

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Role PARP-1 proteinu v buňkách

Bakalářská práce

2022

Patricie Skřipská

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

The role of PARP-1 protein in cells

Bachelor thesis

2022

Patricie Skřipská

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Patricie Skřipská**  
Osobní číslo: **C18276**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Role PARP-1 proteinu v buňkách**  
Téma práce anglicky: **The Role of PARP-1 Protein in Cells**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši na téma PARP-1 protein a popište jeho roli v buňkách. Úvodní část práce zaměřte na popis a charakterizaci skupiny PARP proteinů a shrňte zároveň jejich funkce.
- 2) V hlavní části bakalářské práce se věnujte podrobnějšímu popisu struktury, významu a funkce PARP-1 proteinu. Zaměřte se zejména na úlohu PARP-1 proteinu v apoptotickém procesu a v opravě poškození DNA. V závěrečné části práce shrňte, jaké jsou možnosti využití inhibitorů PARP v léčbě nádorových onemocnění.
- 3) Pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce čerpejte z odborných článků publikovaných v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jiří Handl, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Pavlína Majtnerová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.**  
děkan

L.S.

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Role PARP-1 proteinu v buňkách jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27.6.2022

Patricie Skřipská

## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala RNDr. Jiřímu Handlovi, Ph.D. a Mgr. Pavlíně Majtnerové, Ph.D. za odborné vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat mému snoubenci, rodině a přátelům za jejich trpělivost a podporu.

## **ANOTACE**

Práce se zabývá rolí enzymu poly (adenosindifosfát-ribosa) polymerázy 1 v buňkách, jeho strukturou, aktivací a funkcí. Zkoumá zařazení PARPs enzymů mezi ostatní polymerázy a popisuje jejich vlastnosti a uplatnění v buněčných procesech v porovnání s PARP-1, u kterého dále studuje význam při apoptóze buňky a opravě poškozených úseků DNA. Dále se zabývá možnou léčbou nádorových onemocnění pomocí inhibice poly (adenosindifosfát-ribosa) polymerázy 1, a to včetně možných rizik.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Poly (adenosindifosfát-ribosa) polymeráza 1, DNA, apoptóza, rakovina, PARPs inhibitory.

## **TITLE**

The role of PARP-1 protein in cells

## **ANNOTATION**

This thesis examines the role of the enzyme poly (adenosinediphosphate- ribose) polymerase 1 in cells, its structure and functions. Investigates the classification of PARPs enzymes among other polymerases and describes their properties and applications in cellular processes compared to PARP-1, in which the importance of cell apoptosis and repair of damaged DNA segments is further studied. It also deals with the possible treatment of cancer by inhibition of poly (adenosinediphosphate-ribose) polymerase 1, including possible risks.

## **KEYWORDS**

Poly (adenosinediphosphate-ribose) polymerase 1, DNA, apoptosis, cancer, PARPs inhibitors.

# OBSAH

ÚVOD.....	12
1. POLYMERÁZY .....	13
2. POLY (ADENOSINDIFOSFÁT-RIBOSA) POLYMERÁZY .....	14
2.1 ADP-ribosylace .....	14
2.2 Proteiny PARPs.....	16
2.2.1 PARPs 1-4.....	16
2.2.2 Tankyrázy .....	16
2.2.3 Ostatní PARPs .....	17
3. PARP-1.....	19
3.1 Struktura proteinu PARP-1 .....	19
3.1.1 Zinkové prsty .....	20
3.1.2 Doména na C-konci tumor supresorového genu nádoru prsu.....	21
3.1.3 WGR doména .....	21
3.1.4 Katalytická doména .....	21
3.2 Aktivace PARP-1 .....	23
3.3 Funkce PARP-1.....	25
4. ROLE PARP PŘI APOPTÓZE BUŇKY .....	26
4.1 Apoptóza .....	26
4.2 Funkce PARP-1 při apoptóze.....	27
4.2.1 Štěpení PARP-1 pomocí kaspázy 3 .....	28
5. PARP-1 V LÉČBĚ NÁDORŮ .....	29
5.1 Patogeneze nádorů .....	29
5.1.1 Vznik nádorů.....	30
5.1.2 Prevence vzniku nádorů.....	31
5.2 Léčba nádorového onemocnění.....	32
5.3 Léčba nádorového onemocnění inhibitory PARP-1 .....	32
5.3.1 Princip léčby nádorového onemocnění.....	33
5.3.2 Současné PARP-1 inhibitory .....	34
5.3.3 Rezistence inhibitorů PARP-1 .....	36
ZÁVĚR .....	37
Seznam použité literatury .....	38



## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Strukturní vzorec ADP-ribosy.....	15
Obrázek 2: Uspořádání podjednotek enzymu tankyrázy. ....	17
Obrázek 3: Uspořádání podjednotek enzymů PARP-2 a PARP-3.....	18
Obrázek 4: PARP-1 enzym a uspořádání podjednotek.....	19
Obrázek 5: Aktivace PARP-1.....	24
Obrázek 6: Vznik nádorové tkáně. ....	31

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

<b>AIF</b>	Faktor indukující apoptózu
<b>ADP</b>	Adenosindifosfát
<b>AMK</b>	Aminokyselina
<b>ATP</b>	Adenosintrifosfát
<b>ART</b>	(Adenosindifosfát-ribosyl) transferáza
<b>BAD</b>	Benzamidadenin dinkukleotid
<b>BAK</b>	Homologní antagonist B-buněčného lymfomu
<b>BER</b>	Vystřížení poškozené báze
<b>BCL-2</b>	B-buněčný lymfom
<b>BRCA</b>	Tumor supresorový gen nádoru prsu
<b>BRCT</b>	Doména na C-konci tumor supresorového genu nádoru prsu
<b>DSB</b>	Dvouřetězcové zlomy
<b>FADD</b>	Fas asociovaná doména
<b>FASL</b>	Fas ligand
<b>HD</b>	Helikální subdoména
<b>HPF1</b>	Histonový PARylační faktor 1
<b>HR</b>	Homologní rekombinace
<b>MAR</b>	Mono (adenosindifosfát-ribosa)
<b>MARylace</b>	Mono (ADP)-ribosylace
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Oxidovaná forma koenzymu nikotinamidadenindinukleotidu
<b>NHEJ</b>	Nehomologní spojování konců
<b>PAR</b>	Poly (adenosindifosfát-ribosa)
<b>PARP-1</b>	Poly (adenosindifosfát-ribosa) polymeráza 1
<b>PARP</b>	Poly (adenosindifosfát-ribosa) polymeráza
<b>PARPs</b>	Poly (adenosindifosfát-ribosa) polymerázy
<b>PARylace</b>	Poly (ADP)-ribosylace
<b>SSB</b>	Jednořetězcové zlomy
<b>TNF</b>	Tumor nekrotizující faktor

<b>WGR</b>	Podjednotka PARP obsahující tryptofan, glycin a arginin
<b>XRCC1</b>	Rentgenově opravný křížově se doplňující protein 1
<b>Zn 1,2,3</b>	Zinkové prsty 1, 2, 3

## ÚVOD

Poly (adenosindifosfát-ribosa) polymeráza patří do velké rodiny enzymů, které v organismu působí jako signální molekuly. Jejich největší význam spočívá v opravě deoxyribonukleové kyseliny. DNA je esenciální molekula nesoucí genetickou informaci daného jedince, která se však v průběhu života opotřebovává a je nutné ji pro její zachování neustále opravovat. Jedním z členů skupiny enzymů označovaných jako polymerázy je poly (adenosindifosfát-ribosa) polymeráza 1 (PARP-1). Přítomnost tohoto enzymu indikuje poškozené úseky DNA a tím se podílí na údržbě genetického materiálu. Samotný PARP-1 nestačí k opravě DNA. Buňky jej ale potřebují, aby signalizoval poškozené části DNA a jeho vlastní přítomnost umožňuje opravným enzymům vykonávat jejich funkci. Účastní se opravy jednovláknových a dvouvláknových zlomů a zároveň polymerizuje ADP-ribosu, kterou připojuje k cílovým proteinům, včetně histonů a proteinů, které se účastní opravy DNA. Díky své struktuře využívá reverzibilní posttranslační modifikaci k tvorbě proteinových komplexů účastnících se reparačních mechanismů genetické informace.

PARP-1 také hraje významnou roli při apoptóze buňky. Z tohoto důvodu se považuje za vhodného kandidáta při léčbě nádorů, neboť se jeho inhibice jeví jako účinný a šetrný nástroj pro terapii rakoviny. Práce představuje doposud zjištěné inhibitory a porovnává jejich rozdílné vlastnosti a dopady na pacienta. V závěru jsou shrnuty zjištěné skutečnosti a předkládá se otázka rezistence při budoucím využití PARPs-1 inhibitorů v medicíně.

# 1. POLYMERÁZY

Polymerázy jsou enzymy katalyzující polymeraci deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Obecně se o existenci enzymů dozvídáme již v 19. století, kdy byl objeven první enzym amyláza. Pojem enzym byl poprvé použit v roce 1877 Wilhelmem Kühnem. Tímto termínem popisoval chemikálii, která umožňovala průběh reakce, aniž by došlo ke změně její struktury<sup>[1]</sup>. Dnes víme, že se jedná o molekuly spadající do zvláštní třídy proteinů, které jsou schopny se specificky vázat na tzv. substrát a tím katalyzovat reakci. U chemické reakce je nezbytné dosáhnout aktivační energie, aby mohla správně proběhnout. V některých případech je ovšem zapotřebí přítomnost specifické látky, katalyzátoru. Z tohoto důvodu jsou enzymy podstatnou součástí organismu, protože jsou schopny vést reakci ve více krocích. Díky tomu umožní snížení hladiny aktivační energie a celkově nižší energetickou náročnost děje, nebo zajistí, aby reakce vůbec proběhla. Tímto se enzymy řadí k velice účinným katalyzátorům v těle. Jejich selektivita také způsobuje, že reakce jsou často specifické a pro jednotlivé pochody v těle jsou tedy nutné různé enzymy. To je dáno aktivním místem každého enzymu. Po ukončení reakce enzymy zůstávají v nezměněné podobě a mohou tak dále plnit svou funkci<sup>[2]</sup>.

Enzymy polymerázy jsou pojmenovány dle specifické reakce – polymerace, kterou katalyzují syntézu polymerů či nukleových kyselin. Mezi nejznámější polymerázy patří např. DNA polymerázy a ribonukleové kyseliny (RNA) polymerázy. Tyto enzymy jsou primárně zodpovědné za uchování a replikaci DNA a opravu nukleových kyselin. Nacházejí se převážně v jádře buňky a v mitochondriích. Potřebují ke své funkci DNA, podle které jsou schopny syntetizovat nový komplementární řetězec. DNA polymerázy jsou dále zodpovědné za všechny replikace během buněčného dělení. Můžeme je dále klasifikovat do šesti tříd A, B, C, D, X a Y. Další kategorií polymeráz jsou reverzní transkriptázy neboli RNA dependentní DNA polymerázy<sup>[2][3]</sup>.

Polymerázy jsou běžně využívány také v rámci vyšetřovacích metod ve zdravotnictví při vývoji polymerázové řetězové reakce, dnes stále častěji využívané, např. i v souvislosti s diagnostikou RNA viru SARS-Cov-2, původcem onemocnění covid-19. Pozoruhodná je také rychlost těchto enzymů, kdy v závislosti na typu polymerázy dokážou polymerovat až tisíce nukleotidů za sekundu s minimální chybou<sup>[4]</sup>.

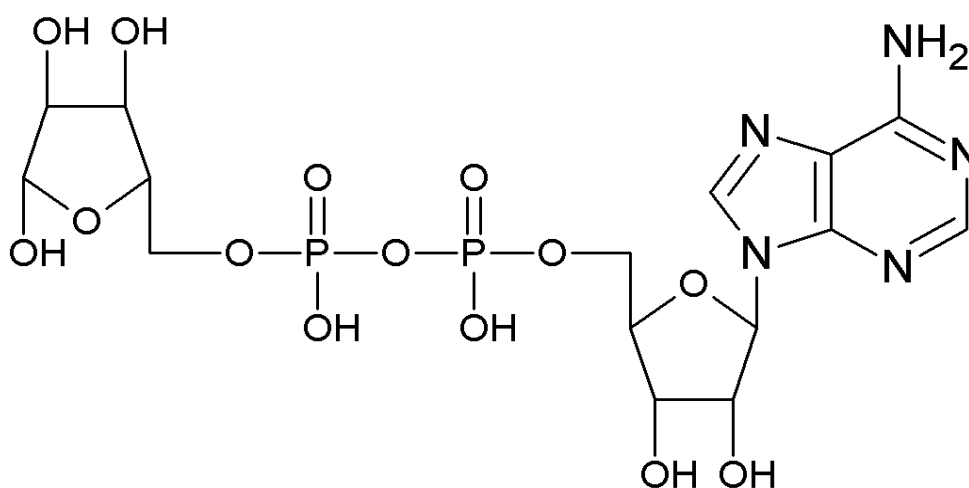
## 2. POLY (ADENOSINDIFOSFÁT-RIBOSA) POLYMERÁZY

Poly (adenosindifosfát-ribosa) (PAR) je produktem posttranslační modifikace a důležitou signální molekulou v jádře buňky. Tento biopolymer je syntetizován enzymy, známými jako poly (adenosindifosfát-ribosa) polymerázy (PARP). V lidském organismu se vyskytuje sedmnáct PARP polymeráz (PARPs), které v eukaryotické buňce zastávají rozdílné úlohy v závislosti na jejich struktuře a funkci. Většina PARPs má společnou katalytickou doménu, která umožňuje přenos mono (adenosindifosfát-ribosy) (MAR) a PAR na různé proteinové receptory nebo se mohou vázat na DNA. Pouze pět enzymů z této skupiny, PARP-1, PARP-2, PARP-3 a tankyrázy PARP-5a a PARP-5b jsou však považovány za pravé PARPs enzymy, jelikož přímo syntetizují PAR, přičemž zbytek katalyzuje pouze MAR posttranslační modifikaci. Tento proces je důležitý pro regulaci mnoha pochodů v lidské buňce, například pro opravu DNA, transkripci, reakci buňky na stres a apoptózu. PARPs potřebují ke správné funkci přítomnost oxidované formy nikotinamidadeninukleotidu ( $\text{NAD}^+$ ) a významně dokáží ovlivnit množství tohoto substrátu v buňce<sup>[5][6]</sup>. Nejdůležitější enzym pro syntézu PAR je PARP-1. I když zastává stejnou roli jako ostatní PARPs, díky své struktuře je schopen vykonávat svou primární funkci nejefektivněji<sup>[5]</sup>.

### 2.1 ADP-ribosylace

ADP-ribosylace je reakce, při níž mohou vznikat monomery nebo polymery ADP-ribosy v závislosti na podmínkách, při kterých tato reakce probíhá. Struktura ADP-ribosy je znázorněna na obrázku 1. ADP-ribosylace je katalyzovaná polymerázami, které přenáší monomerní jednotky či větvené polymery ADP-ribosy na cílové buňky pomocí glykosidické vazby<sup>[6]</sup>. Některé PARPs jsou schopny pouze syntézy MAR, většina z nich však dokáže syntetizovat PAR, a to v množství až 200 jednotek. Všechny jsou ale schopné regulovat funkci cílových proteinů pomocí reverzibilní posttranslační modifikace PAR a MAR, která je účelná hlavně při opravě DNA. Často bývá posttranslační modifikace limitovaná pro určité typy aminokyselin (AMK), které mají podobné funkční skupiny. Ovšem všechny reakční AMK je možné ribosylovat<sup>[5][7]</sup>. aby bylo možné tvořit ADP-ribosové jednotky, je nutná přítomnost  $\text{NAD}^+$ . Jeho množství je spjato produkcí adenosintrifosfátu (ATP). Ve své oxidované formě slouží v buňkách jako elektronový akceptor a zároveň jako dárce elektronů v redukované formě. Je také substrátem mnoha enzymů v těle včetně (ADP-ribosyl) transferázy (ART). Reakce spočívá ve štěpení N-glykosidické vazby  $\text{NAD}^+$ , během které je přemístěna molekula ADP-ribosy a nikotinamidová skupina, kde následuje adice nukleofilní skupiny<sup>[8]</sup>. Touto reakcí

je pak možné přenést zbytek ADP-ribosy z  $\text{NAD}^+$  na cílový substrát<sup>[6]</sup>. Jelikož je  $\text{NAD}^+$  nezbytné pro výrobu MAR a PAR, je důležitá jeho resyntéza v těle, aby se zabránilo snižování koncentrace této molekuly.  $\text{NAD}^+$  může být syntetizováno z AMK L-tryptofanu, nebo z kyseliny nikotinové, poslední krok syntézy je katalyzovaný enzymy adenylyltransferázami. Jeho produkce souvisí s množstvím a rozdílnou potřebou distribuce v různých tkáních. Při ADP ribosylaci se spotřebovává velké množství  $\text{NAD}^+$  na tento úbytek může tělo reagovat jeho zvýšenou výrobou<sup>[9]</sup>.



Obrázek 1: **Strukturní vzorec ADP-ribosy.**

ART enzym může katalyzovat dvě rozdílné reakce, a to mono (ADP)-ribosylaci (MARylaci) a poly (ADP)-ribosylaci (PARylaci). PARylace byla původně objevena jako patogenní mechanismus prokaryot produkujících toxiny. Reakce se nazývá posttranslační modifikace a může nastat kdykoliv během života proteinu. Posttranslační modifikace stabilizuje konformaci a reguluje funkce buněk, dodává nové vlastnosti a přispívá k imunitnímu rozpoznávání<sup>[6]</sup>. MARylace je fylogeneticky starší, reverzibilní posttranslační modifikace proteinů, při které se MAR přes  $\text{NAD}^+$  váže na specifický protein se současným uvolněním nikotinamidu. Mezi cílové molekuly patří AMK, které se mohou modifikovat pomocí ART, například arginin, glutamát, cystein či modifikovaný histidin, tvořící postranní řetězce nalézající se na hostitelských buňkách. Dále se mohou modifikovat histony nebo malé molekuly včetně částí DNA a RNA. ART se obvykle váže na cysteinové zbytky na povrchu monocytů, které následně modifikuje MAR. Tato reakce je specifická pro konkrétní AMK. MARylace je pak méně typická pro modifikaci nukleárních proteinů v eukaryotických buňkách včetně kvasinek, kde se setkáváme spíše se vznikem modifikovaných PAR jednotek. Bakterie ji naopak využívají běžně<sup>[9]</sup>.

## 2.2 Proteiny PARPs

Poprvé byly proteiny PARPs popsány roku 1960 Paulem Mandelem, který pozoroval syntézu polyadenylové kyseliny po přidání nikotinamid mononukleotidu do extraktu potkaních jater. Roku 1980 se zjistilo, že PARP-1 se aktivuje poškozením DNA<sup>[9][10]</sup>.

Nejprve se předpokládalo, že hlavní funkce PARP-1 byla oprava vystřížením jediné chybné báze (BER) a jednořetězcových zlomů (SSB). Později bylo prokázáno, že PARP-1 plní v buňce mnohem více úloh. Dlouhé roky se věřilo, že PARP-1 je jediný, který je schopný PARylace. Nakonec vyšlo najevo, že další PARPs jsou také schopny této reakce. Patří sem PARP-2, PARP-3 a tankyrázy. Ostatní PARPs už jsou schopny pouze MARylace. Po rozluštění krystalické struktury enzymu se zjistilo, že PARP-1 patří do velké skupiny PARPs proteinů. v současné době je známo celkem sedmnáct PARPs<sup>[9][10]</sup>.

### 2.2.1 PARPs 1-4

Mezi PARPs, které se podílí na regulaci poškození DNA patří PARP-1, PARP-2 a PARP-3. Přestože mají stejnou úlohu, tyto enzymy se navzájem částečně liší ve své struktuře. Sdílí společnou katalytickou doménu a C-koncovou doménu tryptofan glycin arginin (WGR). Odlišná je jejich N-koncová doména. Zatímco PARP-2 a PARP-3 využívají pro napojení se na DNA svou WGR doménu, PARP-1 má navíc tři zinkové prsty<sup>[5]</sup>. Za určitých podmínek je PARP-4 schopen PARylace, ovšem jeho hlavní funkcí je MARylace, pomocí které se podílí na transportu a regulaci proteinů. Jeho struktura je nicméně velice podobná PARP-2 a PARP-3. Enzymy jsou ve značné míře distribuovány v jádře buňky. PARP-4 a tankyrázy jsou pak jediné enzymy, které se kromě jádra nachází i v cytoplasmě<sup>[9]</sup>.

### 2.2.2 Tankyrázy

Tankyrázy jsou skupina enzymů řadících se mezi PARPs proteiny. Přesněji se jedná o PARP-5a a PARP-5b<sup>[5]</sup>. Struktura těchto tankyráz je znázorněna na obrázku 2. Jsou tvořeny z pěti opakujících se ankyrin jednotek (ARC), sterilního alfa motivu (SAM) a katalytické domény (CAT), která obsahuje ART pro syntézu PAR. Oproti PARP-1 neobsahují helikální doménu (HD) a jsou z velké části dostupné pro interakci s NAD<sup>+</sup> substrátem. Regulační mechanismy se nachází v ARC a SAM doménách. ARC také mohou interagovat s dalšími proteiny, například s telomerním opakujícím faktorem 1 (TRF1), proteinem nukleárního mitotického aparátu a signálním proteinem  $\beta$  kateninem<sup>[11]</sup>. Tankyrázy mají význam převážně pro telomery buněk. Hrají klíčovou roli v signalizaci  $\beta$  kateninového systému důležitého



pro regulaci buněčné proliferace. Katalytická funkce tankyráz je spojená s posttranslační modifikací PAR i dalšími funkcemi jako např. označení proteinů, které mají být později rozloženy. Váží modifikovanou PAR s tumorsupresorovým proteinem axinem. Ten je součástí  $\beta$  kateninového komplexu, který v buňce ovlivňuje genovou transkripci<sup>[5]</sup>. Poly ADP-ribosylace zprostředkovaná tankyrázami váže PAR na TRF1, který je následně uvolněn z telomer. Poté dojde k rozkladu TRF1, což má za následek zpřístupnění telomer buněk telomerázám. Avšak pokud dojde k inhibici tankyráz, TRF1 se nemůže rozkládat a tím je znemožněna oprava telomer. Bez mechanismů, které by opravovaly telomery může při následných mitózách buněk docházet až k degradaci genetické informace. V případě, že buňky zcela postrádají tankyrázy, vykazují mnohem častější vady mitotického vřeténka, což vede k rychlejšímu zániku buňky<sup>[11]</sup>.



Obrázek 2: **Uspořádání podjednotek enzymu tankyrázy.** Enzym obsahuje pět zřetězených ankyrin jednotek (ARC). Na ně navazuje sterilní alfa motiv (SAM). Reakce probíhají na poslední, katalytické doméně tankyrázy (CAT) (upraveno dle [5]).

### 2.2.3 Ostatní PARPs

Ne všechny doposud zmíněné PARPs jsou schopny se podílet na opravě DNA, či na mitóze buňky. Trojice těchto enzymů, PARP-7, PARP-12 a PARP-13, se váže na RNA přes své zinkové prsty, které obsahují tři cysteinové AMK následované histidinem sloužícím ke koordinaci zinkového iontu, a tedy ke stabilizaci celé domény<sup>[7]</sup>. PARP-7 obsahuje pouze jednu zinkovou doménu, zatímco PARP-12 a PARP-13 mají čtyři zinkové domény. To značí, že zmíněné dva enzymy s větším počtem vazebných domén lépe reagují na RNA zlom. K napojení na RNA je potřeba dvou dimerů PARP enzymů. Tyto dimery jsou důležité pro funkci proteinů, které se váží na RNA a jsou hlavním cílem modifikace ADP-ribosou. Zároveň PARPs enzymy mohou zastat roli jako cílové proteiny pro pozdější modifikaci. Kromě PARP-7, PARP-12 a PARP-13 mohou tuto roli zastávat PARP-10 a PARP-14, jelikož jsou také schopny rozpoznávat RNA a jako PARP-7 obsahují pouze jednu zinkovou doménu k navázání na jedno vláknovou šroubovici. Přispívají k syntéze proteinů, regulaci metabolismu ribozomální a mediátorové RNA<sup>[7]</sup>.

PARPs proteiny zastávají důležitou roli také při buněčném stresu. Pokud je buňka vystavena extrémním tepelným podmínkám, oxidativnímu vlivu nebo virové infekci, dochází ke globálnímu zpomalení translace proteinů za pomoci cytoplasmatických stresových granul. Proteiny vázající RNA tyto granula lokalizují. Aktivita ADP-ribosylace se zvýší jako odpověď na stresovou situaci v buňce. Vyčerpání hladiny PARPs a ostatních enzymů může ovlivnit udržení a stabilitu těchto struktur. PARP je také důležitý při virovém poškození, kdy lze translaci virových proteinů inhibovat PARPs enzymy a to tím, že se samy váží na ribozomální proteiny<sup>[12]</sup>. Další PARPs enzymy jako PARP-9, PARP-14 a PARP-15 se mohou vázat na ADP-ribosu, či na její deriváty. Katalytické funkce všech členů rodiny PARPs jsou tedy významné nejen pro opravu DNA, ale i pro správný chod celé buňky<sup>[7]</sup>.



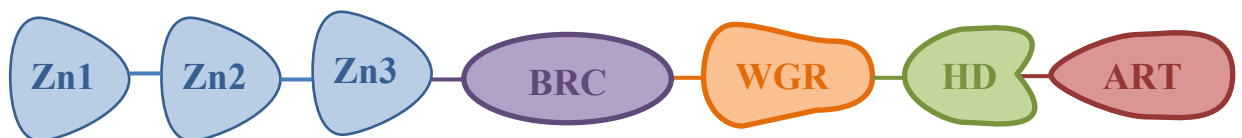
Obrázek 3: **Uspořádání podjednotek enzymů PARP-2 a PARP-3.** WGR podjednotka, která se navazuje na DNA (WGR), helikální doména (HD) a jednotka, katalyzující polymerizaci poly (ADP-ribosy) (ART) (upraveno dle [5]).

### 3. PARP-1

PARP-1 je nejznámější a neúčinnější ze skupiny PARPs proteinů. Jeho struktura a funkce je nejrozmanitější ze všech zástupců PARPs. Slouží jako pohotovostní marker poškození DNA. Přestože se nepodílí na samotné opravě DNA, jeho přítomnost je nepostradatelná. Kromě iniciace opravy je také důležitou signální molekulou. Při poškození DNA s využitím syntézy přitahuje PAR ostatní opravné proteiny do místa poškození a jeho interakce s řetězcem stimuluje PARylaci závislou na  $\text{NAD}^{+}$ <sup>[13]</sup>. Přítomnost PARP-1 je nezbytná pro BER, SSB i opravu dvouvláknových zlomů DNA (DSB), kterou také může zastat tumor supresorový gen nádoru prsu (BRCA). PARP-1 se též podílí na homologní rekombinaci (HR), nehomologním spojování konců (NHEJ) a na opravě Okazakiho fragmentů. Mimo jiné se podílí i na apoptóze<sup>[13][14]</sup>.

#### 3.1 Struktura proteinu PARP-1

PARP-1 obsahuje šest podjednotek, které jsou nezbytné pro správnou katalytickou funkci proteinu<sup>[7]</sup>. Na N-konci enzymu se nachází tři zinkové prsty (Zn1, Zn2 a Zn3), které jsou důležité pro aktivaci a navázání se na DNA. Tyto jednotky jsou složeny z  $\alpha$ -helixu a  $\beta$ -skládaného listu uspořádaných vedle sebe. Další jednotka je pojmenována podle tumor supresorového genu nádoru prsu, sloužícího jako marker rakoviny prsu s terminálním koncem-C (BRCT). Jednotka, jejíž hlavní částí je skupina tří AMK tryptofan, glycin a arginin, a která je důležitá pro aktivaci BRCT jednotky se nazývá WGR. pro samotný PARP-1 protein je velmi důležitá HD, která aktivuje PARP-1 a ART, kde probíhají enzymové reakce. Uspořádání podjednotek je znázorněno na obrázku 4<sup>[15][16]</sup>.



Obrázek 4: **PARP-1 enzym a uspořádání podjednotek.** Zinkové prsty Zn1,2,3 sloužící k identifikaci místa poškození DNA spojené s BRCT doménou, kde k aktivaci je zapotřebí WGR doména. Podjednotka, kde dochází k poly ADP-ribosylaci za přítomnosti  $\text{NAD}^{+}$ , HD doména, na kterou navazuje ART podjednotka (upraveno dle [5]).

### 3.1.1 Zinkové prsty

Zinkové prsty jsou struktury, jejichž název je odvozen ze 3D struktury připomínající prsty. Jsou to primární senzory pro aktivaci PARP-1. Skládají se ze dvou částí, a to  $\alpha$ -helixu, který obsahuje dva histidinové zbytky a  $\beta$ -listu se dvěma cysteinovými zbytky. Mezi oběma těmito strukturami je navázán atom zinku, který stabilizuje celý komplex<sup>[17]</sup>. Zinkové prsty Zn1 a Zn2 se společně napojují prostřednictvím  $\beta$ -listu na konec poškozeného úseku DNA, kde se naváží na cukr-fosfátovou kostru dvoušroubovice. Tím tyto zinkové prsty vytvoří funkční celek, který je schopný interagovat s okolními úseky DNA. Zn1 a Zn2 se zformují do smyčky přímo na dvoušroubovici DNA na poslední bázi 3' cukerného konce, kde se nejdříve napojí Zn2. Zn1 se následně váže na vyčnívající smyčku Zn2 a vznikne tak prostor pro odkloněnou bázi přečnívajícího poškozeného nukleotidu. Zn2 také obsahuje úsek vycházející z malého žlábků v DNA, který zasahuje ke koncové části poškozených bází, a tím blokuje pokračování komplementárního vlákna, čímž efektivněji umožňuje identifikovat konkrétní poškození<sup>[17]</sup>. Ukázalo se, že Zn1 nemusí pro svou aktivaci, na rozdíl od Zn2, vyžadovat přítomnost atomu zinku. Disociační konstanta podjednotky Zn1 je výrazně nižší v porovnání s ostatními strukturami vázajícími zinek, což znamená, že v této podjednotce nemusí být atom zinku přítomen. Tato skutečnost může vysvětlit vyšší citlivost PARP-1 na toxické kovy. Zn1 je tím dostupnější pro vazbu. Jedním z možných mechanismů aktivace PARP-1 může být obsazení Zn1 zinkem po jeho uvolnění při oxidativním stresu buňky. To dává signál, že se poškodil úsek DNA a PARP-1 se tak aktivuje vazbou přes N-konec své struktury na zlom DNA, čímž zahájí tvorbu rozvětvených řetězců PAR. Tyto řetězce poté slouží zejména jako tzv. „konkurence“ s DNA, kdy vytlačuje histony a jiné proteiny, aby se DNA stala přístupnější pro pozdější opravu<sup>[17][18]</sup>.

Zn3 je převážně zapojen do „komunikace“ mezi vazebnými doménami a katalytickou doménou na C-konci PARP-1. Struktury sloužící k jeho navázání jsou součástí mnoha proteinů zapojených do opravy DNA, jako například BRCA1, či tumor supresorový protein p53. O těchto proteinech se předpokládá, že jsou aktivní za podmínky vyhovující koncentrace buněčného zinku<sup>[17][18]</sup>.

### 3.1.2 Doména na C-konci tumor supresorového genu nádoru prsu

Další důležitá podjednotka enzymu se nachází v centrální oblasti PARP-1. Jedná se o automodifikační oblast, kterou tvoří globulární podjednotka BRCT a vyskytuje se u mnoha proteinů zapojených do DNA oprav. Původně byla objevena na C-konci enzymu BRCA, odkud také pochází její pojmenování<sup>[19]</sup>. BRCT doménu tvoří devadesát osm AMK uspořádaných do tří  $\alpha$  helixů a čtyř  $\beta$ -listů. Její primární funkcí je vytvoření vazebného místa pro rentgenově opravný křížově se doplňující protein 1 (XRCC1), který následně působí jako „lešení“ pro další proteiny a faktory. Je to jeden z mnoha enzymů účastnících se na opravě SSB. Pravděpodobně během opravy negativně reguluje hladinu ADP-ribosy. Aby mohla doména BRCT svou funkci vykonávat, musí nejprve projít automodifikací, tedy po navázání PARP-1 na DNA dochází k ADP-ribosylaci podjednotky poly (ADP-ribosou). To umožní XRCC1, aby se spojil se svou vlastní BRCT doménou<sup>[13]</sup>.

### 3.1.3 WGR doména

Tato doména se nachází v blízkosti katalytické domény a je pojmenovaná dle dobře zachované sekvence AMK: tryptofanu (W), glycinu (G) a argininu (R). Doména je také esenciální pro PARP-1 enzym, přesto stále není zcela jasné, jaká je její přesná funkce. Je známo, že WGR doména interaguje jak se zinkovými prsty, tak s katalytickou doménou, když enzym narazí na zlom DNA, čímž vytváří síť mezi doménami<sup>[19][20]</sup>. Struktura PARP-1 a její podjednotky společně spolupracují. Zn1 a Zn3 vytvářejí místo s vhodnou prostorovou orientací pro navázání WGR domény. WGR se váže na 5' konec jednoho řetězce DNA a zároveň tím drží kostru. Zbytek domény se poskládá komplementárně proti nukleosidům na konci řetězce. WGR podjednotka také spolupracuje s HD doménou, kdy poskytuje „most“ mezi poškozeným úsekem DNA a katalytickou doménou<sup>[21]</sup>.

### 3.1.4 Katalytická doména

Katalytická doména, nacházející se na C-konci PARP-1, se skládá ze dvou subdomén. HD domény a ART domény. Zde probíhá ADP-ribosylace, kdy je nutná přítomnost substrátu  $\text{NAD}^+$ . Domény tvoří celkově katalytickou oblast PARP-1 enzymu. ART doména odvozena podle enzymu ribosyltransferázy, katalyzuje přenos ADP-ribosy na cílové proteiny, malé molekuly či nukleové kyseliny. ART je schopna různé modifikace cílových proteinů, pokud je součástí PARPs enzymů. V jiných případech je schopna modifikace cytoskeletálních proteinů nebo se využívá jako signální molekula. PARP-1 katalytická oblast je schopna syntetizovat PAR pomocí O-glykosidické vazby a zároveň s uvolněním  $\text{NAD}^+$ . Aktivní místo domény

zahrnuje tři různé aktivity. Počáteční připojení ADP-ribosy k postranním řetězcům AMK, prodlužování polymerů pomocí dalších jednotek MAR a zavedení vzniklých větvených polymerů. To má za následek vznik velkých rozvětvených molekul. Poprvé byla ART doména nalezena jako mechanismus toxinů v bakteriích, které způsobily patologické stavy v napadených eukaryotních buňkách jejich hostitele<sup>[6]</sup>.

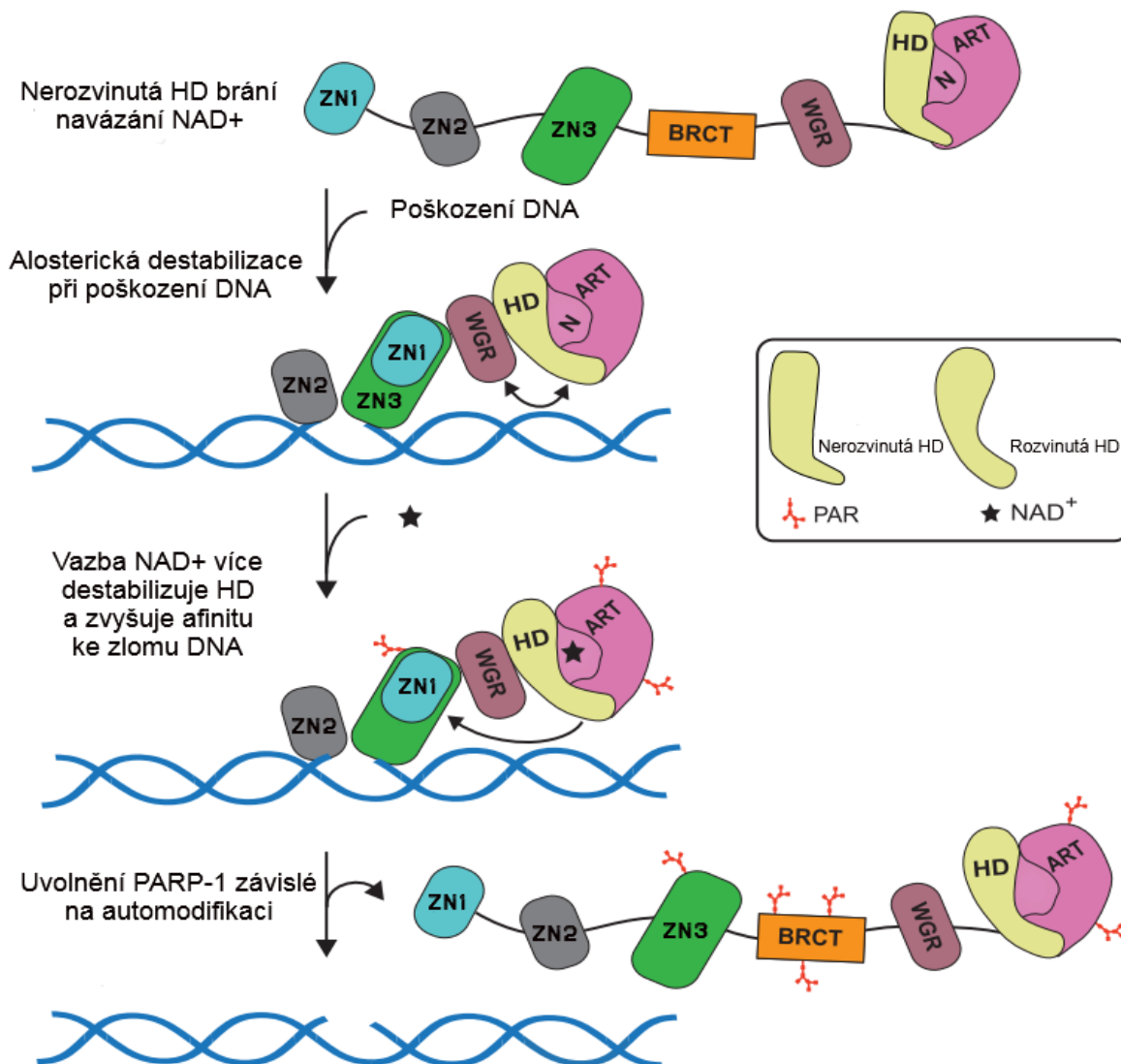
ART enzymy vykazují odlišnost na úrovni sekvence, ovšem na strukturální úrovni jsou zde jen malé rozdíly. Mají stejný silně konzervovaný záhyb jádra. Jádro se skládá z  $\beta$ -listu rozděleného na dvě odlišné jednotky tvořené třemi vzájemně propletenými vlákny. Obvykle na tato vlákna nasedá spirálovitý prvek, což naznačuje, že celý záhyb vzniká skrze opakované skládání dvojice vlákno-spirála. Vlákna jsou pak rozložena mezi dvěma podjednotkami. U většiny PARPs enzymů jsou aktivní centra vytvořena mezi těmito vlákny, v důsledku toho je molekula  $\text{NAD}^+$  podjednotkami stericly omezena<sup>[6][20]</sup>.

Druhá katalytická doména je HD, která reaguje, když PARP-1 narazí na zlom v DNA. Slouží jako inhibitor blokující vazbu  $\text{NAD}^+$ , čímž reguluje funkci PARP-1 proteinu a má tímto důležitou roli při stanovení inhibitorů PARPs. Blokace PARP-1 pomocí HD udržuje aktivitu tohoto enzymu na bazální úrovni v nepřítomnosti DNA. Po rozvinutí HD dochází k masivní aktivaci PARP-1. HD se skládá ze dvou leucinových zbytků AMK a prokázalo se, že napodobením těchto struktur došlo ke zvýšení aktivity PARP-1 proteinu i při nepřítomnosti DNA. Z toho vyplývá skutečnost, že pro aktivitu a správnou funkci PARP-1 je nutná HD doména. Přestože je katalytická doména nejdůležitější doménou, spolupráce s dalšími doménami je nezbytná. To se týká primárně Zn1, Zn3 a WGR, které zajišťují správnou enzymatickou funkci PARPs<sup>[6][20]</sup>.

### 3.2 Aktivace PARP-1

Mechanismus, jak přesně probíhá aktivace PARP-1 není doposud zcela objasněn. Pomocí *in vitro* podmínek je možné nasimulovat chování tohoto enzymu, když dojde k poškození DNA. Přítomnost zinkových prstů je však klíčová pro správnou aktivaci, kde je také nutná dostatečná hladina atomů zinku v těle. Pokud máme nedostatek zinku, snižuje se tím poly ADP-ribosylační kapacita enzymu. Ovšem odpovídající množství zinku není jediným faktorem pro správnou funkci enzymu, jedná se zde spíše o schopnost buněk specificky vázat tyto atomy. PARP-1 se aktivně účastní několika možností opravy genetické informace. Primární funkcí je signalizace a detekce poškozeného místa na DNA<sup>[18]</sup>.

Zn1, Zn2 a WGR se naváží na porušené místo DNA, kde chybí fosfodiesterová vazba mezi sousedními nukleotidy na jednom vlákně v určité orientaci. Zn1 nasedá na 5' konec a Zn2 na 3' konec, čímž se určí navázání molekuly PARP-1. Takto vzniklé seskupení dovolí nasednout poslednímu zinkovému prstu na nově vzniklé vazebné místo k Zn1. Tyto složité interakce mezi zinkovými prsty jsou velmi citlivé a mutace jediné části znemožní správné navázání PARP-1 na DNA<sup>[16]</sup>. K aktivaci enzymu je důležitá doména HD, která slouží jako inhibitor. Pokud PARP-1 není aktivovaný, HD brání přístup aktivního místa k NAD<sup>+</sup>. V momentě, kdy se enzym aktivuje, dojde k uvolnění katalytické domény, což můžeme vidět na obrázku 5<sup>[16][22]</sup>.



Obrázek 5: **Aktivace PARP-1.** Pokud není poškozená DNA, PARP-1 domény nejsou propojené a připomínají svým uspořádáním kuličky na řetězci. Helikální doména (HD) je autoinhibiční doména regulující katalytickou aktivitu PARP-1 pomocí blokování NAD<sup>+</sup> navázáním na nikotinamidové místo (N) domény (ADP-ribosyl) transferázy (ART). PARP-1 detekuje poškození DNA zlomů pomocí zinkových domén (Zn1, Zn2, Zn3) a naváže se do kompaktní konformace kolem porušené části DNA. Mezi doménové kontakty destabilizují HD doménu a umožní NAD<sup>+</sup> přístup k N. Vazba NAD<sup>+</sup> zvyšuje interakci PARP-1 s porušenou DNA pomocí reverzní alosterické komunikace z katalytické domény na domény vázající DNA.

Automodifikace PARP-1 v automodifikační doméně (BRCT) umožňuje uvolnění PARP-1 z DNA (upraveno dle [22]).



### 3.3 Funkce PARP-1

PARPs proteiny se podílí na mnoha buněčných procesech, přičemž ne všechny jsou spojeny s opravou genetické informace. Tyto enzymy slouží například pro přenos buněčných signálů, dále se uplatní při ischemii a buněčné smrti. Mezi jejich další aktivity spadá DNA transkripce a replikace, tvarování chromatinu, výměna sesterských chromatid, regulace centrosomu a telomer. Nejznámější ze skupiny PARPs, PARP-1 se podílí na opravě chybějících bází vytvářením PAR z monomerů ADP-ribosy přenesených z  $\text{NAD}^+$ . Reakce je ve velké míře využívána v eukaryotických buňkách<sup>[15]</sup>. Při opravě DNA se PARP-1 uplatňuje v mnoha typech reparačních mechanismů. PARP-1, společně s PARP-2 nabírá opravné proteiny, převážně XRCC1 při BER, která je zodpovědná za odstraňování malých lézí oxidací, alkylací, či deaminací. Pokud tyto léze nejsou korigované, mohou zastavit replikaci a transkripci a způsobit genomovou nestabilitu, která by mohla vést až k buněčné smrti. PARP-1 a jeho produkty fungují jako tzv. *scaffold*, který přitahuje opravné enzymy na místo poškození. Mnoho těchto enzymů včetně XRCC1, DNA ligáza III, p53 či DNA polymeráza  $\beta$  obsahují vazebné místo, které interaguje s PAR řetězci. Tím se urychluje samotná oprava DNA. Vazba a aktivace PARP-1 ovlivňuje NHEJ, která opravuje DNA na obou vláknech přímým spojováním dvou fragmentů. Přestože tento opravný mechanismus zachovává integritu DNA, je NHEJ náchylná k chybám, při nichž může dojít až ke ztrátě bází DNA v místě spojení. Role PARP-1 je při tomto mechanismu stále nejasná<sup>[14][22]</sup>.

Příkladem vazebného partnera PARP-1 je histonový PARylační faktor 1 (HPF1), který dokáže zvýšit katalytickou funkci, či měnit specifitu substrátu. HPF1 se naváže na katalytickou doménu a kolokalizuje se s místy poškození s PARP-1, kdy jejich interakce omezuje automodifikaci PARP-1 a zároveň podporuje ADP-ribosylaci histonů a proteinů zapojených do opravy DNA. HPF1 je také schopný formace s PARPs enzymy, které jsou svou strukturou nejbližší podobné PARP-1, a to PARP-2. Spolu tvoří aktivní místo a lépe mohou interagovat s PARP-1. Dalším vazebným partnerem je protein tim, který interaguje přes katalytickou doménu PARP-1. Na rozdíl od HPF1 tento partner přímo reaguje s PARP-1 doménou a jejich interakce je nutná pro nábor tim proteinu, který podpoří HR poškozeného úseku DNA. Tento komplex je pak klíčovým faktorem při opravě DSB<sup>[22]</sup>.

## 4. ROLE PARP PŘI APOPTÓZE BUŇKY

### 4.1 Apoptóza

Lidské tělo je soubor mnoha buněk, kdy každá z nich může fungovat jako samostatná jednotka, či vzájemně kooperovat dohromady jako celý organismus. Jelikož se jedná o velice složitý proces udržování rovnováhy, může v průběhu života buňky nastat chyba, která v důsledku ohrozí celý organismus. Proto si buňka vytvořila specifický obranný mechanismus. Tím je schopna zničit samu sebe a zabránit tak narušení rovnováhy okolí. Lze jej však také uplatnit již také v počátku života při regulaci počtu buněk a formování organismu. Tento mechanismus se nazývá apoptóza<sup>[23]</sup>.

Apoptóza je fyziologický děj, kterým je buňka schopná ukončit svůj život. Dochází k tomu v momentě, kdy nastane její nevratné poškození a buňka už není schopná plnit svou funkci v rámci celého organismu. Při tomto procesu dochází ke ztmavnutí a smršťování cytoplasmy, kondenzuje jádro a celkově se zmenší objem buňky. Nastane fragmentace, buňka se rozpadne na apoptotická tělíčka, která nevyvolávají zánětlivou reakci. Vzniklá apoptotická tělíčka poté přitahují fagocytující buňky migrující tělem a jsou odstraněna dříve, než by došlo k vylití obsahu buňky do mezibuněčného prostoru. Apoptóza může být indukována prostřednictvím signálů z vnějšího prostředí, či přímo ze signálů uvnitř buňky<sup>[2][24]</sup>. Za vnitřní spuštění apoptózy mohou intracelulární proteázy označované jako kaspázy. Normálně nacházíme tyto proteiny ve všech živočišných buňkách v neaktivním stavu, kde jsou pak spuštěny na základě signálů z buňky. Kaspázy jsou z velké části závislé na jejich postupné aktivaci. Vnější cesta aktivace zahrnuje tumor nekrotizující faktor (TNF), který využívá aktivaci kaspáz jako signální mechanismus, čímž spojuje vazbu ligandu na povrchu buňky a indikuje tím apoptózu. Druhá, vnitřní cesta zahrnuje účast mitochondrií, které uvolňují do cytosolu proteiny aktivující kaspázy, čímž vyvolají apoptózu<sup>[24]</sup>.

Na povrchu mitochondrií můžeme nalézt řadu proteinů podílejících se na vnitřní cestě spuštění apoptózy např. antiapoptotický protein B-buněčný lymfom (BCL-2) nebo antagonist BCL-2 proapoptický protein (BAK). U zdravé buňky BCL-2 reguluje propustnost mitochondrií a omezuje tím tak spuštění apoptózy. Protein je v rovnováze s BAK, ovšem pokud je buňka poškozená, nedostává pokyny k přežití a BCL-2 je blokován. Domény smrti se účastní vnější cesty aktivace kaspáz, jelikož se také nalézají na povrchu TNF, kde aktivují kaspázy, či vyhledávají FAS asociovanou doménu, (FADD), která spojuje vnitřní a vnější cestu aktivace apoptózy<sup>[24][26]</sup>.

Vnější cesta aktivace apoptózy se spouští pomocí signálů z okolí buňky. Primárně od pomocných T-lymfocytů, které nesou na svém povrchu polypeptid FAS ligand (FASL). Patří do skupiny cytokinů, kdy úkolem FASL je hledání FAS receptorů na membráně buněk, které by mohly projít apoptózou. Pokud na takovouto buňku narazí T-lymfocyt, naváže se na její FAS receptor a dojde k aktivaci, která spouští další doménu, a to FADD, která je spouštěčem proteolytické kaskády, kde dojde k aktivaci kaspáz. Porozuměním principu apoptózy a její inhibice v nádorových buňkách lze efektivně určit cílenou terapii pro léčbu rakovinného bujení<sup>[24][26]</sup>.

## 4.2 Funkce PARP-1 při apoptóze

Apoptóza je velice důležitý obranný mechanismus buňky, kterým reaguje na narušení vnitřní rovnováhy v případě nevratného poškození. Na tomto procesu se podílí také PARP-1. Nachází se ve velkém množství v jádrech buněk a jeho množství je zvyšováno při buněčném stresu, který by mohl poškodit genom buňky. Pro ADP-ribosylaci vyžaduje PARP-1 jako substrát  $\text{NAD}^+$ , který je nezbytný pro přenos elektronů v redoxních reakcích. Při masivním růstu koncentrace tohoto enzymu, může dojít k dramatickému poklesu energie, což může vést až k buněčné smrti<sup>[24]</sup>. Inhibicí aktivity PARP-1 je možné buněčné smrti v její ranné fázi zabránit<sup>[27][28]</sup>. Buňky, které mají fungující PARP-1 protein lépe reagují na poškození DNA, pokud je však genetická informace příliš znehodnocena, dochází k výraznému poklesu  $\text{NAD}^+$  vlivem nadměrné aktivity tohoto enzymu a buňka směřuje ke svému zániku kvůli nedostatku energie. V případě, že bude PARP-1 protein inhibován, jsou buňky chráněny proti toxickému působení látek a k nekróze nedochází, jelikož je možné udržet optimální hladinu  $\text{NAD}^+$ <sup>[28]</sup>.

Zvýšená aktivita PARP-1 aktivuje mitochondriální protein nazvaný faktor indikující apoptózu (AIF), který indikuje buněčnou smrt. Tento protein se nachází v membráně mitochondrií spolu s jinými apoptotickými induktory. Při aktivaci se AIF přemísťuje do jádra buňky, kde indukuje kondenzaci chromatinu. Po vyloučení AIF se spouští zbytek apoptoticky aktivních proteinů včetně kaspáz. Pouhá inhibice kaspáz nicméně nezabrání spuštění apoptózy u AIF dependentních buněk závislých na PARP-1 proteinu. U těchto buněk může dojít k nechtěné rané produkci PAR, k vyčerpání  $\text{NAD}^+$  a ke smrti buňky. Toto dokazuje, že pouhou inhibicí kaspáz nedojde k zabránění buněčné smrti, pokud buňka využívá AIF a PARP-1. Naopak, snížená hladina  $\text{NAD}^+$  a následné snížení energie buňky působí jako signál, který iniciuje apoptózu<sup>[27][28]</sup>. Navíc postupnou kondenzací jádra dochází i k zániku mitochondrií, což uvolní cytochrom C z mezibuněčného prostoru, díky kterému se následně uvolní kaspázy<sup>[28]</sup>.

#### 4.2.1 Štěpení PARP-1 pomocí kaspázy 3

PARP-1, jakožto důležitý protein při opravě DNA, se mimo jiné podílí na buněčné smrti. Ukázalo se, že ke štěpení PARPs proteinů dochází pomocí kaspáz, přesněji kaspázy 3. Tento proces štěpení má pozitivní regulační roli v apoptóze buněk a je používán jako biomarker při detekci apoptózy<sup>[29]</sup>.

Kaspázy se aktivují pomocí proteázové kaskády. Tato aktivace je však v buňce silně regulována a při jejím chybném spuštění by mohlo dojít k nechtěnému poškození buňky. Dochází k ní například při buněčném stresu. Nejdůležitější kaspázou je kaspáza 3, která hraje významnou roli v buněčné smrti. Kaspáza 3 je posledním proteolytickým enzymem a k jeho aktivaci je nutná řada jiných kaspáz. V těle máme nejméně čtrnáct kaspáz, ovšem detekovatelná je jen malá skupina. Celý sled reakcí následně postupuje až k poslední aktivaci kaspázy 3<sup>[29][30]</sup>.

Kaspáza 3 patří do rodiny proteáz kyseliny asparagové. Za normálních okolností se tento enzym nachází v neaktivní formě. Pokud je kaspáza 3 aktivována, začne štěpit různé strukturální a regulační proteiny, včetně PARP-1<sup>[29]</sup>. Zamezí aktivování PARP-1, enzym není také schopen spolupráce na opravě DNA a nespotřebovává  $\text{NAD}^+$ . Nemůže dojít ke snížení energie buňky, které by nenávratně vedlo k nekróze a spotřebě ATP při aktivním stavu PARP-1. Buňka zahájí svou regulovatelnou buněčnou smrt, která je šetrnější pro její okolí na rozdíl od nekrózy<sup>[29]</sup>.

## 5. PARP-1 V LÉČBĚ NÁDORŮ

Nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí ve světě po ischemické chorobě srdeční. Ve světovém měřítku jsou v současné době statisticky nejvýznamnější nádory plic, prsou a prostaty. Předpokládá se, že v roce 2060 by se rakovina mohla stát onemocněním s nejvíce úmrtími na zemi, a proto je kladen velký důraz na včasnou a účinnou léčbu. Současné metody však působí invazivně a oslabují organismus. Z tohoto důvodu se neustále hledají nové postupy umožňující méně agresivní eliminaci nádorů. Mezi nové, nadějně vyhlížející způsoby léčby lze zařadit například inhibici enzymu PARP-1, který je aktivní při opravě DNA i u nádorových buněk<sup>[31]</sup>.

### 5.1 Patogeneze nádorů

Rakovina může vzniknout z abnormální proliferace jakékoliv buňky v těle. Existuje tedy více než sto rozdílných druhů tohoto onemocnění. Jednotlivé druhy se přitom významně liší svým chováním a také reakcí na léčbu. Důležitým aspektem je rozlišení mezi benigním a maligním nádorem. Jak benigní, tak maligní nádory jsou klasifikovány podle typu buňky, ze které vycházejí. Většina rakovin spadá do jedné ze skupin: karcinomy, sarkomy a leukémie nebo lymfomy. Karcinomy, které zahrnují přibližně 90 % rakovin, jsou zhoubné nádory epiteliálních buněk. Sarkomy jsou u lidí vzácné, jedná se o pevné nádory pojivových tkání, jako jsou svaly, kosti, chrupavky a vazivové tkáně. Leukémie a lymfomy, které tvoří přibližně 8 % lidských malignit, pocházejí z krvetvorných buněk, respektive z buněk imunitního systému<sup>[33]</sup>.

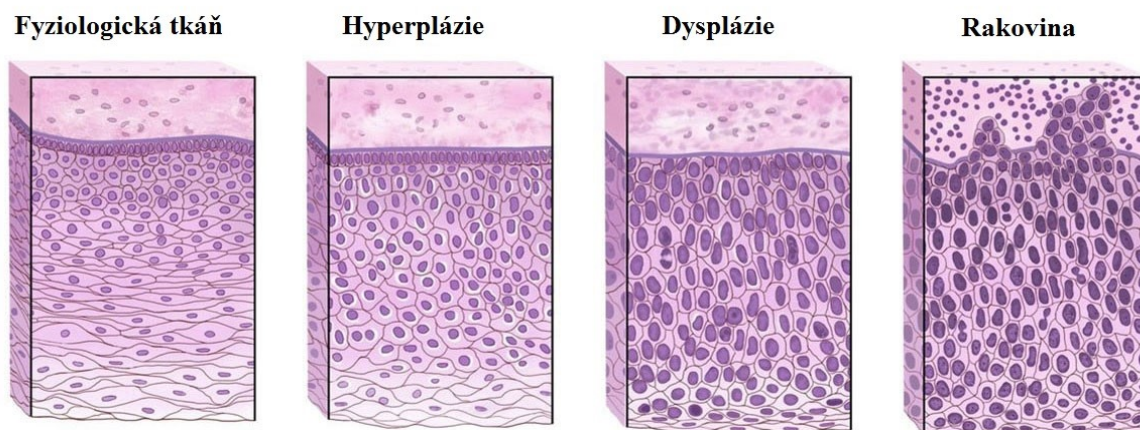
Jedním ze základních rysů rakoviny je nádorová klonalita, vývoj nádorů z jednotlivých buněk, které začnou abnormálně proliferovat. Klonální původ nádorů však neznamená, že původní progenitorová buňka, která dává vzniknout nádoru, zpočátku získala všechny charakteristiky rakovinné buňky. Vývoj rakoviny je vícestupňový proces, ve kterém se buňky postupně stávají maligními prostřednictvím progresivní série změn. Ovšem většina rakovin se vyvíjí v pozdější fázi života. Například riziko výskytu rakoviny tlustého střeva se zvyšuje více než desetinásobně mezi 30. a 50. rokem, a mezi 50. a 70. rokem vzrůstá o další desetinásobek. Takto dramatický nárůst výskytu rakoviny s věkem naznačuje, že většina rakovin se vyvíjí jako důsledek četných abnormalit, které se hromadí v průběhu života. Na buněčné úrovni je vývoj rakoviny vnímán jako vícestupňový proces zahrnující mutaci a selekci buněk s progresivně se zvyšující schopností proliferace, přežití, invaze a metastáz. Předpokládá se, že první krok v procesu, iniciace nádoru, je výsledkem genetické změny vedoucí k abnormální proliferaci jedné buňky. Buněčná proliferace pak vede k růstu populace

klonálně odvozených nádorových buněk. Progrese nádoru pokračuje, když se v buňkách nádorové populace objevují další mutace. Některé z těchto mutací propůjčují buňce selektivní výhodu, jako je rychlejší růst, a buňky nesoucí takovou mutaci se následně stanou dominantními v populaci nádoru. Tento proces se nazývá klonální selekce, protože nový klon nádorových buněk se vyvinul na základě jeho zvýšené rychlosti růstu nebo jiných vlastností, které poskytují selektivní výhodu. Klonální selekce pokračuje během vývoje nádoru, takže nádory neustále rostou rychleji a jsou stále malignější<sup>[32][33][34]</sup>. Angiogeneze, což je novotvorba kapilár je další vlastnost nádorové tkáně. Zajišťuje přísun kyslíku a živin a podporuje tak jejich přežívání v organismu<sup>[34]</sup>.

### 5.1.1 Vznik nádorů

Látky, které způsobují rakovinu se nazývají karcinogeny. Vzhledem k tomu, že vývoj malignity je komplexním vícestupňovým procesem, může pravděpodobnost, že se rakovina vyvine, ovlivnit mnoho faktorů. Bylo zjištěno, že mnoho faktorů, včetně záření, chemikálií a virů, vyvolává rakovinu. Záření a mnoho chemických karcinogenů působí tak, že poškozují DNA a vyvolávají mutace. Tyto karcinogeny jsou obecně označovány jako iniciační činidla, protože se předpokládá, že indukce mutací v klíčových cílových genech je počáteční událostí vedoucí k rozvoji rakoviny. Některé z iniciačních činidel, které přispívají k lidské rakovině, zahrnují ultrafialové spektrum slunečního záření, karcinogenní chemikálie v tabákovém kouří a aflatoxiny. Karcinogeny v tabákovém kouří jsou hlavními identifikovanými příčinami rakoviny u lidí. Kouření je nespornou příčinou 80 až 90 % rakoviny plic a také se podílí na rakovině dutiny ústní, hltanu, hrtanu, jícnu a dalších lokalizací. Celkově se odhaduje, že kouření je zodpovědné za téměř jednu třetinu všech úmrtí na rakovinu. Jiné karcinogeny přispívají k rozvoji rakoviny spíše stimulací buněčné proliferace. Takové sloučeniny se označují jako nádorové promotory, protože zvýšené buněčné dělení, které indukují, je vyžadováno pro růst populace během raných fází vývoje nádoru. Hormony, zejména estrogenu, jsou důležité jako nádorové promotory při rozvoji některých rakovin. Kromě chemikálií a záření vyvolávají rakovinu i některé viry. Mezi běžné lidské rakoviny způsobené viry patří rakovina jater a karcinom děložního čípku<sup>[34]</sup>.

Fyziologická tkáň se mikroskopicky a makroskopicky liší od nádorové. Zdravé buňky mají typický tvar a strukturu. Jsou uspořádané a reagují na okolní podněty. Dělení probíhá jen za určitých podmínek, právě zde však často nastává chyba, která může zapříčinit vznik mutací. Buňka může začít ztrácet svůj tvar, přestane adekvátně reagovat na okolní podněty a také může získat schopnost dělit se nekontrolovatelně. To pak vede až ke vzniku nádorových buněk<sup>[33]</sup>.



Obrázek 6: **Vznik nádorové tkáně.** Prvním stádiem je hyperplázie neboli zmnožení buněk, což má za následek zvětšení orgánu. Ta dále přechází v dysplázii, při které je narušena struktura epitelu změnami tvaru a velikosti buněk. Bez včasného zásahu může přejít v poslední fázi, rakovinné bujení (upraveno dle [34] ).

Změna může být nepatrná. Začíná vznikem hyperplázie, výraznému zmnožení buněk. Později hyperplázie přechází v dysplázii, která se projevuje narušením struktur tkáně a změnou tvaru buněk. Při včasném zásahu nemusí dojít k poslední fázi, a to k rakovinnému bujení, kdy jsou už buňky schopny prorůstat do okolní tkáně, což lze vidět na obrázku 6<sup>[33]</sup>.

### 5.1.2 *Prevence vzniku nádorů*

Geny chránící genetickou informaci buňky se nazývají protoonkogeny. Při replikaci DNA často dochází k různým vadám, které by mohly vést až ke vzniku rakovinného bujení. Proto je potřeba zajistit správné fungování protoonkogenů. Jedná se o normální struktury genů buňky. Ty řídí správnou proliferaci, jsou také důležité pro přenos signálu v buňce a regulují genovou expresi. Při určitých patologických procesech se z nich mohou stát onkogeny, které naopak umožní přežít buňkám jinak předurčeným k zániku. Tumor supresorové geny potlačují vznik mutace buňky a její nekontrolovatelné změny na nádorovou a regulují buněčný cyklus. Mají zásadní roli při dědičnosti nádorového onemocnění. Mezi tyto geny můžeme zařadit BRCA1 a BRCA2, kdy následná mutace tohoto genu zapříčiní vznik různých typů rakoviny, nejčastěji rakovinu prsou a vaječníků<sup>[2][34][35]</sup>.

## 5.2 Léčba nádorového onemocnění

Zahájení rychlé a intenzivní léčby je klíčové pro přežití jedince postiženého nádorovým onemocněním. Je prioritní včasná a správná diagnóza. Ta se odvíjí od typu karcinomu. Obecně je důležité chirurgické odstranění nádorové tkáně. U maligního onemocnění se klade důraz na vyjmutí celého primárního ložiska. Riziko je u metastáz, které mohou vycestovat a zakládat sekundární ložiska v těle. Dnes se chirurgický zákrok kombinuje s vysoce invazivní chemoterapeutickou léčbou. Účelem je zpomalit či zcela zastavit růst nádoru pomocí ozařování. Dojde tak k zastavení dělení nádorových buněk, postižena je však i zdravá tkáň. Vedlejších účinků chemoterapie je mnoho, např. zhoršení imunity, špatná krvetvorba a riziko poškození jiných důležitých orgánů. Přes všechna negativa je chemoterapie stále nejpoužívanější protinádorovou léčbou<sup>[32]</sup>.

Mimo chemoterapii také lze uplatnit také alternativní způsoby léčby u určitých typů nádorů. Radioterapie využívá rentgenové záření, které ničí rakovinné buňky přístrojovou technikou, či radioaktivně značenou protilátkou. Imunoterapie stimuluje nebo naopak potlačuje imunitní systém, a tím pomáhá bojovat proti tumorovým buňkám a podporuje potlačení infekce. Výhodou této léčby je možnost zaměřit se na jednotlivé buňky. Hormonální terapie blokuje hormony, které při vyšší akumulaci v těle mohou podporovat růst určité rakovinné tkáně, například u prsou či prostaty, ať už podáním syntetického hormonu nebo léky, které zablokují zvýšenou tvorbu hormonů v těle<sup>[32][34]</sup>.

## 5.3 Léčba nádorového onemocnění inhibitory PARP-1

PARP-1 enzym slouží jako senzor poškození DNA. Usnadňuje její opětovné párování při nižších úrovních genomického stresu, při nadměrném poškození genetické informace ovšem může spustit buněčnou smrt. PARP-1 se díky jeho roli v udržování stability genomu stal slibným adeptem pro cílenou léčbu nádorového onemocnění. Nejvíce se uplatňuje při rakovině vaječníků a prsou, což jsou nejvíce fatální ženské malignity na světě. Tyto karcinomy představují těžce léčitelné, často smrtelné onemocnění, a mohou postihnout ženy v jakémkoliv věku. Riziko vzniku nádoru zvyšují také mutace tumor supresorového genu BRCA, který je důležitý při řízení růstu buněk. Buňka tak není schopna regulovat svoji proliferaci, apoptózu a další metabolické dráhy chránící před vznikem rakoviny<sup>[36][37]</sup>.

Chemoterapie má mnoho vedlejších účinků a dochází při ní také k poškození zdravých buněk. Jednou z dalších možností léčby nádorového onemocnění je cílená léčba. Její označení pochází z anglického slovního spojení *targeted therapy*. Využívá méně destruktivní terapii,



kteřá poškozujė zdravė buňky jen minimálně oproti současné zavedené metodě, klasické chemoterapii v kombinaci s cytostatiky. Různými postupy lze působit na řadu enzymů či jiné molekuly, které přispívají k růstu a šíření nádorového bujení. Výhodou této léčby je snížení negativního dopadu vedlejších účinků na celý organismus, a to především díky jejímu selektivnímu zaměření na postižené buňky<sup>[38]</sup><sup>0</sup>. Mezi enzymy, které se dnes využívají k cílené léčbě, patří také skupina PARPs, které v posledním desetiletí přitáhly pozornost díky klinickým úspěchům inhibitorů těchto proteinů. Jelikož jsou PARPs stále aktivní v rakovinných buňkách, přispívají k dlouhodobému přežívání buněk díky své funkci při opravě DNA. Vzhledem k této skutečnosti se začala studovat možnost jejich inhibice pro méně destruktivní eliminaci nádorů, a to primárně u rakoviny prsou a vaječníků. Nejvíce atraktivním cílem léčby se stal PARP-1 z celé rodiny enzymů PARPs, protože má nejvíce dominantní roli při zachycování DNA zlomů pomocí jeho zinkových prstů. Ty jiné PARPs enzymy postrádají, a proto se dnes klade důraz především na PARP-1<sup>[38]</sup><sup>[39]</sup>.

### 5.3.1 *Princip léčby nádorového onemocnění*

V buňkách nádorů postihujících především prsní tkáň a vaječníky je v důsledku poškození vyřazena dráha pro opravu genetické informace využívající BRCA. Tyto proteiny opravují poškozené úseky na obou vláknech DNA, proto při jejich deficitu buňka spoléhá na iniciaci opravy pomocí PARPs. Z tohoto důvodu lze u těchto onemocnění aplikovat léčbu pomocí inhibice aktivity PARP-1, jehož primární enzymovou funkcí je lokalizace poškozeného úseku dvoušroubovice, syntéza PAR pomocí substrátu NAD<sup>+</sup> a následného navázání dalších proteinů uzpůsobených k opravě DNA. Ostatní proteiny z rodiny PARPs nejsou pro léčbu v tuto chvíli tak atraktivní, zejména kvůli absenci N-terminálních zinkových prstů pro vazbu na nukleovou kyselinu. Proto se PARP-1 stal hlavním prostředkem léčby těchto druhů rakoviny. V současné době se optimalizují a testují účinné léčebné strategie zaměřené především na snížení rezistence a překrývající se toxicity<sup>[39]</sup>.

Nádorové buňky postrádající supresorové geny BRCA1 a BRCA2, mají v souvislosti s touto skutečností zvýšenou expresi PARPs-1 proteinů, které nahrazují chybějící enzymy při opravě poškozených úseků DNA s pomocí mechanismu BER, SSB a nábořem XRCC1, DNA polymerázy  $\beta$  a DNA ligazy III. Při inhibici PARP-1 nelze poškozené úseky opravit a buňka přechází k HR ve snaze nahradit poškozené báze. Vzhledem k rozsahu poškození však není schopná genetickou informaci s pomocí HR obnovit. Proces inhibice spočívá v zastavení PARylace a změně struktury PARP-1 proteinu, která zabrání jeho navázání na DNA<sup>[39]</sup>.

### 5.3.2 *Současné PARP-1 inhibitory*

Jsou navrženy dva modely základního mechanismu inhibice. První model vychází ze skutečnosti, že PARP-1 je spojen primárně s opravou BER a opravou SSB na DNA a náborem opravných proteinů. Když dojde k inhibici PARP-1, nelze poruchu na jednom vlákně opravit a během replikace buňka ve snaze opravit genetickou informaci vynutí HR, ale při absenci BRCA1 a BRCA2 dojde k poškození a buňka umírá. Druhý model uplatňuje inhibici PARylace u PARP-1 při změně jeho struktury. Cytotoxicita PARPs závisí na dostatečném zachycení na DNA. Při tom vznikají toxické produkty, které zpomalují postup replikačních vidlic. Chyba může být u zdravých buněk eliminována pomocí BRCA1 a BRCA2, ovšem buňky s deficitem těchto proteinů vykazují zvýšenou genomickou nestabilitu, která vede až ke smrti buňky. Tento model je upřednostňován více, a to z toho důvodu, že cytotoxické inhibitory PARPs fungují lépe než genetická delece PARPs enzymů a cytotoxicita PARPs inhibitorů koreluje spíše se schopností zachytit PARPs na DNA než se samotnou katalytickou inhibiční vlastností těchto inhibitorů<sup>[40]</sup>.

Inhibitory PARPs mají klinickou a neklinickou formu. V současné době existuje pět klinických inhibitorů, z nichž olaparib, talazoparib, niraparib a rucaparib byly schváleny k léčbě rakoviny vaječníků a prsou s deficitem BRCA1 a BRCA2 a jsou srovnatelné ve své katalytické inhibici. Pracují na principu kompetitivní inhibice, kdy tyto inhibitory soutěží s  $\text{NAD}^+$  o aktivní místo na PARP-1, čímž mohou inhibovat aktivitu tohoto proteinu. Ukázalo se, že olaparib také prospívá pacientům s metastazující rakovinou slinivky nebo prostaty. Pátý z inhibitorů, veliparib zatím není přijat. Talazoparib, prodáváný pod komerčním názvem Talzenna, je orálně podávaný lék inhibující PARylaci. Inhibuje již zmíněnou dráhu opravy DNA za pomoci posttranslační ADP-ribosylace jaderných proteinů signalizujících část poškozené dvoušroubovice a tím aktivují opravné enzymy jednoho poškozeného vlákna DNA. U nádorové buňky, která postrádá správný opravný mechanismus, tím zvyšuje riziko hromadění zlomů řetězců DNA. Narůstá tak nestabilita genomu, která posléze vede k apoptóze nádorové buňky. Niraparib se ukázal jako účinný inhibitor bez nutnosti mutace BRCA genu. Obecně každý z těchto inhibitorů, i když se výrazně neliší principem má různou schopnost indukovat katalytickou inhibici k zachycení PARP-1 na zlomech DNA a má tedy rozdílnou potenci indukovat buněčnou smrt<sup>[34]</sup>. Pro léčení rakoviny plic i vaječníků se experimentálně podává kombinace inhibitorů PARPs-1 a léku durvalumab. Jedná se o protilátku IgG proti antigenu, který spadá mezi kontrolní body na vnější straně membrány a bývá exprimován na povrchu nádorových buněk. Durvalumab tak zabráňuje jeho rozeznání imunitním systémem.

Protilátka omezuje jeho expresi na povrchu a zároveň zlepšuje aktivaci T lymfocytů. Podává se pacientům po ukončení radioterapie<sup>[40]</sup>.

Benzamidadenin dinkukleotid (BAD) a EB-47 jsou dva inhibitory v preklinických studiích. BAD je náhradou  $\text{NAD}^+$ , který působí jako substrát pro PARP1, zatímco EB-47 dokáže napodobovat vazbu  $\text{NAD}^+$  s afinitou srovnatelnou s klinickými inhibitory. Ačkoli všechny inhibitory fungují na stejném principu a váží se v katalytickém centru, kde zablokuje  $\text{NAD}^+$  a zabrání produkci PAR, vykazují různou účinnost při usmrcení rakovinné buňky. Je to pravděpodobně dáno jejich rozdílnými schopnostmi indukovat katalytickou inhibici a zachytit PARP-1 na DNA zlomu. Inhibitory PARPs ovlivňují kritickou alosterickou regulační doménu enzymu, stejně jako doménu HD. Podle vlivu na alosterii PARP-1 se inhibitory dělí na tři typy. BAD a EB-47 spadají do první kategorie. Jedná se o inhibitory alostericky zachycující DNA. Napojí se na  $\alpha\text{F}$  šroubovici HD a mají silný, zpětný alosterický efekt při destabilizaci této domény. Tato nestabilita vede ke změnám zvyšujícím afinitu PARP-1 k DNA. Laboratorní výsledky ukazují následné efekty BAD a EB-47 při napojení PARP-1 na vady v DNA. Nicméně nikdy nebyly vyvíjeny jako klinické inhibitory, pravděpodobně kvůli neselektivní povaze BAD a neprůchodnosti EB-47 skrze buněčné linie. Druhá kategorie, kam patří olaparib a talazoparib, jsou neutrální inhibitory vůči alosterii PARP-1 a vyvolávají jen minimální zvýšení afinity ke zlomu DNA. Olaparib se nepojí s HD doménou, a proto nemá vliv na mezidoménovou komunikaci, která se podílí na vázání PARP-1 s DNA. Talazoparib je naopak velmi účinný při katalytické inhibici a nevykazuje tak výrazný reverzní alosterický účinek na PARP-1. Omezuje PARylaci nutnou k rychlému uvolnění PARP-1 z místa poškození. Poslední typ inhibitorů, kam patří rucaparib, nicaparib a veliparib, působí opačně než inhibitory prvního typu. Stabilizují HD doménu a mají nižší afinitu s PARP-1 k DNA. Inhibitory talazoparib a rucaparib vykazují podobnou inhibiční účinnost a vazebné vlastnosti jako PARP-1<sup>[35][41]</sup>.

Léčba inhibitory PARPs je obzvláště účinná u pacientů s rakovinou, kterým se tato nemoc vyvinula díky dědičným defektům HR u nosičů s mutací BRCA1 a BRCA2. Předpokládaná vysoká účinnost a specifita léčby metodou inhibice PARPs vychází ze skutečnosti, že pouze rakovinné buňky postrádají BRCA, a proto jsou defektní v HR. U cílových buněk tak bude pozastavením funkce PARPs indukována buněčná smrt, zatímco zdravé buňky díky své rezistenci na léčbu nebudou ničeny. Další výhodou této léčebné metody je fakt, že jiné mutace, které se také mohou fenotypově projevit defektem v HR, nevyvolávají buněčnou smrt při použití PARPs inhibitorů, jako je tomu u BRCA genů. PARP-1 je také regulátorem dalšího

mechanismu opravy, a to NHEJ. Protože tento mechanismus zprostředkovává PARP-1, může se vyskytovat selektivněji v buňkách s deficitem HR. Prokázalo se, že inhibitory mohou sloužit i jako „jedy“ při zachycování PARP-1 v místech poškození DNA, čímž dají vzniknout cytotoxičtějším komplexům než u neopravených úseků<sup>[42]</sup>.

Co se týče bezpečnosti inhibitorů a jejich možných vedlejších účinků, jedná se o zásadní problém, a to hlavně u léků, které jsou adjuvantní, tedy v případě, kdy jsou užívány po primární léčbě a pacient může být už vyléčen. Prostředek olaparib byl užíván pacienty s pokročilým nádorovým onemocněním a celkově je tento lék organismem dobře snášen. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří nevolnost, únava, zvracení, anémie a hematologické toxicity. Dále byly prokázány trombocytopenie a neutropenie. Vysoce nebezpečným, a relativně častým vedlejším účinkem vyskytujícím se u léků zaměřených na opravu DNA je vznik nové malignity. Při použití olaparibu se ovšem ukázalo, že u pouhého jednoho procenta pacientů s pokročilým stádiem rakoviny došlo k vývoji malignit<sup>[42]</sup>.

### 5.3.3 *Rezistence inhibitorů PARP-1*

Rakovinné buňky si mohou vyvinout rezistenci proti léčbě PARP-1 inhibitory, a to v případě, že mutace BRCA nezpůsobí zastavení HR. Ukázalo se, že velká část pacientů s rakovinou vaječníků je rezistentní na PARPs inhibitory<sup>[34]</sup>. Typicky se tato rezistence vyskytuje u tumoru proteinu p53, kdy může dojít opět k obnově HR a k opravě DNA. Navíc je typický eflux léčiva u tumorové tkáně, který tak snižuje akumulaci léčiva. Konkrétně u těchto typů léků je to způsobené glykoproteinem P-glykoproteinem 1, který je transportním proteinem PARPs inhibitorů. Všechny tyto i jiné faktory představují výzvu k porozumění dané problematiky vedoucí ke zvýšení pravděpodobnosti úspěchu léčby inhibitorů PARPs<sup>[42]</sup>.

## ZÁVĚR

Pro buňky lidského organismu je enzym PARP-1 vysoce užitečným nástrojem pro opravy DNA, neboť je schopen detekovat poškozené místo a signalizovat ostatním účastníkům opravného mechanismu nutnost okamžité reakce. Udržení genomové stability je jeho primární funkcí. Nadměrná aktivita v případě rozsáhlého poškození však může vést k výraznému poklesu  $\text{NAD}^+$  a tak spustit zcela opačný proces, apoptózu. PAR, který za účelem indikace poškozeného místa PARP-1 produkuje, má také využití při reverzibilní posttranslační modifikaci proteinů, a to často těch, které se podílejí na opravě DNA či stabilizování její struktury.

Díky své komplexitě a vyššímu počtu podjednotek schopných navázat se na DNA oproti ostatním PARPs enzymům se právě PARP-1, tento první indikátor poškození genetické informace, ukázal být velmi významným pro výzkum na poli efektivní léčby rakoviny bez rizika destrukce okolních tkání a narušení homeostázy celého organismu pacienta. Převážně pro onemocnění vaječníků, prsou a prostaty, kdy je PARP-1 stále aktivní i při rakovinném bujení a přispívá tak k odolnosti a dlouhověkosti nádorových buněk, které jej využívají k opravě své DNA, bylo zjištěno, že jeho inhibice značně snižuje jejich schopnost napravovat škody vzniklé v důsledku chyb při replikaci genetické informace. Díky skutečnosti, že tyto buňky mají navíc nefunkční BRCA geny tvořící významný opravný mechanismus, lze inhibicí PARP-1 dosáhnout prakticky nenapravitelného poškození DNA, eventuelně vedoucího k usmrcení rakovinné buňky.

Přínos inhibitorů PARP-1, z nichž mnohé jsou stále v klinických studiích, je nesporně kladný, ovšem až další zkoumání pozitivních i negativních účinků při léčbě nádorového onemocnění metodami založenými na tomto principu odhalí jejich skutečný význam. Vystává zde také například otázka rezistence vůči léčivým přípravkům založeným na inhibici PARPs. Od objevu poly (adenosindifosfát-ribosa) polymerázy 1, však byly i v tomto výzkumu učiněny značné pokroky a jen s postupem času lze tedy určit přínos PARP-1 pro pacienty trpící rakovinou na celém světě.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HECKMANN, Christian M. a Francesca PARADISI. Looking Back: a Short History of the Discovery of Enzymes and How They Became Powerful Chemical Tools. *ChemCatChem*. 2020, 12(24), 6082-6102. ISSN 1867-3880. DOI:10.1002/cctc.202001107
- [2] ALBERTS, Bruce, Denis BRAY a Alexander JOHNSON. Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, 2005. ISBN 80-902-9062-0.
- [3] SAUGUET, Ludovic. The Extended “Two-Barrel” Polymerases Superfamily: Structure, Function and Evolution. *Journal of Molecular Biology*. 2019, 431(20), 4167-4183. ISSN 00222836. DOI:10.1016/j.jmb.2019.05.017
- [4] CHEN, Tingjian a Floyd E. ROMESBERG. Directed polymerase evolution. *FEBS Letters*. 2014, 588(2), 219-229. ISSN 00145793. DOI:10.1016/j.febslet.2013.10.040
- [5] LANGELIER, Marie-France, Travis EISEMANN, Amanda A. RICCIO a John M. PASCAL. PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly (ADP-ribose) posttranslational modification. *Current Opinion in Structural Biology*. 2018, 53, 187-198. ISSN 0959440X. DOI:10.1016/j.sbi.2018.11.002.
- [6] DI GIROLAMO, Maria, Nadia DANI, Annalisa STILLA a Daniela CORDA. Physiological relevance of the endogenous mono (ADP-ribosyl)ation of cellular proteins. *FEBS Journal*. 2005, 272(18), 4565-4575. ISSN 1742-464X. DOI:10.1111/j.1742-4658.2005.04876.x.
- [7] VYAS, Sejal, Ivan MATIC, Lilen UCHIMA, Jenny ROOD, et al. Family-wide analysis of poly (ADP-ribose) polymerase activity. *Nature Communications*. 2014, 5(1), 1-13. ISSN 2041-1723. DOI:10.1038/ncomms5426.
- [8] HOPP, Ann-Katrin, Federico TELONI, Lavinia BISCEGLIE, Corentin GONDRAND, et al. Mitochondrial NAD Controls Nuclear ARTD1-Induced ADP-Ribosylation. *Molecular Cell*. 2021, 81(2), 340-354.e5. ISSN 10972765. DOI:10.1016/j.molcel.2020.12.034.

- [9] HASSA, Paul O., Sandra S. HAENNI, Michael ELSER a Michael O. HOTTIGER. Nuclear ADP-Ribosylation Reactions in Mammalian Cells: Where Are We Today and Where Are We Going? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2006, 70(3), 789-829. ISSN 1092-2172. DOI:10.1128/MMBR.00040-05.
- [10] DREW, Yvette. The development of PARP inhibitors in ovarian cancer: from bench to bedside. *British Journal of Cancer*. 2015, 113(S1), S3-S9. ISSN 0007-0920. DOI:10.1038/bjc.2015.394
- [11] KIM, Mi. Novel insight into the function of tankyrase (Review). *Oncology Letters*. 2018, 2018, 6895-6902. ISSN 1792-1074. DOI:10.3892/ol.2018.9551.
- [12] BOCK, Florian J., Tanya T. TODOROVA a Paul CHANG. RNA Regulation by Poly (ADP-Ribose) Polymerases. *Molecular Cell*. 2015, 58(6), 959-969. ISSN 10972765. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.01.037.
- [13] LOEFFLER, Paul A., Matthew J. CUNEO, Geoffrey A. MUELLER, Eugene F. DEROSE, et al. Structural studies of the PARP-1 BRCT domain. *BMC Structural Biology*. 2011, 11(1). ISSN 1472-6807. DOI:10.1186/1472-6807-11-37.
- [14] SPIEGEL, Jacob O., Bennett VAN HOUTEN a Jacob D. DURRANT. PARP1: Structural insights and pharmacological targets for inhibition. *DNA Repair*. 2021, 103, 1-14. ISSN 15687864. DOI:10.1016/j.dnarep.2021.103125.
- [15] KOUYAMA, Kenichi, Kouta MAYANAGI, Setsu NAKAE, Yoshisuke NISHI, et al. Single-particle analysis of full-length human poly (ADP-ribose) polymerase 1. *Biophysics and Physicobiology* 2019, 16, 59-67. ISSN 2189-4779. DOI:10.2142/biophysico.16.0\_59.
- [16] ALEMASOVA, Elizaveta E a Olga I. LAVRIK. Poly (ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins. *Nucleic Acids Research*. 2019, 47(8), 3811-3827. ISSN 0305-1048. DOI:10.1093/nar/gkz120.
- [17] ALI, Ammar A. E., Gyula TIMINSZKY, Raquel ARRIBAS-BOSACOMA, Marek KOZLOWSKI, et al. The zinc-finger domains of PARP1 cooperate to recognize DNA strand breaks. *Nature Structural & Molecular Biology* 2012, 19(7), 685-692. ISSN 1545-9993. DOI:10.1038/nsmb.2335.

- [18] WEDLER, Nadin, Tizia MATTHÄUS, Bettina STRAUCH, Elena DILGER, et al. Impact of the Cellular Zinc Status on PARP-1 Activity and Genomic Stability in HeLa S3 Cells. *Chemical Research in Toxicology*. 2021, 34(3), 839-848. ISSN 0893-228X. DOI:10.1021/acs.chemrestox.0c00452.
- [19] BRCT domain. INTERPRO: Classification of protein families Hinxton: Welcome Genome Campus. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR001357>
- [20] LANGELIER, Marie-France a John M. PASCAL. PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly (ADP-ribose) synthesis. *Current Opinion in Structural Biology*. 2013, 23(1), 134-143. ISSN 0959440X. DOI:10.1016/j.sbi.2013.01.003.
- [21] LANGELIER, Marie-France, Jamie L. PLANCK, Swati ROY a John M. PASCAL. Structural Basis for DNA Damage–Dependent Poly (ADP-ribosyl)ation by Human PARP-1. *Science*. 2012, 336(6082), 728-732. ISSN 0036-8075. DOI:10.1126/science.1216338.
- [22] PANDEY, Nootan a Ben E. BLACK. Rapid Detection and Signaling of DNA Damage by PARP-1. *Trends in Biochemical Sciences*. 2021, 46(9), 744-757. ISSN 09680004. DOI:10.1016/j.tibs.2021.01.014.
- [23] KERR, J. F. R., A. H. WYLLIE a A. R. CURRIE. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972, 26(4), 239-257. ISSN 0007-0920. DOI:10.1038/bjc.1972.33.
- [24] REED, John C. Mechanisms of Apoptosis. *The American Journal of Pathology*. 2000, 157(5), 1415-1430. ISSN 00029440. DOI:10.1016/S0002-9440(10)64779-7.
- [25] PASTOREKOVÁ, Silvia. Molekulárna Biológia Rakoviny. Bratislava: VEDA & CVTI, 2009. ISBN 978-80-224-1114-1.
- [26] XU, Xuebo, Yueyang LAI a Zi-Chun HUA. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*. 2019, 39(1), 1-17. ISSN 0144-8463. DOI:10.1042/BSR20180992.
- [27] CHIARUGI, A. Cell Biology: PARP-1-a Perpetrator of Apoptotic Cell Death? *Science*. 2002, 297(5579), 200-201. ISSN 00368075. DOI:10.1126/science.1074592.
- [28] YU, S.-W. Mediation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1-Dependent Cell Death by Apoptosis-Inducing Factor. *Science*. 2002, 297(5579), 259-263. ISSN 00368075. DOI:10.1126/science.1072221.



- [29] BEROSKE, Lucas, Tim VAN DEN WYNGAERT, Sigrid STROOBANTS, Pieter VAN DER VEKEN, et al. Molecular Imaging of Apoptosis: The Case of Caspase-3 Radiotracers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(8), 1-19. ISSN 1422-0067. DOI:10.3390/ijms22083948.
- [30] PORTER, Alan G. a Reiner U. JÄNICKE. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. 1999, 6(2), 99-104. ISSN 1350-9047. DOI:10.1038/sj.cdd.4400476
- [31] MATTIUZZI, Camilla a Giuseppe LIPPI. Current Cancer Epidemiology. *Journal of Epidemiology and Global Health* 2019, 9(4). ISSN 2210-6014. DOI:10.2991/jegh.k.191008.001.
- [32] STŘÍTESKÝ, Jan. Patologie: [učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium]. Olomouc: Epava, 2001, 338 s. ISBN 80-862-9706-3.
- [33] COOPER, G.M. The Cell: a Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000. ISBN 9780878931064.
- [34] What is Cancer. NATIONAL CANCER INSTITUTE. The Cancer Information Service, 2015. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
- [35] ZHOU, Ping, Justin WANG, Daniel MISHAIL a Cun-Yu WANG. Recent advancements in PARP inhibitors-based targeted cancer therapy. *Precision Clinical Medicine*. 2020, 3(3), 187-201. ISSN 2096-5303. DOI:10.1093/pcmedi/pbaa030
- [36] LAMPERT, Erika J., Alexandra ZIMMER, Michelle PADGET, Ashley CIMINO-MATHEWS, et al. Combination of PARP Inhibitor Olaparib, and PD-L1 Inhibitor Durvalumab, in Recurrent Ovarian Cancer: a Proof-of-Concept Phase II Study. *Clinical Cancer Research*. 2020, 26(16), 4268-4279. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-20-0056.
- [37] LIU, Lili, Muwen KONG, Natalie R. GASSMAN, Bret D. FREUDENTHAL, et al. PARP1 changes from three-dimensional DNA damage searching to one-dimensional diffusion after auto-PARylation or in the presence of APE1. *Nucleic Acids Research*. 2017, 45(22), 12834-12847. ISSN 0305-1048. DOI:10.1093/nar/gkx1047.
- [38] NATIONAL CANCER INSTITUTE Cancer Treatment. The Cancer Information Service. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment>.

- [39] ROSE, Maddison, Joshua T. BURGESS, Kenneth O'BYRNE, Derek J. RICHARD, et al. PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020, 8(8), 1-22. ISSN 2296-634X. DOI:10.3389/fcell.2020.564601 (review).
- [40] BÍLEK, O. Durvalumab v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic. *Klin Farmakol Farm*, 2021, vol. 35, iss. 1, p. 35-39.
- [41] ZANDARASHVILI, Levani, Marie-France LANGELIER, Uday Kiran VELAGAPUDI, Mark A. HANCOCK, et al. Structural basis for allosteric PARP-1 retention on DNA breaks. *Science*. 2020, 368(6486), 1-24. DOI:10.1126/science.aax6367.
- [42] SONNENBLICK, Amir, Evandro DE AZAMBUJA, Hatem A. AZIM a Martine PICCART. An update on PARP inhibitors—moving to the adjuvant setting. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2015, 12(1), 27-41. ISSN 1759-4774. DOI:10.1038/nrclinonc.2014.163.