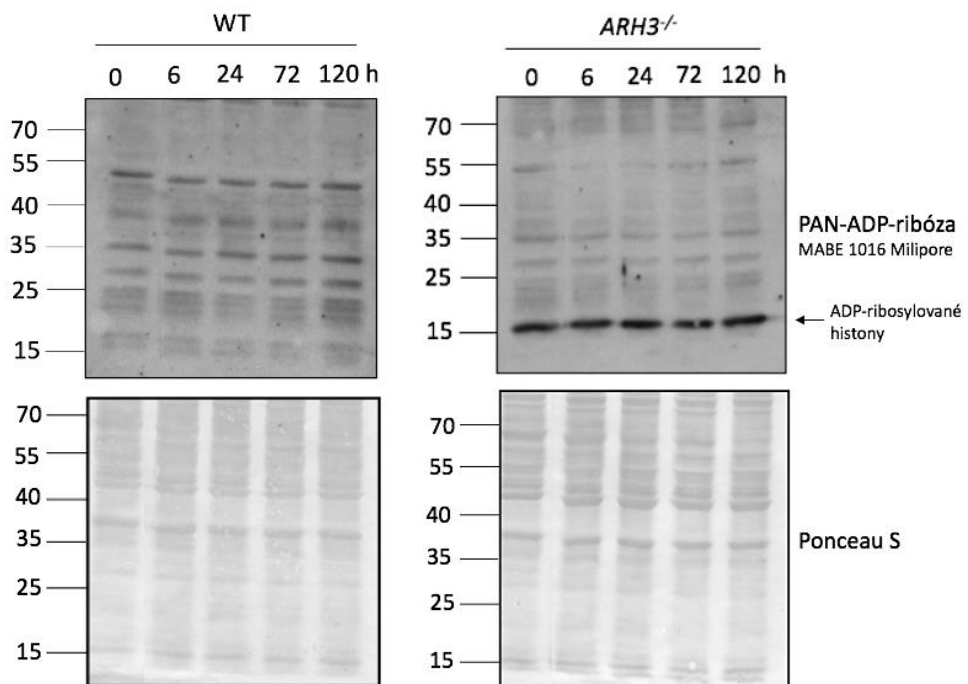
c)



d)



Obrázek 18 - *Působení AI26 inhibitoru na RPE-1 buňky po inkubaci v delších časových intervalech. Buňky byly inkubovány s inhibitorem v různých časových intervalech, a poté lyzovány a barveny na imunofluorescenci; a, b) Reprezentativní obrázky ze ScanR mikroskopu (WT) a (*ARH3<sup>-/-</sup>*), modře – jádra obarvena DAPI barvou, zeleně – ADP-ribosylace barveny protilátkou proti PAN, červeně – poškození DNA barveno protilátkou  $\gamma$ H2AX; c) Kvantifikace signálu ADP-ribózy v jádře z 500 buněk z jednoho experimentu; d) Kvantifikace signálu  $\gamma$ H2AX z 500 buněk z jednoho experimentu*



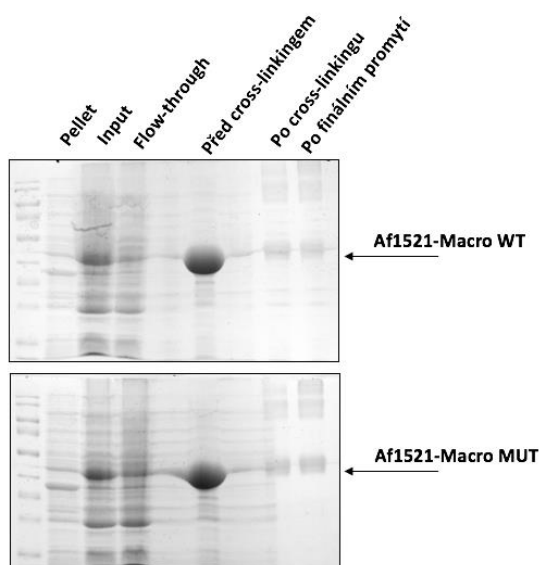
Obrázek 19 - ADP-ribosylace po použití inhibitoru AI26 detekovaná pomocí Western blotu. Buňky byly inkubovány s AI26 (10  $\mu$ M) po dobu 6, 24, 72 a 120 h, poté byly lyzovány, a barveny anti-PAN protilátkou na Western blotu; pro kontrolu nanesení proteinů bylo použito Ponceau S

### 5.3 Identifikace ADP-ribosylovaných proteinů u ARH3 deficientních buněk

Posledním cílem mé práce bylo zjistit, jaké proteiny jsou u ARH3 deficientních RPE-1 buněk ADP-ribosylované. Proto byla provedena imunoprecipitace ADP-ribosylovaných proteinů pomocí Afl521 makro domény. Afl521-WT makro doména váže jak poly-, tak mono-ADP-ribosylace. Za to mutantní Afl521-MUT makro doména s mutací G42E ADP-ribosylace neváže, a proto je v následujících experimentech využita k přečištění od nespecifických proteinů, které se jinak na doménu vážou.

Nejprve byly připraveny glutathion-sepharosové kuličky navázané s Afl521-WT a Afl521-MUT makro doménou. Aby se zjistilo, jestli se mutantní a WT domény navázaly na glutathion-sepharosové kuličky správně, byla provedena elektroforéza (Obr. 20). Na obarveném gelu je vidět, jak velké množství proteinu (makro domén) bylo vytvořeno

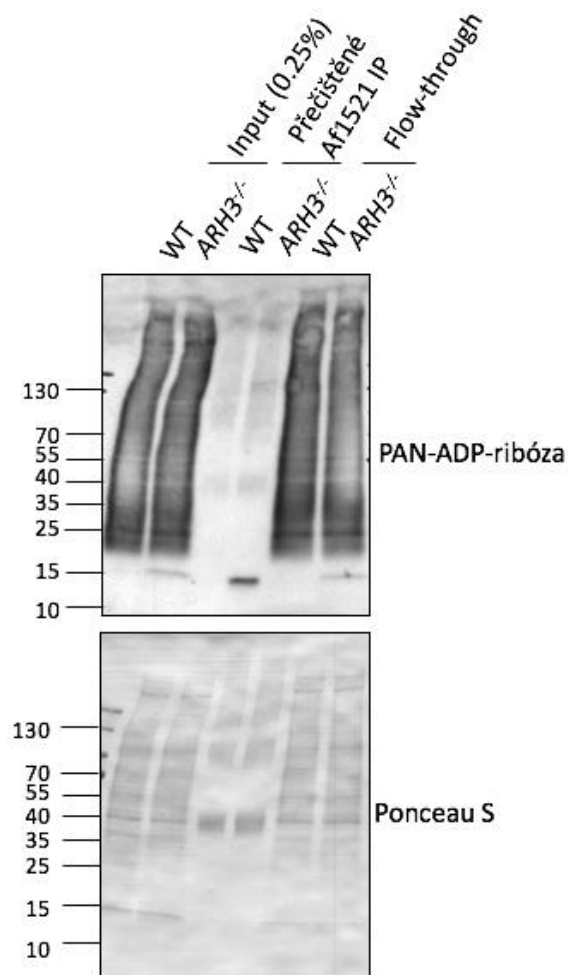
(před cross-linkingem), a že po cross-linkingu, kdy mezi makro doménou a kuličkami vznikla kovalentní vazba, zůstala makro doména navázaná na kuličkách, protože nebyla na blotu detekována.



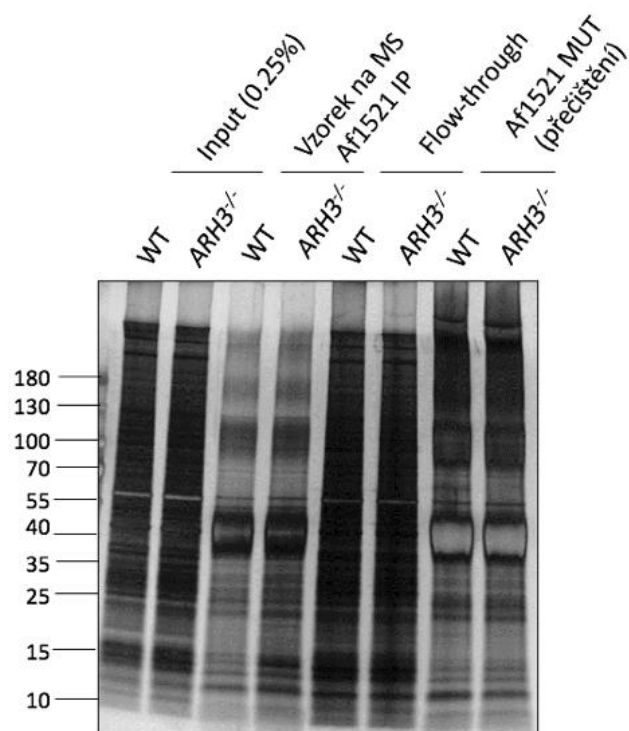
*Obrázek 20 - Množství Af1521-Macro WT a Af1521-Macro MUT domény na gelu. Makro domény byly navázány na glutathion-sepharosové kuličky, a poté byl proveden cross-linking; vzorky byly nanášeny na gel a barveny Coomassie barvicím roztokem; Pellet – peleta s vytvořenými doménami, Input – vzorek před navázáním na kuličky, Flow-through – nespecifické proteiny, co se nenavázaly na kuličky*

Tyto kuličky byly následně použity na imunoprecipitaci s buněčnými RPE-1 lyzáty. Vzorky se nejprve inkubovaly s kuličkami s Af1521-MUT makro doménou, a tím se ze vzorků odstranily nespecifické proteiny, které se na makro doménu vážou. Po pročištění se vzorky inkubovaly s Af1521-WT makro doménou, na kterou se navázaly ADP-ribosylované proteiny. Se vzorky, které byly imunoprecipitací získány byl proveden Western blot (nanášení 0,25 % z celkového objemu) a barvení anti-PAN-ADP-ribóza protilátkou (Obr. 21). Na Western blotu se ukázalo, že se imunoprecipitací podařilo získat ADP-ribosylované proteiny. Následně byla provedena podobná imunoprecipitace, jejíž vzorky byly barveny stříbrem (Obr. 22). Zbytek vzorků byl odeslán na hmotnostní spektrometrii. Hmotnostní spektrometr detekoval jako významně ADP-ribosylované proteiny uvedené v tabulce 6. Proteiny byly vybrány a seřazeny podle hodnoty MS/MS count, která říká kolik počet MS/MS spekter přispělo k identifikaci konkrétního proteinu. Podle hodnoty Q-value, což je pravděpodobnost falešně pozitivní detekce. Dále podle molekulové hmotnosti a počtu peptidových sekvencí spojených s proteinovou skupinou

a podle toho, jaké procento sekvence celého proteinu pokrývají identifikované peptidy. Po tomto seřazení se mezi významně ADP-ribosylovanými proteiny nacházely histony H2B a H3.



*Obrázek 21 - Imunoprecipitace pomocí Afl521 makro domény. Vzorky byly naneseny na gel a barveny pomocí anti-PAN-ADP-ribóza protilátky (Milipore – MABE 1016), pro kontrolu nanesení proteinů bylo použito Ponceau S; Input – počáteční vzorek, který se mísil s kuličkami; Flow-through – nespecifické proteiny, co se nenasázaly na Afl521-WT makro doménu; Přečištěné Afl521 IP – ADP-ribosylované proteiny, co se navázaly na Afl521-WT makro doménu*



Obrázek 22 – **Imunoprecipitace pomocí Af1521 makro domény zaslaná na MS.** Vzorky byly naneseny na gel, a poté barveny stříbrem; Input - počáteční vzorek, který se mísil s kuličkami; Flow-through – proteiny, co se nenavázaly na Af1521-WT makro doménu; Af1521 MUT – nespecifické proteiny navázané na mutantní doménu

Tabulka 6 – Seznam významně ADP-ribosylovaných proteinů z MS; seřazeno podle Q-value, hodnoty MS/MS count, počtu peptidů a sekvence pokrytí

Protein ID	Název proteinu	Název genu
Q562R1	Beta-actin-like protein 2	ACTBL2
Q32P51	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2	HNRNPA1L2
O15511	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	ARPC5
Q09028	Histone-binding protein RBBP4	RBBP4
P60953	Cell division control protein 42 homolog	CDC42
P08708	40S ribosomal protein S17	RPS17
P29966	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCS
O60811	PRAME family member 2	PRAMF2
P29692	Elongation factor 1-delta	EEF1D
P49327	Fatty acid synthase	FASN
P62877	E3 ubiquitin-protein ligase RBX1	RBX1
P62714	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	PPP2CB
P62318	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	SNRPD3
P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	ATP2A2

<b>Protein ID</b>	<b>Název proteinu</b>	<b>Název genu</b>
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	HNRNPA0
P63208	S-phase kinase-associated protein 1	SKP1
Q71DI3	Histone H3.2	HIST2H3A
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2
Q13162	Peroxiredoxin-4	PRDX4
O00303	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	EIF3F
Q16555	Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYSL2
Q92841	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	DDX17
P31930	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	UQCRC1
Q16629	Serine/arginine-rich splicing factor 7	SRSF7
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP
P51148	Ras-related protein Rab-5C	RAB5C
Q3MHD2	Protein LSM12 homolog	LSM12
Q13155	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	AIMP2
Q01518	Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1
Q00610	Clathrin heavy chain 1	CLTC
P30050	60S ribosomal protein L12	RPL12
O43447	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H	PPIH
Q15637	Splicing factor 1	SF1
P19338	Nucleolin	NCL
P12814	Alpha-actinin-1	ACTN1
O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	DDX3X
P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	OAT
O00244	Copper transport protein ATOX1	ATOX1
P36578	60S ribosomal protein L4	RPL4
P02794	Ferritin heavy chain	FTH1
Q99880	Histone H2B type 1-L	HIST1H2BL
P04439	HLA class I histocompatibility antigen, A-3 alpha chain	HLA-A
P62913	60S ribosomal protein L11	RPL11
Q15819	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	UBE2V2
P07437	Tubulin beta chain	TUBB
Q14315	Filamin-C	FLNC
Q9UHB6	LIM domain and actin-binding protein 1	LIMA1
P50990	T-complex protein 1 subunit theta	CCT8
Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD
P49321	Nuclear autoantigenic sperm protein	NASP
P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29	ERP29
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1
Q8NI77	Kinesin-like protein KIF18A	KIF18A
O43852	Calumenin	CALU
Q9Y3B8	Oligoribonuclease, mitochondrial	REXO2
Q9NX24	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2	NHP2



## 6 DISKUZE

Jednovláknová poškození DNA jsou rychle detekována pomocí PARP1, který transientně poly-ADP-ribosyluje sebe a ostatní proteiny v místě poškození. Poly-ADP-ribosylace jsou vzápětí rychle odstraněny pomocí poly(ADP-ribosyl) glykohydrolázy (PARG). PARG však neumí odstranit terminální ADP-ribózu. K tomu slouží hydrolázy TARG1 a ARH3. Protein ARH3 je popisován jako důležitá glykohydroláza, která zodpovídá za odstranění poly- nebo mono(ADP-ribózy) ze serinového zbytku na histonech (Fontana et al. 2017). Ačkoliv i ostatní ADP-ribosyl hydrolázy hrají důležitou roli v metabolismu ADP-ribosylace ukazuje se, že právě ADP-ribosylace na serinech hrají podstatnou roli při opravách poškozené DNA (Palazzo et al. 2018). Mutace spojené s ARH3 jsou příčinou několika neurodegenerativních onemocnění, proto se tento protein stává čím dál tím více středem mnoha výzkumů.

Nedávno bylo zjištěno, že absence ARH3 hydrolázy vede k perzistenci ADP-ribózy jako chromatinové jizvy na histonech v místech, kde došlo k jednovláknovému poškození DNA (Hanzlíková et al. 2020). K tomuto zjištění byly využity U2OS buňky, u kterých byl gen pro ARH3 inaktivován pomocí metody CRISPR/Cas9. U *ARH3*<sup>-/-</sup> U2OS buněk nebyly detekovány žádné hladiny ARH3 proteinu, a s pomocí anti-PAN-ADP-ribóza protilátky, která detekuje jak poly-ADP-ribosylace, tak mono-ADP-ribosylace, byly detekovány ADP-ribosylace histonů. Podařilo se detekovat hladinu ADP-ribosylace pomocí anti-PAN(ADP-ribóza) detekčních činidel u *ARH3*<sup>-/-</sup> U2OS buněk, ale po použití dvou různých anti-poly(ADP-ribóza) protilátek nebyl pozorován žádný signál. Díky tomuto poznatku byla vytvořena hypotéza, že při deficienci proteinu ARH3 se v buňkách akumulují mono-ADP-ribosylace. (Hanzlíková et al. 2020). V této bakalářské práci byl proveden podobný experiment s kontrolními a inaktivovanými *ARH3*<sup>-/-</sup> RPE-1 buňkami. Pomocí dvou různých anti-PAN-ADP-ribóza protilátek byl u *ARH3*<sup>-/-</sup> RPE-1 buněk prokázán výskyt poly- nebo mono-ADP-ribosylace na histonech. Tím se ověřilo, že se RPE-1 buňky chovají stejně jako již dříve testované U2OS buňky. Aby se však potvrdilo, že se skutečně jedná o mono-ADP-ribosylace byla využita nově vytvořená a nedávno popsaná anti-mono(ADP-ribóza) protilátka, která byla na základě spolupráce poskytnuta k otestování (Bonfiglio et al. 2020). Tato protilátka se prokázala jako velmi dobře fungující, a díky ní se konečně definitivně potvrdila hypotéza, že se u *ARH3*<sup>-/-</sup> buněk akumulují právě mono-ADP-ribosylované proteiny.

Aby naše výzkumná skupina mohla jednoduše využít tyto získané poznatky na vícero typech buněk a zvířecích modelech byl by vhodným nástrojem ARH3 inhibitor. Nedávno byla taková sloučenina poprvé objevena a popsána jako ARH3 inhibitor – AI26 (Liu et al. 2020).

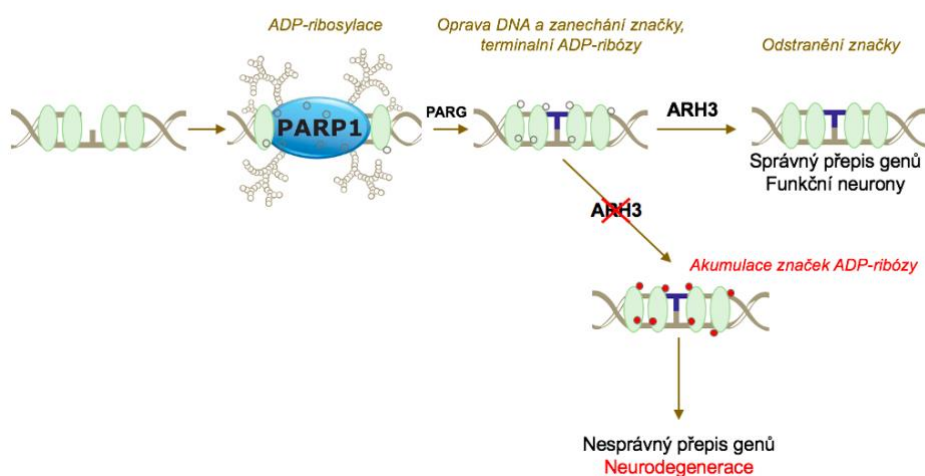
AI26 je sloučenina s malou molekulou, která funguje tak, že se váže na katalytické místo ARH3 a inhibuje jeho enzymatickou aktivitu. Specificky útočí na katalytickou kapsu ARH3, a díky konformační rozmanitosti katalytické kapsy nedokáže AI26 blokovat enzymatickou aktivitu jiných ADPr hydroláz. Inhibitor byl testován na U2OS buňkách, u kterých bylo vyvoláno exogenní DNA poškození například irradiací. U experimentů byla po exogenním poškození pozorována přetrvávající ADP-ribosylace (Liu et al. 2020).

V mé práci byl testován účinek AI26 v RPE-1 buňkách s endogenním poškozením. Funkce inhibitoru byla testována na WT i *ARH3*<sup>-/-</sup> buňkách. Pokud by měl AI26 fungovat, u kontrolních WT RPE-1 buněk, které mají funkční protein ARH3, by se měly postupně hromadit mono-ADP-ribosylace histonů. Byl očekáván signál podobný signálu u *ARH3*<sup>-/-</sup> RPE-1 buněk. Bohužel u *ARH3*<sup>-/-</sup> RPE-1 buněk nebyl pozorován žádný specifický signál, ani po prodloužení doby působení inhibitoru. Nefunkčnost inhibitoru může být způsobená jiným typem buněk nebo tím, že se buňky s inhibitorem netestovaly po vyvolaném exogenním poškození DNA, ale sledovala se pouze endogenní jednovláknová poškození, ke kterým dochází fyziologicky, a v menším množství než po vyvolaném poškození. Příčina nefunkčnosti inhibitoru v mém experimentu může být dána jeho nízkou koncentrací, i když byla použita stejná koncentrace jako byla uvedena v článku (10  $\mu$ M). Inhibitor byl testován i v koncentraci 20  $\mu$ M, ale ani v této koncentraci nebyly pozorovatelné mono-ADP-ribosylace, a vlivem vysoké koncentrace docházelo k rozpadu buněk, proto není tento experiment v této práci zahrnut.

Dále je o AI26 známo, že potlačení ARH3-zprostředkované hydrolýzy ADP-ribosylace výrazně narušuje opravu jednovláknového poškození DNA. Kromě toho se také zjistilo, že AI26 poškozuje enzym EXO1, který se podílí na zpracování konce u dvouvláknových poškození DNA (Liu et al. 2020). Proto byly RPE-1 buňky v mém experimentu po inkubaci s inhibitorem barveny phospho-gamma-H2AX protilátkou, což je marker dvouvláknových poškození DNA, aby se ukázalo, jestli vlivem AI26 nedochází ke vzniku dvouvláknového DNA poškození. Na snímcích ze ScanR mikroskopu, ani při kvantifikaci signálu v GraphPad Prism však nebylo pozorováno žádné specifické poškození v RPE-1 buňkách.

V budoucnu by bylo možné otestovat aktivitu AI26 *in vitro*, avšak pro výzkum našeho týmu je zapotřebí inhibitor, který funguje v buňkách, což se bohužel u AI26 nepodařilo prokázat.

*In vitro* bylo objeveno, že ADP-ribosylace hlavních histonů zabraňuje vzniku jiných chromatinových modifikací, jako je třeba acetylace H3K9 (Bartlett et al. 2018). Zároveň platí i opak, že acetylace H3K9 zabraňuje ADP-ribosylaci H3S10, z čehož je tedy usuzováno, že se tyto dvě histonové modifikace vzájemně vylučují (Liszczak et al. 2018). Jak je znázorněno na obrázku 23, předpokládá se, že u ARH3-defektních buněk zůstávají mono(ADP-ribózy) v chromatinu jako molekulové značky těch míst, kde dříve došlo k jednovláknovému poškození. Tyto mono(ADP-ribóza) značky se akumulují a mohou bránit lokální acetylaci histonů a jiným modifikacím, což pravděpodobně vede k narušení histonového kódu, deregulované transkripci a buněčné dysfunkci (Hanzlíková et al. 2020). Nyní je středem zájmu ověřit, jestli se tyto změny v histonových modifikacích vyskytují i u fibroblastů získaných od pacientů s mutacemi v ARH3 a mozkové tkáni na *ARH3*<sup>-/-</sup> myších modelech.



**Obrázek 23 – Model vzniku a vlivu perzistentních mono-ADP-ribóza značek u neurologických onemocnění. Zelené ovály značí histony, bílé (červené) kruhy jsou mono-ADP-ribózy (Hanzlíková et al. 2020)**

Aby bylo možné studovat tyto souvislosti dále, bylo by vhodné zjistit které histony na jakých aminokyselinových zbytcích jsou ADP-ribosylované. U *ARH3*<sup>-/-</sup> U2OS buněk byla detekována zvýšená endogenní ADP-ribosylace pomocí Western blotu, a na základě

elektroforetické mobility v gelu bylo usuzováno, že ADP-ribosylovanými proteiny by měly být histony, pravděpodobně H2B a H3 (Hanzlíková et al. 2020). V mém experimentu byla proto provedena imunoprecipitace ADP-ribosylovaných proteinů pomocí makro domény Afl521, která váže jak poly-, tak mono-ADP-ribosylace. Získaný vzorek byl dán na hmotnostní spektrometrii, kde byly detekovány jako mono-ADP-ribosylované histony H2B a H3 spolu s dalšími proteiny. Z dalších ADP-ribosylovaných proteinů byl významně ADP-ribosylovaný Histone-binding protein RBBP4, který se váže na histony a podílí se na replikaci a opravě DNA, jeho ADP-ribosylace tak může být podstatná. Hmotnostní spektrometrie také detekovala jako hojně ADP-ribosylované aktinové proteiny, což bývají časté kontaminanty hmotnostní spektrometrie. Jelikož je tento experiment pilotní, nedají se z něho usuzovat závěry, a je zapotřebí získaná data ověřit. Detekcí histonů H2B a H3 se však potvrdila již dříve nastíněná teorie. Díky znalosti toho, jaké histony jsou ADP-ribosylované, bude do budoucna možné izolovat pouze tyto specifické histony z *ARH3*<sup>-/-</sup> buněk, a pomocí hmotnostní spektrometrie určit specifické aminokyseliny, kde se mono-ADP-ribosylace nacházejí, a kde tedy došlo k jednovláknovým poškozením. Na základě toho bude možné použít specifické protilátky, které se budou vázat přímo na tato místa a označí tak místo DNA, kde došlo k poškozením. Následně bude možné provést chromatinovou imunoprecipitaci (ChIP assay), a osekvenovat specifická místa, kde k poškozením DNA dochází. Předpokládá se, že problém jednovláknových zlomů DNA je u postmitotických dlouhožijících neuronů, které se nedělí, a zřejmě akumulují DNA poškození. O lézích, které se vyskytují v neuronech, a zda se hromadí v celém genomu nebo ve specifických lokusech, se toho moc neví. Nedávno však bylo zjištěno, že lidské postmitotické neurony akumulují neočekávaně vysoké hladiny jednovláknových poškození DNA na specifických místech uvnitř genomu. Mapováním celého genomu se odhalilo, že jednovláknové zlomy jsou lokalizovány uvnitř enhancerů v neuronech. Je možné, že hromadění mutací v místech opakující se opravy DNA uvnitř neuronálních enhancerů může vést k nenormální genové expresi, což v průběhu času může vést k neurologické dysfunkci (Wu et al. 2021).

Vliv ADP-ribosylace na jiné posttranslační modifikace je zatím do velké míry neprozkoumán. V návaznosti na moji práci by mohla být dále provedena další imunoprecipitace pomocí ADP-ribóza protilátek, na hmotnostním spektrometru měřena acetylace, a následně by mohla být porovnána s ADP-ribosylací. Tyto experimenty by

měly vést k prohloubení znalostí o tom, že zvýšená ADP-ribosylace histonů u ARH3-defektních buněk ovlivňuje hladinu jiných posttranslačních modifikací, a tím reguluje a narušuje histonový kód, což nejspíše vede ke tvorbě dysfunkčních neuronů a vzniku neurodegenerativních onemocnění (Obr. 23). Zatím je popisován dopad jednovláknových poškození DNA a ADP-ribosylace histonů na neurodegeneraci u vzácných onemocnění, ale do budoucna je cílem zjistit, jak se tyto procesy podílí i na častějších onemocněních jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba.

## 7 ZÁVĚR

ADP-ribosylace histonů je důležitá posttranslační modifikace, která se podílí na opravách poškozené DNA. Je známo, že poruchy v mechanismu opravy jednovláknového poškození DNA mohou vést k různým neurodegenerativním onemocněním. Proto se studium ADP-ribosylace histonů dostává čím dál tím více do popředí.

Cílem teoretické části mé bakalářské práce bylo podat ucelený přehled informací o ADP-ribosylaci, její souvislosti s jednovláknovým DNA poškozením, a popsat, jak se poruchy v těchto procesech podílejí na vzniku neurodegenerativních onemocnění.

Výzkumem se podařilo charakterizovat novou linii ARH3 deficientních RPE-1 buněk. Za pomoci specifických protilátek byly u těchto buněk detekovány mono-ADP-ribosylace histonů a ukázalo se tak, že protein ARH3 je zodpovědný za jejich odstraňování. Otestována byla také funkce nového ARH3 inhibitoru (AI26), po jehož inkubaci s RPE-1 buňkami v různých časových intervalech nebyla pozorována akumulující se ADP-ribosylace.

Dále se pomocí imunoprecipitace a hmotnostní spektrometrie zjistilo, že mono-ADP-ribosylované jsou histony H2B a H3. Jelikož se předpokládá, že mono-ADP-ribosylace značí místa, kde k jednovláknovým poškozením došlo, cílem dalšího zkoumání bude izolovat pouze tyto dva histony a určit přesné aminokyseliny, které jsou na těchto histonech mono-ADP-ribosylované. To umožní přesně identifikovat místo v genomu, kde k endogenním jednovláknovým poškozením DNA dochází.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Auto-poly-ADP-ribosylační doména
ADP	Adenosin difosfát
ADPr	ADP-ribóza
AI26	ARH3 inhibitor 26
AMP	Adenosin monofosfát
AOA1	Ataxia-okulomotor apraxia 1
AOA4	Ataxia-okulomotor apraxia 4
APE1	AP endonukleáza 1
APS	Peroxodisíran amonný
APTX	Aprataxin
ARH	ADP-ribosyl hydroláza
ARH1	ADP-ribosyl hydroláza 1
ARH2	ADP-ribosyl hydroláza 2
ARH3	ADP-ribosyl hydroláza 3
ART	ADP-ribosyl transferáza
ART	ADP-ribosyl transferázová subdoména
ARTC	Cholera toxin-like ADP-ribosyl transferáza
ARTC1	Cholera toxin-like ADP-ribosyl transferáza 1
ARTC3	Cholera toxin-like ADP-ribosyl transferáza 3
ARTC4	Cholera toxin-like ADP-ribosyl transferáza 4
ARTC5	Cholera toxin-like ADP-ribosyl transferáza 5
ARTD	Diphtheria toxin-like ADP-ribosyl transferáza
ARTD1	Diphtheria toxin-like ADP-ribosyl transferáza 1
AT	Ataxia telangiectasia
ATCC	Sbírka americké typové kultury (společnost)
BCA	Kyselina bicinchoninová (esej)
BER	Bázová excizní oprava
BRCA1	Protein citlivosti na rakovinu prsu 1. typu
BRCT	BRCA1 C-terminální motiv
CAT	Katalytická doména
CMT2B2	Charcot-Marie-Tooth onemocnění 2 B2

CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Intersaced Short Palindromatic Repeats/ CRISPR associated protein 9 (Nahloučené pravidelně rozložené krátké palindromatické repetice/Cas protein 9)
dH <sub>2</sub> O	Destilovaná voda
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenylindol
DMP	Dimethyl pimelimidát dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EXO1	Exonukleáza 1
DraG	Dinitrogenázová reduktázo-aktivující glykohydroláza
dRP	Deoxyribóza-fosfát konec
E	Kyselina glutamová
FEN-1	Flap endonukleáza-1
FHA	Forkhead-associated doména
γH2AX	Phospho-gamma-H2AX
GPI	Glykofosfatidylinositol
H	Histidin
HeLa	Henrietta Lacks
HD	Helikální subdoména
HPF1	Histonový PARylační Faktor 1
hTERT	Lidská telomeráza reverzní transkriptáza
IF	Imunofluorescence
IP	Imunoprecipitace
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid
K	Lysin
LIG1	DNA ligáza 1
LIG3α	DNA ligáza 3α
MAR	mono(ADP-ribóza)
MCSZ	Mikrocefalie s časnými záchvaty
MS	Hmotnostní spektrometrie
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid adenin dinukleotid
NBS1	Protein na opravu DNA a udržování telomer
NER	Nukleotidová excizní oprava
NMR	Oprava chybného párování bazí



NTR	N-terminální konec (region)
OAADPr	<i>O</i> -acetyl-ADPr
PAR	Poly(ADP-ribóza)
PARG	Poly(ADP-ribosyl) glykohydroláza
PARGi	Poly(ADP-ribóza) glykohydroláza inhibitor
PARP	Poly(ADP-ribóza) polymeráza
PARP1	Poly(ADP-ribóza) polymeráza 1
PARPi	Poly(ADP-ribóza) polymeráza inhibitor
PARP2	Poly(ADP-ribóza) polymeráza 2
PARP3	Poly(ADP-ribóza) polymeráza 3
PARP5A	Poly(ADP-ribóza) polymeráza 5A
PARP5B	Poly(ADP-ribóza) polymeráza 5B
PARP9	Poly(ADP-ribóza) polymeráza 9
PARP14	Poly(ADP-ribóza) polymeráza 14
PARP15	Poly(ADP-ribóza) polymeráza 15
PBM	Základní PAR-vázající motiv
PBZ	Poly(ADP-ribóza)-vázající zinkový prst
PCNA	Proliferující buněčný jaderný antigen
PNKP	Polynukleotid kináza/fosfatáza
POL $\beta$	DNA polymeráza $\beta$
R	Arginin
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RPE-1	Retinální pigmentové epitelové buňky 1
RT	Pokojová teplota
S	Serin
SEM	Standardní chyba průměru
SIRT4	Sirtuin 4
SIRT6	Sirtuin 6
SCAN1	Spinocerebelární ataxie s axonální neuropatií 1
SSB	Jednovláknové poškození DNA
TARG1	Terminální ADP-ribóza glykohydroláza 1
TDP1	Tyrosyl DNA fosfodiesteráza 1
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TOP1	DNA topoizomeráza 1

WB	Western blot
WGR	Tryptofan-glycin-arginin DNA vázající doména
WT	Wild type
WWE	Tryptofan-glutamát-glutamát doména
XRCC1	X-ray repair cross complementing protein 1
Y	Tyrosin

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABPLANALP, Jeannette, Mario LEUTERT, Emilie FRUGIER, et al., 2017. Proteomic analyses identify ARH3 as a serine mono-ADP-ribosylhydrolase. *Nature Communications* [online]. **8**(1), 1-11 [cit. 2021-5-4]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-017-02253-1

ADAMIETZ, P a A RUDOLPH, 1984. ADP-ribosylation of nuclear proteins in vivo. Identification of histone H2B as a major acceptor for mono- and poly(ADP-ribose) in dimethyl sulfate-treated hepatoma AH 7974 cells. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **259**(11), 6841-6846 [cit. 2021-5-7]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(17)39804-6

AICARDI, Jean, Celia BARBOSA, Eva ANDERMANN, et al., 1988. Ataxia -ocular motor apraxia: A syndrome mimicking ataxia-telangiectasia. *Annals of Neurology* [online]. **24**(4), 497-502 [cit. 2021-5-6]. ISSN 0364-5134. Dostupné z: doi:10.1002/ana.410240404

ALTMAYER, Matthias, Simon MESSNER, Paul O. HASSA, Monika FEY a Michael O. HOTTIGER, 2009. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Research* [online]. **37**(11), 3723-3738 [cit. 2021-5-4]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkp229

BAI, Péter a Carles CANTÓ, 2012. The Role of PARP-1 and PARP-2 Enzymes in Metabolic Regulation and Disease. *Cell Metabolism* [online]. **16**(3), 290-295 [cit. 2021-5-4]. ISSN 15504131. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmet.2012.06.016

BARKAUSKAITE, Eva, Gytis JANKEVICIUS a Ivan AHEL, 2015. Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation. *Molecular Cell* [online]. **58**(6), 935-946 [cit. 2021-2-22]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2015.05.007

BARTLETT, Edward, Juan José BONFIGLIO, Evgeniia PROKHOROVA, Thomas COLBY, Florian ZOBEL, Ivan AHEL a Ivan MATIC, 2018. Interplay of Histone Marks with Serine ADP-Ribosylation. *Cell Reports* [online]. **24**(13), 3488-3502.e5 [cit. 2021-5-8]. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2018.08.092

BOCK, Florian J. a Paul CHANG, 2016. New directions in poly(ADP-ribose) polymerase biology. *The FEBS Journal* [online]. **283**(22), 4017-4031 [cit. 2021-5-4]. ISSN 1742464X. Dostupné z: doi:10.1111/febs.13737

BONFIGLIO, Juan José, Pietro FONTANA, Qi ZHANG, et al., 2017. Serine ADP-Ribosylation Depends on HPF1. *Molecular Cell* [online]. **65**(5), 932-940.e6 [cit. 2021-5-4]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2017.01.003

BONFIGLIO, Juan José, Orsolya LEIDECKER, Helen DAUBEN, Edoardo José LONGARINI, Thomas COLBY, Pablo SAN SEGUNDO-ACOSTA, Kathryn A. PEREZ a Ivan MATIC, 2020. An HPF1/PARP1-Based Chemical Biology Strategy for Exploring ADP-Ribosylation. *Cell* [online]. **183**(4), 1086-1102.e23 [cit. 2021-5-8]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2020.09.055

BOULIKAS, T., 1988. At least 60 ADP-ribosylated variant histones are present in nuclei from dimethylsulfate-treated and untreated cells. *The EMBO Journal* [online]. **7**(1), 57-67 [cit. 2021-5-7]. ISSN 02614189. Dostupné z: doi:10.1002/j.1460-2075.1988.tb02783.x

BRADLEY, Matthews O. a Kurt W. KOHN, 1979. X-ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution. *Nucleic Acids Research* [online]. **7**(3), 793-804 [cit. 2021-5-6]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/7.3.793

BRAS, Jose, Isabel ALONSO, Clara BARBOT, et al., 2015. Mutations in PNKP Cause Recessive Ataxia with Oculomotor Apraxia Type 4. *The American Journal of Human Genetics* [online]. **96**(3), 474-479 [cit. 2021-5-6]. ISSN 00029297. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajhg.2015.01.005

BRESLIN, Claire, Peter HORNYAK, Andrew RIDLEY, Stuart L. RULTEN, Hana HANZLIKOVÁ, Antony W. OLIVER a Keith W. CALDECOTT, 2015. The XRCC1 phosphate-binding pocket binds poly (ADP-ribose) and is required for XRCC1 function. *Nucleic Acids Research* [online]. **43**(14), 6934-6944 [cit. 2021-5-7]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkv623

BURZIO, L.O., P.T. RIQUELME a S.S. KOIDE, 1979. ADP ribosylation of rat liver nucleosomal core histones. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **254**(8), 3029-3037 [cit. 2021-5-8]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(17)30178-3

BÜTEPAGE, Mareike, Laura ECKEI, Patricia VERHEUGD a Bernhard LÜSCHER, 2015. Intracellular Mono-ADP-Ribosylation in Signaling and Disease. *Cells* [online]. **4**(4), 569-595 [cit. 2021-5-4]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells4040569

BÜTEPAGE, Mareike, Christian PREISINGER, Alexander VON KRIEGSHEIM, et al., 2018. Nucleolar-nucleoplasmic shuttling of TARG1 and its control by DNA damage-induced poly-ADP-ribosylation and by nucleolar transcription. *Scientific Reports* [online]. **8**(1), 1-17 [cit. 2021-5-1]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-25137-w

BU, Xiangning, Jiro KATO a Joel MOSS, 2019. Emerging roles of ADP-ribosyl-acceptor hydrolases (ARHs) in tumorigenesis and cell death pathways. *Biochemical Pharmacology* [online]. **167**, 44-49 [cit. 2021-5-4]. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2018.09.028

CALDECOTT, K. W., S. AOUFUCHI, P. JOHNSON a S. SHALL, 1996. XRCC1 Polypeptide Interacts with DNA Polymerase and Possibly Poly (ADP-Ribose) Polymerase, and DNA Ligase III Is a Novel Molecular 'Nick-Sensor' In Vitro. *Nucleic Acids Research* [online]. **24**(22), 4387-4394 [cit. 2021-5-6]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/24.22.4387

CALDECOTT, Keith W., 2003. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair* [online]. **2**(9), 955-969 [cit. 2021-5-6]. ISSN 15687864. Dostupné z: doi:10.1016/S1568-7864(03)00118-6

CALDECOTT, Keith W., 2008. Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics* [online]. **9**(8), 619-631 [cit. 2021-4-25]. ISSN 1471-0056. Dostupné z: doi:10.1038/nrg2380

CALDECOTT, Keith W., 2014a. Protein ADP-ribosylation and the cellular response to DNA strand breaks. *DNA Repair* [online]. **19**, 108-113 [cit. 2021-5-7]. ISSN 15687864. Dostupné z: doi:10.1016/j.dnarep.2014.03.021

CALDECOTT, Keith W., 2014b. DNA single-strand break repair. *Experimental Cell Research* [online]. **329**(1), 1-8 [cit. 2020-11-8]. ISSN 0014-4827. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2014.08.027

CALDECOTT, Keith W., 2014c. Ribose--An Internal Threat to DNA. *Science* [online]. **343**(6168), 260-261 [cit. 2021-5-6]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1248234

CALDECOTT, Keith W., 2019. XRCC1 protein; Form and function. *DNA Repair* [online]. **81**(1), 1-8 [cit. 2021-5-8]. ISSN 15687864. Dostupné z: doi:10.1016/j.dnarep.2019.102664

COHEN, Michael S a Paul CHANG, 2018. Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation. *Nature Chemical Biology* [online]. **14**(3), 236-243 [cit. 2021-5-4]. ISSN 1552-4450. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.2568

CRAWFORD, Kerryanne, Juan José BONFIGLIO, Andreja MIKOČ, Ivan MATIC a Ivan AHEL, 2018. Specificity of reversible ADP-ribosylation and regulation of cellular processes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* [online]. **53**(1), 64-82 [cit. 2021-5-4]. ISSN 1040-9238. Dostupné z: doi:10.1080/10409238.2017.1394265

D'AMOURS, Damien, Serge DESNOYERS, Icy D'SILVA a Guy G. POIRIER, 1999. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochemical Journal* [online]. **342**(2), 249-268 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj3420249

DANHAUSER, Katharina, Bader ALHADDAD, Christine MAKOWSKI, et al., 2018. Bi-allelic ADPRHL2 Mutations Cause Neurodegeneration with Developmental Delay, Ataxia, and Axonal Neuropathy. *The American Journal of Human Genetics* [online]. **103**(5), 1-9 [cit. 2021-5-8]. ISSN 00029297. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajhg.2018.10.005

DANI, N., A. STILLA, A. MARCHEGIANI, A. TAMBURRO, S. TILL, A. G. LADURNER, D. CORDA a M. DI GIROLAMO, 2009. Combining affinity purification by ADP-ribose-binding macro domains with mass spectrometry to define the mammalian ADP-ribosyl proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **106**(11), 4243-4248 [cit. 2021-5-8]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0900066106

DATE, Hidetoshi, Osamu ONODERA, Hajime TANAKA, et al., 2001. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nature Genetics* [online]. **29**(2), 184-188 [cit. 2021-5-6]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng1001-184

DAVIDOVIC, Laetitia, Momchil VODENICHAROV, El Bachir AFFAR a Guy G. POIRIER, 2001. Importance of Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase in the Control of Poly(ADP-Ribose) Metabolism. *Experimental Cell Research* [online]. **268**(1), 7-13 [cit. 2021-5-6]. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1006/excr.2001.5263

DEMPLE, Bruce a Michael S DEMOTT, 2002. Dynamics and diversions in base excision DNA repair of oxidized abasic lesions. *Oncogene* [online]. **21**(58), 8926-8934 [cit. 2021-5-6]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1206178

DE MURCIA, Gilbert a Josiane Ménissier DE MURCIA, 1994. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. **19**(4), 172-176 [cit. 2021-5-4]. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/0968-0004(94)90280-1

ELIASSON, Mikael J.L., Kenji SAMPEI, Allen S. MANDIR, et al., 1997. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nature Medicine* [online]. **3**(10), 1089-1095 [cit. 2021-5-8]. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/nm1097-1089

EL-KHAMISY, S. F., 2003. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research* [online]. **31**(19), 5526-5533 [cit. 2021-5-6]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkg761

EUSTERMANN, Sebastian, Christoph BROCKMANN, Pawan Vinod MEHROTRA, Ji-Chun YANG, David LOAKES, Stephen C WEST, Ivan AHEL a David NEUHAUS, 2010. Solution structures of the two PBZ domains from human APLF and their interaction with poly(ADP-ribose). *Nat Struct Mol Biol.* [online]. **17**(2), 241-243 [cit. 2021-2-22]. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb.1747

FEIJS, Karla L. H., Alexandra H. FORST, Patricia VERHEUGD a Bernhard LÜSCHER, 2013. Macrodomein-containing proteins: regulating new intracellulare Funktionen von mono(ADP-ribosyl)ation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **14**(7), 443-451 [cit. 2021-5-4]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3601

FENG, Xiaoxing a David W. KOH, 2013. Roles of Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase in DNA Damage and Apoptosis. *Int Rev Cell Mol Biol* [online]. Elsevier, 2013, **304**(1), 227-281 [cit. 2021-5-8]. International Review of Cell and Molecular Biology. ISBN 9780124076969. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-407696-9.00005-1



FONTANA, Pietro, Juan José BONFIGLIO, Luca PALAZZO, Edward BARTLETT, Ivan MATIC a Ivan AHEL, 2017. Serine ADP-ribosylation reversal by the hydrolase ARH3. *ELife* [online]. **6**, 1-20 [cit. 2021-5-4]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.28533

GHOSH, Shereen G., Kerstin BECKER, He HUANG, et al., 2018. Biallelic Mutations in ADPRHL2, Encoding ADP-Ribosylhydrolase 3, Lead to a Degenerative Pediatric Stress-Induced Epileptic Ataxia Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* [online]. **103**(3), 1-9 [cit. 2021-5-8]. ISSN 00029297. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajhg.2018.07.010

GIBBS-SEYMOUR, Ian, Pietro FONTANA, Johannes Gregor Matthias RACK a Ivan AHEL, 2016. HPF1/C4orf27 Is a PARP-1-Interacting Protein that Regulates PARP-1 ADP-Ribosylation Activity. *Molecular Cell* [online]. **62**(3), 432-442 [cit. 2021-5-4]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2016.03.008

GIBSON, Bryan A. a W. Lee KRAUS, 2012. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **13**(7), 411-424 [cit. 2021-5-4]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3376

GUPTE, Rebecca, Ziyang LIU a W. Lee KRAUS, 2017. PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. *Genes & Development* [online]. **31**(2), 101-126 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.291518.116

HANZLIKOVÁ, Hana, Evgeniia PROKHOROVA, Katerina KREJCIKOVÁ, et al., 2020. Pathogenic ARH3 mutations result in ADP-ribose chromatin scars during DNA strand break repair. *Nature Communications* [online]. **11**(1), 1-13 [cit. 2020-10-14]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-020-17069-9

HOCH, Nicolas C., Hana HANZLIKOVÁ, Stuart L. RULTEN, et al., 2017. XRCC1 mutation is associated with PARP1 hyperactivation and cerebellar ataxia. *Nature* [online]. **541**(7635), 87-91 [cit. 2021-5-8]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature20790

HOTTIGER, Michael O., Paul O. HASSA, Bernhard LÜSCHER, Herwig SCHÜLER a Friedrich KOCH-NOLTE, 2010. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. **35**(4), 208-219 [cit. 2021-5-4]. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2009.12.003

HTERT RPE-1, 2016. In: *ATCC* [online]. United Kingdom [cit. 2021-5-1]. Dostupné z: <https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/CRL-4000.ashx>

HUANG, He, Shu LIN, Benjamin A. GARCIA a Yingming ZHAO, 2014. Quantitative Proteomic Analysis of Histone Modifications. *Chemical Reviews* [online]. **115**(6), 2376-2418 [cit. 2021-5-8]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr500491u

IKEJIMA, M, S NOGUCHI, R YAMASHITA, T OGURA, T SUGIMURA, D M GILL a M MIWA, 1990. The zinc fingers of human poly(ADP-ribose) polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and nicks and the consequent enzyme activation. Other structures recognize intact DNA. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **265**(35), 21907-21913 [cit. 2021-5-8]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)45824-3

IPTG induction, 2004. In: *Biologics International Corp* [online]. USA: Pearson Education [cit. 2021-5-1]. Dostupné z: <https://www.biologicscorp.com/wp-content/uploads/2016/03/IPTG-Induction.jpg>

JUMP, Donald B., Tauseef R. BUTT a Mark SMULSON, 1979. Nuclear protein modification and chromatin substructure. 3. Relationship between poly(adenosine diphosphate) ribosylation and different functional forms of chromatin. *Biochemistry* [online]. **18**(6), 983-990 [cit. 2021-5-7]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00573a008

KARRAS, Georgios I, Georg KUSTATSCHER, Heeran R BUHECHA, Mark D ALLEN, Céline PUGIEUX, Fiona SAIT, Mark BYCROFT a Andreas G LADURNER, 2005. The macro domain is an ADP-ribose binding module. *The EMBO Journal* [online]. **24**(11), 1911-1920 [cit. 2021-5-1]. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1038/sj.emboj.7600664

KAWAICHI, M., K. UEDA a O. HAYAISHI, 1980. Initiation of poly(ADP-ribosyl) histone synthesis by poly(ADP-ribose) synthetase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **255**(3), 816-819 [cit. 2021-5-7]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)86100-8

KOCH-NOLTE, Friedrich, 2008. Mammalian ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases. *Frontiers in Bioscience* [online]. **Volume**(13), 16-29 [cit. 2021-5-4]. ISSN 10939946. Dostupné z: doi:10.2741/3184

KREIMEYER, A, K WIELCKENS, P ADAMIETZ a H HILZ, 1984. DNA repair-associated ADP-ribosylation in vivo. Modification of histone H1 differs from that of the principal acceptor proteins. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **259**(2), 890-896 [cit. 2021-5-7]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(17)43540-X

LAING, Sabrina, Mandy UNGER, Friedrich KOCH-NOLTE a Friedrich HAAG, 2011. ADP-ribosylation of arginine. *Amino Acids* [online]. **41**(2), 257-269 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0939-4451. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-010-0676-2

LANGELIER, Marie-France, Kristin M. SERVENT, Elizabeth E. ROGERS a John M. PASCAL, 2008. A Third Zinc-binding Domain of Human Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Coordinates DNA-dependent Enzyme Activation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **283**(7), 4105-4114 [cit. 2021-5-8]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M708558200

LANGELIER, Marie-France, Jamie L. PLANCK, Swati ROY a John M. PASCAL, 2011. Crystal Structures of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Zinc Fingers Bound to DNA. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **286**(12), 10690-10701 [cit. 2021-5-8]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.202507

LANGELIER, M.-F., J. L. PLANCK, S. ROY a J. M. PASCAL, 2012. Structural Basis for DNA Damage-Dependent Poly(ADP-ribosyl)ation by Human PARP-1. *Science* [online]. **336**(6082), 728-732 [cit. 2021-5-8]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1216338

LANGELIER, Marie-France, Amanda A. RICCIO a John M. PASCAL, 2014. PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic Acids Research* [online]. **42**(12), 7762-7775 [cit. 2021-5-8]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gku474

LANGELIER, Marie-France, Levani ZANDARASHVILI, Pedro M. AGUIAR, Ben E. BLACK a John M. PASCAL, 2018. NAD analog reveals PARP-1 substrate-blocking mechanism and allosteric communication from catalytic center to DNA-binding domains. *Nature Communications* [online]. **9**(1) [cit. 2021-5-8]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-018-03234-8

LARSEN, Sara C., Ivo A. HENDRIKS, David LYON, Lars J. JENSEN a Michael L. NIELSEN, 2018. Systems-wide Analysis of Serine ADP-Ribosylation Reveals Widespread Occurrence and Site-Specific Overlap with Phosphorylation. *Cell Reports* [online]. **24**(9), 2493-2505.e4 [cit. 2021-5-4]. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2018.07.083

LEAL, Alejandro, Sixto BOGANTES-LEDEZMA, Arif B. EKICI, et al., 2018. The polynucleotide kinase 3'-phosphatase gene (PNKP) is involved in Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2B2) previously related to MED25. *Neurogenetics* [online]. **19**(4), 215-225 [cit. 2021-4-25]. ISSN 1364-6745. Dostupné z: doi:10.1007/s10048-018-0555-7

LEIDECKER, Orsolya, Juan José BONFIGLIO, Thomas COLBY, et al., 2016. Serine is a new target residue for endogenous ADP-ribosylation on histones. *Nature Chemical Biology* [online]. **12**(12), 998-1000 [cit. 2021-5-4]. ISSN 1552-4450. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.2180

LEUNG, Anthony K. L., Robert Lyle MCPHERSON, Diane E. GRIFFIN a Rebecca Ellis DUTCH, 2018. Macrodomein ADP-ribosylhydrolase and the pathogenesis of infectious diseases. *PLOS Pathogens* [online]. **14**(3), 1-9 [cit. 2021-5-8]. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1006864

LI, G.-Y., R. D. MCCULLOCH, A. L. FENTON, M. CHEUNG, L. MENG, M. IKURA a C. A. KOCH, 2010. Structure and identification of ADP-ribose recognition motifs of APLF and role in the DNA damage response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **107**(20), 9129-9134 [cit. 2021-5-8]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1000556107

LI, M., L.-Y. LU, C.-Y. YANG, S. WANG a X. YU, 2013. The FHA and BRCT domains recognize ADP-ribosylation during DNA damage response. *Genes & Development* [online]. **27**(16), 1752-1768 [cit. 2021-5-7]. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.226357.113

LISZCZAK, Glen, Katharine L. DIEHL, Geoffrey P. DANN a Tom W. MUIR, 2018. Acetylation blocks DNA damage-induced chromatin ADP-ribosylation. *Nature Chemical Biology* [online]. **14**(9), 837-840 [cit. 2021-5-8]. ISSN 1552-4450. Dostupné z: doi:10.1038/s41589-018-0097-1

LIU, Xiuhua, Rong XIE, Lily L. YU, et al., 2020. AI26 inhibits the ADP-ribosylhydrolase ARH3 and suppresses DNA damage repair. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **295**(40), 13838-13849 [cit. 2021-4-25]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.RA120.012801

LOSEVA, Olga, Ann-Sofie JEMTH, Helen E. BRYANT, Herwig SCHÜLER, Lari LEHTIÖ, Tobias KARLBERG a Thomas HELLEDAY, 2010. PARP-3 Is a Mono-ADP-ribosylase That Activates PARP-1 in the Absence of DNA. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **285**(11), 8054-8060 [cit. 2021-4-29]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M109.077834

LUO, X. a W. L. KRAUS, 2012. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes & Development* [online]. **26**(5), 417-432 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.183509.111

LÜSCHER, Bernhard, Mareike BÜTEPAGE, Laura ECKEL, Sarah KRIEG, Patricia VERHEUGD a Brian H. SHILTON, 2017. ADP-Ribosylation, a Multifaceted Posttranslational Modification Involved in the Control of Cell Physiology in Health and Disease. *Chemical Reviews* [online]. **118**(3), 1092-1136 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.7b00122

MARTELLO, Rita, Mario LEUTERT, Stephanie JUNGMICHEL, Vera BILAN, Sara C. LARSEN, Clifford YOUNG, Michael O. HOTTIGER a Michael L. NIELSEN, 2016. Proteome-wide identification of the endogenous ADP-ribosylome of mammalian cells and tissue. *Nature Communications* [online]. **7**(1), 1-13 [cit. 2021-5-8]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms12917

MASSON, Murielle, Claude NIEDERGANG, Valérie SCHREIBER, Sylviane MULLER, Josiane MENISSIER-DE MURCIA a Gilbert DE MURCIA, 1998. XRCC1 Is Specifically Associated with Poly(ADP-Ribose) Polymerase and Negatively Regulates Its Activity following DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **18**(6), 3563-3571 [cit. 2021-5-6]. ISSN 1098-5549. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.18.6.3563

MESSNER, Simon, Matthias ALTMAYER, Hongtao ZHAO, et al., 2010. PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. *Nucleic Acids Research* [online]. **38**(19), 6350-6362 [cit. 2021-5-7]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkq463

MESSNER, Simon a Michael O. HOTTIGER, 2011. Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends in Cell Biology* [online]. **21**(9), 534-542 [cit. 2021-5-7]. ISSN 09628924. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcb.2011.06.001

MILNE, Jill C a John M DENU, 2008. The Sirtuin family: therapeutic targets to treat diseases of aging. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. **12**(1), 11-17 [cit. 2021-5-7]. ISSN 13675931. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2008.01.019

MUELLER-DIECKMANN, C., S. KERNSTOCK, M. LISUREK, J. P. VON KRIES, F. HAAG, M. S. WEISS a F. KOCH-NOLTE, 2006. The structure of human ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3) provides insights into the reversibility of protein ADP-ribosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **103**(41), 15026-15031 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0606762103

MUNNUR, Deeksha, Edward BARTLETT, Petra MIKOLČEVIĆ, Ilsa T KIRBY, Johannes Gregor Matthias RACK, Andreja MIKOČ, Michael S COHEN a Ivan AHEL, 2019. Reversible ADP-ribosylation of RNA. *Nucleic Acids Research* [online]. **47**(11), 5658-5669 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkz305

NAKAMOTO, Meagan Y., Johannes RUDOLPH, Deborah S. WUTTKE a Karolin LUGER, 2019. Nonspecific Binding of RNA to PARP1 and PARP2 Does Not Lead to Catalytic Activation. *Biochemistry* [online]. **58**(51), 5107-5111 [cit. 2021-4-29]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biochem.9b00986

NAKANO, Tsuyoshi, Azusa TAKAHASHI-NAKAGUCHI, Masafumi YAMAMOTO a Masahiko WATANABE, 2015. Pierisins and CARP-1: ADP-Ribosylation of DNA by ARTCs in Butterflies and Shellfish. *Endogenous ADP-Ribosylation* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2014-7-18, **384**, 127-149 [cit. 2021-5-4]. Current Topics in Microbiology and Immunology. ISBN 978-3-319-10770-7. Dostupné z: doi:10.1007/82\_2014\_416

NOWAK, Kathrin, Florian ROSENTHAL, Tobias KARLBERG, et al., 2020. Engineering Af1521 improves ADP-ribose binding and identification of ADP-ribosylated proteins. *Nature Communications* [online]. **11**(1), 14 [cit. 2021-2-15]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-020-18981-w

OGATA, N., K. UEDA a O. HAYAISHI, 1980a. ADP-ribosylation of histone H2B. Identification of glutamic acid residue 2 as the modification site. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **255**(16), 7610-7615 [cit. 2021-5-7]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)43872-6

OGATA, N., K. UEDA, H. KAGAMIYAMA a O. HAYAISHI, 1980b. ADP-ribosylation of histone H1. Identification of glutamic acid residues 2, 14, and the COOH-terminal lysine residue as modification sites. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **255**(16), 7616-7620 [cit. 2021-5-7]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)43873-8

OKANO, Satoshi, Li LAN, Keith W. CALDECOTT, Toshio MORI a Akira YASUI, 2003. Spatial and Temporal Cellular Responses to Single-Strand Breaks in Human Cells. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **23**(11), 3974-3981 [cit. 2021-5-6]. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.23.11.3974-3981.2003

OKA, Shunya, Jiro KATO a Joel MOSS, 2006. Identification and Characterization of a Mammalian 39-kDa Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **281**(2), 705-713 [cit. 2021-5-4]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M510290200

PALAZZO, Luca, Andreja MIKOČ a Ivan AHEL, 2017. ADP-ribosylation: new facets of an ancient modification. *The FEBS Journal* [online]. **284**(18), 2932-2946 [cit. 2021-5-8]. ISSN 1742464X. Dostupné z: doi:10.1111/febs.14078

PALAZZO, Luca a Ivan AHEL, 2018. PARPs in genome stability and signal transduction: implications for cancer therapy. *Biochemical Society Transactions* [online]. **46**(6), 1681-1695 [cit. 2021-4-29]. ISSN 0300-5127. Dostupné z: doi:10.1042/BST20180418

PALAZZO, Luca, Orsolya LEIDECKER, Evgeniia PROKHOROVA, Helen DAUBEN, Ivan MATIC a Ivan AHEL, 2018. Serine is the major residue for ADP-ribosylation upon DNA damage. *ELife* [online]. **7**, 1-12 [cit. 2021-5-4]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.34334

PALAZZO, Luca, Petra MIKOLČEVIĆ, Andreja MIKOČ a Ivan AHEL, 2019. ADP-ribosylation signalling and human disease. *Open Biology* [online]. **9**(4), 18 [cit. 2020-11-22]. ISSN 2046-2441. Dostupné z: doi:10.1098/rsob.190041



PANDEY, Nootan a Ben E. BLACK, 2021. Rapid Detection and Signaling of DNA Damage by PARP-1. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. **46**(2), 1-14 [cit. 2021-5-8]. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2021.01.014

PAN, Patricia W., Jessica L. FELDMAN, Mark K. DEVRIES, Aiping DONG, Aled M. EDWARDS a John M. DENU, 2011. Structure and Biochemical Functions of SIRT6. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **286**(16), 14575-14587 [cit. 2021-5-7]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M111.218990

PEHRSON, J. R. a R. N. FUJI, 1998. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Research* [online]. **26**(12), 2837-2842 [cit. 2021-5-8]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/26.12.2837

POMMIER, Y, 2003. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. **532**(1-2), 173-203 [cit. 2021-5-6]. ISSN 00275107. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.08.016

POSAVEC MARJANOVIĆ, Melanija, Kerryanne CRAWFORD a Ivan AHEL, 2017. PARP, transcription and chromatin modeling. *Semin Cell Dev Biol* . [online]. **63**, 102-113 [cit. 2021-5-4]. ISSN 10849521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcdb.2016.09.014

POURFARJAM, Yasin, Jessica VENTURA, Igor KURINOV, Ahra CHO, Joel MOSS a In-Kwon KIM, 2018. Structure of human ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3 bound to ADP-ribose reveals a conformational switch that enables specific substrate recognition. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **293**(32), 12350-12359 [cit. 2021-5-4]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.RA118.003586

RACK, Johannes Gregor Matthias, Dragutin PERINA a Ivan AHEL, 2016. Macrod domains: Structure, Function, Evolution, and Catalytic Activities. *Annual Review of Biochemistry* [online]. **85**(1), 431-454 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014935

RACK, Johannes Gregor Matthias, Antonio ARIZA, Bryon S. DROWN, Callum HENFREY, Edward BARTLETT, Tomohiro SHIRAI, Paul J. HERGENROTHER a Ivan AHEL, 2018. (ADP-ribosyl)hydrolases: Structural Basis for Differential Substrate Recognition and Inhibition. *Cell Chemical Biology* [online]. **25**(12), 1533-1546.e12 [cit. 2021-5-4]. ISSN 24519456. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2018.11.001

RACK, Johannes Gregor Matthias, Luca PALAZZO a Ivan AHEL, 2020. (ADP-ribosyl)hydrolases: structure, function, and biology. *Genes & Development* [online]. **34**(5-6), 263-284 [cit. 2021-4-28]. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.334631.119

RAY CHAUDHURI, Arnab a André NUSSENZWEIG, 2017. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **18**(10), 610-621 [cit. 2021-5-1]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm.2017.53

RECHKUNOVA, N. I., E. A. MALTSEVA a O. I. LAVRIK, 2019. Post-translational Modifications of Nucleotide Excision Repair Proteins and Their Role in the DNA Repair. *Biochemistry (Moscow)* [online]. **84**(9), 1008-1020 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0006-2979. Dostupné z: doi:10.1134/S0006297919090037

REINHARDT, H. Christian a Michael B. YAFFE, 2013. Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **14**(9), 563-580 [cit. 2021-5-7]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3640

RINGEL, Alison E., Sarah A. TUCKER a Marcia C. HAIGIS, 2018. Chemical and Physiological Features of Mitochondrial Acylation. *Molecular Cell* [online]. **72**(4), 610-624 [cit. 2021-5-4]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2018.10.023

RIPPMANN, Jörg F., Klaus DAMM a Andreas SCHNAPP, 2002. Functional Characterization of the Poly(ADP-ribose) Polymerase Activity of Tankyrase 1, a Potential Regulator of Telomere Length. *Journal of Molecular Biology* [online]. **323**(2),

217-224 [cit. 2021-5-4]. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-2836(02)00946-4

SAUVE, Anthony A., 2010. Sirtuin chemical mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* [online]. **1804**(8), 1591-1603 [cit. 2021-5-7]. ISSN 15709639. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2010.01.021

SAUVE, Anthony A a Dou Yeon YOUN, 2012. Sirtuins: NAD -dependent deacetylase mechanism and regulation. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. **16**(5-6), 535-543 [cit. 2021-5-4]. ISSN 13675931. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2012.10.003

SHARIFI, Reza, Rosa MORRA, C DENISE APPEL, et al., 2013. Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease. *The EMBO Journal* [online]. **32**(9), 1225-1237 [cit. 2021-5-8]. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1038/emboj.2013.51

SHEN, Jun, Edward C GILMORE, Christine A MARSHALL, et al., 2010. Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nature Genetics* [online]. **42**(3), 245-249 [cit. 2021-5-6]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng.526

SCHREIBER, Valérie, Jean-Christophe AMÉ, Pascal DOLLÉ, Inès SCHULTZ, Bruno RINALDI, Valérie FRAULOB, Josiane MÉNISSIER-DE MURCIA a Gilbert DE MURCIA, 2002. Poly(ADP-ribose) Polymerase-2 (PARP-2) Is Required for Efficient Base Excision DNA Repair in Association with PARP-1 and XRCC1. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **277**(25), 23028-23036 [cit. 2021-5-6]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M202390200

SLADE, Dea, Mark S. DUNSTAN, Eva BARKAUSKAITE, et al., 2011. The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Nature* [online]. **477**(7366), 616-620 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature10404

SPARKS, Justin L., Hyongi CHON, Susana M. CERRITELLI, Thomas A. KUNKEL, Erik JOHANSSON, Robert J. CROUCH a Peter M. BURGERS, 2012. RNase H2-Initiated Ribonucleotide Excision Repair. *Molecular Cell* [online]. **47**(6), 980-986 [cit. 2021-5-6]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2012.06.035

SUSKIEWICZ, Marcin J., Florian ZOBEL, Tom E. H. OGDEN, et al., 2020. HPF1 completes the PARP active site for DNA damage-induced ADP-ribosylation. *Nature* [online]. **579**(7800), 598-602 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-2013-6

TAKASHIMA, Hiroshi, Cornelius F. BOERKOEL, Joy JOHN, et al., 2002. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nature Genetics* [online]. **32**(2), 267-272 [cit. 2021-5-6]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng987

TALHAOUI, Ibtissam, Natalia A. LEBEDEVA, Gabriella ZARKOVIC, et al., 2016. Poly(ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments in vitro. *Nucleic Acids Research* [online]. **44**(19), 9279-9295 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkw675

TELONI, Federico a Matthias ALTMAYER, 2016. Readers of poly(ADP-ribose): designed to be fit for purpose. *Nucleic Acids Research* [online]. **44**(3), 993-1006 [cit. 2021-2-15]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkv1383

TONG, Lei a John M. DENU, 2010. Function and metabolism of sirtuin metabolite O-acetyl-ADP-ribose. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* [online]. **1804**(8), 1617-1625 [cit. 2021-5-4]. ISSN 15709639. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2010.02.007

TUMBALE, Percy, Jessica S. WILLIAMS, Matthew J. SCHELLENBERG, Thomas A. KUNKEL a R. Scott WILLIAMS, 2014. Aprataxin resolves adenylated RNA-DNA junctions to maintain genome integrity. *Nature* [online]. **506**(7486), 111-115 [cit. 2021-5-6]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature12824

VIVELLO, Christina A. a Anthony K. L. LEUNG, 2015. Proteomics approaches to identify mono-(ADP-ribosyl)ated and poly(ADP-ribosyl)ated proteins. *PROTEOMICS* [online]. **15**(2-3), 203-217 [cit. 2021-5-4]. ISSN 16159853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.201400217

VOORNEVELD, Jim, Johannes G. M. RACK, Ivan AHEL, Herman S. OVERKLEEF, Gijsbert A. VAN DER MAREL a Dmitri V. FILIPPOV, 2018. Synthetic  $\alpha$ - and  $\beta$ -Ser-ADP-ribosylated Peptides Reveal  $\alpha$ -Ser-ADPr as the Native Epimer. *Organic Letters* [online]. **20**(13), 4140-4143 [cit. 2021-5-4]. ISSN 1523-7060. Dostupné z: doi:10.1021/acs.orglett.8b01742

VYAS, Sejal, Ivan MATIC, Lilen UCHIMA, Jenny ROOD, Roko ZAJA, Ronald T. HAY, Ivan AHEL a Paul CHANG, 2014. Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Nature Communications* [online]. **5**(1), 1-29 [cit. 2021-5-4]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms5426

WANG, James C., 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **3**(6), 430-440 [cit. 2021-5-6]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm831

WANG, Z., G. A. MICHAUD, Z. CHENG, Y. ZHANG, T. R. HINDS, E. FAN, F. CONG a W. XU, 2012. Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly(ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly(ADP-ribosyl)ation-dependent ubiquitination. *Genes & Development* [online]. **26**(3), 235-240 [cit. 2021-5-7]. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.182618.111

WANG, Mengxi, Zenglin YUAN, Rong XIE, Yinliang MA, Xiuhua LIU a Xiaochun YU, 2018. Structure–function analyses reveal the mechanism of the ARH3-dependent hydrolysis of ADP-ribosylation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **293**(37), 14470-14480 [cit. 2021-5-4]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.RA118.004284

WIELCKENS, Klaus, Reinhard BREDEHORST, Peter ADAMIETZ a Helmut HILZ, 1981. Protein-Bound Polymeric and Monomeric ADP-Ribose Residues in Hepatic Tissues. *European Journal of Biochemistry* [online]. **117**(1), 69-74 [cit. 2021-4-29]. ISSN 00142956. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1981.tb06303.x

WILLIAMS, Jessica S., Dana J. SMITH, Lisette MARJAVAARA, Scott A. LUJAN, Andrei CHABES a Thomas A. KUNKEL, 2013. Topoisomerase 1-Mediated Removal of Ribonucleotides from Nascent Leading-Strand DNA. *Molecular Cell* [online]. **49**(5), 1010-1015 [cit. 2021-5-6]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2012.12.021

WILLIAMS, Jessica S. a Thomas A. KUNKEL, 2014. Ribonucleotides in DNA: Origins, repair and consequences. *DNA Repair* [online]. **19**, 27-37 [cit. 2021-5-6]. ISSN 15687864. Dostupné z: doi:10.1016/j.dnarep.2014.03.029

WINTERS, Thomas A., W.David HENNER, Pamela S. RUSSELL, Amanda MCCULLOUGH a Timothy J. JORGENSEN, 1994. Removal of 3'-phosphoglycolate from DNA strand-break damage in an oligonucleotide substrate by recombinant human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1. *Nucleic Acids Research* [online]. **22**(10), 1866-1873 [cit. 2021-5-6]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/22.10.1866

WU, Wei, Sarah E. HILL, William J. NATHAN, et al., 2021. Neuronal enhancers are hotspots for DNA single-strand break repair. *Nature* [online]. **591**(7851), 22 [cit. 2021-4-28]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-021-03468-5

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Struktura PARP1 domén a subdomén.....	14
Obrázek 2	Rozdíl DNA-vázajících domén u PARP1, PARP2 a PARP3 .....	15
Obrázek 3	Struktura komplexu makro domény Afl521 s ADP-ribózou.....	17
Obrázek 4	Enzymy podílející se na metabolismu ADP-ribózy.....	19
Obrázek 5	Schéma ADP-ribosylovaných míst v histonech.....	22
Obrázek 6	Schéma opravy jednovláknového poškození DNA .....	24
Obrázek 7	Buňky hTERT RPE-1 .....	33
Obrázek 8	Detekce proteinů na membráně, obarvené pomocí Ponceau S.....	35
Obrázek 9	Schéma funkce IPTG.....	38
Obrázek 10	Hladina HPF1 a ARH3 proteinu ve WT a ARH3 <sup>-/-</sup> RPE-1 buňkách .....	42
Obrázek 11	Množství PAN-ADP-ribosylace u ARH3 <sup>-/-</sup> a WT RPE-1 buněk .....	43
Obrázek 12	ARH3 <sup>-/-</sup> RPE-1 buňky akumulující poly-/mono-ADP-ribosylace (PAN) .....	44
Obrázek 13	Množství PAN-ADP-ribosylace u ARH3 <sup>-/-</sup> a WT RPE-1 buněk.....	45
Obrázek 14	ARH3 <sup>-/-</sup> RPE-1 buňky akumulující poly-/mono-ADP-ribosylace (PAN) .....	46
Obrázek 15	Množství poly-ADP-ribosylace (PAR) u WT a ARH3 <sup>-/-</sup> RPE-1 buněk ...	47
Obrázek 16	ARH3 <sup>-/-</sup> RPE-1 buňky akumulující mono-ADP-ribosylace (MAR) na chromatinu .....	48
Obrázek 17	Působení AI26 inhibitoru na RPE-1 buňky po inkubaci v kratších časových intervalech .....	49
Obrázek 18	Působení AI26 inhibitoru na RPE-1 buňky po inkubaci v delších časových intervalech .....	51
Obrázek 19	ADP-ribosylace po použití inhibitoru AI26 detekovaná pomocí Western blotu .....	52
Obrázek 20	Množství Afl521-Macro WT a Afl521-Macro MUT domény na gelu.....	53
Obrázek 21	Imunoprecipitace pomocí Afl521 makro domény .....	54
Obrázek 22	Imunoprecipitace pomocí Afl521 makro domény zaslaná na MS .....	55
Obrázek 23	Model vzniku a vlivu perzistentních mono-ADP-ribóza značek u neurologických onemocnění.....	59

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Seznam použitých chemikálií .....	29
Tabulka 2 Seznam použitých pufrů a jejich složení a použitá média .....	30
Tabulka 3 Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek.....	31
Tabulka 4 Seznam použitých inhibitorů.....	32
Tabulka 5 Seznam použitých kitů .....	32
Tabulka 6 Seznam významně ADP-ribosylovaných proteinů z MS .....	55