

## ABSTRAKT

Buňky v našem těle jsou každý den vystaveny poškození DNA vlivem endogenních a exogenních faktorů. Schopnost buněk opravit poškozenou DNA je důležitá pro zachování genetické informace. Mezi nejvíce cytotoxické DNA léze patří dvojláknové zlomy DNA. Oxidační poškození DNA je jednou z nejčastějších lézí. Cílem této práce bylo prohloubit stávající znalosti molekulárních mechanismů opravy dvojláknových zlomů DNA a oxidačního poškození DNA.

Hlavním zdrojem oxidačního poškození buněk jsou reaktivní formy kyslíku, které jsou neustále generovány jako vedlejší produkty buněčného metabolismu. Jednou z nejčastěji vznikajících modifikací DNA je 7,8-dihydro-8-oxo-guanin (8-oxo-G), jež se během replikace chybně páruje s adeninem. Pokud toto poškození není opraveno, dochází k akumulaci bodových mutací. Oxidační poškození DNA je opravováno převážně vystřížením porušené báze, tzv. „base excision repair“ (BER). Při odstranění špatně inkorporovaného adeninu oproti 8-oxo-G dochází v prvním kroku k jeho vystřížení MutY DNA glykosylázou (MUTYH). Naše výsledky ukazují, že v následném kroku tohoto procesu opravy DNA WRN helikáza (WRN) fyzicky interaguje s polymerázou  $\lambda$  a stimuluje správné přiřazení cytosinu oproti 8-oxo-G a následnou syntézu DNA vedoucí k opravě poškozené DNA.

Oprava dvojláknových zlomů DNA má dvě hlavní větve: homologní rekombinaci (HR) a nehomologní spojování konců (tzv. non-homologous end-joining, NHEJ). Zatímco HR je téměř bezchybný proces, NHEJ je proces vysoce náchylný k chybám. V rámci HR existují dvě paralelní dráhy, a to tzv. „synthesis-dependent strand-annealing“ (SDSA) a kanonická oprava dvojláknových zlomů DNA (DSBR). Zatímto výsledkem DSBR může být tzv. „crossover“ (CO), kdy dochází k výměně části DNA mezi sesterskými chromatidami, nebo „non-crossover“ (NCO), kdy k této výměně nedochází, v případě SDSA jsou produkty vždy NCO. Tvorba CO je nežádoucí, protože může vést k přesmykům v chromozomech a ztrátě heterozygotnosti. V mitotických buňkách proto většina oprav probíhá mechanismem SDSA.

Molekulární podstata procesu, který napomáhá SDSA oproti DSBR není v lidských buňkách dobře prostudována. Lidské helikázy RECQ5 a FBH1 byly navrženy jako funkční orthology Srs2 helikázy, která podporuje SDSA v kvasinkách. Zjistili jsme, že RECQ5 helikáza dokáže zabránit nelegitimní tvorbě RAD51 nukleofilamentu během post-synaptické fáze SDSA a tím podporuje

tvorbu NCO produktů. Na základě tohoto zjištění navrhuje, že funkčním orthologem Srs2 v lidských buňkách je právě RECQ5 helikáza.

V kvasinkách existují dvě oddělené dráhy resekce DNA závisící na exonukleáze 1 (Exo1) a Dna2 ve spojení s Sgs1. V lidských buňkách byla navržena Bloom (BLM) helikáza jakožto funkční ortholog Sgs1 helikázy spolupracující s DNA2 v tomto procesu. Naše výsledky ukazují, že DNA2 může spolupracovat v lidských buňkách jak s BLM, tak i s WRN helikázou. Další experimenty naznačují, že BLM helikáza je v tomto procesu vázána v komplexu s TopIII $\alpha$ -RMI1-RMI2.

Aktivace *Ataxia telangiectasia* and Rad3 related (ATR) kinázy po indukci dvojvláknových zlomů v buňce je závislá na resekci DNA. Během našeho výzkumu jsme identifikovali MSH2-MSH3 komplex jako součást signální dráhy ATR. Ukázali jsme, že MSH2-MSH3 se váže na konce dvojvláknových zlomů DNA v závislosti na resekci a stimuluje opravu těchto dvojvláknových zlomů DNA homologní rekombinací. Naše výsledky naznačují, že MSH2-MSH3 komplex se váže na sekundární struktury přítomné v jednovláknové DNA i po navázání replikačního proteinu A a rekrutuje ATR-ATRIP komplex, čímž stimuluje aktivaci ATR a opravu DNA.