



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc

V Olomouci 12. září 2017

**Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská genetika**

**Mgr. Eva Veselá**, vědecká pracovnice Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP, studentka prezenční formy doktorského studijního programu *Lékařská genetika* na LF UP v Olomouci.

Téma práce: „Application of quantitative image analysis for studies of cellular response to DNA damage“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 12. září 2017 v 8:30 hod.

**Komise:**

předseda: prof. MUDr. Martin Procházka, Ph.D. .... ✓

místopředseda: doc. Mgr. Radek Vodička, Ph.D. .... ✓

členové: prof. MUDr. Jiří Šantavý, CSc. .... ✓

doc. MUDr. Alena Šantavá, CSc. .... ✓

MUDr. Renata Gaillyová, Ph.D. .... ✓

**Oponenti:**

prof. Simon Holst Bekker-Jensen ..... OHLUŠEN ✓

Department of Cellular and Molecular Medicine, Faculty of Health and Medical Sciences, Copenhagen, Denmark

MUDr. Zdeněk Hodný, CSc. .... ✓

Ústav molekulární genetiky AV ČR v Praze

**Školitel:** Mgr. Martin Mistrík, Ph.D. .... ✓

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Uchazeč odpověděl na připomínky a dotazy oponentů.

Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo 5... členů komise. Kladně hlasovalo 5... členů, záporně 0... členů, neplatných lístků bylo odevzdáno 0... .

**Usnesení:**

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **Mgr. Eva Veselá** obhájila disertační práci a doporučili udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

.....  
prof. MUDr. Martin Procházka, Ph.D.  
předseda komise

Otázka:

Část teoretického úvodu je věnována fragilním místům, ačkoliv tyto se neobjevují ve výsledkové části. Kromě běžných (common) fragilních míst jsou v literatuře uváděna také vzácná fragilní místa. Jaký je mezi nimi rozdíl? Přispívají vzácná fragilní místa k nestabilitě genomu? Uvádí se rovněž, že běžná fragilní místa jsou v savčích genomech konzervována. Jaký by pro to mohl být důvod? V diskuzi je vysloven předpoklad, že XPC se účastní incise problematických sekundárních struktur DNA (tj. afidikolinem aktivovaných fragilních míst). Jakým experimentálním přístupem by bylo možné tento předpoklad prověřit?

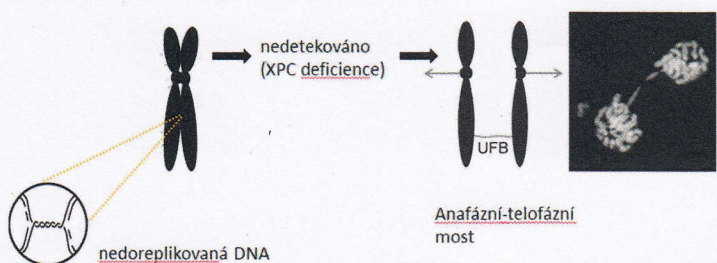
Odpověď:

Jedná se o různé fenomény, oba však způsobují problémy při replikaci DNA a oba způsobují nestabilitu genomu. Běžná fragilní místa (CFS) se objevují u všech jednotlivců, k jejich expresi dochází s různou frekvencí mezi jednotlivci i mezi různými buněčnými typy. Vzácná fragilní místa (RFS) se vyskytují sporadicky u cca 5% populace, obsahují mikro a mini-satelitní sekvence (jejich expanze vede k fragilitě alel) některá jsou příčinou dědičných onemocnění (např. fragilní chromosom X). Zvýšený počet repetice RFS přispívá k nárůstu počtu repetice v těchto místech. Nejsou asociována s velkými přeskupeními genetické informace nebo rakovinným bujením. CFS jsou asociovány s vyšší mírou DNA poškození, velkými přeskupeními, delece a výskytem preneoplastických lézí a rakovinného bujení.

Genomická nestabilita asociovaná s CFS jde proti logice ponechání těchto míst v genomu. Existuje několik teorií, proč tato místa v genomu jsou. Teorie 1: CFS fungují jako sensory nesprávně opravených lézí, obzvláště po replikačním stresu (RS). V těchto místech pak dochází ke zlomům, nárůstá poškození DNA a v případě funkčních kontrolních mechanismů je spuštěna senescence, příp. apoptóza, čímž je buňkám s neopravitelnou DNA znemožněna replikace. Teorie 2: Jedná se o místa možné integrace virální DNA. Možnost zachovat si schopnost modifikovat genom a indukci mutací, je nezbytným nástrojem evoluce.

Ověření funkce XPC proteinu:

1. Pull-down assay: buňky ovlivněné APH – afinitní chromatografie, na koloně protilátka proti XPC – izolace DNA – sekvenování
  2. enzymatický *in vitro* test: rekombinantní XPC protein, specifická DNA sekvence (schopná utvořit sek. strukturu) – gelová elektroforéza DNA fragmentů, může být komplikované (správné pufrы, dalších interagujících proteinů, histony)
  3. detekce a analýza anafázních-telofázních mostů (ultra-tenké mosty, UFB)
- schéma vzniku UFB s možnou rolí XPC:



podle German et al., 2014, Pampalona 2016

### Otázka:

Na straně 29 je uvedeno "Then, under-replicated regions enter G2 and may even remain undetected and enter mitosis." Pokud dojde k dělení buňky s nedoreplikovanou DNA, jaký je osud nedoreplikované DNA v dceřinných buňkách?

### Odpověď:

Je možné, že dojde k nerovnoměrnému rozdělení genetické informace do dceřinných buněk, mohou vzniknout zlomy. Na dvouvláknové zlomy se následně v G1 fázi buněčného cyklu váže protein 53BP1. K opravě zlomů pak může dojít pomocí NHEJ opravné dráhy (nehomologní spojování komců) v G1 fázi, nebo pomocí HR opravné dráhy (homologní rekombinace) v S fázi. Přesný mechanismus prozatím není objasněn, pravděpodobně jsou však tyto léze opraveny až v následující S fázi pomocí HR.

### Otázka:

Signál akumulující se v místě poškození je v populaci buněk na obrázku 4a velmi heterogenní (i přesto, že kultura buněk byla získána klonální expanzí). Koreluje tato heterogenita s variabilní expresí reportéru nebo zde hraje roli ještě jiný faktor?

### Odpověď:

Tento fenomén nebyl testován. Snažila jsem se o eliminaci vlivu heterogenního signálu několika přístupy:

1. aktivní sledování fluorescence v buňkách – srovnávání experimentů pouze při podobných množstvích reportérového proteinu
2. udržování co nejnižší míry heterogenity kultivačními podmínkami – buňky byly drženy v kultuře vždy jen 5-6 týdnů, poté byla rozmrazena nová zásobní vialka
3. způsobem analýzy – signál kumulující se v místech poškození byl vztažen k celkovému signálu v jádře

Používané buněčné linie byly získány tak, že exprimují endogenní protein a navíc fluorescenčně značený reportérový protein. Expresí fluorescenčně značeného proteinu tedy může být ovlivněna, např. fází buněčného cyklu či genetickým pozadím.

MDC1 protein je známý tumor supresor. U několika typů nádorů byla pozorována jeho snížená hladina a také jev, kdy zvýšení MDC1 proteinu vedlo ke zpomalení proliferace nádorových buněk.

53BP1 protein by mohl vykazovat podobný jev jako obdobný jev jako MDC1 protein. 53BP1 byl také popsán jako možný tumor supresor (např. pro buňky rakoviny prsu). Vyšší hladina 53BP1 snižuje schopnost buněk tvořit nádory (myší xenografty).

Dovolím si tedy vyslovit předpoklad, že použitá U2OS nádorová linie může mít sklon aktivně snižovat množství tumor supresorového proteinu a tím postupem času vykazovat slabší fluorescenční signál.

FANCD2 protein byl exprimován v linii PD20F, jedná se o lymfoblasty deficientní v proteinu FANCD2. Do této linie byl vnesen ektopicky exprimovaný značený FANCD2. Tato linie vykazovala menší heterogenitu než U2OS linie.

#### Otázka:

Časový sběr na obrázku 4c naznačuje ztrátu paralelity signálu s postupujícím časem od ozáření. Vzhledem k tomu, že se vzájemná poloha buněk příliš nemění, lze tento jev vysvětlit spíše rotací jádra než buněčnou lokomocí. Poloha jádra v buňce je důležitá pro genovou expresi. Je něco známo o tom, že by poškození DNA vedlo ke změně rotaci jádra?

#### Odpověď:



Rotace jádra není v literatuře popsána v souvislosti s DNA poškozením. Je popsána mobilita chromatinu a jeho remodelace. Tento jev by také mohl přispívat ke ztrátě paralelity signálu.

Studie provedená v MEF buňkách ukazuje, že mobilita chromatinu není ovlivněna dvouvláknovými zlomy (Kruhlak et al., JCB, 2006). Fokusy 53BP1 nevykazovaly vyšší mobilitu po UV záření ani  $\gamma$  záření. Nicméně samotný pohyb jádra i jeho rotace by mohly být DNA poškozením ovlivněny.

#### Otázka:

Při dostatečně 'detailním' skenování se jeví, že oblast jadérek je bez reportérového signálu (např. obrázek 6). Chromatinová precipitace protilátkou proti histonu gamaH2AX naznačuje (viz Urban et al. 2016, J Cell Biol 214(4): 401-415), že i na genech kódujících ribosomální RNA je přítomen fosforylovaný histon H2AX. Co by mohlo být příčinou této diskrepance? Je známo, jak rychle dochází k přesunu rDNA po jejím poškození na periferii jadérka při segmentaci?

#### Odpověď:

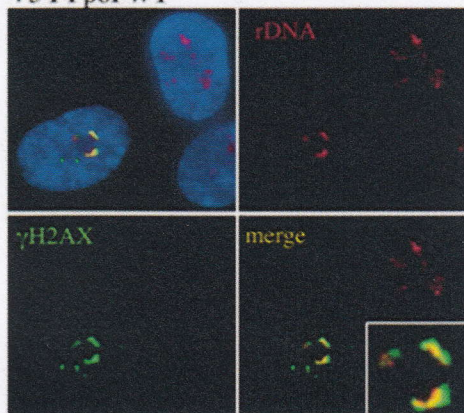
Fosforylovaný histon H2AX byl detekován v oblastech rDNA v několika studiích různými metodami jak je uvedeno na následujícím obrázku:

**IF studie** – van Sluis et al 2015, Genes Dev.,

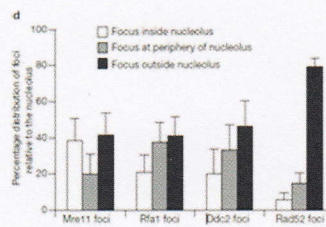
- $\gamma$ H2AX lokalizuje v oblastech s rDNA
- není detekován v jadérku

Torres-Rosell et. Al, 2011  
(kvasinky)  
1h bleomycinu

V5 I-PpoI WT



6h inkubace s restrikční  
endonukleasou PpoI

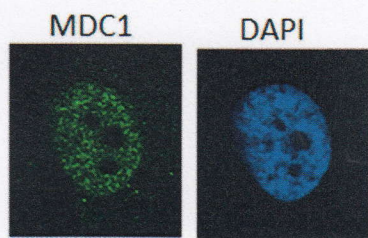


Moore et al, 2011

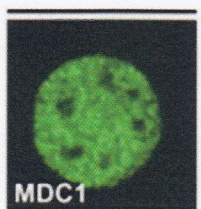
Transmisní elektronová mikroskopie  
reorganizace jadérka – 3-6h  
relokizace proteinů – (jadérové, odpověď  
na DNA poškození) – minuty po vzniku poškození

Řada dalších signalizačních a opravných proteinů však v jadérku detekována není. Navíc byla pozorována řada proteinů, které po poškození migrují pryč z oblasti jadérka. To je v souladu s pozorováním, že DNA poškození se přesouvá na okraj jadérka, kde probíhá oprava.

Protein MDC1 není detekovatelný v jadérku ani v nepoškozených buňkách, řada studií detekovala endogenní MDC1 protein pomocí IF metody - jadérka jsou bez signálu. V disertační práci používaná reportérová linie vykazuje podobné znaky jako IF barvení endogenního proteinu.



MDC1, IF staining, A549 cell line  
Sanz-Garcia, 2012, JBC



MDC1, IF staining, MEF cell line  
Stucki, 2005, Cell

Dovolím si tedy vyslovit předpoklad, že iniciační signalizace DNA poškození dochází v jadérku (např. fosforylace H2AX), nicméně přesun poškození na periferii je velmi rychlý a pozdější signalizační a mediátorové proteiny (např. MDC1) se již váží na poškození na periferii jadérka.

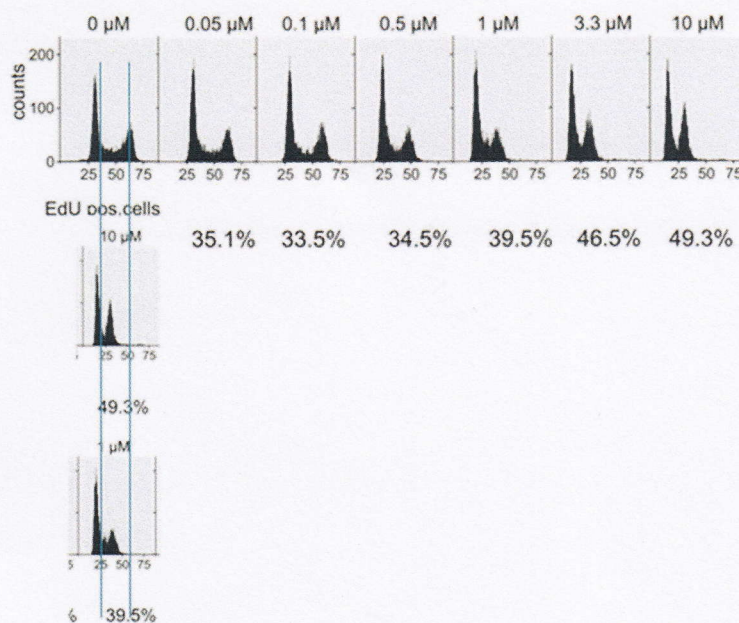
### Otázka:

Obrázek 7b ukazuje, že množství EdU-pozitivních (replikujících) buněk narůstá s koncentrací BrdU. Není tento výsledek vzhledem ke krátkému pulsu EdU (20 min - viz metody) a 24 hodinové kultivaci s BrdU překvapivý?

### Odpověď:

Barvení EdU ukazuje na kumulaci buněk v S fázi. Vyšší koncentrace BrdU pravděpodobně zpomalují replikaci DNA a buňky se kumulují v pozdní S fázi (viz obrázek, čáry označují hranice G1/S fáze a S/G2 fáze).

EdU barvení bylo provedeno z důvodu ověření, že dlouhodobá inkubace s BrdU nemění vazbu DNA na barvivo.



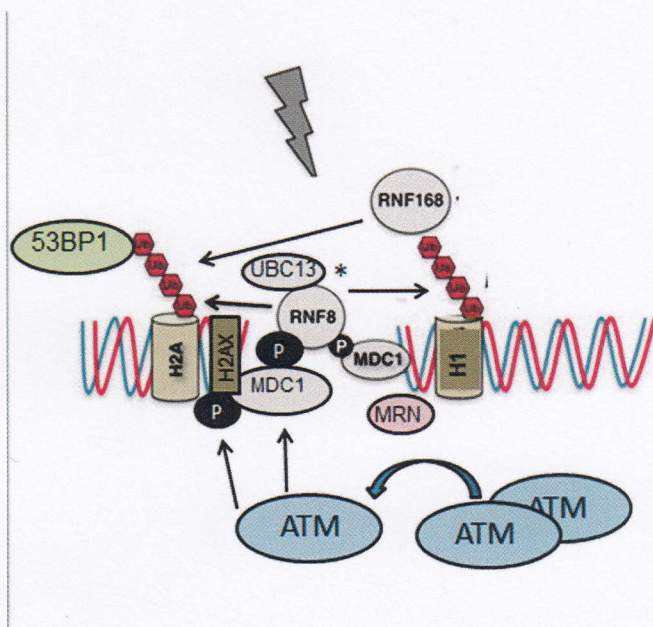
### Otázka:

AJ: At her defence, I suggest that the candidate gives a comprehensive explanation of how initial phosphorylation based signalling (ATM, MDC1 recruitment) is linked to ubiquitin signaling and subsequent 53BP1/BRCA1 recruitment. This complicated pathway is covered by a substantial body of literature.

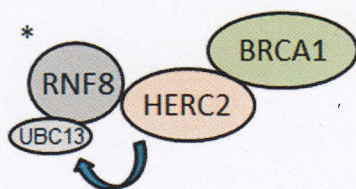
ČJ: Vysvětlete signální dráhy dvouvláknových zlomů s důrazem na post-translační modifikace. Jak je počáteční fosforylace propojena s následnou ubikvitinylací vedoucí k vazbě 53BP1, BRCA1 do míst poškození.

### Odpověď:

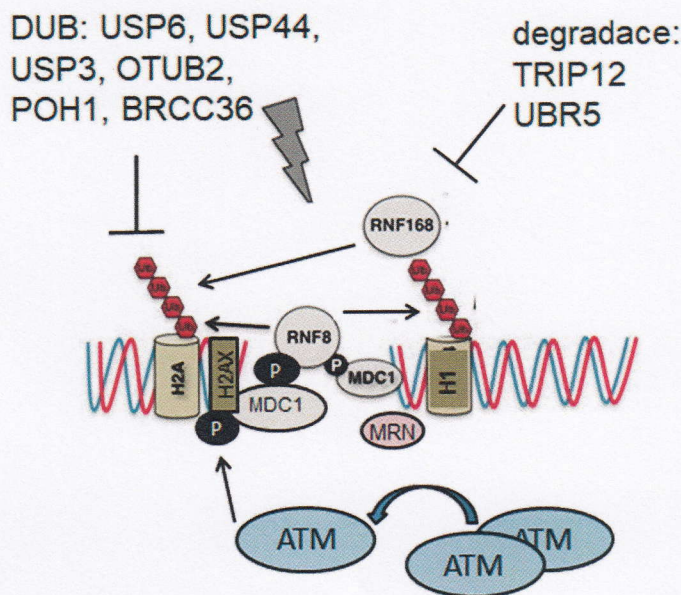
Dvouvláknový zlom je rozpoznán pomocí MRN komplexu, dochází k aktivaci ATM kinázy, tzn. jejímu rozpadu na monomer. ATM fosforyluje H2AX, který slouží jako platforma pro vazbu MDC1. MDC1 je po vazbě fosforylován a dále slouží jako platforma pro vazbu RNF8-ubikvitinligázy. RNF8 ubikvitinyluje histon H2 a H1, které slouží jako platforma pro vazbu RNF168-ubikvitinligázy. RNF8 a RNF168 ubikvitinylují další histony a tím vytváří místa pro vazbu dalších molekul. Ubikvitinylace histonu H2A na lysinu 13 a 15 je místem kam se váže protein 53BP1.



RNF8 dále interaguje s proteinem HERC2, který podporuje vazbu RNF8 a UBC13. UBC13 přímo interaguje s BRCA1.



Nárůst signálu signálu je regulován celou řadou deubikvitinylačních enzymů (DUB) a také pomocí proteinů TRIP12 a UBR5, které umožňují degradaci RNF8 a RNF168. Schéma regulace signalizace:



### Otázka:

AJ: At her defence, I suggest that the candidate discusses these results and tries to make sense of the underlying biology. One aspect could be the effects of ATM, ATR and DNA-PK inhibitors. Which of these kinases may and may not contribute to gamma-H2AX formation, and why does caffeine (an inhibitor of some of these kinases) not have any effect?

ČJ: Diskutujte efekty ATM, ATR a DNA-PK inhibitorů, které jste pozorovala ve výsledcích screeningu. Které z těchto kináz by mohly přispívat k tvorbě fokusů  $\gamma$ H2AX a proč kofein nevykazoval žádný efekt?

### Odpověď:

ATM, ATR, DNA-PK jsou hlavní kinázy aktivované po vzniku DNA poškození, obsahují doménu schopnou fosforylovat SQ-TQ motiv na cílových proteinech, všechny přispívají k tvorbě fokusů  $\gamma$ H2AX. ATM, DNA-PK jsou preferenčně aktivované po dvouvláknových zlomech, ATR je preferenčně aktivovaná jednovláknovou DNA, replikačním stresem. Kinázy se navzájem mohou zastupovat.

Odvozovat závěry z této pilotní studie by mohlo být zavádějící z několika důvodů: tímto způsobem dosud provedena dynamická studie signalizace DNA poškození v jednotlivých živých buňkách a míra inhibice enzymů nebyla před studií stanovena. Bylo by tedy potřeba provést další experimenty. Studie necílila na osvětlení mechanismů účinků látek, primárním cílem bylo zjistit, zda je metoda vhodná k vysoce-propustnému skrínigovému testování látek, tj. zda je schopná zachytit látky ovlivňující odpověď na DNA poškození.

Pokusila jsem se částečně adresovat vliv alespoň některých látek:

| cell line |           | U-2-OS-MDC1-GFP |       |         |       | U-2-OS-53BP1-GFP |       |         |       | PD20F-FANCD2-GFP |       |         |       | r |
|-----------|-----------|-----------------|-------|---------|-------|------------------|-------|---------|-------|------------------|-------|---------|-------|---|
| Target    | Compound  | Amp             | Tpeak | Relax30 | Relax | Amp              | Tpeak | Relax30 | Relax | Amp              | Tpeak | Relax30 | Relax |   |
| ATR       | VE-821    |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| CHK1      | LY2603618 |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| pan       | caffeine  |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| DNA-PK    | NU7026    |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| PARP      | olaparib  |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| ATM       | KU55933   |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| PLK1      | BI2536    |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| Aurora A  | MLN8237   |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| mTOR      | CC115     |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| Mre11     | mirin     |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |

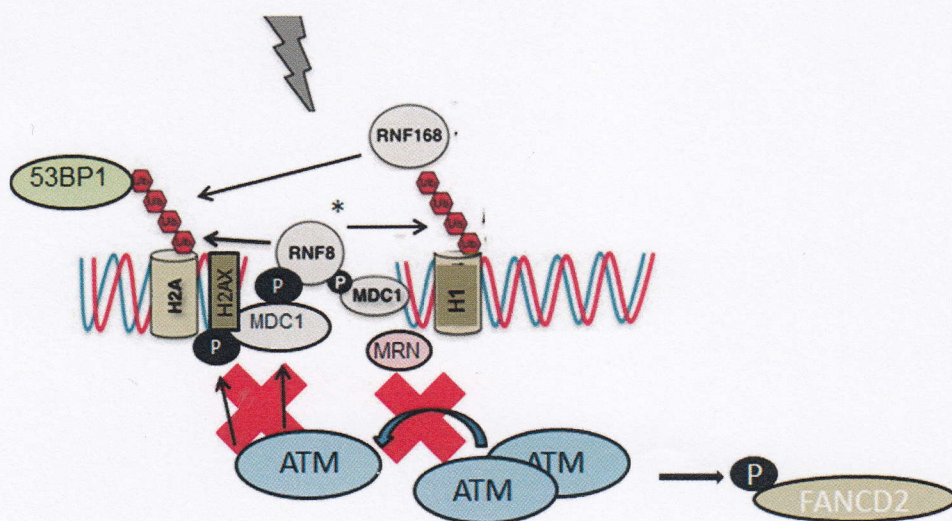
### ATM inhibitor

Vyžaduje delší čas potřebný k dosažení vazby maximálního množství proteinu (zvýšená hodnota Tpeak, červená barva). ATM kináza přímo fosforyluje MDC1 i FANCD2, při jeho inhibici tedy dochází ke zpomalení vazby proteinu. Vazba 53BP1 je na této fosforylaci také závislá nicméně 53BP1 se do míst poškození váže později a čas nutný k navázání maximálního množství proteinu je delší než u MDC1. Je tedy možné, že během tohoto času už další kinázy funkci ATM nahradí a inhibice ATM pak nemá na vazbu 53BP1 výrazný vliv.

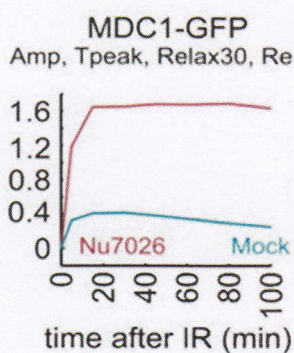
### ATR inhibitor

Přímo fosforyluje všechny sledované proteiny. U všech je Tpeak zvýšen (dochází ke zpomalení vazby proteinu do míst poškození).

Schéma inhibice ATM kinázy:



| cell line |           | U-2-OS-MDC1-GFP |       |         |       | U-2-OS-53BP1-GFP |       |         |       | PD20F-FANCD2-GFP |       |         |       | r |
|-----------|-----------|-----------------|-------|---------|-------|------------------|-------|---------|-------|------------------|-------|---------|-------|---|
| Target    | Compound  | Amp             | Tpeak | Relax30 | Relax | Amp              | Tpeak | Relax30 | Relax | Amp              | Tpeak | Relax30 | Relax |   |
| ATR       | VE-821    |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| CHK1      | LY2603618 |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| pan       | caffeine  |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| DNA-PK    | NU7026    |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| PARP      | olaparib  |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| ATM       | KU55933   |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| PLK1      | BI2536    |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| Aurora A  | MLN8237   |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| mTOR      | CC115     |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |
| Mre11     | mirin     |                 |       |         |       |                  |       |         |       |                  |       |         |       |   |



#### DNA-PK inhibitor

Nemá vliv na FANCD2 protein, což je v souladu s publikovanými pracemi, kde nebyly reportovány žádná fosforylační místa na FANCD2 proteinu. Oba proteiny mají zcela různé funkce – FANCD2 směřuje buňky k opravě pomocí HR, DNA-PK k opravě NHEJ. Výrazný efekt inhibice DNA-PK je možné pozorovat na proteinech MDC1 i 53BP1. Kináza přímo interaguje s oběma proteiny, inhibice zároveň výrazně zpomaluje opravu DNA poškození a MDC1 i 53BP1 jsou zadržovány v místech poškození.

#### Otázka:

Bylo by možné výsledky získané v souvislosti se studiem protein XPC využít v terapii některých onemocnění?

#### Odpověď:

V práci byla studována deficeience proteinu XPC při odpovědi na replikační stress. Protein XPC však hraje velmi důležitou roli v opravné dráze NER (nucleotide excision repair, oprava DNA vystřížením báze), deficeience tohoto proteinu vede k závažnému onemocnění Xeroderma Pigmentosum, které je spojeno s obrovskou sensitivitou na sluneční záření. Inhibice funkce tohoto proteinu by tedy byla užitečná pouze v případě cílené léčby, tj. cílené distribuce léčiva, např. do nádorových buněk.

Studium funkce XPC proteinu během replikačního stresu je prozatím na začátku. Možnost využití v klinické praxi vidím však spíše v diagnostice. Pokud by byl přesně znám mechanismus funkce XPC, mohlo by být užitečné stanovovat množství proteinu v rakovinových buňkách a na základě této informace, společně s dalšími charakteristikami nádoru volit optimální léčbu.

**Otázka:**

Nedávno byl představen koncept šamponu na vlasy, který by měl bránit vypadávání vlasů. Šampon by měl obsahovat velká množství kofeinu. Můžete zkusit vysvětlit, jakým způsobem by mohl kofein ovlivňovat vypadávání vlasů?

**Odpověď:**

Z hlediska DNA poškození by mohlo docházet k následujícímu jevu. V případě, že vypadávající vlasy jsou důsledkem signalizace DNA poškození v buňkách a tato signalizace je příčinou spuštění apoptózy, mechanismus kofeinu by mohl být následující. Kofein blokuje signalizaci DNA poškození inhibicí všech důležitých signálních proteinkináz, ATM, ATR i DNA-PK. Buňky by tedy nebyly po aplikaci šamponu schopné signalizovat DNA poškození, které vede ke spuštění apoptózy. V případě, že DNA poškození by nebylo takového rozsahu, aby ohrozilo přežití buňky, tato by mohla dále přežívat a vyživovat vlas.