

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory

Molekulární biologie a biochemie organismů



Veronika Vachová

Odpověď na poškození DNA u Huntingtonovy choroby

DNA damage response in Huntington's disease

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Mgr. Petr Šolc, Ph.D.

Praha 2015

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Mgr. Petru Šolcovi, Ph.D. za čas, ochotu a cenné rady, které mi věnoval během psaní této bakalářské práce. Dále chci poděkovat svým blízkým za podporu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15. 5. 2015

.....

podpis

ABSTRAKT

Huntingtonova choroba (HD) je autozomálně dominantní neurodegenerativní onemocnění, které vede ke ztrátě striatálních neuronů v bazálních gangliích. HD se projevuje nekoordinovanými pohyby a progresivním narušením kognitivních funkcí. HD je poměrně vzácné onemocnění a vyskytuje se přibližně u 0,01 % západoevropské populace. Je způsobena expanzí CAG repetice v genu pro huntingtin (HTT). Tato mutace vede k prodloužení polyglutaminového řetězce. Během exprese mutantního huntingtinu (mHTT) dochází v buňce k akumulaci dvouřetězcových zlomů (DSB) kvůli snížené schopnosti je opravit, což přispívá k patogenezi HD. Tento mechanismus však není zcela objasněn. Je několik úhlů pohledu, jak mHTT narušuje odpověď na DNA poškození (DDR). Některé studie tvrdí, že při expresi mHTT dochází k nadměrné aktivaci DDR včetně p53 signální dráhy vedoucí k apoptóze. Další výsledky poukazují na neschopnost buňky efektivně dokončit opravu pomocí nehomologního spojování konců (NHEJ) nebo neschopnost buňky tyto DSB dokonce rozeznat. Všechny tyto teorie mohou vysvětlit buněčnou smrt v důsledku vysokého počtu neopravených DNA poškození. Pochopení těchto mechanismů je důležité pro vývoj terapeutických strategií.

Klíčová slova: Huntingtonova choroba, huntingtin, dvouřetězcové zlomy DNA, DNA poškození, homologní rekombinace, nehomologní spojování konců, p53

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder, which leads to loss of striatal neurons in basal ganglia. It is characterized by involuntary movements and progressive cognitive impairment. HD is a relatively rare disease and the prevalence is approximately 0,01 % of the population of Western Europeans. HD is caused by a CAG repeat expansion in the huntingtin gene (HTT). This mutation results in an elongated stretch of glutamine. Mutant huntingtin (mHTT) expression leads to accumulation of DNA double-strand breaks (DSB) due to reduced ability of effective reparation, which contributes to the pathogenesis of HD, however this mechanism is not fully understood. There are several viewpoints on how mHTT impairs DNA damage response (DDR). Some studies say that the expression of the mHTT initiates excessive activation of the DDR, including the p53 signaling pathway, leading to apoptosis. Other studies represent results for dysfunction of non-homologous end joining after recognition of DSB or that the cell is not able to recognize DSB. All theories would explain cell death as a consequence of high levels of unrepaired DNA damage. The understanding of these mechanisms is important for the development of therapeutical strategies.

Key words: Huntington's disease, huntingtin, DNA double-strand breaks, DNA damage, homologous recombination, non-homologous end joining, p53

OBSAH

ABSTRAKT	3
ABSTRACT	4
SEZNAM ZKRATEK	7
1 ÚVOD	9
2 DVOUŘETĚZCOVÉ ZLOMY DNA	9
2.1 Rozpoznávání dvouřetězcových zlomů DNA.....	10
2.2 Oprava dvouřetězcových zlomů.....	13
2.2.1 Nehomologní spojování volných konců – NHEJ.....	13
2.2.2 Homologní rekombinace - HR.....	15
2.2.3 Výběr reparačního mechanismu DSB.....	16
2.2.4 Role p53 v odpovědi na poškození DNA.....	18
3 HUNTINGTONOVA CHOROBA	18
3.1 CAG expanze.....	19
3.2 Dědičnost HD.....	20
3.3 Funkce huntingtinu.....	20
3.4 Projevy HD.....	20
3.5 Léčba HD.....	21
3.6. Oxidativní poškození u HD.....	21
3.7 Formování inkluzních tělísek.....	22
3.8 Myší modely HD.....	22
4 ODPOVĚĎ NA POŠKOZENÍ DNA U HD	23
4.1 Akumulace DSB v buňkách s mHTT.....	24
4.2 Zvýšená apoptóza u buněk s mHTT.....	24
4.3 Zvýšená aktivace H2AX a ATM během exprese mHTT.....	24
4.3.1 Cílení na ATM snižuje toxicitu mHTT.....	25
4.4 Snížená schopnost rozpoznávání DSB během exprese mHTT.....	26
4.4.1 Nižší detekce γ H2AX u buněk s mHTT po ozáření.....	26
4.4.2 mHTT zadržuje pATM v cytoplazmě.....	27
4.5 Pozměněná hladina BRCA1 a dynamika γ H2AX v buňkách s mHTT.....	27
4.6 Narušení NHEJ v důsledku vazby mHTT na Ku70.....	29
4.6.1 Zvýšená exprese Ku70 obnovuje narušenou reparační aktivitu.....	29
4.7 Interakce mezi p53 a mHTT.....	30
4.7.1 p53 zvyšuje hladinu HTT a mHTT.....	30
4.7.2 p53 se váže na <i>HD/Hdh</i> promotor.....	31
4.7.3 Delece p53 zmírňuje projevy HD.....	31

4.7.4 Modely p53-mHTT interakce.....	31
4.8 Hladina p53 se po transfekci plasmidem s mHTT nemění	33
4.9 Modifikace p53 během exprese mHTT.....	34
4.9.1 Interakce p53 s Pin1	34
4.9.2 Posttranslační modifikace p53 během exprese mHTT.....	34
5 ZÁVĚR.....	35
6 POUŽITÁ LITERATURA.....	37

SEZNAM ZKRATEK

53BP1	Tumor protein p53-binding protein 1
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATRIP	ATR interacting protein
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1
BRCA1	Breast cancer 1
BRCA2	Breast cancer 2
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
CPT	Camptothecin
CtIP	CtBP-interacting protein
DDR	DNA damage response
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
DSB	Double-strand breaks
EXO1	Exonuclease 1
FEN1	Flap structure-specific endonuclease 1
GFP	Green fluorescent protein
H2AX	H2A histone family, member X
HD	Huntington's disease
HEK293	Human Embryonic Kidney 293 cells
HIPK2	Homeodomain interacting protein kinase 2
hMTH1	human MTH1 hydrolase
HR	Homologous recombination
HTT	Huntingtin
Chk1	Checkpoint kinase 1
iASPP	Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53
IB	Inclusion bodies
iPSC	Induced pluripotent stem cell
Ku70 (XRCC6)	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6
Ku80 (XRCC5)	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5
Lig IV	Ligase IV
MDC1	Mediator of DNA-damage checkpoint 1
MDM2	Murine double minute 2
MEF	Mouse embryonic fibroblast
mHTT	Mutant huntingtin
MRE11	Meiotic recombination 11
MRN	MRE11-RAD50-NBS1 complex
Msh2	mutS homolog 2
Msh3	mutS homolog 3
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin)
NHEJ	Non-homologous end joining
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
p53	Tumor suppressor p53

PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
PIKK	Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases
Pin1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1
PKC δ	Protein kinase C delta type
RAD51	RAD51 recombinase
RAG proteins	Recombination-activating proteins
RAP80	Receptor-associated protein 80
RIF1	Replication timing regulatory factor 1
RNF8	Ring finger protein 8
RPA	Replication protein A
Spo11	SPO11 meiotic protein covalently bound to DSB
SSB	Single-strand breaks
TOPBP1	Topoisomerase (DNA) II binding protein 1
UBC13	Ubiquitin-conjugating enzymes, complex 13
UIMs	Ubiquitin-interacting motif domains
wt-HTT	Wild-type huntingtin
XRCC4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4
γ H2AX	Phosphorylated form of H2AX

1 ÚVOD

Ve zdravých buňkách denně dochází k poškození DNA působením endogenních i exogenních vlivů. Mezi nejzávažnější poškození patří dvojřetězcové zlomy (double-strand breaks, DSB). Při vzniku DSB dochází v buňce ke spuštění odpovědi na poškození DNA (DNA damage response, DDR) - k opravě poškození, zástavě buněčného cyklu nebo apoptóze. Jsou vyvinuty opravné mechanismy, mezi které patří nehomologní spojování konců (non-homologous end joining, NHEJ) a homologní rekombinace (homologous recombination, HR). Selhání těchto reparačních drah může vést např. ke kancerogenezi nebo k buněčné smrti.

Huntingtonova choroba (HD) je neurodegenerativní genetická porucha, která vede k poškození nervového systému, zejména v žíhánem jádře (corpus striatum) bazálních ganglií. Projevuje se nekontrolovatelnými pohyby a výraznou změnou vnímání a chování postiženého. Dědí se autozomálně dominantně a vyskytuje se přibližně u 0,01 % západoevropské populace.

Molekulární podstatou HD je expanze CAG repetit, které kódují polyQ řetězec v genu pro protein huntingtin (HTT). Běžný počet těchto CAG repetit je v nemutovaném genu asi 9 - 35, po překročení přibližně 40 repetit mluvíme o mutovaném huntingtinu (mHTT). Věk, kdy dojde k nástupu choroby, souvisí s počtem repetit. S větším počtem dochází k časnějším projevům onemocnění. Funkce HTT však není zatím zcela objasněna.

Při expresi mHTT dochází s věkem k akumulaci DSB. To má za následek buněčné dysfunkce a zejména v nervových buňkách vede vysoké množství neopravených DSB k buněčné smrti. Buňky exprimující mHTT mají sníženou schopnost DSB efektivně opravit. Jaký je přesný mechanismus narušení reparačních drah, není zatím objasněno a tato problematika je nyní předmětem výzkumu.

Cíle práce:

- Shrnout reparační mechanismy dvouřetězcových DNA zlomů.
- Zpracovat na základě dostupné literatury problematiku odpovědi na dvouřetězcové zlomy v HD patogenezi.

2 DVOUŘETĚZCOVÉ ZLOMY DNA

Denně vzniká v buňce mnoho poškození na úrovni genomové DNA, mezi která patří například depurinace nebo deaminace bází, jejich alkylace či oxidace, jednořetězcové zlomy a další.

Dvouřetězcové zlomy (double-strand breaks, DSB), během kterých se přeruší obě vlákna DNA, představují pro buňku největší hrozbu. Není zde totiž druhé vlákno, které by mohlo sloužit jako templát pro dosyntetizování přerušeno vlákna DNA, jako je tomu například u jednořetězcových zlomů.

Tyto zlomy mohou vznikat na základě endogenních i exogenních vlivů, chemických, fyzikálních a biologických faktorů. Mezi exogenní faktory patří například ionizační záření, radiomimetické drogy (bleomycin, neokarcinostatin) nebo inhibitory topoizomeráz (Mahaney et al. 2009).

DSB se také endogenně tvoří při běžných buněčných procesech, jako je meiotická rekombinace, V(D)J rekombinace při vzniku různých izoform receptorů T-lymfocytů a imunoglobulinů, přesmyk těžkých řetězců u imunoglobulinů, apoptotická fragmentace DNA, kolaps replikační vidličky nebo během buněčného metabolismu, při kterém vznikají volné kyslíkové radikály, které taktéž poškozují DNA (Mahaney et al. 2009).

Ačkoliv jsou v buňce vyvinuty mechanismy pro opravu DSB a jiných poškození, chyby v opravách vedou k mutacím, chromozomovým translokacím, genomové nestabilitě, buněčné smrti nebo transformaci buňky v buňku rakovinnou (Mahaney et al. 2009).

2.1 Rozpoznávání dvouřetězcových zlomů DNA

Při rozpoznávání dvouřetězcových zlomů hraje důležitou roli protein Ku70/80. Je to heterodimer, který je pojmenován podle velikosti svých dvou podjednotek (Ku70 = 69,8 kDa, Ku80 = 82,7 kDa) (Zhang et al. 2001). Ku70/80 se s vysokou afinitou váže na volné konce dvouřetězcové DNA, tedy i na DSB, bez potřeby energie, sekvenční specifity a bez ohledu na přesah volných konců. Stabilizuje je a chrání před aktivitou DNA modifikujících enzymů (Blier et al. 1993). Chrání tak DNA před degradací exonukleázami a dalšími enzymy a před vazbou na jiná místa genomové DNA. Vazba probíhá bez sekvenční specifity z důvodu vazby na sacharidovou kostru DNA a nikoliv na báze (Walker et al. 2001). Jedná se o protein s toroidní strukturou, kterou se přímo navléká na volné konce DNA, a to během několika sekund od vzniku DSB v buňce (Ciccía and Elledge 2010).

Ku70/80 funguje jako proteinové lešení, na které se váží další komponenty důležité pro opravu mechanismem NHEJ. Koncentrace Ku70/80 vázaného na volné konce DNA je v dynamické rovnováze s koncentrací volného proteinu, z čehož vyplývá, že skládání komplexu pro opravu cestou NHEJ je reverzibilní (Mari et al. 2006).

Dalším enzymem, který rozpoznává zlomy DNA řetězce je Poly(ADP-ribose) polymeráza 1 (Poly (ADP-ribose) polymerase 1, PARP1). Účastní se především oprav jednořetězcových zlomů (single-strand breaks, SSB). U DSB pak kompetuje s proteinem Ku70/80 a podporuje HR (Hochegger et al. 2006) nebo alternativní cestu NHEJ (alt-NHEJ) (Wang et al. 2006). PARP1

také zprostředkovává a usnadňuje počáteční akumulaci proteinového komplexu MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) na místech DSB (Haince et al. 2008).

Komplex **MRN** hraje úlohu v rozpoznávání, funguje jako koaktivátor specifických signálních cest regulace buněčného cyklu způsobených DSB a jako efektor během HR a NHEJ. Tento komplex lze také nalézt v asociaci s telomerami na koncích lineárních chromozomů, kde přispívá k jejich údržbě. MRN komplex hraje roli během brzké fáze DDR jako senzor DSB (Petrini 2003).

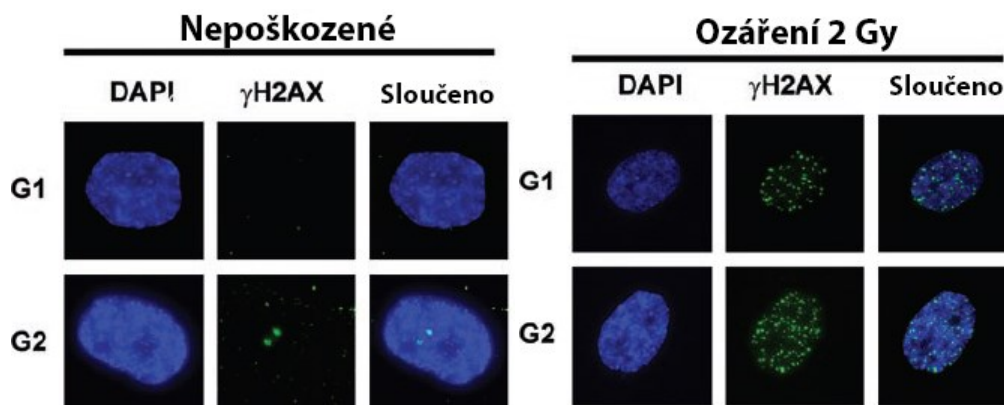
Samostatný MRE11 (meiotic recombination 11) tvoří stabilní dimery, které zajišťují vlastní vazbu na DNA a spojování DSB konců. Mají také exonukleázovou a endonukleázovou aktivitu vůči různým jednořetězcovým i dvouřetězcovým DNA (Paull and Gellert 1999). *In vivo* tvoří MRE11 komplexy s RAD50 tak, že každý MRE11 váže jeden RAD50, kde výsledkem je heterodimer MRE11₂RAD50₂. RAD50 obsahuje ATPázovou doménu typu ABC (ATP binding cassette), která interaguje s MRE11 a zajišťuje asociaci s konci DNA u DSB (Hopfner et al. 2000). S rostoucí koncentrací MRE11₂RAD50₂ oligomerizují na koncích dsDNA, kde zajišťují spojení mezi DNA konci, a tak tvoří lešení, které drží tyto konce pohromadě (de Jager et al. 2001). Dnešní představa o funkci tohoto komplexu je, že MRE11 dimer usnadňuje vazbu blízko se nacházejících konců DSB a RAD50 umožňuje vazbu vzdálenějších molekul DNA (Hopfner et al. 2002). RAD50 zvyšuje afinitu MRE11 k DNA a stimuluje nukleázovou aktivitu. Tyto účinky dále posiluje navázání NBS1 (nibrin) (Paull and Gellert 1999). NBS1 je především zodpovědný za lokalizaci MRN komplexu do jádra (Desai-Mehta et al. 2001). Stimuluje vazbu komplexu na DNA a nukleázovou aktivitu MR komplexu, ale sám nevykazuje žádnou enzymatickou aktivitu. Přispívá k procesu opravy DSB hlavně zprostředkováním protein-protein interakce na místech DNA poškození. C-konec obsahuje doménu interagující s ATM (Ataxia telangiectasia mutated), který je směřován do místa DSB (You et al. 2005).

ATM je fosfoinositol-3-kináze podobná kináza (PIKK) s helikální HEAT opakující se doménou v N-koncové oblasti. Má centrální roli v řízení DDR. Aktivace ATM je regulována komplexem MRN. V nepoškozených buňkách se ATM vyskytuje jako neaktivní homodimer, který není v této konformaci schopen fosforylace substrátů. Během DSB je ATM rekrutován do místa poškození interakcí s C-koncovým motivem NBS1. Dimer se disociuje, ATM se stává aktivním a dochází k autofosforylaci na serinu-1981 (Bakkenist and Kastan 2003).

Jakmile je ATM aktivována, fosforyluje řadu cílů, které jsou klíčové k dalšímu postupu. Jedním z takových je histon H2AX (u metazoí), přesněji jeho C-konec, ze kterého vznikne fosforylovaný γ H2AX. Tato modifikace se rychle rozšíří okolo místa účinku do vzdálenosti až několika megabází u vyšších eukaryot (Berkovich et al. 2007).

Takto upravené histony jsou dále cílem pro další PIKK jako je ATR (Ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related protein) a DNA proteinkináza (DNA-PK) (Downs et al. 2000). Tato fosforylace tedy označí DSB místo a poskytne tak fosforylací regulovatelnou platformu pro

shromáždění opravných a podpůrných faktorů. Amplifikace počátečního signálu z DSB je usnadněna přímým navázáním fosforylovaných γ H2AX na C-konce BRCT domén mediátoru kontrolního bodu buněčného cyklu MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1), který dále rekrutuje aktivované ATM, což vede k další fosforylaci a γ H2AX šíření (Lou et al. 2006).



Obr. 1. Formování γ H2AX ložisek během G1 a G2 fáze. Nepoškozené buňky obvykle vykazují menší množství γ H2AX ložisek v G1 fázi, v G2 fázi mírně zvýšenou hladinou. Po ozáření 2 Gy je zřetelné výrazné množství γ H2AX ložisek, které se formují na vzniklých DSB. V G2 fázi je oproti G1 fázi přibližně jednou takové množství. Převzato z Löbrich et al. 2010.

Lokalizace **MDC1** do blízkosti DSB a následná expanze γ H2AX usnadňuje rekrutaci a zadržení proteinů kontrolních bodů účastnících se opravy DNA jako NBS1, 53BP1 (p53-binding protein1) a BRCA1 (breast cancer 1) pro zastavení buněčného cyklu a k opravě DNA (Goldberg et al. 2003). MDC1 je jako zesilovač signalizace ATM životně důležitý během DDR a při zajištění stability genomu (Lou et al. 2006).

Bylo zjištěno, že v přímém okolí DSB (1 - 2 kb) je poměrně malý výskyt γ H2AX, což kontrastuje s hojným nálezem MRE11 a dalších opravných proteinů. Hladina MRE11 a NBS1 klesá se zvyšující se vzdáleností od DSB, což ukazuje na nepřímou úměru ve vztahu γ H2AX a MRN (Shroff et al. 2004; Berkovich et al. 2007).

ATR je další PIKK, která je aktivována poškozením DNA. Za pomoci svého regulátoru ATRIP (ATR-interacting protein) rozpoznává ssDNA, která jsou tvořena během zpracování DSB nebo je přítomna u zastavené replikační vidličky. ATR je rekrutován na místo poškození replikačním proteinem A (replication protein A, RPA), který se váže k ssDNA (Zou and Elledge 2003). ATRIP mimo jiné usnadňuje rekrutaci proteinu TopBP1 (DNA topoisomerase-2-binding protein 1), který je právě přímým aktivátorem komplexu ATR-ATRIP (Choi et al. 2010).

Mezi substráty, které ATR fosforyluje patří p53, BRCA1, Chk1 (Checkpoint kinase 1) a Rad17 (Cell cycle checkpoint protein RAD17). Tato fosforylace nakonec inhibuje replikaci a mitózu a umožní opravu DNA, rekombinaci nebo apoptózu. ATR je na rozdíl od příbuzného ATM aktivován poškozením UV zářením, a zatímco ATM reaguje hlavně na detekci DSB, ATR je aktivována v případech zablokování postupu replikační vidlice (Cimprich and Cortez 2008).

2.2 Oprava dvouřetězcových zlomů

DSB mohou být opraveny několika reparačními mechanismy, mezi které patří nehomologní spojování volných konců (non-homologous end joining, NHEJ) a homologní rekombinace (homologous recombination, HR).

2.2.1 Nehomologní spojování volných konců – NHEJ

NHEJ je hlavní reparační dráhou DSB v savčích buňkách. Jedná se o rychlé opětovné spojení volných konců DNA v místě zlomu. Není zde vyžadována sesterská chromatida, která by sloužila jako templát pro dosyntetizování poškozené DNA, proto je NHEJ využívána především v G1 a brzké S fázi buněčného cyklu. Během opravy pomocí NHEJ dochází však k úpravě poškozených konců DNA potřebné pro jejich správnou ligaci, což ale velmi často vede ke ztrátě či zisku části sekvence. Proto se oproti jiným reparačním drahám, jako je HR, vyznačuje vysokou chybovostí (Chapman et al. 2012).

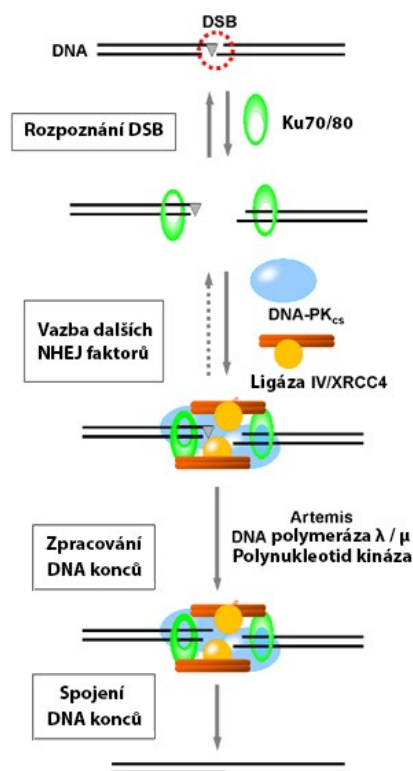
Jak bylo zmíněno výše, v prvním kroku NHEJ dochází k rozpoznání DSB a vazbě heterodimeru Ku70/80 na volné konce DNA. Za vazbu na DNA je zodpovědná C-terminální doména proteinu Ku70 (Zhang et al. 2001). C-terminální oblast podjednotky Ku80 rekrutuje a aktivuje katalytickou podjednotku DNA-dependentní proteinkinázy (DNA-dependent protein kinase, catalyticsubunit, DNA-PKcs) (Singleton et al. 1999). Po vazbě DNA-PKcs na Ku70/80 spolu dvě molekuly DNA-PKcs interagují za vzniku homodimeru a dochází k přemostění (end-bridging) konců DNA, což je nezbytné pro intramolekulární ligaci v místech zlomu, tedy pro spojení v rámci jedné molekuly DNA (DeFazio et al. 2002).

DNA-PKcs patří do rodiny PIKK, C-terminální oblast obsahuje katalytickou fosfoinositol-3 kinázovou doménu (PI3 kinase domain). Je to DNA-dependentní serin/threoninová proteinkináza, která následně fosforyluje a tím aktivuje další proteiny účastnící se opravy (Davis et al. 2014).

V dalším kroku procesu NHEJ dochází k úpravě volných DNA konců, aby mohlo dojít k jejich správnému spojení. Tento krok ovšem není vždy vyžadován, například pokud při zlomu vzniknou dva tupé konce, mohou se bez úprav znovu propojit. Působením ionizačního záření nebo reaktivních kyslíkových radikálů však často vznikají konce nevhodné pro okamžitou ligaci, většinou s 3' nebo 5' jednořetězcovým přesahem. Na komplex proteinů Ku70/80 a DNA-PKcs se poté váží enzymy mající na starost úpravu těchto konců. Úprava spočívá v přímém odstranění přesahů či v dosyntetizování komplementárního vlákna, přičemž nukleotidová sekvence přesahu je využita jako templát (Davis et al. 2014). Tento krok velmi přispívá k chybovosti mechanismu NHEJ, často totiž dochází k odstranění nebo vložení několika nukleotidů.

Pokud se na konci vlákna DNA vyskytuje skupina blokující ligaci, tedy fosfátová skupina na 3' konci nebo hydroxylová skupina na 5' konci vlákna, enzym polynukleotid kináza (polynukleotide kinase, PNK) vytvoří na základě své 5'-kinázové/3'-fosfatázové aktivity na 5' konci fosfátovou a na 3' konci hydroxylovou skupinu, které jsou důležité pro efektivní ligaci konců DNA (Bernstein et al. 2005). V posledním kroku dochází k vazbě DNA ligázy IV (DNA ligase IV, Lig IV), která opět spojí volné konce DNA. Její aktivita je stimulována proteinem XRCC4 (X-ray repair cross-complementing protein 4), se kterým tvoří v buňce komplex (Grawunder et al. 1997). XRCC4-Lig IV má nízkou DNA vazebnou aktivitu, a proto je pro rekrutování ligázy IV k DNA koncům potřeba vazby na heterodimer Ku70/80. Přítomnost DNA-PKcs pro zajištění vazby není vyžadována, ovšem lze očekávat její stabilizační efekt na tento komplex. Pro vznik stabilního komplexu NHEJ reparační dráhy není tedy nutné fixní pořadí vazby jednotlivých faktorů (Calsou et al. 2003; Mari et al. 2006).

XRCC4 se kromě ligace účastní také úpravy konců DNA před samotnou ligací, případně interaguje s enzymy za úpravu zodpovědnými (Koch et al. 2004). Intramolekulární ligace je rychlá a efektivní i v malých koncentracích enzymu a substrátu a vysokému podílu nepoškozené DNA (McElhinny et al. 2000).



Obr. 2. Nehomologní spojování konců. DSB jsou rozeznávány proteinovým komplexem Ku70/80. Poté dochází k vazbě DNA-PKcs, komplexu XRCC4/Lig IV a proteinů, které se účastní úpravy konců. Následně dochází ke spojení obou volných DNA konců. Převzato z van Gent and van der Burg 2007.

2.2.2 Homologní rekombinace - HR

Další pro buňky esenciální opravný mechanismus je HR. Oproti NHEJ se vyznačuje vysokou přesností. Je zde totiž využita nepoškozená sesterská chromatida, která slouží jako templát pro syntézu chybějící části sekvence a nedochází tak ke ztrátě genetické informace. HR se uplatňuje během S a G2 fáze, tedy ve fázích, kdy je sesterská chromatida k dispozici (Chapman et al. 2012).

Zatímco fosforylace histonu H2AX a vazba MDC1 probíhá velmi brzy po indukci DSB, další proteiny účastníci se HR, jako BRCA1, se objevují v reparačním komplexu mnohem později, je tedy zřejmé, že reparace pomocí HR je vysoce organizovaný a regulovaný proces (Bekker-Jensen et al. 2006). Pro jejich rekrutování je důležitá akumulace MDC1 a jako další faktory hrající roli v tomto procesu se objevují proteiny RNF8 (Ring finger protein 8), RAP80 (receptor-associated protein 80) a kaskády posttranslačních modifikací - fosforylace a ubikvitinace (Yan and Jetten 2008).

RNF8 je E3 ubikvitin ligáza vázající se do reparačního komplexu na základě vazby vlastní FHA domény (Forkhead-associated domain) s fosforylovaným MDC1. Je schopna vázat ubikvitin konjugační enzymy, konkrétně ubikvitinační komplex UBC13, prostřednictvím její RING domény (Ito et al. 2001), a poté ubikvitinovat histon γ H2AX na Lys63 (K63) (Mailand et al. 2007; Plans et al. 2006).

Na takto polyubikvitinovaný histon γ H2AX se následně váže protein RAP80, který ve své N-terminální doméně obsahuje dva ubikvitin-interagující motivy (ubiquitin-interacting motif domains, UIMs). Na jeho aktivaci se podílí fosforylace ATM kinázou (Yan et al. 2007).

Aktivovaný RAP80 přivádí do komplexu protein BRCA1, s nímž interaguje pomocí BRCT domény na C-konci. Na N-konci má pak RING doménu rozpoznávanou RING motivem proteinu BARD1 (BRCA1 associated RING domain 1). Tvoří spolu heterodimer BRCA1-BARD1 fungující jako ubikvitin ligáza a interagující s dalšími proteiny, se kterými tvoří rozsáhlé komplexy (Yan et al. 2007). Především s CtIP (CtBP-interacting protein), který zároveň interaguje s MRN komplexem lokalizovaným na volných DNA koncích (Chen et al. 2008; Greenberg 2006).

Bylo dokázáno, že komplex BRCA1/CtIP/MRN se podílí na regulaci buněčného cyklu a je konkrétně podstatný pro G2/M kontrolní bod. Ukázalo se, že fosforylace CtIP probíhá právě pouze v G2 fázi. Navíc je tento komplex zodpovědný za aktivaci Chk1 a tedy následné zastavení buněčného cyklu (Yu and Chen 2004).

BRCA1/CtIP/MRN komplex je také vyžadován pro následnou resekci DNA konců, čímž vznikají jednořetězcové úseky DNA potřebné pro opravu pomocí HR (Chen et al. 2008). V první fázi dochází k částečné resekcí, jež je regulována ATM a přímo se na ní podílí podjednotka MRN komplexu MRE11 mající endonukleázovou aktivitu (You and Bailis 2010). Další fází je za pomoci helikáz rozsáhlá resekce prostřednictvím exonukleázy 1 (EXO1), která generuje 3'

ssDNA. Na těchto místech dochází k akumulaci RPA, což vede ke stabilizaci vzniklých jednořetězcových úseků a nedochází tak k jejich degradaci nebo nežádoucímu vzniku sekundárních struktur (Bolderson et al. 2010).

Za následnou invazi řetězců do homologní části sesterské chromatidy, kde dochází k homolognímu párování a vzniku DNA heteroduplexu, je zodpovědná rekombináza RAD51 vytvářející na ssDNA nukleoproteinová filamenta. Lokalizace RAD51 je zprostředkována proteinem BRCA2 (Breast cancer 2) (Yuan et al. 1999). Invazí volných konců do homologního chromozomu vzniká v další fázi HR D-smyčka. Vlákna jsou v tuto chvíli kovalentně propojená a udržují se tak u sebe. DNA polymeráza prodlužuje 3' přesahující řetězec syntézou nové DNA po vzoru vlákna na sesterské chromatidě. Za pomoci ligázy dochází v molekule DNA k propojení nově nasyntetizovaných a původních vláken a vzniká tak křížová struktura nazývaná Hollidayův spoj (Holliday junction). Na jejím rozvolnění se podílí komplex s nukleázovou aktivitou resolváza. Dojde tak k rozštěpení vláken, rozvolnění struktury a opětovné ligaci (Ip et al. 2008). Výsledkem jsou dvě intaktní molekuly DNA a znovu obnovená nukleotidová sekvence na vláknech, která byla poškozená.

2.2.3 Výběr reparačního mechanismu DSB

To, jak si buňka vybírá, kterou z opravných cest poškození DNA použije, není dodnes zcela objasněné. Předpokládá se, že mezi sebou jednotlivé cesty soutěží. Je dokázáno, že tuto soutěživost mezi sebou vykazují minimálně NHEJ a HR a že mohou za určitých podmínek opravovat stejné druhy poškození (Takata et al. 1998; Kim et al. 2005). Bylo také zjištěno, že v buňkách je zvýšené množství proteinů HR v případě, kdy je z nějakého důvodu NHEJ nefunkční. Může tak dojít k částečné záchraně u vážných fenotypů spojených s deficitem XRCC4 nebo Lig IV rozrušením komplexu DNA-PK. V takovém případě, kdy je DNA-PK deletována, jsou DSB snáze přístupny pro HR a vyruší se tak tento vážný fenotyp (Adachi et al. 2001).

Výběr cesty opravy DSB je regulován několika faktory. Jde hlavně o typ poškození a fázi buněčného cyklu. Naprogramované DSB jsou směřovány do předem určených cest opravy. DSB generované V(D)J rekombinací RAG proteiny jsou opravovány NHEJ a zlomy generované při rekombinaci během meiózy proteiny Spo11 jsou opraveny HR (Dudley et al. 2005; Cole et al. 2010). U oprav programovaných DSB může posílit výběr cesty několik faktorů. Např. u výše zmíněného Spo11 dochází k jeho kovalentní vazbě na DNA a je odštěpována komplexem MRX/Sae2 (Neale et al. 2005).

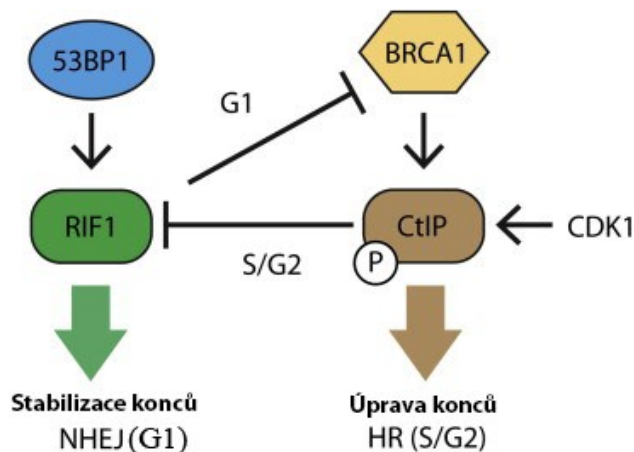
Rovnováha mezi NHEJ a HR se posouvá během buněčného cyklu. Dostupnost templátů pro opravu ovlivňuje účinnost HR, která je upregulována během S a G2 fáze. Tedy v momentě, kdy jsou dostupné sesterské chromatidy (Kadyk and Hartwell 1992). NHEJ ale zůstává aktivní i

během těchto fází buněčného cyklu a tedy soutěží s HR i ve chvíli, kdy jsou dostupné homologní templáty (Takata et al. 1998). NHEJ je naopak aktivní nejvíce v buňkách během G1 fáze.

Tato závislost opravy DSB na buněčném cyklu je zapříčiněna fosforylacemi reparačních proteinů cyklin dependentními kinázami. Hladina proteinu CtIP je nízká během G1 fáze, ale je upregulována při postupu skrze S/G2 kontrolní bod. CDK2-dependentní fosforylace CtIP na Ser-327 podporuje formování komplexu mezi CtIP, MRN a BRCA1 v S/G2 (Buis et al. 2012; Chen et al. 2008). Fosforylace pomocí CDK může hrát také negativní roli. Fosforylací Ser-3291 je zablokována C-koncová interakce mezi BRCA2 a Rad51 a tím je HR inhibována (Esashi et al. 2005).

Důležitost DNA-PK hraje také svou roli. Ve většině případů je prvním reparačním faktorem, který se naváže na DSB. Expresе všech komponent DNA-PK není redukována během S fáze, kdy je aktivnější HR (Lee et al. 1997). Je tedy možné, že v soutěžení mezi HR a NHEJ by vždy vyhrálo NHEJ a skutečně se ukázalo, že u vyšších eukaryot NHEJ převládá u většiny oprav DSB (75 % oprav zajišťuje NHEJ, 25 % HR) (Mao et al. 2008).

Volba cesty opravy DSB může být řízena protichůdnými aktivitami proteinů 53BP1 a BRCA1. 53BP1 stimuluje NHEJ, zatímco BRCA1 směřuje proces k úpravě konců a HR. Efektorem je právě 53BP1, který je fosforylován pomocí ATM. To probíhá převážně během G1 fáze buněčného cyklu. Během G2/S fáze dochází k produkci CDK1, která aktivuje komplex BRCA1-CtIP. Ten vypudí RIF1 z místa DSB a je zahájena HR. Během G1 je RIF1 blíže neznámým mechanismem schopen inhibovat interakci BRCA1 s DSB a dochází k NHEJ (Escribano-Díaz et al. 2013).



Obr.3. Výběr reparační dráhy prostřednictvím kompetice mezi 53BP1-RIF1 a BRCA1-CtIP komplexem v závislosti na buněčném cyklu. Převzato z Escribano-Díaz et al. 2013.

2.2.4 Role p53 v odpovědi na poškození DNA

p53 je tumor supresorovým proteinem, který hraje významnou roli v buněčné odpovědi na stres, poškození, v regulaci buněčného cyklu a apoptóze. Tyto funkce jsou důležité pro udržení genetické integrity a brání vzniku nádorových buněk.

Za nestresových podmínek je v buňce množství p53 nízké a vzrůstá až při vzniku DNA poškození. Jeho hladinu má pod kontrolou antagonistický protein MDM2 (murine double minute 2), který se na něj váže a udržuje ho v cytoplazmě v inaktivním stavu. MDM2 funguje jako ubiquitin-ligáza, která molekulu p53 označí ubiquitinem, čímž dochází ke směřování do proteazomu a degradaci (Haupt et al. 1997; Kubbutat et al. 1997).

Aktivuje se fosforylací a dalšími posttranslačními modifikacemi, translokuje se do jádra a reguluje transkripci širokého spektra genů uplatňujících se při opravě. Iniciuje transkripci proteinu p21, který následně inhibuje komplex cyklin-CDK (cyclin dependent kinase) zajišťující přechod mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu. V tu chvíli je zastavena buněčná proliferace a teprve po opravě DNA buňka dokončí svůj buněčný cyklus (Kuerbitz et al. 1992).

Vedle spouštění opravných a protektivních mechanismů je p53 schopen v buňce indukovat apoptózu aktivací syntézy proapoptotických genů. Děje se tak např. při osmotickém šoku, nebo když je DNA poškození tak závažné a rozsáhlé, že dojde k selhání opravy (Haupt et al. 2003).

3 HUNTINGTONOVA CHOROBA

Huntingtonova choroba (Huntington disease, HD) je autozomálně dominantně dědičné neurodegenerativní onemocnění způsobené expanzí CAG repeticí části genu kódujícího polyglutamin v proteinu huntingtin (HTT). Mutace tohoto proteinu vede k prodloužení úseku glutaminu poblíž jeho N-konce, což nakonec ústí ve špatné složení proteinu a tvorbě agregátů (Macdonald et al. 1993). V nemutovaném genu proteinu se nachází normálně 9 - 35 CAG repetice, pokud je jich 40 a více, propuká onemocnění. Čím větší počet repetice, tím je nástup HD časnější (Snell et al. 1993). Výskyt v západní Evropě se udává ve 4 - 10 případech ze 100 000 (Al-Jader et al. 2001).

Po čase dochází k neurodegeneraci mozku, a to převážně ke ztrátě eferentních středních trnitých neuronů ve striatu (corpus striatum, žíhané jádro) bazálních ganglií. Tyto neurony produkují kyselinu gama amino-máselnou a jsou tedy inhibiční. Hrají roli v zahájení a kontrole pohybů těla, končetin a očí (Vonsattel et al. 1985). HD se většinou projevuje triádou symptomů zahrnující pohyb, vnímání a změnu chování. Nynější kritéria považují za nástup onemocnění, jakmile u pacienta, který má expandovanou CAG repetici, propukne jednoznačná přítomnost jinak nevysvětlitelných extrapyramidálních poruch pohybu (chorea, dystonie, bradykinesie, rigidita) (Siesling et al. 1998).

Symptomy spojené s pohybem zahrnují především zrychlené neúmyslné pohyby (tzv. chorea). Vnímání může být změněno již 15 let před propuknutím samotné nemoci. U pacienta se projevuje snížená pozornost, malá duševní přizpůsobivost, menší schopnost plánování, zvýšená zmatenost a emocionální nestálost. Zmíněné symptomy se mohou podobat např. Alzheimerově chorobě, ale i když je schopnost učení a vstřebávání informací snižena, typické rychlé zapomínání se u HD nevyskytuje (Solomon et al. 2007). V emocionální rovině se vyskytují deprese a podrážděnost, které jsou brzkými symptomy. V pozdějším stádiu dochází k apatii, která se postupem času zhoršuje (Thompson et al. 2012).

Na rozdíl od ostatních neurodegenerativních onemocnění není nefunkčnost DDR geneticky determinovaná, ale je způsobena nepřímo nebo sekundárně získaná akumulací mHTT a jeho toxicitou.

3.1 CAG expanze

Na expanzi polyQ řetězce se podílí větší množství faktorů, které nejsou dodnes zcela známy. Patří mezi ně jak mechanismy replikace během meiózy, tak procesy během opravy DNA.

Předmětem výzkumu tohoto jevu jsou zárodečné buňky modelových organismů. Bylo zjištěno, že důležitou roli hraje replikace během meiózy. U myšího modelu R6/1 se CAG expanze objevuje pouze u haploidních spermatid, tedy po proběhlé meióze (Kovtun and McMurray 2001). U pacientů s HD je však expanze přítomna již u buněk, které meiózu ještě nepodstoupily, a u spermatid je stále přítomna. To může být způsobeno tím, že počet dělení zárodečných buněk během života člověka je o řád vyšší než u myši, u které není dostatek času k akumulaci mutací před samotnou meiózou (Yoon et al. 2003). Mechanismem tvorby expanze CAG repetice může být sklouznutí DNA polymerázy, zastavení replikace a její následný restart.

Trinukleotidové repetice (TNR) mohou mít za následek chybné párování řetězců během replikace nebo oprav, což má za následek tvorbu smyček a vlásenek, ve kterých jsou repetice stabilizovány a může tak dojít k jejich dalšímu prodloužení. V myším modelu HD bylo již dříve předvedeno, že po deleci genů pro opravné proteiny chybného párování Msh2 a Msh3 byla na věku závislá tvorba expanzí CAG zastavena (Wheeler et al. 2003). Je tedy zjevné, že oprava chybného párování hraje roli v expanzi polyQ řetězce a Msh2 nebo Msh3 by mohly do budoucna představovat cíl pro zpomalení patogeneze HD u člověka. Mimo jiné např. funkce endonukleázy odštěpující 5' přesah (FEN1) je inhibována sekundárními strukturami tvořenými TNR (Spiro et al. 1999). Tato endonukleáza se účastní při opravě dlouhých úseků DNA během BER (base excision repair, excizní reparace báží).

3.2 Dědičnost HD

Jak bylo zmíněno, HD je autozomálně dominantní choroba a u potomka postiženého rodiče je 50% riziko, že onemocní také. Jakmile ani jeden z rodičů nemá více jak 36 repeticí, je riziko vzniku onemocnění mutací velmi vzácné. V případě rodičů, kdy každý vlastní jeden expandovaný gen HD riziko narůstá na 75 %, pokud oba rodiče mají obě kopie genu expandované, je riziko 100%. Nutno poznamenat, že se jedná o velmi vzácné případy. Homozygotní expanze se projevuje vážnějšími projevy onemocnění (Squitieri et al. 2003).

3.3 Funkce huntingtinu

Funkce huntingtinu v buňce není stále plně definovaná. Ukázalo se, že v neuronech se huntingtin váže na β podjednotku tubulinu, a proto zde může být jeho role spojena s vesikulárním a axonálním transportem (Hoffner et al. 2002). To podporují poznatky, že během exprese mHTT se transport v neuronu narušuje, a to zejména transport spojený s mitochondriemi (Trushina et al. 2004). Během mitózy je prokázána jeho lokalizace na pólech dělicího vřetenka a je zde esenciální pro jeho orientaci (Godin et al. 2010). Další funkce mohou být spojeny například s vazbou některých transkripčních faktorů (Dunah et al. 2002).

3.4 Projevy HD

Jedním z prvních znaků počínající HD je špatné složení huntingtinu do β -skládaného listu a další posttranslační modifikace, jako je štěpení nebo alternativní fosforylace (Kim 2013). mHTT může vstoupit do buněčného jádra a změnit genovou transkripci, stejně jako ovlivňuje funkci mitochondrií, což má za následek produkci abnormálních metabolitů, či oxidativní stres (Ayala-Peña 2013).

Hladina mHTT roste během progresu onemocnění, a to hlavně z důvodu akumulace fragmentů N-konců (Weiss et al. 2009).

Hlavním znakem HD je smrt neuronů, která je nejspíše důsledkem funkční poruchy těchto buněk. Za následek této poruchy je považována právě chorea, zatímco pohybové postižení jako bradykinie a porucha jemné motoriky jsou přisuzovány vlastní smrti neuronů. Tento poznatek vychází z pozorování brzkého nástupu chorey a pozdního postižení motoriky. Neuronální dysfunkce je hojně pozorována ve zvířecích modelech HD (Yamamoto et al. 2000).

Dalším důležitým znakem pro HD je i mezibuněčná komunikace. mHTT má velmi pravděpodobně excitotoxické účinky a je schopen se šířit mezi buňkami podobně jako priony (Ren et al. 2009). Huntingtin je v cytoplazmě pozorován ve formě agregátů. Jako takový je přístupný k navázání uměle přidaného jaderného lokalizačního signálu, a tak může vstoupit do jádra, kde se projeví jeho cytotoxicita (Yang et al. 2002). Bylo zjištěno, že huntingtin ve formě

juxt nukleárních inkluzních tělísek je schopen se účastnit i mezibuněčné komunikace (Brundin et al. 2010).

3.5 Léčba HD

Vyléčení HD není dnes možné, ale dostupné léčebné procesy mohou nástup tohoto onemocnění zpomalit či zmírnit pohybové (pomocí neuroleptik) a psychické poruchy (anxiolytika, antidepresiva), jedná se pouze o léčbu symptomatickou.

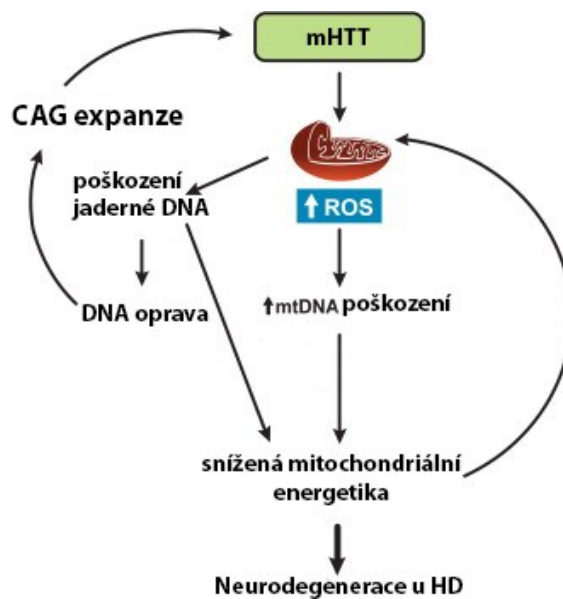
Výzkum ohledně léčby HD se zaměřuje především na zlepšení přežití buněk v přítomnosti mHTT, což zahrnuje nápravu regulace transkripce, zlepšení mitochondriálního metabolismu nebo úpravu agregace huntingtinu. Další výzkumy se zaměřují na umlčování genů (gene silencing) pomocí RNAi, který tlumí produkci mHTT v mozku primátů (McBride et al. 2011).

3.6. Oxidativní poškození u HD

Oxidativní poškození DNA je spojováno se stárnutím organismu a je jedním z průvodních jevů HD. Na myším modelu bylo experimentálně ukázáno, že expanze CAG spojená s věkem v somatických buňkách je závislá na opravném enzymu 7,8 – dihydro – 8 – oxoguanin DNA glykosyláza (OGG1), který řídí opravu běžných modifikací DNA (např. právě 7,8 – dihydro – 8 – oxoguanin) způsobených oxidativním stresem. Hromadění této modifikace může být způsobeno buď přímou oxidací DNA řetězce nebo inkorporací 8-oxoG během replikace a má za následek trasverzi GC na AT (Kovtun et al. 2007). Enzym hMTH1 je hlavní lidskou hydrolázou, která štěpí jak 8-oxodGTP, tak 8-oxo dGDP na monofosfáty a brání tak jejich inkorporaci do DNA řetězce. V myším modelu byly chemicky indukovány symptomy HD. U těchto myši byla zároveň exprimována lidská hMTH1 hydroláza, která účinně chránila buňky před toxickými účinky spojenými s HD. hMTH1 zároveň ochránila progenitorové striatální buňky, které vykazovaly expandované CAG repetice před toxickými účinky HTT (De Luca et al. 2008). Tyto výzkumy ukazují na důležitou funkci oxidativního poškození během progresu onemocnění HD a mohou určit směr v dalším výzkumu.

Mitochondrie je dalším místem, kde se projevuje poškození DNA pomocí oxidativního stresu. Imortalizované myši neurony striata se 111 CAG repeticemi vykazují výrazně zvýšenou hladinu superoxidu produkovaného mitochondriemi v porovnání se zdravými buňkami (Siddiqui et al. 2012). Takové poškození mtDNA může ovlivnit transport elektronů během oxidativní fosforylace, což zmenší membránový potenciál mitochondrie, negativně ovlivní ATP syntézu a zvýší produkci ROS. To vede k dalšímu poškození mitochondriální i jaderné DNA.

mHTT je schopen u experimentálních modelů interakce s vnější mitochondriální membránou, kde indukuje otevírání mitochondriální permeabilních tranzitních pórů, což vede k uvolnění cytochromu c a ke spuštění apoptózy (Choo et al. 2004).



Obr. 4. Oxidativní poškození během exprese mHTT. Převzato z Ayala-Peña 2013.

3.7 Formování inkluzních tělísek

mHTT se v buňce vyskytuje ve dvou stavech. V rozpustné formě, anebo agreguje a vytváří tak inkluzní tělíčka (inclusion bodies, IB). Bylo zjištěno, že smrt neuronů exprimujících mHTT se dá předpovědět na základě množství difuzní formy v buňce a míře jejich polyQ snižováním hladiny toxického difuzního mHTT (Arrasate et al. 2004). To bylo podpořeno myším modelem s HD, který exprimuje N-terminální fragmenty obsahující 120 CAG repetiči a tvoří rozsáhlá IB, přesto nevykazuje žádné známky neuronální dysfunkce a degenerace (Slow et al. 2005). PolyQ expanze zvyšuje riziko smrti buněk nezávisle na jeho působení na intracelulární hladinu difuzního mHTT. Avšak tvorba IB tuto hladinu rozpustného mHTT snižuje a prodlužuje přežívání neuronu. Z toho můžeme usoudit, že formování IB chrání neurony.

3.8 Myší modely HD

Transgenní myš R6/2 je rozsáhle charakterizovaný model pro studium HD. Využívá se pro výzkum neurologických fenotypů a molekulárních drah pro identifikování cílů pro terapeutické účely. Obsahuje 1 kb 5' konce lidského genu pro mHTT, včetně promotoru a exonu 1 s přibližně 150 CAG repetičemi. Dochází u něj k expresi mHTT a produkci mHTT agregátů v mnoha oblastech mozku, jako je striatum, mozeček, hipokampus nebo mozková kůra (Davies et al. 1997). Progrese onemocnění u této myši napodobuje rysy HD v lidských pacientech. Vyznačuje se fenotypem podobným choree, samovolnými pohyby a třesem. Počátek onemocnění je pozorován mezi 10. a 13. týdnem života (Mangiarini et al. 1996; Carter et al. 1999).

Dalším vhodným modelem pro preklinické studie je myší kmen BACHD. Probíhá u něj exprese lidského mHTT v plné délce zprostředkovaná bakteriálním artificiálním chromozomem (BAC - bacterial artificial chromosome). Obsahuje 97 glutaminových repetic, které jsou kódovány střídavými CAA-CAG repeticemi. Myš BACHD vykazuje fenotyp srovnatelný s myším kmenem R6/2, nástup onemocnění je však u této myši pozorován později (Gray et al. 2008).

4 ODPOVĚĎ NA POŠKOZENÍ DNA U HD

Expres mHTT v buňce má pleiotrofní efekt na metabolismus buňky včetně vzniku DNA poškození a jeho opravy. Výsledky potvrdily, že mHTT zrychluje hromadění DSB a způsobuje dysfunkci buněk již od brzkého stádia onemocnění a významně tak přispívá k patogenezi HD (Ryan et al. 2006).

Akumulace proteinu s polyQ řetězcem podněcuje v buňce stres, s čímž souvisí výskyt reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS). Tento oxidativní stres způsobuje v buňkách poškození DNA, což bylo podpořeno nálezem vysoké hladiny 8-hydroxy-2-deoxyguanosinu v mtDNA u pacientů s HD (Polidori et al. 1999). V jádře takto vznikají SSB, které mohou být rozšířeny na DSB, např. pokud se akumulují na replikační vidličce. Expres mHTT iniciuje vznik DSB v jádře. Neznamena to však, že by se choval jako nukleáza, spíše funguje jako iniciátor vzniku poškození. Má vliv na uvolňování již zmíněných volných kyslíkových radikálů, které přímo působí na DNA. K akumulaci DSB přispívá snížená schopnost tyto zlomy opravit (Illuzzi et al. 2009).

Existuje několik prací s různými pohledy na danou problematiku. Některé tvrdí, že exprese mHTT v buňce podněcuje neadekvátní odpověď na DSB a vzniklé stresové signály, ve které je nadměrně zvýšená aktivace DDR, včetně p53 signální dráhy. Taková odpověď vede k apoptóze. Podle některých výzkumů dochází v mutované buňce k rozpoznání DSB proteiny, jako jsou γ H2AX, ATM nebo Ku70, ale v pozdějších fázích DDR dochází k narušení NHEJ a hromadění neopravených DSB. Ukázalo se také, že by problémem mohla být neschopnost buňky DSB rozeznat. V buňkách může být přítomno pouze určité množství DNA poškození, jakmile dosáhne prahové hodnoty, dochází k eliminaci takových buněk. Oba pohledy by vysvětlovaly odumírání nervových buněk během HD.

V následujících kapitolách se zaměřuji na dosud proběhlé výzkumy spojené s touto problematikou.

4.1 Akumulace DSB v buňkách s mHTT

Pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE) byla měřena genomická integrita DNA v buňkách feochromocytomu označovaných jako PC12 buněčná linie. Do nich byl integrován zkrácený gen pro huntingtin s expandovanou CAG repeticí o počtu 103 (Q103). Tyto buňky se označují jako Htt14A2.6. Buňky Htt17A.2 mají také integrovaný HTT, ale s menší oblastí kódující polyQ řetězec (Q25) a exprimují tak wt-HTT. Jako pozitivní aktivátor vzniku DSB bylo použito DNA poškozující činidlo kamptotecin (CPT), který fuguje jako inhibitor topoizomeráz. V naivních PC12 a Htt17A2 buňkách byla zřetelná bazální hladina DSB, která byla ale značně zvýšena po inkubaci s CPT. U Htt14A2.6 buněk bylo od začátku pozorováno mnohem větší množství DSB. V čase se však množství DSB u buněk s wt-HTT snižovalo, zatímco u buněk s mHTT rostlo. Snížení množství DSB je pravděpodobně způsobené efektivním opravným mechanismem, který při expresi mHTT selhává (Illuzzi et al. 2009).

4.2 Zvýšená apoptóza u buněk s mHTT

Dalším cílem bylo zjištění, jak je indukované DNA poškození spojeno s buněčnou smrtí. Striatální buněčné linie s expresí HTT (Q7) nebo mHTT (Q111) byly po vystavení CPT analyzovány průtokovou cytometrií. CPT způsoboval apoptózu v obou typech buněk, u Q111 byl ale nárůst větší a navíc se u tohoto typu buněk vyskytovalo více indukovaných DSB. Q111 buňky jsou tedy mnohem citlivější na DSB způsobené CPT (Jeon et al. 2012).

4.3 Zvýšená aktivace H2AX a ATM během exprese mHTT

Při výskytu DSB je předvídatelnou buněčnou reakcí spuštění DDR a tedy aktivace H2AX a ATM. Ke zjištění přítomnosti γ H2AX během exprese mHTT byly opět použity buňky feochromocytomu a bylo zkoumáno, zda v nich dochází k aktivaci H2AX. V Htt14A2.6 buňkách bylo detekováno zvýšené množství γ H2AX. Při kontrole naivních PC12 a Htt17A.2 buněk nebylo γ H2AX pozorováno. Vzhledem k tomu, že H2AX aktivuje ATM kináza, proběhly experimenty, zda je v těchto buněčných liniích přítomno aktivované ATM (pATM). Použitím protilátek anti-pATM byl potvrzen výskyt pATM shodný s výskytem γ H2AX (Illuzzi et al. 2009)

Pro kontrolu *in vivo* byly použity R6/2 transgenní myši a byly pozorovány stejné výsledky jako v předchozích pokusech *in vitro*. Potvrdily se zvýšené signály γ H2AX v jádře. Na DSB byl také ve vysokém množství lokalizován 53BP1. Nebyla zde pozorována přítomnost RAD51 (Illuzzi et al. 2009; Enokido et al. 2010). To souhlasí se zjištěním, že HR je využívána pouze u dělicích se kmenových/progenitorových buněk, ale NHEJ je hlavním opravným mechanismem v postmitotických neuronech (Orr et al. 2006).

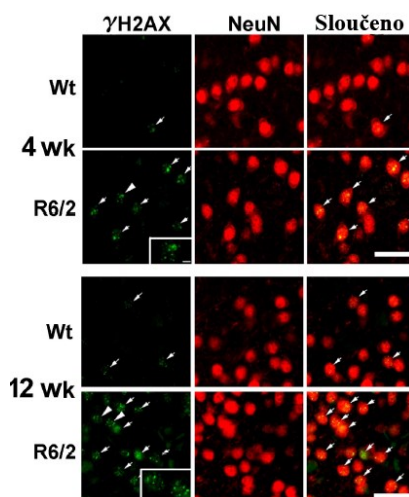
V R6/2 myších bylo množství γ H2AX zvýšeno už během 4. týdne života, což značí, že DSB se objevují v HD patogenezi velmi brzy. Hladina γ H2AX v kontrolní wild-type myši a R6/2

myši s věkem konstantně rostla, z čehož vyplývá, že tvorba DSB je běžný jev při stárnutí. U R6/2 myši byla však tato hladina stále značně vyšší (viz Obr.5.) (Enokido et al. 2010).

Zvýšené signály γ H2AX i přítomnost zvýšené ATM signalizace byla potvrzena i u striatálních neuronů z pacientů s HD oproti kontrolním pacientům, kteří HD netrpěli (Enokido et al. 2010; Lu et al. 2014).

K dalšímu hodnocení nepřiměřené ATM signální dráhy během HD byly použity embryonální fibroblasty (MEF) s expresí mHTT a délkou polyQ řetězce Q97 z myšího kmene BACHD. Byly vystaveny H_2O_2 , který způsobuje oxidativní stres. Bylo pozorováno značně zvýšené množství aktivovaného ATM oproti kontrolním MEF buňkám (Lu et al. 2014).

Jako další činidlo způsobující DSB byl použit etoposid, který inhibuje funkci topoizomeráz. Zde ale významné rozdíly v množství γ H2AX mezi BACHD a kontrolními MEF nebyly. Je proto navržena hypotéza, že buňky exprimující mHTT mají zvýšenou ATM signalizaci jako odpověď na oxidativní stres a není to přímá odpověď na přítomnost DSB (Lu et al. 2014).



Obr. 5. Imunohistochemická detekce γ H2AX (zeleně) a biomarkeru neuronů NeuN (červeně) ve striatu transgenní R6/2 myši a netransgenní (wt) myši během 4. a 12. týdne věku. Šipky označují aktivované γ H2AX. U R6/2 myši je oproti wt myši hladina γ H2AX výrazně vyšší. U obou myši se stárnutím hladina zvyšuje. Převzato z Enokido et al. 2010.

4.3.1 Cílení na ATM snižuje toxicitu mHTT

Zjištění nadměrné aktivace H2AX a ATM vedlo k návrhu, že by genetická redukce nebo farmakologická inhibice ATM mohla v buněčných a myších modelech snížit toxicitu mHTT.

4.3.1.1 Genetická redukce ATM

Byly identifikovány dvě krátké RNA vlásenky (shRNAs), jejichž výsledkem je knockdown ATM mRNA o více než 80 %. V buňkách neuroblastomu udělila značnou protekci proti buněčné smrti indukované expresí mHTT (Lu et al. 2014).

K posílení tohoto pozorování, zda redukce myšního ATM zlepšit patogenezu HD *in vivo*, byl použit myší model BACHD. V heterozygotní myši ATM^{+/-} je redukována ATM signalizace a je tak rezistentní vůči ATM indukované apoptóze. Dochází také ke snížení množství γ H2AX. Křížením BACHD myši s myši ATM^{+/-} vznikla dvojité transgenní myš BACHD/ATM^{+/-}. U ní byla výrazně zlepšena motorika, došlo ke snížení množství samovolných pohybů a dokonce se zlepšily psychiatrické problémy, které myši s mHTT vykazují (příznaky podobné depresím). V mozku u dvojité transgenní myši byla stejná exprese mHTT jako u BACHD, čili zlepšený fenotyp nemůže být přisuzován případným změnám exprese mHTT po křížení (Lu et al. 2014).

Tento výsledek byl podpořen pozorováním transgenní Drosophily exprimující lidský mHTT Q128. Křížením s heterozygotní Drosophilou ATM^{+/-} došlo i u tohoto modelu ke zlepšení motorických deficitů (Lu et al. 2014).

4.3.1.2 Farmakologická inhibice ATM

Výhodou je dostupnost silných a relativně specifických ATM inhibitorů, které by se mohly použít k farmakologické inhibici ATM. Pro experiment, zda budou účinné i v HD, byly použity myši kortikální a striatální buňky s expresí mHTT Q73. Protektivní účinky se však vyskytly pouze u striatálních buněk (Lu et al. 2014).

K testování, zda by mohly být ATM inhibitory účinné i u pacientů s HD, byly použity striatálně diferencované kultury iPSC (indukované pluripotentní kmenové buňky) se 180 a 109 CAG repeticemi. Kontrolní diferencované iPSC linie nevykazovaly žádný fenotyp spojený s mHTT. Bylo potvrzeno, že u diferencovaných buněk z HD pacientů vzrostla buněčná smrt oproti kontrolním buňkám. Přidání ATM inhibitoru mělo protektivní účinek a buněčná smrt se snížila (Lu et al. 2014).

Tyto výsledky podporují hypotézu, že genetická redukce nebo farmakologická inhibice ATM může mít protektivní účinky u všech použitých buněčných linií a modelových organismů. Je však potřeba dalších klinických výzkumů, zda jsou bezpečné pro pacienty a nemají vážné vedlejší efekty (Lu et al. 2014).

4.4 Snížená schopnost rozpoznávání DSB během exprese mHTT

4.4.1 Nižší detekce γ H2AX u buněk s mHTT po ozáření

Během pokusů s fibroblasty exprimujícími mHTT bylo zjištěno, že po poškození DNA pomocí γ -záření docházelo k výrazně menšímu rozpoznávání DSB během NHEJ. To se projevilo i sníženým ukládáním ložisek γ H2AX a 53BP1 proteinů (Ferlazzo et al. 2014).

Nebyly pozorovány výrazné stopy γ H2AX jak u kontrol, tak u HD buněk za normálních podmínek. Po ozáření byla hodnota γ H2AX (tedy rozpoznávaných DSB) vyšší u kontrol než u buněk postižených HD. Mutace HTT tedy nejspíše snižují schopnost buňky rozpoznat DSB pomocí NHEJ. Po 24 hodinách však množství γ H2AX v buňce je vyšší u HD fibroblastů než u kontrol, což ukazuje na sníženou schopnost opravy a přetrvávající výskyt DSB v těchto buňkách (Ferlazzo et al. 2014).

4.4.2 mHTT zadržuje pATM v cytoplazmě

Použitím protilátky anti-HTT bylo zjištěno, že se HTT spontánně vyskytuje v cytoplazmě jak u HD, tak u kontrolních zdravých fibroblastů. Po ozáření proběhla inkubace buněk po dobu až 24 hodin. HTT nadále zůstal přítomen hlavně v cytoplazmě ve všech testovaných buněčných liniích (Ferlazzo et al. 2014).

V neozářených kontrolách bylo pATM nalezeno v cytoplazmě. Po ozáření se formovala ložiska pATM v jádře. Po 24 hodinách od ozáření, v důsledku oprav poškození, počet detekovaných ložisek pATM klesá. V HD fibroblastech je počet ložisek 10 minut po ozáření značně nižší. Protože HTT zůstává i po ozáření v cytoplazmě, nelze tedy předpokládat jeho roli v aktivitě pATM v jádře. mHTT tedy nejspíše vede k zadržování pATM v cytoplazmě, zdržuje vstup pATM do jádra a zabraňuje rozpoznání a opravu DSB pomocí NHEJ (Ferlazzo et al. 2014).

Podle těchto výsledků je předpokládána interakce mHTT s pATM v cytoplazmě, což brání jeho aktivitě v jádře. Nedochozí tedy k dostatečné aktivaci H2AX a DSB nejsou efektivně rozpoznány.

4.5 Pozměněná hladina BRCA1 a dynamika γ H2AX v buňkách s mHTT

Jak bylo zmíněno výše, H2AX je v rámci několika málo minut po výskytu DNA poškození fosforylováno na γ H2AX a přemístěno na místa DSB. U BRCA1 také dochází po vzniku poškození k rychlé fosforylaci pomocí ATM a interakci s γ H2AX prostřednictvím vlastní BRCT domény, na místě poškození pak vznikají komplexy BRCA1- γ H2AX, které rekrutují další důležité reparační faktory. Protože je tato interakce nezbytná pro reparační proces, je předmětem výzkumu, jak BRCA1 a γ H2AX interagují a přispívají v DDR v buňkách s HD. Ukázalo se, že hladina fosforylovaného a nefosforylovaného ATM a BRCA1 je v buněčném a myším modelu s HD pozměněna a v důsledku toho je narušena časoprostorová dynamika γ H2AX (Jeon et al. 2012).

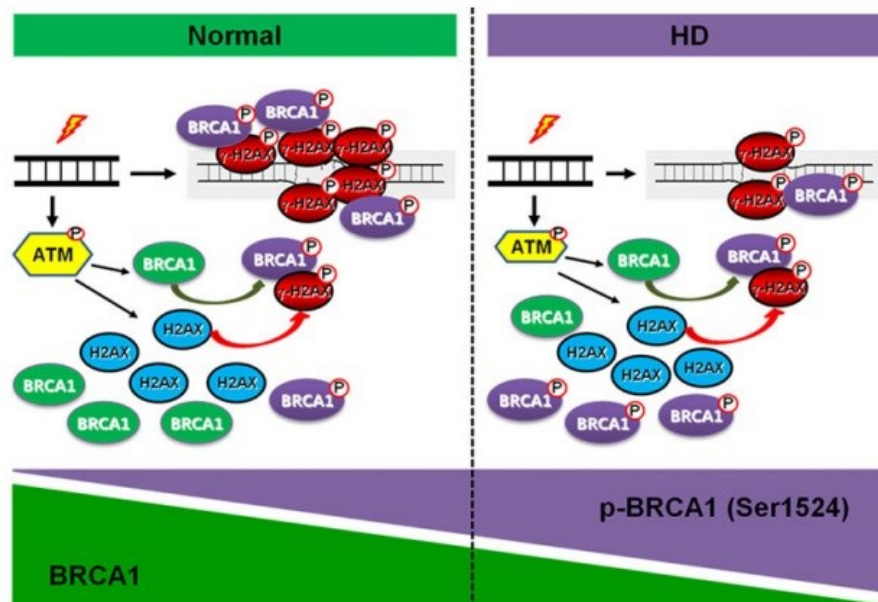
Byla použita striatální buněčná linie - kontrolní Q7 a mutantní Q111. V Q111 buňkách byla hladina ATM a pATM lehce zvýšená oproti Q7 buňkám. Množství nefosforylovaného BRCA1 bylo u Q111 buněk v porovnání s Q7 buňkami značně sníženo a zároveň p-BRCA1 značně

zvýšeno. Výzkum hladin obou proteinů byl proveden pomocí GFP exprese také *in vivo* na R6/2 myších. Hladiny byly stejné jako v předchozích pokusech (Jeon et al. 2012).

Buněčná linie byla vystavena CPT, aby mohlo být zjištěno, zda tato pozměněná hladina BRCA1 postihuje DDR. V Q7 buňkách byla po indukci aktivace ATM, fosforylace BRCA1 i H2AX zvýšená. U Q111 se prokázaly nižší aktivity (Jeon et al. 2012).

V buněčných modelech byla zkoumána distribuce ATM, BRCA1 i γ H2AX. Po vzniku DNA poškození došlo u všech buněk k redistribuci do jádra, u Q7 byl tento jev vyšší (Jeon et al. 2012).

Knockdown BRCA1 ve zdravých buňkách po přidání CPT inhiboval prostorovou distribuci γ H2AX, u Q111 byl tento efekt větší a došlo k tlumení γ H2AX signálu. Tyto zjištění silně podporují důležitost role BRCA1 v regulaci γ H2AX během DDR (Jeon et al. 2012).



Obr. 6. Hladina nefosforylovaného a fosforylovaného BRCA1 je v buňkách pozměněna. Oproti kontrolním nemutovaným buňkám je hladina BRCA1 snížena a hladina p-BRCA1 zvýšena. Časoprostorová dynamika γ H2AX je pak narušená. DNA oprava probíhající prostřednictvím BRCA1 a γ H2AX je v HD buňkách nefunkční a vede ke zhoršení DNA poškození. Převzato z Jeon et al. 2012.

Pro funkci proteinů je velmi důležitým faktorem jejich lokalizace. Ukázalo se, že p-BRCA1 a γ H2AX jsou rozdílně lokalizovány v Q7 a Q111. U Q7 se vyskytují BRCA1 a γ H2AX společně, u Q111 je jen část těchto proteinů lokalizována u sebe. Konstitutivní interakce byla pozorována u Q7, ale ne u Q111, kde se tato interakce projevila až po přidání CPT. Stále však síla této interakce nedosahovala hodnot u Q7 (Jeon et al. 2012).

U myšího modelu R6/2 byly výsledky stejné. Hladina p-BRCA1 *in vivo* byla oproti kontrolám zvýšená, zatímco hladina γ H2AX naopak snižena (Jeon et al. 2012).

4.6 Narušení NHEJ v důsledku vazby mHTT na Ku70

Výzkum ukázal, že dalším rozhodujícím faktorem v patologiích HD spojených s DNA poškozením je protein Ku70. Jak bylo popsáno výše, heterodimer Ku70/80 jako první detekuje DSBs a dochází k jeho vazbě na poškozenou DNA. Do tohoto místa přivádí DNA-PKcs a iniciuje tak opravu pomocí NHEJ prostřednictvím komplexu XRCC4-Lig IV. V NHEJ je Ku70 nenahraditelný pro tvorbu a funkci komplexu Ku70/80-DNA-PKcs.

Byla navržena hypotéza, že se mHTT váže na Ku70, a tím znemožňuje interakci s Ku80, tedy i vznik na DNA se vzájemného komplexu Ku70/80, čímž se inhibuje aktivita DNA-PK. To má za následek hromadění neopravených DSB (Enokido et al. 2010).

Pro testování této hypotézy byla použita buněčná linie HEK293 (human embryonic kidney 293 cells), která exprimuje mHTT s délkou polyQ řetězce Q88. Imunoprecipitací byla v těchto buňkách detekována kolokalizace Ku70 a mHTT. Stejný výsledek měla i analýza R6/2 myši. V kontrolních myších nebyla interakce Ku70 s wt-HTT detekována. Stejná situace byla navíc potvrzena v HeLa buňkách exprimujících mHTT (Q110) a kontrolních HeLa buňkách (Q20) (Enokido et al. 2010).

V HeLa buňkách s wt-HTT (Q20) a nadměrnou expresí Ku70 byla pozorována interakce mezi wt-HTT a Ku70, ale s velmi malou četností. Ukázalo se, že část peptidu HTT obsahující polyQ interaguje s Ku70. Lze z toho předpokládat, že mHTT interaguje s Ku70 mnohem silněji. Pro účinnou interakci s Ku70 je hladina exprese mHTT ekvivalentní expresi endogenního HTT. Během tohoto experimentu bylo prokázáno, že mezi mHTT a Ku80 nebo DNA-PKcs žádná interakce neprobíhá (Enokido et al. 2010).

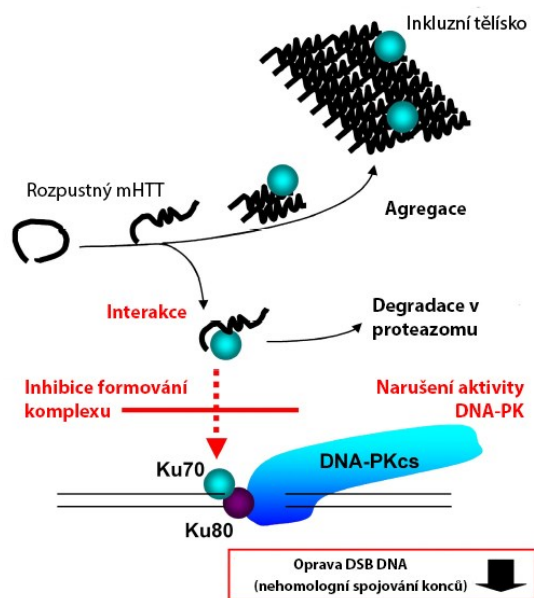
HeLa buňky Q110 vykazovaly narušenou vazbu Ku70 na DNA, vznik Ku70/80 komplexu i aktivitu DNA-PKcs. V případě Q20 buněk k takovým situacím nedocházelo. Tento výsledek byl opět potvrzen u R6/2 myši. Jako v předchozím případě, pro inhibici aktivity DNA-PKcs je třeba stejná hladina exprese mHTT, jako je exprese endogenního wt-HTT. To bylo potvrzeno v HeLa buňkách, jelikož se v nich pomocí koncentrace tetracyklinu dá regulovat exprese mHTT (Enokido et al. 2010).

4.6.1 Zvýšená exprese Ku70 obnovuje narušenou reparační aktivitu

U nervových tkání modelových R6/2 myši je tedy prokázána nižší aktivita DNA-PK. Po doplnění Ku70 se však její reparační aktivita významně navrácí, přestože hladina vzrůstu Ku70 je relativně malá. K tomuto experimentu posloužila dvojité transgenní myš, která exprimuje mHTT a zvýšenou hladinu Ku70 oproti kontrolní myši (Enokido et al. 2010).

Dále se ukázalo, že koexprese Ku70 podstatně prodlužuje přežití u *Drosophily* exprimující lidský mHTT. Tyto výsledky podporují myšlenku, že zvýšená hladina exprese Ku70 by mohla mít terapeutický efekt (Enokido et al. 2010; Tamura et al. 2011).

Stejné výsledky v buněčných i myších modelech podporují hypotézu, že mHTT by u pacientů s HD mohl také vyvazovat Ku70 a narušit tak NHEJ. Zvýšení hladiny Ku70 by u takových pacientů mohlo mít terapeutický efekt. Otázkou je provedení zvýšené exprese Ku70 u lidí, jelikož v předchozích pokusech se jednalo o genetické manipulace modelových organismů.



Obr. 7. mHTT vyvazuje Ku70 a brání jeho vazbě na Ku80 a DNA. Inhibuje aktivitu DNA-PKcs a potlačuje tak NHEJ. Ku70 navázaný na mHTT podstupuje degradaci v proteozomu. Vyskytuje se také koagregace do inkluzních tělísek, ale funkční narušení DNA-PK komplexu se objevuje ihned při vazbě na rozpustný mHTT a nikoliv při kvantitativních změnách Ku70. Převzato z Enokido et al. 2010.

4.7 Interakce mezi p53 a mHTT

Protože je p53 zapojený v odpovědi na poškození DNA, na stres a v buněčné smrti, má potenciál hrát důležitou roli v progresi neurodegenerativních onemocnění. Proto je v současné době předmětem výzkumu, jak p53 interaguje s mHTT.

4.7.1 p53 zvyšuje hladinu HTT a mHTT

Fenokopie u $Hdh^{-/-}$ a $p53^{-/-}$ potvrzují, že p53 a HTT sdílejí signální dráhu, která udržuje neuronální délku života a že ztráta jednoho nebo druhého mohou vést k neurodegeneraci. Vzhledem k tomu, že v $Hdh^{-/-}$ myši je neurodegenerace 100% penetrantní, ale pouze 25% penetrantní v $p53^{-/-}$ myši, se navrhuje, že p53 leží v této signální dráze ve směru upstream od genu pro HTT. Pokud ztráta p53 vede ke ztrátě HTT, nastane neurodegenerace. Pro zjištění, zda p53 ovlivňuje hladinu HTT, došlo ke srovnání myši s wt-HTT a myši s mHTT o délce polyQ řetězce Q140. Výsledky ukázaly, že *in vivo* zvyšující se dóze p53 vede ke zřetelné zvýšení hladiny mHTT i wt-HTT (Ryan et al. 2006).

4.7.2 p53 se váže na *HD/Hdh* promotor

p53 je transkripční faktor, a proto jedním z mechanismů, jak by mohl modifikovat hladinu HTT, je vazba na jeho promotor. Na myším (*Hdh*) i lidském (*HD*) promotoru byla nalezena konsenzus sekvence, na kterou se váží p53 response elementy (RE) (Ryan et al. 2006).

Byly vytvořeny konstrukty, kde je těmito promotory řízen gen pro enzym luciferázu. Do MEF p53^{+/+} a p53^{-/-} byly kotransfekovány *HDluc* a *HdhLuc* konstrukty společně s vektorem se vzrůstající dózí p53 exprese. Aktivace promotoru byla pak determinovaná stanovením luciferázové aktivity. V MEF p53^{-/-} byla aktivita značně nižší oproti p53^{+/+}. Se zvyšováním exprese p53 docházelo u p53^{+/+} k mírnému zvýšení luciferázové aktivity, u p53^{-/-} se aktivita zvýšila až na hladinu srovnatelnou s MEF p53^{+/+}. Použitím western blotu byly stejné výsledky pozorovány přímo u testování hladiny exprimovaného HTT. Hladina HTT byla tedy vyšší u MEF p53^{+/+} oproti p53^{-/-}. Po přidání p53 se hladina HTT u p53^{+/+} mírně zvýšila, u p53^{-/-} dosahovala hodnot stejných jako u p53^{+/+} (Ryan et al. 2006).

4.7.3 Delece p53 zmírňuje projevy HD

p53 má stejný efekt na hladinu HTT a mHTT. Zůstává však otázkou, jak přispívá tento fakt k HD patogenezi. Pokud má p53 podněcovat HD patogenezi, tak by jeho delece měla mít prospěšné účinky. Jestliže má p53 protektivní funkci, delece by HD fenotyp ještě zhoršila.

Předpokládá se, že pokud p53 podněcuje HD patogenezi, tak by myš p53^{-/-} exprimující mHTT měla mít méně vážný fenotyp. Pro testování této hypotézy se sledovala hladina mRNA pro neurotransmitter proenkefalin. Dřívější analýzy ukázaly, že mRNA proenkefalínu je už během brzkých stádií HD snížena, jak v pacientech, tak v myších modelech (Albin et al. 1991; Menalled et al. 2000). V myším modelu *Hdh*^{Q140/Q140} byla hladina mRNA oproti kontrolním buňkám značně nižší. Delece p53 navrátila hladinu mRNA proenkefalínu, a to na stejnou úroveň, jako je v kontrolních buňkách (Ryan et al. 2006).

V tomto myším modelu je jen vzácně pozorována ztráta neuronů. Nízká hladina mRNA proenkefalínu je tedy výsledkem snížení transkripce proenkefalínu v neuronech s HD a nikoliv výsledkem smrti neuronů, které exprimují enkefalin (Ryan et al. 2006).

4.7.4 Modely p53-mHTT interakce

Jsou navrženy tři modely interakce mezi p53 a mHTT (viz Obr.8.).

4.7.4.1 Lineární model

První jednoduchý lineární model je založen na schopnosti p53 modifikovat aktivitu promotoru mHTT, a tak modulovat hladinu mHTT upstream. Delece p53 tedy snižuje množství

mHTT, čímž zmírňuje fenotyp onemocnění. Tento model také předpovídá, že ztráta proenkefalínu u pacientů s HD je přímým důsledkem působení mHTT. Proto se při eliminaci p53 hladina mRNA proenkefalínu částečně navrácí. Tento lineární model však plně nevysvětluje otázku ohledně tvorby agregátů (Ryan et al. 2006).

4.7.4.2 Rozvětvený model

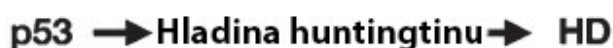
Ukázalo se, že během obvyklé p53 odpovědi je v HD formování IB inhibováno. Role p53 v HD tak musí být zahrnuta alespoň ve dvou cestách. Jedna probíhá přímo prostřednictvím mHTT a ovlivňuje tak expresi proenkefalínu. Další cesta probíhá přes zatím nedefinovaný mediátor tvorby agregátů. Děje se tak transaktivací cílového genu, který určuje stupeň agregace. V tomto rozvětveném modelu jsou za další aspekty HD fenotypu zodpovědné cílové molekuly, které jsou aktivovány p53. Je ale třeba zvážit, jestli a jakým způsobem HD působí na aktivitu p53 (Ryan et al. 2006).

4.7.4.3. Zpětnovazebný model

p53 působí na promotor HTT a funguje jako transkripční faktor aktivující expresi genů potřebných v odpovědi na poškození, je tedy otázka, zda mezi tyto proteiny patří také HTT. Ukázalo se, že wt-HTT má antiapoptotickou funkci a jeho nadměrná exprese ochraňuje buňky proti neurodegeneraci (Zhang et al. 2003). Z toho vyplývá, že při běžné odpovědi na stres v HD prostřednictvím p53 se zvyšuje hladina mHTT, čímž se tedy opět zvyšuje stres a buněčná dysfunkce. To vede ke změnám ve funkci samotného p53.

Bylo zjištěno, že mHTT zvyšuje hladinu p53, stejně tak i jeho transkripční aktivitu (Bae et al. 2005). Proto předchází rozvětvený model taktéž plně nereprezentuje p53-mHTT interakci v HD. Je tedy navržen model, ve kterém je efektor HD schopný zpětnovazebného působení na aktivitu p53. Tím může být například oxidativní stres, který je jedním ze základních spouštějících faktorů v patogenezi HD a je o něm známo, že aktivuje p53 a iniciuje p53 zprostředkovanou apoptotickou dráhu. K jakým konkrétním změnám v aktivitě p53 v HD dochází a jak tyto změny ovlivňují další procesy regulované p53, je nyní předmětem výzkumu (Ryan et al. 2006).

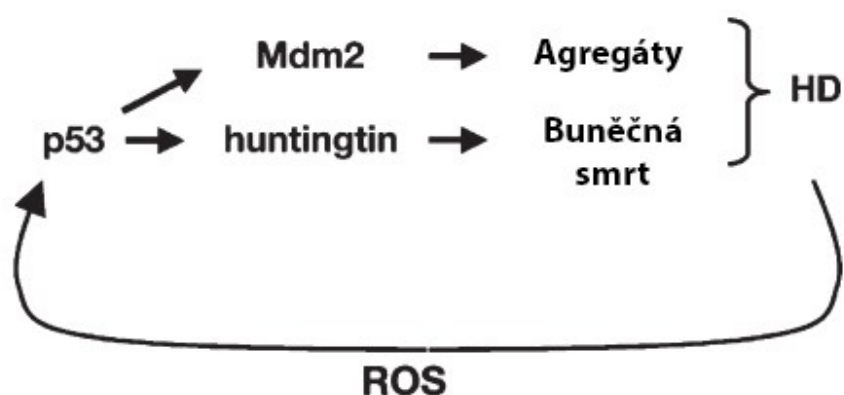
A. Lineární model



B. Rozvětvený model



C. Zpětnovazebný model



Obr. 8. Modely p53-mHTT interakce. Převzato z Ryan et al. 2006.

4.8 Hladina p53 se po transfekci plasmidem s mHTT nemění

HEK293 buňky byly transfekovány plasmidem pQ25 (HTT) nebo pQ72 (mHTT). Při expresi pQ72 se v buňce akumulují DSB. Následně se sledovala hladina p53, která by mohla napovědět, jaké jsou další procesy při DNA poškození během brzké exprese mHTT. Hladina p53 je u obou typů transfekcí srovnatelná a nemění se v čase (Illuzzi et al. 2011).

Toto pozorování se shoduje se současnými studiemi, které roli p53 mírně přehodnocují. Nejedná se nejspíš pouze o pomocníka během tumor suprese, ale i ochránce všech buněk. Malá hladina p53 byla objevena i v zárodečných buňkách, kde podporuje správný vývoj organismu. Základní hladina p53 je důležitá pro údržbu hematopoetických kmenových buněk v inaktivním stavu (Vousden and Lane 2007; Liu et al. 2009).

Po přidání CPT v buňkách hladina p53 významně vzrostla, což je velice zajímavé, protože jak CPT, tak i pQ72 způsobují DSB a přitom po transfekci plasmidem pQ72 se hladina p53 nezměnila (Illuzzi et al. 2011). Důvodem bude nejspíše mechanismus nepřímého vlivu exprese mHTT na vznik DSB.

4.9 Modifikace p53 během exprese mHTT

4.9.1 Interakce p53 s Pin1

Fosforylace p53 na Ser46 vede k interakci s prolyl-izomerázou Pin1 a k následné disociaci od apoptotického inhibitoru iASPP. Tím může být zahájena exprese genů spojených s apoptózou. Fosforylace na Ser46 následuje po vážném a přetrvávajícím stresu a představuje hlavní událost na p53 závislém posunu ze zastavení buněčného cyklu k apoptóze (Mayo et al. 2005; Mantovani et al. 2007)

Bylo potvrzeno, že během exprese mHTT taktéž dochází k fosforylaci p53 na Ser46 a je přítomna v mozcích pacientů s HD. I zde platí, že je v buňkách exprimujících mHTT interakce s Pin1 hlavním bodem ve spuštění apoptózy (Grison et al. 2011).

Na modelu myši bylo ukázáno, že ablace Pin1 zabránila předčasnou aktivaci p53, což poukázalo na její důležitou roli minimálně v brzkých stádiích HD. Transkripční aktivita p53 byla pozorována v neuronech striatu více jak 1 rok před propuknutím buněčné smrti, což vede k předpokladu, že jsou tyto buňky schopné dlouhodobě odolávat stresu. Analýzou starších myši se zjistilo, že cílením na Pin1 dochází k blokaci p53 a lze tak zabránit mHTT způsobené neurodegeneraci (Grison et al. 2011).

Zabránění fosforylace p53 na Ser46 prostřednictvím inhibice kináz, které přímo nebo nepřímo vedou k této fosforylaci, např. HIPK2 (s homeodoménou-interagující proteinkináza 2) nebo PKC δ , stejně tak jako blokace Pin1, mohou ochránit neurony před mHTT indukovanou apoptózou. Proto by tyto inhibiční mechanismy mohly být v budoucnu použity v terapeutické strategii pro léčbu HD. V této problematice je však třeba pokračovat v klinických studiích (Grison et al. 2011).

4.9.2 Posttranslační modifikace p53 během exprese mHTT

Při sledování hladiny aktivovaného - fosforylovaného p53 u transfekovaných HEK293 buněk pomocí plasmidů pQ25 a pQ72, se ukázalo, že během exprese pQ25 se hladina nemění, při expresi pQ72 je značně zvýšená, stejně tak po přidání CPT. V tomto případě hladina fosforylace p53 koreluje s výskytem DSB (Illuzzi et al. 2011).

Další modifikací, která se u p53 objevuje jako odpověď na poškození DNA, je acetylace. Ta je důležitá pro oligomerizaci a směrování p53 do jádra (Kawaguchi et al. 2006). Během exprese pQ72 acetylace klesala pod hodnoty obvyklé pro základní hladinu. Během exprese pak dochází pouze k náhodným dimerizacím či trimerizacím, které ale nejsou stabilní, a tak p53 není schopno zaujmout stálou konformaci. To ovlivňuje jeho schopnost vstupu do jádra, obvyklou modulaci transkripce během odpovědi na buněčný stres a expresi důležitých genů pro DDR. Chybějící aktivita opravných proteinů vede k narušení DDR, což následně znamená více vzniklých a neopravených DSB (Illuzzi et al. 2011).

Zatímco acetylace p53 vyústí k aktivaci stresové odpovědi, monoubikvitinace znamená akumulaci p53 v cytoplazmě. Během exprese pQ72 dochází souběžně s poklesem acetylace ke vzrůstu monoubikvitinovaného p53. V tomto stavu zůstává navázán jeho negativní regulátor MDM2 a není schopen katalyzovat DDR (Li et al. 2003; Illuzzi et al. 2011).

Tento článek poukazuje na změny v posttranslačních modifikacích p53 během DDR. K přesnému pochopení, jak tyto změny přispívají k HD patogenezi, je potřeba se touto problematikou dále zabývat.

5 ZÁVĚR

Tato práce shrnuje dosud proběhlé výzkumy týkající se problematiky odpovědi na poškození DNA během patogeneze HD. V jednotlivých pracích se lze setkat s různými pohledy a odlišnými výsledky ohledně oprav a akumulace DSB v HD. Jednou z hypotéz, proč dochází k odumírání neuronů, je nadměrná aktivace DDR a p53 signální dráhy během exprese mHTT, která ve výsledku vede k apoptóze. Existují práce, které navrhují, že p53 zvyšuje hladinu mHTT a podněcuje tak progresi HD. Stejně tak proběhly experimenty zkoumající aktivitu H2AX a ATM, při kterých bylo zjištěno, že je nadměrně zvýšená. Další hypotézou je snížená schopnost opravy během DDR. V těchto pracích jsou detekovány signály γ H2AX, dochází tedy k rozpoznávání DSB a následnému selhání opravných mechanismů. Ukázalo se, že mHTT je schopen vyvazovat Ku70 a narušit tak NHEJ. V důsledku toho dochází k hromadění DSB v buňce. V nedávné době byla navržena další hypotéza, podle které není buňka schopna efektivně rozpoznávat DSB. To opět vede k hromadění neopravených zlomů. Při překročení určitého prahu množství DNA poškození podléhají takové buňky smrti.

Je také důležitým faktorem, v jakém kontextu byl výzkum této problematiky prováděn. Odlišné výsledky mohou být také přičteny různým způsobům, které byly použity pro indukci DNA poškození.

Expres mHTT nepostihuje pouze nervové buňky, ale nejvíce se v nich projevuje jeho toxicita. Nervová tkáň má velmi sníženou schopnost sebeobnovy kvůli omezenému počtu kmenových buněk. V postmitotických neuronech je hlavním opravným mechanismem NHEJ. Při jeho selhání během toxického působení mHTT nemá buňka možnost efektivně opravit DSB.

Je nutné si uvědomit, že během výzkumů byly použity různé typy buněk a modelových organismů. Například použité nádorové linie s vloženým transgenem pro mHTT mají už samy o sobě abnormální buněčné funkce a po indukované expresi mHTT nemusí následné buněčné pochody odpovídat situacím v nervových buňkách pacientů s HD. To platí i pro ostatní použité buněčné linie nepocházející z nervové tkáně.

Vzhledem k nadměrné aktivaci p53 a ATM a jejich vztahu k progresi HD, byly provedeny pokusy s jejich inhibicí, která se v myších modelech ukázala jako terapeuticky přínosná. Došlo ke zmírnění projevů onemocnění. Avšak ve zvířecích modelech nebyla HD nikdy prokázána, jedná se pouze o fenotyp napodobující toto onemocnění. Zůstává tedy otázkou, jaké výsledky by měla případná klinická studie u lidských pacientů. Inhibice p53 u lidí je z pohledu bezpečnosti léčby velmi problémová vzhledem k jeho ostatním důležitým funkcím v buňce. p53 je tumor supresorový protein a je tedy velmi pravděpodobné, že jeho inhibice by ve výsledku mohla vést k rozvoji rakoviny. Teoretickou možností by mohlo být určení hladiny inhibice p53, při které ještě nedochází k rakovinnému bujení, a zároveň by mírnila projevy HD. Taková hladina by však u jednotlivých pacientů byla velmi individuální a případná klinická studie je z důvodu bezpečnosti velmi problematická.

Podobnou úvahu lze aplikovat i na inhibici ATM, která má v buňce taktéž esenciální funkce. U myších modelů se ukázalo, že částečná inhibice ATM nemá negativní dopad na životní funkce, ale je opět otázkou, zda by tomu tak bylo i u lidí. Jsou známé farmakologické inhibitory, u kterých je nutné do budoucna prozkoumat vedlejší účinky během dlouhodobého užívání pacienty.

Je třeba pokračovat ve výzkumu přesných molekulárních mechanismů k jejich plnému pochopení a k jejich aplikaci během klinických studií. Cílem je získat důležité poznatky pro vývin léků mírnících projevy onemocnění a do budoucna i pro léčbu HD.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- Adachi N, Ishino T, Ishii Y, Takeda S, and Koyama H. 2001. DNA Ligase IV-Deficient Cells Are More Resistant to Ionizing Radiation in the Absence of Ku70: Implications for DNA Double-Strand Break Repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (21): 12109–13.
- Albin Roger L, Ying Qin, Young AB, Penney JB, and Chesselet MF. 1991. Preproenkephalin Messenger RNA containing Neurons in Striatum of Patients with Symptomatic and Presymptomatic Huntington's Disease: An in Situ Hybridization Study. *Annals of Neurology* 30 (4): 542–49.
- Al-Jader LN, Harper PS, Krawczak M, and Palmer SR. 2001. The Frequency of Inherited Disorders Database: Prevalence of Huntington Disease. *Community Genetics* 4 (3): 148–57.
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, and Finkbeiner S. 2004. Inclusion Body Formation Reduces Levels of Mutant Huntingtin and the Risk of Neuronal Death. *Nature* 431 (7010): 805–10.
- Ayala-Peña S. 2013. Role of Oxidative DNA Damage in Mitochondrial Dysfunction and Huntington's Disease Pathogenesis. *Free Radical Biology & Medicine* 62: 102–10.
- Bae BI, Xu H, Igarashi S, Fujimuro M, Agrawal N, Taya Y, Hayward DS, et al. 2005. p53 Mediates Cellular Dysfunction and Behavioral Abnormalities in Huntington's Disease. *Neuron* 47 (1): 29–41.
- Bakkenist ChJ and Kastan MB. 2003. DNA Damage Activates ATM through Intermolecular Autophosphorylation and Dimer Dissociation. *Nature* 421 (6922): 499–506.
- Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, and Lukas J. 2006. Spatial Organization of the Mammalian Genome Surveillance Machinery in Response to DNA Strand Breaks. *The Journal of Cell Biology* 173 (2): 195–206.
- Berkovich E, Monnat RJ, and Kastan MB. 2007. Roles of ATM and NBS1 in Chromatin Structure Modulation and DNA Double-Strand Break Repair. *Nature Cell Biology* 9 (6): 683–90.
- Bernstein NK, Williams SR, Rakovszky ML, Cui D, Green R, Karimi-Busheri F, Mani RS, Galicia S, Koch AC, and Cass CE. 2005. The Molecular Architecture of the Mammalian DNA Repair Enzyme, Polynucleotide Kinase. *Molecular Cell* 17 (5): 657–70.
- Blier PR, Griffith AJ, Craft J, and Hardin JA. 1993. Binding of Ku Protein to DNA. Measurement of Affinity for Ends and Demonstration of Binding to Nicks. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (10): 7594–7601.
- Bolderson E., Tomimatsu N, Richard DJ, Boucher D, Kumar R, Pandita TK, Burma S, and Khanna KK. 2010. Phosphorylation of Exo1 Modulates Homologous Recombination Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Nucleic Acids Research* 38 (6): 1821–31.
- Brundin P, Melki R, and Kopito R. 2010. Prion-like Transmission of Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (4): 301–7.
- Buis J, Stoneham T, Spehalski E, and Ferguson DO. 2012. Mre11 Regulates CtIP-Dependent Double-Strand Break Repair by Interaction with CDK2. *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (2): 246–52.
- Calsou P, Delteil Ch, Frit P, Drouet J, and Salles B. 2003. Coordinated Assembly of Ku and p460 Subunits of the DNA-Dependent Protein Kinase on DNA Ends Is Necessary for XRCC4–ligase IV Recruitment. *Journal of Molecular Biology* 326 (1): 93–103.
- Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, and Morton AJ. 1999. Characterization of Progressive Motor Deficits in Mice Transgenic for the Human Huntington's Disease Mutation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (8): 3248–57.
- Chapman JR, Taylor MRG, and Boulton SJ. 2012. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell* 47 (4): 497–510.

- Chen L, Nievera CJ, Lee AYL, and Wu X. 2008. Cell Cycle-Dependent Complex Formation of BRCA1-CtIP-MRN Is Important for DNA Double-Strand Break Repair. *Journal of Biological Chemistry* 283 (12): 7713–20.
- Choi JH, Lindsey-Boltz LA, Kemp M, Mason AC, Wold MS, and Sancar A. 2010. Reconstitution of RPA-Covered Single-Stranded DNA-Activated ATR-Chk1 Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (31): 13660–65.
- Choo YS, Johnson GVW, MacDonald M, Detloff PJ, and Lesort M. 2004. Mutant Huntingtin Directly Increases Susceptibility of Mitochondria to the Calcium-Induced Permeability Transition and Cytochrome c Release. *Human Molecular Genetics* 13 (14): 1407–20.
- Ciccia A and Elledge SJ. 2010. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell* 40 (2): 179–204.
- Cimprich KA and Cortez D. 2008. ATR: An Essential Regulator of Genome Integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (8): 616–27.
- Cole F, Keeney S, and Jasin. 2010. Evolutionary Conservation of Meiotic DSB Proteins: More than Just Spo11. *Genes & Development* 24 (12): 1201–7.
- Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross ChA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, and Bates GP. 1997. Formation of Neuronal Intranuclear Inclusions Underlies the Neurological Dysfunction in Mice Transgenic for the HD Mutation. *Cell* 90 (3): 537–48.
- Davis AJ, Chen BPC, and Chen DJ. 2014. DNA-PK: A Dynamic Enzyme in a Versatile DSB Repair Pathway. *DNA Repair* 17 (May): 21–29.
- DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD, and Chu G. 2002. Synapsis of DNA Ends by DNA-Dependent Protein Kinase. *The EMBO Journal* 21 (12): 3192–3200.
- De Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, and Wyman C. 2001. Human Rad50/Mre11 Is a Flexible Complex That Can Tether DNA Ends. *Molecular Cell* 8 (5): 1129–35.
- De Luca G, Russo MT, Degan P, Tiveron C, Zijno A, Meccia E, Ventura I, et al. 2008. A Role for Oxidized DNA Precursors in Huntington's Disease-like Striatal Neurodegeneration. *PLoS Genetics* 4 (11): e1000266.
- Desai-Mehta A, Cerosaletti KM, and Concannon P. 2001. Distinct Functional Domains of Nibrin Mediate Mre11 Binding, Focus Formation, and Nuclear Localization. *Molecular and Cellular Biology* 21 (6): 2184–91.
- Downs JA, Lowndes NF, and Jackson SP. 2000. A Role for *Saccharomyces Cerevisiae* Histone H2A in DNA Repair. *Nature* 408 (6815): 1001–4.
- Dudley DD, Chaudhuri J, Bassing CH, and Alt FW. 2005. Mechanism and Control of V(D)J Recombination versus Class Switch Recombination: Similarities and Differences. In *Advances in Immunology*, 86:43–112.
- Dunah AW, Jeong H, Griffin A, Kim YM, Standaert DG, Hersch SM, Mouradian MM, Young AB, Tanese N, and Krainc D. 2002. Sp1 and TAFII130 Transcriptional Activity Disrupted in Early Huntington's Disease. *Science (New York, N.Y.)* 296 (5576): 2238–43.
- Enokido Y, Tamura T, Ito H, Arumughan A, Komuro A, Shiwaku H, Sone M, et al. 2010. Mutant Huntingtin Impairs Ku70-Mediated DNA Repair. *The Journal of Cell Biology* 189 (3): 425–43.
- Esashi F, Christ N, Gannon J, Liu Y, Hunt T, Jasin M, and West SC. 2005. CDK-Dependent Phosphorylation of BRCA2 as a Regulatory Mechanism for Recombinational Repair. *Nature* 434 (7033): 598–604.
- Escribano-Díaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, Xing M, Young JTF, Tkáč J, Cook MA, et al. 2013. A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. *Molecular Cell* 49 (5): 872–83.
- Ferlazzo ML, Sonzogni L, Granzotto A, Bodgi L, Lartin O, Devic C, Vogin G, Pereira S, and Foray N. 2014. Mutations of the Huntington's Disease Protein Impact on the ATM-Dependent Signaling

- and Repair Pathways of the Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks: Corrective Effect of Statins and Bisphosphonates. *Molecular Neurobiology* 49 (3): 1200–1211.
- Godin JD, Colombo K, Molina-Calavita M, Keryer G, Zala D, Charrin BC, Dietrich P, et al. 2010. Huntingtin Is Required for Mitotic Spindle Orientation and Mammalian Neurogenesis. *Neuron* 67 (3): 392–406.
- Goldberg M, Stucki M, Falck J, D'Amours D, Rahman D, Pappin D, Bartek J, and Jackson SP. 2003. MDC1 Is Required for the Intra-S-Phase DNA Damage Checkpoint. *Nature* 421 (6926): 952–56.
- Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M, and Lieber MR. 1997. Activity of DNA Ligase IV Stimulated by Complex Formation with XRCC4 Protein in Mammalian Cells. *Nature* 388 (6641): 492–95.
- Gray M, Shirasaki DI, Cepeda C, Andre VM, Wilburn B, Lu XH, Tao J, et al. 2008. Full-Length Human Mutant Huntingtin with a Stable Polyglutamine Repeat Can Elicit Progressive and Selective Neuropathogenesis in BACHD Mice. *Journal of Neuroscience* 28 (24): 6182–95.
- Greenberg RA. 2006. Multifactorial Contributions to an Acute DNA Damage Response by BRCA1/BARD1-Containing Complexes. *Genes & Development* 20 (1): 34–46.
- Grison A, Mantovani F, Comel A, Agostoni E, Gustincich S, Persichetti F, and Del Sal G. 2011. Ser46 Phosphorylation and Prolyl-Isomerase Pin1-Mediated Isomerization of p53 Are Key Events in p53-Dependent Apoptosis Induced by Mutant Huntingtin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (44): 17979–84.
- Haince JF, McDonald D, Rodrigue A, Déry U, Masson JY, Hendzel MJ, and Poirier GG. 2008. PARP1-Dependent Kinetics of Recruitment of MRE11 and NBS1 Proteins to Multiple DNA Damage Sites. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (2): 1197–1208.
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, and Haupt Y. 2003. Apoptosis - the p53 Network. *Journal of Cell Science* 116 (20): 4077–85.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, and Oren M. 1997. Mdm2 Promotes the Rapid Degradation of p53. *Nature* 387 (6630): 296–99.
- Hochegger H, Dejsuphong D, Fukushima T, Morrison C, Sonoda E, Schreiber V, Zhao GY, et al. 2006. Parp-1 Protects Homologous Recombination from Interference by Ku and Ligase IV in Vertebrate Cells. *The EMBO Journal* 25 (6): 1305–14.
- Hoffner G, Kahlem P, and Djian P. 2002. Perinuclear Localization of Huntingtin as a Consequence of Its Binding to Microtubules through an Interaction with Beta-Tubulin: Relevance to Huntington's Disease. *Journal of Cell Science* 115 (Pt 5): 941–48.
- Hopfner KP, Craig L, Moncalian G, Zinkel RA, Usui T, Owen BAL, Karcher A, et al. 2002. The Rad50 Zinc-Hook Is a Structure Joining Mre11 Complexes in DNA Recombination and Repair. *Nature* 418 (6897): 562–66.
- Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, and Tainer JA. 2000. Structural Biology of Rad50 ATPase. *Cell* 101 (7): 789–800.
- Illuzzi JL, Vickers CA, and Kmiec EB. 2011. Modifications of p53 and the DNA Damage Response in Cells Expressing Mutant Form of the Protein Huntingtin. *Journal of Molecular Neuroscience* 45 (2): 256–68.
- Illuzzi J, Yerkes S, Parekh-Olmedo H, and Kmiec EB. 2009. DNA Breakage and Induction of DNA Damage Response Proteins Precede the Appearance of Visible Mutant Huntingtin Aggregates. *Journal of Neuroscience Research* 87 (3): 733–47.
- Ip SCY, Rass U, Blanco MG, Flynn HR, Skehel JM, and West SC. 2008. Identification of Holliday Junction Resolvases from Humans and Yeast. *Nature* 456 (7220): 357–61.
- Ito K, Adachi S, Iwakami R, Yasuda H, Muto Y, Seki N, and Okano Y. 2001. N-Terminally Extended Human Ubiquitin-Conjugating Enzymes (E2s) Mediate the Ubiquitination of RING-Finger Proteins, ARA54 and RNF8. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 268 (9): 2725–32.

- Jeon GS, Kim KY, Hwang YJ, Jung MK, An S, Ouchi M, Ouchi T, Kowall N, Lee J, and Ryu H. 2012. Deregulation of BRCA1 Leads to Impaired Spatiotemporal Dynamics of γ -H2AX and DNA Damage Responses in Huntington's Disease. *Molecular Neurobiology* 45 (3): 550–63.
- Kadyk LC and Hartwell LH. 1992. Sister Chromatids Are Preferred over Homologs as Substrates for Recombinational Repair in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics* 132 (2): 387–402.
- Kawaguchi Y, Ito A, Appella E, and Yao TP. 2006. Charge Modification at Multiple C-Terminal Lysine Residues Regulates p53 Oligomerization and Its Nucleus-Cytoplasm Trafficking. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (3): 1394–1400.
- Kim JS, Krasieva TB, Kurumizaka H, Chen DJ, Taylor AM, and Yokomori K. 2005. Independent and Sequential Recruitment of NHEJ and HR Factors to DNA Damage Sites in Mammalian Cells. *The Journal of Cell Biology* 170 (3): 341–47.
- Kim M. 2013. Beta Conformation of Polyglutamine Track Revealed by a Crystal Structure of Huntingtin N-Terminal Region with Insertion of Three Histidine Residues. *Prion* 7 (3): 221–28.
- Koch ChA, Agyei R, Galicia S, Metalnikov P, O'Donnell P, Starostine A, Weinfeld M, and Durocher D. 2004. Xrcc4 Physically Links DNA End Processing by Polynucleotide Kinase to DNA Ligation by DNA Ligase IV. *The EMBO Journal* 23 (19): 3874–85.
- Kovtun IV, Liu Y, BJORAS M, Klungland A, Wilson SH, and McMurray CT. 2007. OGG1 Initiates Age-Dependent CAG Trinucleotide Expansion in Somatic Cells. *Nature* 447 (7143): 447–52.
- Kovtun IV, and McMurray CT. 2001. Trinucleotide Expansion in Haploid Germ Cells by Gap Repair. *Nature Genetics* 27 (4): 407–11.
- Kubbutat MHG, Jones SN, and Vousden KH. 1997. Regulation of p53 Stability by Mdm2. *Nature* 387 (6630): 299–303.
- Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, and Kastan MB. 1992. Wild-Type p53 Is a Cell Cycle Checkpoint Determinant Following Irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (16): 7491–95.
- Lee SE, Mitchell RA, Cheng A, and Hendrickson EA. 1997. Evidence for DNA-PK-Dependent and -Independent DNA Double-Strand Break Repair Pathways in Mammalian Cells as a Function of the Cell Cycle. *Molecular and Cellular Biology* 17 (3): 1425–33.
- Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, and Gu W. 2003. Mono- Versus Polyubiquitination: Differential Control of p53 Fate by Mdm2. *Science* 302 (5652): 1972–75.
- Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Liu Y, Huang G, Di Giandomenico S et al. 2009. p53 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence. *Cell Stem Cell* 4 (1): 37–48.
- Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, and Jeggo PA. 2010. γ H2AX Foci Analysis for Monitoring DNA Double-Strand Break Repair: Strengths, Limitations and Optimization. *Cell Cycle* 9 (4): 662–69.
- Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, Manis JP, et al. 2006. MDC1 Maintains Genomic Stability by Participating in the Amplification of ATM-Dependent DNA Damage Signals. *Molecular Cell* 21 (2): 187–200.
- Lu XH, Mattis VB, Wang N, Al-Ramahi I, van den Berg N, Fratantoni SA, Waldvogel H, et al. 2014. Targeting ATM Ameliorates Mutant Huntingtin Toxicity in Cell and Animal Models of Huntington's Disease. *Science Translational Medicine* 6 (268): 268ra178.
- Macdonald M, Ambrose ChM, Duyao MP, Myers RH, Lin C, Srinidhi L, Barnes G, and et al.. 1993. A Novel Gene Containing a Trinucleotide Repeat That Is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes. *Cell* 72 (6): 971–83.
- Mahaney BL, Meek K, and Lees-Miller SP. 2009. Repair of Ionizing Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks by Non-Homologous End-Joining. *Biochemical Journal* 417 (3): 639.

- Mailand N, Bekker-Jensen S, Faustrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, and Lukas J. 2007. RNF8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins. *Cell* 131 (5): 887–900.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, et al. 1996. Exon 1 of the HD Gene with an Expanded CAG Repeat Is Sufficient to Cause a Progressive Neurological Phenotype in Transgenic Mice. *Cell* 87 (3): 493–506.
- Mantovani F, Tocco F, Girardini J, Smith P, Gasco M, Lu X, Crook T, and Del Sal G. 2007. The Prolyl Isomerase Pin1 Orchestrates p53 Acetylation and Dissociation from the Apoptosis Inhibitor iASPP. *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (10): 912–20.
- Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, and Gorbunova V. 2008. Comparison of Nonhomologous End Joining and Homologous Recombination in Human Cells. *DNA Repair* 7 (10): 1765–71.
- Mari PO, Florea BI, Persengiev SP, Verkaik NS, Bruggenwirth HT, Modesti M, Giglia-Mari G, et al. 2006. Dynamic Assembly of End-Joining Complexes Requires Interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (49): 18597–602.
- Mayo LD, Seo YR, Jackson MW, Smith ML, Rivera Guzman J, Korgaonkar CK, and Donner DB. 2005. Phosphorylation of Human p53 at Serine 46 Determines Promoter Selection and Whether Apoptosis Is Attenuated or Amplified. *Journal of Biological Chemistry* 280 (28): 25953–59.
- McBride JL, Pitzer MR, Boudreau RL, Dufour B, Hobbs T, Ojeda SR, and Davidson BL. 2011. Preclinical Safety of RNAi-Mediated HTT Suppression in the Rhesus Macaque as a Potential Therapy for Huntington’s Disease. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (12): 2152–62.
- Menalled L, Zanjani H, MacKenzie L, Koppel A, Carpenter E, Zeitlin S, and Chesselet MF. 2000. Decrease in Striatal Enkephalin mRNA in Mouse Models of Huntington’s Disease. *Experimental Neurology* 162 (2): 328–42.
- Neal MJ, Pan J, and Keeney S. 2005. Endonucleolytic Processing of Covalent Protein-Linked DNA Double-Strand Breaks. *Nature* 436 (7053): 1053–57.
- McElhinny NSA, Snowden SM, McCarville J, and Ramsden DA. 2000. Ku Recruits the XRCC4-Ligase IV Complex to DNA Ends. *Molecular and Cellular Biology* 20 (9): 2996–3003.
- Orii KE, Lee Y, Kondo N, and McKinnon PJ. 2006. Selective Utilization of Nonhomologous End-Joining and Homologous Recombination DNA Repair Pathways during Nervous System Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (26): 10017–22.
- Paull TT, and Gellert M. 1999. Nbs1 Potentiates ATP-Driven DNA Unwinding and Endonuclease Cleavage by the Mre11/Rad50 Complex. *Genes & Development* 13 (10): 1276–88.
- Petrini J. 2003. The Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks: Defining the Sensors and Mediators. *Trends in Cell Biology* 13 (9): 458–62.
- Plans V, Scheper J, Soler M, Loukili N, Okano Y, and Thomson TM. 2006. The RING Finger Protein RNF8 Recruits UBC13 for Lysine 63-Based Self Polyubiquitylation. *Journal of Cellular Biochemistry* 97 (3): 572–82.
- Polidori MC, Mecocci P, Browne SE, Senin U, and Beal MF. 1999. Oxidative Damage to Mitochondrial DNA in Huntington’s Disease Parietal Cortex. *Neuroscience Letters* 272 (1): 53–56.
- Ren PH, Lauckner JE, Kachirskaia I, Heuser JE, Melki R, and Kopito RR. 2009. Cytoplasmic Penetration and Persistent Infection of Mammalian Cells by Polyglutamine Aggregates. *Nature Cell Biology* 11 (2): 219–25.
- Ryan AB, Zeitlin SO, and Scrabble H. 2006. Genetic Interaction between Expanded Murine Hdh Alleles and p53 Reveal Deleterious Effects of p53 on Huntington’s Disease Pathogenesis. *Neurobiology of Disease* 24 (2): 419–27.
- Shroff R, Arbel-Eden A, Pilch D, Ira G, Bonner WM, Petrini JH, Haber JE, and Lichten M. 2004. Distribution and Dynamics of Chromatin Modification Induced by a Defined DNA Double-Strand Break. *Current Biology* 14 (19): 1703–11.

- Siddiqui A, Rivera-Sánchez S, del R. Castro M, Acevedo-Torres K, Rane A, Torres-Ramos CA, Nicholls DG, Andersen JK, and Ayala-Torres S. 2012. Mitochondrial DNA Damage Is Associated with Reduced Mitochondrial Bioenergetics in Huntington's Disease. *Free Radical Biology & Medicine* 53 (7): 1478–88.
- Siesling S, van Vugt JP, Zwinderman KA, Kiebertz K, and Roos RA. 1998. Unified Huntington's Disease Rating Scale: A Follow up. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 13 (6): 915–19.
- Singleton BK, Torres-Arzayus MI, Rottinghaus ST, Taccioli GE, and Jeggo PA. 1999. The C Terminus of Ku80 Activates the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit. *Molecular and Cellular Biology* 19 (5): 3267–77.
- Slow EJ, Graham RK, Osmand AP, Devon RS, Lu G, Deng Y, Pearson J, et al. 2005. Absence of Behavioral Abnormalities and Neurodegeneration in Vivo despite Widespread Neuronal Huntingtin Inclusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (32): 11402–7.
- Snell RG, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, MacDonald ME, Gusella JF, Harper PS, and Shaw DJ. 1993. Relationship between Trinucleotide Repeat Expansion and Phenotypic Variation in Huntington's Disease. *Nature Genetics* 4 (4): 393–97.
- Solomon AC, Stout JC, Johnson SA, Langbehn DR, Aylward EH, Brandt J, Ross ChA et al. 2007. Verbal Episodic Memory Declines prior to Diagnosis in Huntington's Disease. *Neuropsychologia* 45 (8): 1767–76.
- Spiro C, Pelletier R, Rolfsmeier ML, Dixon MJ, Lahue RS, Gupta G, Park MS, Chen X, Mariappan SV, and McMurray CT. 1999. Inhibition of FEN-1 Processing by DNA Secondary Structure at Trinucleotide Repeats. *Molecular Cell* 4 (6): 1079–85.
- Squitieri F, Gellera C, Cannella M, Mariotti C, Cislighi G, Rubinsztein DC, Almqvist EW, et al. 2003. Homozygosity for CAG Mutation in Huntington Disease Is Associated with a More Severe Clinical Course. *Brain: A Journal of Neurology* 126 (Pt 4): 946–55.
- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, and Takeda S. 1998. Homologous Recombination and Non-Homologous End-Joining Pathways of DNA Double-Strand Break Repair Have Overlapping Roles in the Maintenance of Chromosomal Integrity in Vertebrate Cells. *The EMBO Journal* 17 (18): 5497–5508.
- Tamura T, Sone M, Iwatsubo T, Tagawa K, Wanker EE, and Okazawa H. 2011. Ku70 Alleviates Neurodegeneration in Drosophila Models of Huntington's Disease. Edited by Patrick Callaerts. *PLoS ONE* 6 (11): e27408.
- Thompson JC, Harris J, Sollom AC, Stopford ChL, Howard E, Snowden JS, and Craufurd D. 2012. Longitudinal Evaluation of Neuropsychiatric Symptoms in Huntington's Disease. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 24 (1): 53–60.
- Trushina E, Dyer RB, Badger JD, Ure D, Eide L, Tran DD, Vrieze BT, et al. 2004. Mutant Huntingtin Impairs Axonal Trafficking in Mammalian Neurons in Vivo and in Vitro. *Molecular and Cellular Biology* 24 (18): 8195–8209.
- Van Gent DC and van der Burg M. 2007. Non-Homologous End-Joining, a Sticky Affair. *Oncogene* 26 (56): 7731–40.
- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, and Richardson EP. 1985. Neuropathological Classification of Huntington's Disease: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 44 (6): 559–77.
- Vousden KH, and Lane DP. 2007. p53 in Health and Disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (4): 275–83.
- Walker JR, Corpina RA, and Goldberg J. 2001. Structure of the Ku Heterodimer Bound to DNA and Its Implications for Double-Strand Break Repair. *Nature* 412 (6847): 607–14.

- Wang M, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H, and Iliakis G. 2006. PARP-1 and Ku Compete for Repair of DNA Double Strand Breaks by Distinct NHEJ Pathways. *Nucleic Acids Research* 34 (21): 6170–82.
- Weiss A, Abramowski D, Bibel M, Bodner R, Chopra V, DiFiglia M, Fox J, et al. 2009. Single-Step Detection of Mutant Huntingtin in Animal and Human Tissues: A Bioassay for Huntington's Disease. *Analytical Biochemistry* 395 (1): 8–15.
- Wheeler VC, Lebel LA, Vrbanac V, Teed A, te Riele H, and MacDonald ME. 2003. Mismatch Repair Gene Msh2 Modifies the Timing of Early Disease in Hdh(Q111) Striatum. *Human Molecular Genetics* 12 (3): 273–81.
- Yamamoto A, Lucas JJ, and Hen R. 2000. Reversal of Neuropathology and Motor Dysfunction in a Conditional Model of Huntington's Disease. *Cell* 101 (1): 57–66.
- Yang W, Dunlap JR, Andrews RB, and Wetzel R. 2002. Aggregated Polyglutamine Peptides Delivered to Nuclei Are Toxic to Mammalian Cells. *Human Molecular Genetics* 11 (23): 2905–17.
- Yan J, and Jetten AM. 2008. RAP80 and RNF8, Key Players in the Recruitment of Repair Proteins to DNA Damage Sites. *Cancer Letters* 271 (2): 179–90.
- Yan J, Kim YS, Yang XP, Li LP, Liao G, Xia F, and Jetten AM. 2007. The Ubiquitin-Interacting Motif Containing Protein RAP80 Interacts with BRCA1 and Functions in DNA Damage Repair Response. *Cancer Research* 67 (14): 6647–56.
- Yoon SR, Dubeau L, de Young M, Wexler NS, and Arnheim N. 2003. Huntington Disease Expansion Mutations in Humans Can Occur before Meiosis Is Completed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (15): 8834–38.
- You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, and Russell P. 2005. ATM Activation and Its Recruitment to Damaged DNA Require Binding to the C Terminus of Nbs1. *Molecular and Cellular Biology* 25 (13): 5363–79.
- You Z, and Bailis JM. 2010. DNA Damage and Decisions: CtIP Coordinates DNA Repair and Cell Cycle Checkpoints. *Trends in Cell Biology* 20 (7): 402–9.
- Yuan SS, Lee SY, Chen G, Song M, Tomlinson GE, and Lee EY. 1999. BRCA2 Is Required for Ionizing Radiation-Induced Assembly of Rad51 Complex in Vivo. *Cancer Research* 59 (15): 3547–51.
- Yu X, and Chen J. 2004. DNA Damage-Induced Cell Cycle Checkpoint Control Requires CtIP, a Phosphorylation-Dependent Binding Partner of BRCA1 C-Terminal Domains. *Molecular and Cellular Biology* 24 (21): 9478–86.
- Zhang Y, Li M, Drozda M, Chen M, Ren S, Sanchez ROM, Leavitt BR, et al. 2003. Depletion of Wild-Type Huntingtin in Mouse Models of Neurologic Diseases: Depletion of Huntingtin in Neurological Diseases. *Journal of Neurochemistry* 87 (1): 101–6.
- Zhang, Z, Zhu L, Lin D, Chen F, Chen DJ, and Chen Y. 2001. The Three-Dimensional Structure of the C-Terminal DNA-Binding Domain of Human Ku70. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (41): 38231–36.
- Zou L, Elledge J. 2003. Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* 300 (5625): 1542–48.