

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2024

Bc. Anna Kabotová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Srovnávací analýza vybraných proteinů
podílejících se na syntéze a opravách DNA**

Diplomová práce
Bc. Anna Kabotová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: RNDr. Anna Ligasová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Anna KABOTOVÁ**
Osobní číslo: **R210599**
Studijní program: **N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Srovnávací analýza vybraných proteinů podílejících se na syntéze a opravách DNA**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

Bude provedena srovnávací analýza vybraných proteinů účastnících se syntézy a oprav jaderné DNA u různých lidských buněčných linií. Cílem je nalezení případných rozdílů mezi zdravými, senescentními a nádorovými buňkami. Práce bude zahrnovat metody pro zjištění proteinového obsahu, mikroskopické lokalizační experimenty a ve vybraných případech, rovněž metody pro zjištění enzymatické aktivity. Důležitou součástí diplomové práce je vypracování literární rešerše týkající se základních znaků nádorových a senescentních buněk.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Yo-Chuen Lin, Supriya G. Prasanth, Replication initiation: Implications in genome integrity, *DNA Repair*, 103, 2021, 103131, doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103131.
2. Mocanu C, Chan KL. Mind the replication gap. *R Soc Open Sci*. 2021 Jun 9;8(6):201932. doi: 10.1098/rsos.201932. PMID: 34113447; PMCID: PMC8188003.
3. Briu, L. M., Maric, C., & Cadoret, J. C. (2021). Replication Stress, Genomic Instability, and Replication Timing: A Complex Relationship. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4764. <https://doi.org/10.3390/ijms22094764>.
4. Vouzas AE, Gilbert DM. Mammalian DNA Replication Timing. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2021 Jul 1;13(7):a040162. doi: 10.1101/cshperspect.a040162. PMID: 33558366; PMCID: PMC8247564.
5. William A. Beard, Julie K. Horton, Rajendra Prasad, Samuel H. Wilson. Eukaryotic Base Excision Repair: New Approaches Shine Light on Mechanism. *Annual Review of Biochemistry* 2019 88:1, 137-162.
6. Wallace S. S. (2014). Base excision repair: a critical player in many games. *DNA repair*, 19, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.030>.
7. Chandra T., et al., (2015) Global Reorganization of the Nuclear Landscape in Senescent Cells. *Cell Reports*, Volume 10, Issue 4, 471-483, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.055>
8. Muñoz-Espín D, Serrano M. (2014) Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15(7):482-96. doi: 10.1038/nrm3823. PMID: 24954210.
9. Kosar M, Bartkova J, Hubackova S, Hodny Z, Lukas J, Bartek J. Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type-and insult-dependent manner and follow expression of p16(ink4a). *Cell Cycle*. 2011 Feb 1;10(3):457-68. doi: 10.4161/cc.10.3.14707.

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Anna Ligasová, Ph.D.**
Ústav molekulární a translační medicíny

Oponent diplomové práce: **RNDr. Karel Koberna, Ph.D.**
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání diplomové práce: **22. října 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **31. července 2023**

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Bc. Anna Kabotová
Název práce	Srovnávací analýza vybraných proteinů podílejících se na syntéze a opravách DNA
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	RNDr. Anna Ligasová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zabývá srovnávací analýzou proteinů účastnících se syntézy a oprav DNA. Analyzovány byly proteiny UNG2, NTH1, RPA32, PCNA, MCM7, DNA polymeráza β a CDC45. Proteiny byly analyzovány z hlediska proteinového obsahu pomocí metody western blot v jaderných lyzátech nádorových buněčných linií, linií rostoucích a senescentních diploidních fibroblastů a imortalizované diploidní buněčné linie. Obsah jednotlivých proteinů byl současně analyzován v celobuněčných lyzátech dvou vybraných buněčných linií. V práci byla dále porovnána aktivita uracilových DNA glykosyláz v jednotlivých buněčných liniích a byla provedena imunofluorescenční lokalizace proteinů v buněčné linii HeLa.

Výsledky práce ukázaly, že se obsah jednotlivých proteinů mezi testovanými nádorovými buněčnými liniemi lišil. Korelativní analýza ukázala pozitivní korelaci mezi DNA glykosylázami UNG2 a NTH1 a rovněž mezi replikačními proteiny RPA32 a MCM7. Tento trend byl potvrzen i v rámci celkového porovnání všech testovaných buněčných linií. Současně provedená korelativní analýza mezi obsahem proteinu UNG2 a aktivitou uracilových DNA glykosyláz v testovaných buněčných liniích rovněž prokázala pozitivní korelaci mezi sledovanými parametry. Srovnání obsahu proteinů u celobuněčných a jaderných lyzátů ukázalo na podobný obsah u téměř všech sledovaných proteinů. Rozdíl byl zjištěn pouze v případě proteinu UNG2 a PCNA. Porovnání obsahu proteinů u diploidních fibroblastů IMR-90 a imortalizovaných buněk hTERT RPE-1 ukázalo, že rychle proliferující imortalizované buňky měly obsah všech proteinů vyšší než buňky diploidní.

Klíčová slova	Syntéza a oprava DNA, western blot, aktivita uracilových DNA glykosyláz, imunofluorescence, obsah proteinů
Počet stran	100
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographic identification

Autor's first name surname	Bc. Anna Kabotová
Title	The comparative analysis of chosen proteins participating in their DNA synthesis and repair
Type of thesis	Master
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	RNDr. Anna Ligasová, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

The master thesis submitted is focused on a comparative analysis of proteins participating in the DNA synthesis and repair. The following proteins were analysed: UNG2, NTH1, PCNA, MCM7, DNA polymerase β , and CDC45. The protein content was measured in the nuclear lysates of the cancer cell lines, growing and senescent diploid fibroblasts, and immortalized diploid cell line using the western blot method. The protein content was also analysed in the whole cell extracts of the two chosen cell lines. Further, the uracil glycosylase activity in all the tested cell lines was compared. Last, the immunofluorescence localisation of the studied proteins in HeLa cell line was performed.

The results of the thesis showed that the protein content differs among the analysed cancer cell lines. The correlative analysis showed positive correlation between the DNA glycosylases UNG2 and NTH1 and also between the replication proteins RPA32 and MCM7. This trend was confirmed by the comparison of all the cell lines tested. The simultaneously performed correlative analysis of UNG2 content and uracil DNA glycosylases activity showed the positive correlation between the tested parameters as well. The comparison of the protein content the in whole cell extracts and the nuclear extracts showed the similar content in almost all of the proteins analysed. The difference was only in the case of protein UNG2 and PCNA. Finally, the analysis of the protein content in the diploid fibroblasts IMR-90 and immortalized diploid hTERT RPE-1 cells showed that the rapidly proliferating immortalized cells had higher content of all the analysed proteins than the diploid cells.

Keywords	DNA synthesis and repair, western blot, activity of uracil DNA glycosylases activity, immunofluorescence, proteins' content
Number of pages	100
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Anny Ligasové, Ph.D., za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci, dne: _____

Podpis: _____

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména vedoucí mé diplomové práce, RNDr. Anně Ligasové, Ph.D., za odborné vedení, čas a trpělivost při vedení mé práce. Ráda bych poděkovala také paní laborantce Monice Masopustové za praktické rady v laboratoři a pomoc při osvojení některých laboratorních postupů.

Experimentální část práce byla podpořena projektem Ministerstva zdravotnictví České republiky NU22-08-00148.

OBSAH

1 Úvod.....	1
2 Cíle práce	2
3 Literární přehled.....	3
3.1 Struktura DNA	3
3.2 Buněčný cyklus a replikace DNA	3
3.3 Opravy DNA	6
3.3.1 Bázová excizní oprava	7
3.3.2 Další způsoby oprav DNA	8
3.4 Způsoby hodnocení obsahu proteinů a aktivity uracilové DNA glykosylázy.....	10
3.4.1 Analýza obsahu proteinů.....	10
3.4.1.1 SDS-PAGE a Western blot	10
3.4.1.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).....	13
3.4.2 Analýza aktivity glykosyláz vyštěpujících uracil	14
3.5 Buněčná senescence	17
3.5.1 Indukovaná senescence	17
3.5.1.1 Detekce senescentních buněk.....	18
3.5.1.2 Využití indukce senescence v terapii	22
3.5.2 Nádorové bujení.....	22
3.5.3 Apoptóza	23
4 Metodika	24
4.1 Biologický materiál.....	24
4.2 Použité chemikálie a roztoky	24
4.2.1 Použité chemikálie	24
4.2.2 Použité soupravy	26
4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava.....	26
4.2.3.1 Příprava roztoků pro kultivaci buněk.....	26
4.2.3.2 Příprava buněčných lyzátů	27
4.2.3.3 Roztoky použité pro metodu western blot.....	29
4.2.3.4 Roztoky použité pro detekci proteinů a replikační aktivity pomocí mikroskopu....	30
4.2.3.5 Roztoky pro měření glykosylázové aktivity	31
4.2.3.6 Roztoky použité pro kontrolu buněčné senescence	32
4.2.4 Kultivace použitých buněčných linií.....	32
4.3 Seznam použitých přístrojů a pomůcek	32
4.4 Použité experimentální postupy	33
4.4.1 Příprava jaderných lyzátů.....	33

4.4.2 Příprava celobuněčných lyzátů	34
4.4.3 Měření koncentrace proteinů pomocí BCA kitu	34
4.4.4 Denaturující polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE).....	35
4.4.5 Western blot	36
4.4.6 Lokalizace proteinů pomocí fluorescenční mikroskopie	37
4.4.7 Analýza glykosylační aktivity.....	38
4.4.7.1 Příprava magnetických částic s ukotvenými oligonukleotidovými próbami obsahujícími uracil nebo thymin.....	38
4.4.7.2 Příprava vzorků pro měření glykosylázové aktivity	39
4.4.8 Kontrola buněčné senescence	39
4.4.8.1 Analýza replikační aktivity	39
4.4.8.2 Analýza SAHFů.....	40
4.4.8.3 Analýza SA-Gal	40
5 Výsledky	42
5.1 Příprava buněčných lyzátů a měření koncentrace proteinů.....	42
5.2 Porovnání obsahu vybraných proteinů v lidských buněčných liniích.....	43
5.2.1 Analýza obsahu vybraných proteinů v nádorových buněčných liniích	43
5.2.1.1 Analýza proteinu UNG2	44
5.2.1.2 Analýza proteinu NTH1	45
5.2.1.3 Analýza proteinu RPA32	47
5.2.1.4 Analýza proteinu PCNA	48
5.2.1.5 Analýza proteinu MCM7	50
5.2.1.6 Analýza proteinů DNA polymerázy β a Cdc45	51
5.2.2 Analýza obsahu vybraných proteinů u lidských diploidních buněk	51
5.2.2.1 Obsah vybraných proteinů u diploidních buněčných liniích.....	52
5.2.2.2 Obsah vybraných proteinů u rostoucích a senescentních buněk.....	52
5.2.3. Analýza obsahu vybraných proteinů u celobuněčných lyzátů HeLa a NCI-H2009 buněk..	53
5.2.4. Porovnání obsahu vybraných proteinů mezi testovanými buněčnými liniemi	55
5.3 Analýza glykosylázové aktivity	56
5.4 Korelativní analýza	57
5.4.1 Korelativní analýza proteinů v nádorových buněčných liniích.....	57
5.4.2 Korelativní analýza proteinů u všech sledovaných buněčných linií.....	58
5.4.3 Korelativní analýza proteinů u diploidních buněk.....	59
5.4.4 Korelativní analýza mezi aktivitou uracilových DNA glykosyláz a obsahem UNG2.....	60
6 Diskuze.....	62
7 Závěr	66

8 Literatura 67

Seznam symbolů a zkratek

6-FAM	6-karboxyfluorescein
A	adenin
AP	alkalická fosfatáza
AP-místo	abazické místo
APE1	AP-endonukleáza 1
APLF	aprataxin a PNKP podobný protein
APS	persíran amonný
B2M	β_2 mikroglobulin
BCA	bicinchoninová kyselina
BER	bázová excizní oprava
BHQ-1	Black Hole Quencher 1
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
BSA	hovězí sérový albumin
C	cytosin
CDK	cyklin dependentní kináza
CDK/DDK	cyklin dependentní kináza/ Dfb4 dependentní protein kináza
CMG	komplex složený z Cdc45-MCM-GINS
D-MEM	Dulbecovo modifikované Eaglovo médium
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DID-VP	neznačené dvouvláknové sondy a navázání malé organické molekuly
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA-PKcs	DNA dependentní protein kináza
dNMP	deoxynukleosid fosfát
DR	receptory smrti

dRPase	deoxyribofosfatáza
DSB	dvouvláknový zlom
E-MEM	Eaglovo minimální esenciální médium
EdU	etynyl-2'-deoxyuridin
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay (imunoenzymatická analýza)
FBS	fetální hovězí sérum
FEN-1	flap endonukleáza
G	guanin
GINS	komplex komplex Sld5, Psf1, Psf2 a Psf3 proteinů (go-ichi-ni-san, v překladu 5-1-2-3)
GO	grafen oxidu
H3K9me3	histon H3 metylovaný na lysinu 9
HP1	heterochromatin protein 1
HR	homologní rekombinace
HRP	křenová peroxidáza
hTERT RPE-1	imortalizovaná diploidní buněčná linie RPE-1 pocházející z epitelových buněk sítnice
MCM2-7	minichromosome maintance protein complex
MMR	korekce párování bází
NAF	fluorid sodný
NER	nukleotidová excizní oprava
NHEJ	nehomologní spojování konců
NTH1	endonuclease III-like protein 1
OCCM	Orc-Cdc6-Cdt1-MCM7
ON	oligonukleotid
ORC 1-6	origin recognition complex
PCNA	proliferační antigen buněčného jádra

PML	promyelocytická leukemická tělíska
PMSF	fenylmetylsulfonyl fluorid
PNKP	polynukleotidová kináza/fosfatáza
pRb	retinoblastomový protein
Pufr L. S.	Laemmliho vzorkový pufr
PVDF	polyvinylidendifluoridová membrána
rNMP	ribonukleosid monofosfát
ROS	reaktivní kyslíkový radikál
RPA	replikační protein A
SA-Gal	5-bromo-4-chloro-indolyl-galaktopyranosid
SA- β -Gal	β -galaktosidáza asociovaná se senescencí
SAHFs	heterochromatinová ohniska asociovaná se senescencí
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SRP	povrchová plasmonová rezonance
ss-DNA	jednovláknová DNA
SSB	jednovláknový zlom
T	tymin
TBS	Tris-Buffered Saline
TBS/T	Tween 20 v pufru 1x TBS
TEMED	<i>N N N' N'</i> - Tetrametyl-etylendiamin
TFIIH	komplex transkripčního faktoru
TGS	Tris-Glycin-SDS
TIS	terapie indukovaná senescencí
TNF	tumor nekrotizující faktor
WB	western blot

XPA	Xenoderma pigmentosum A
XPC	Xenoderma pigmentosum C
XPF	Xenoderma pigmentosum F
XPG	Xenodermapigmentosum G
XRCC4	X-ray cross complementing protein

Seznam obrázků

- Obrázek 1** Schéma buněčného cyklu a jeho regulace cykliny a Cdk
- Obrázek 2** Schéma replikace jaderné DNA
- Obrázek 3** Schéma báze excizní opravy
- Obrázek 4** Schématické znázornění jednotlivých kroků western blotu
- Obrázek 5** Schéma provedení různých typů metody ELISA
- Obrázek 6** Schéma metody pro analýzu glykosylázové aktivity
- Obrázek 7** Schéma metody pro analýzu glykosylázové aktivity
- Obrázek 8** Příklad kalibrační křivky
- Obrázek 9** Monitorování senescence u IMR-90 buněk
- Obrázek 10** Imunofluorescenční analýza lokalizace proteinu UNG2 v HeLa buňkách
- Obrázek 11** Zastoupení proteinu UNG2 v nádorových buňkách
- Obrázek 12** Imunofluorescenční analýza lokalizace proteinu NTH1 v HeLa buňkách
- Obrázek 13** Zastoupení proteinu NTH1 v nádorových buňkách
- Obrázek 14** Imunofluorescenční analýza lokalizace proteinu RPA32 v HeLa buňkách
- Obrázek 15** Zastoupení proteinu RPA32 v nádorových buňkách
- Obrázek 16** Imunofluorescenční analýza lokalizace proteinu PCNA v HeLa buňkách
- Obrázek 17** Zastoupení proteinu PCNA v nádorových buňkách
- Obrázek 18** Imunofluorescenční analýza lokalizace proteinu MCM7 v HeLa buňkách
- Obrázek 19** Zastoupení proteinu MCM7 v nádorových buňkách
- Obrázek 20** Western blot detekce DNA polymerázy β a Cdc45
- Obrázek 21** Obsah sledovaných proteinů u diploidních buněk
- Obrázek 22** Obsah sledovaných proteinů u rostoucích a senescentních fibroblastů
- Obrázek 23** Obsah vybraných proteinů v celobuněčných lyzátech
- Obrázek 24** Analýza vzájemného vztahu mezi studovanými proteiny u jaderných a celobuněčných lyzátů
- Obrázek 25** Porovnání obsahu proteinů u všech testovaných buněčných linií
- Obrázek 26** Analýza aktivity uracilových DNA glykosyláz
- Obrázek 27** Analýza vzájemného vztahu mezi některými studovanými proteiny u nádorových buněk
- Obrázek 28** Analýza vzájemného vztahu mezi některými studovanými proteiny u všech buněk
- Obrázek 29** Analýza vzájemného vztahu mezi studovanými proteiny u diploidních buněk
- Obrázek 30** Analýza vzájemného vztahu mezi obsahem UNG2 a aktivitou uracilových DNA glykosyláz

Seznam tabulek

Tabulka 1 Porovnání některých metod pro stanovení množství celkových proteinů v buněčných lyzátech

Tabulka 2 Přehled vybraných metod detekce senescentních buněk

Tabulka 3 Použitá ředění primárních protilátek pro western blot

Tabulka 4 Použitá ředění sekundárních protilátek pro western blot

Tabulka 5 Použitá ředění primárních protilátek pro detekci protilátek pomocí mikroskopu

Tabulka 6 Použitá ředění sekundárních protilátek a DAPI pro detekci protilátek pomocí mikroskopu

Tabulka 7 Průměrné naměřené hodnoty koncentrací proteinů ve vzorcích jednotlivých buněčných linií

Tabulka 8 Korelace mezi jednotlivými sledovanými proteiny v rámci nádorových buněčných linií

Tabulka 9 Korelace mezi jednotlivými proteiny u všech sledovaných buněk

1 Úvod

Molekula DNA zajišťuje přenos genetické informace na následující generace v procesu replikace. DNA je neustále vystavována vlivům vnějšího i vnitřního prostředí, které mohou vést k jejímu poškození a následně i ke vzniku maligních buněk. Podle typu a rozsahu poškození jsou uplatňovány různé mechanismy oprav DNA, jakými jsou básová excizní oprava, nukleotidová excizní oprava, korekce párování bází, homologní rekombinace nebo nehomologní spojování konců.

V předkládané práci jsem se v přehledové části zaměřila na strukturu DNA, její replikaci a opravy. Dále jsem se zabývala možnostmi analýzy obsahu proteinů a aktivity uracilových DNA glykosyláz, které hrají důležitou úlohu v básové excizní opravě. V experimentální části jsem detekovala a kvantifikovala vybrané proteiny účastnící se syntézy a oprav DNA v různých buněčných liniích, a to jak nádorových, tak i diploidních. Současně jsem v rámci své práce provedla imunofluorescenční experimenty zaměřené na lokalizaci sledovaných proteinů v buňkách a měření aktivity uracilových DNA glykosyláz. Na závěr jsem provedla korelativní analýzu mezi jednotlivými sledovanými proteiny a rovněž mezi obsahem UNG2 a aktivitou uracilových DNA glykosyláz.

2 Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše na téma: DNA – její struktura, replikace a opravy způsoby hodnocení obsahu proteinů a aktivity uracilové DNA glykosylázy.
2. Vypracování literární rešerše na téma: Buněčná senescence a základní znaky nádorových a senescentních buněk.
3. Provedení srovnávací analýzy vybraných proteinů účastnících se syntézy a oprav jaderné DNA u různých lidských buněčných linií.
4. Nalezení případných rozdílů mezi rostoucími, senescentními a nádorovými buňkami pomocí analýzy proteinového obsahu, mikroskopických lokalizačních experimentů a ve vybraných případech pomocí analýzy enzymové aktivity.

3 Literární přehled

3.1 Struktura DNA

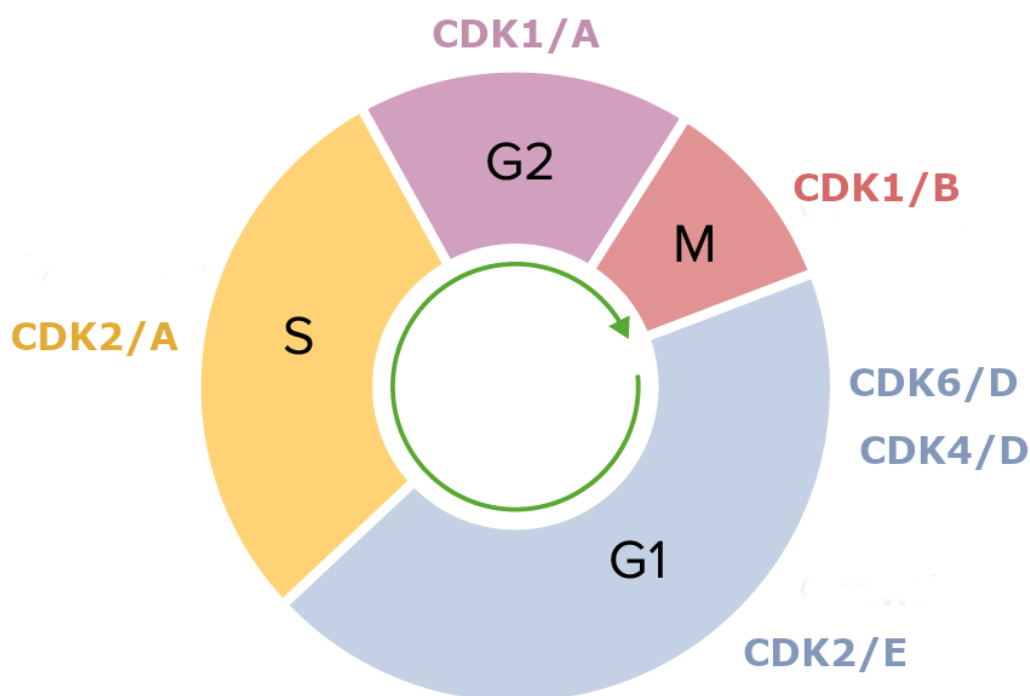
Na počátku 50. let 20. století bylo díky výzkumu Rosalind Franklin objasněno, že molekula DNA se skládá ze dvou vláken, která jsou uspořádána do dvoušroubovice (Franklin *et* Gosling, 1953). Tyto klíčové poznatky pak umožnily Jamesi Watsonovi a Francisi Crickovi objasnit strukturu DNA a začít uvažovat o molekulě DNA jako o nositelce genetické informace (Watson *et* Crick, 1953).

Jak bylo předesláno, molekula DNA se skládá ze dvou vláken uspořádaných do dvoušroubovice. Řetězec na 3' konci končí hydroxylovou skupinou a na 5' konci fosfátovou skupinou (Alberts *et al.*, 2002). Každé vlákno je tvořeno nukleotidy spojenými fosfodiesterovými vazbami. Nukleotidy jsou složeny z báze, kterou může být – adenin (A), guanin (G), cytosin (C) a tymin (T) sacharidu 2'-deoxy-*D*-ribózy a fosfátové skupiny (Zhang *et* Yang, 2019). Pořadí nukleotidů ve vlákně DNA je označováno jako primární struktura DNA. Sekundární struktura DNA je založena na párování bází v protilehlých řetězcích (Ghannam *et al.*, 2021). Ty jsou spojeny vodíkovými můstky. Nukleotidy jsou k sobě vázány na základě komplementarity. Zatímco adenin vytváří pár s tyminem pomocí dvou vodíkových můstků, guanin se páruje s cytosinem pomocí tří vodíkových můstků. To odpovídá Chargaffovu pravidlu (Chargaff *et al.* 1949; Chargaff, 1951), které říká, že počet adeninů se rovná počtu tyminů a počet guaninů se rovná počtu cytosinů. Současně platí, že obě báze se na protilehlých řetězcích mohou párovat pouze, pokud jsou řetězce antiparalelní (Alberts *et al.*, 2002).

V lidských buňkách se DNA nachází především v jádře, kde je spojena s histony (H1, H2A, H2B, H3 a H4) a dalšími proteiny. Celý tento komplex je nazýván chromatin (Stein *et* Farber 1972; van Holde, 1988). Těsná vazba mezi DNA a histony je dána rozdílným nábojem. Zatímco DNA je díky přítomnosti fosfátových skupin nabita negativně, histony nesou pozitivní náboj (Annunziato, 2008). Kromě jádra se DNA nachází rovněž v mitochondriích (Heuer, 2021).

3.2 Buněčný cyklus a replikace DNA

DNA je nositelkou genetické informace organismu (Alberts *et al.*, 2002) Její přesnou duplikaci a segregaci do dceřiných buněk je zajištěna kontinuita genetické informace (Noguchi, 2010). Tento důležitý krok se odehrává v průběhu buněčného cyklu, který se dělí na dvě hlavní fáze: interfázi a mitózu. Během interfáze se buňky připravují na buněčné dělení a syntézují DNA. V průběhu mitózy pak dochází k segregaci DNA do dceřiných buněk a k fyzickému rozdělení mateřské buňky na dvě dceřiné. Interfáze je rozdělena na fázi G1 (gap 1), S a G2 (gap 2; viz obr. 1). Během G1 fáze se buňky připravují na syntézu DNA. Pokud jsou podmínky pro syntézu nepříznivé, může buňka vstoupit do klidové fáze (G0). V opačném případě vstupuje buňka do S fáze a dochází k syntéze DNA. Během fáze G2 pak dochází k přípravě buňky na buněčné dělení (Alberts *et al.*, 2002).



Obrázek 1 Schéma buněčného cyklu a jeho regulace cykliny a Cdk
Převzato a upraveno z: 2.10 The cell cycle [online] [navštíveno 16. 04. 2023]. Dostupné z <https://www.linkedin.com/pulse/210-cell-cycle-epun-dissanayake>.

Buněčný cyklus je řízen zejména cyklin-dependentními kinázami (CDK), které jsou regulovány cykliny a Cdk inhibitory (Barnum *et al.*, 2014; Collins *et al.*, 1997). Cykliny tvoří s Cdk komplex cyklin/Cdk a společně regulují průchod buněk přes jednotlivé fáze buněčného cyklu (viz obr. 1) (Malumbres, 2014). Nejprve je v G1 fázi cykliny typu D aktivována Cdk4/6 kináza. Syntéza cyklinů D je regulována extracelulárními vlivy, např. mitogenními signály (Ding *et al.*, 2009). Aktivní komplex cyklin D/Cdk4/6 iniciuje fosforylaci a inaktivaci retinoblastomového proteinu (pRB), a tím aktivaci E2F transkripčních faktorů (Ding *et al.*, 2009; Jašková, 2010). Výsledkem je exprese cyklinů E, A, B a dalších genů potřebných v S a M fázi. V pozdější části G1 fáze dochází k aktivaci Cdk2 kinázy cyklinem E a další fosforylaci pRB proteinu. To umožňuje přechod buněk do S fáze. V S fázi dochází k výměně cyklinu E za cyklin A a vytvoření cyklinu A/Cdk2 kinázy. Tento komplex umožňuje průchod buněk S fázi, její ukončení fosforylací CDC6 a E2F1 proteinů a přechod buněk do G2 fáze (Ding *et al.*, 2020). V G2 fázi působí komplex cyklinu A/Cdk1 kinázy a cyklinu B/Cdk1, které umožňují průchod buněk G2 fázi a jejich vstup do M fáze (Chotiner *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019).

Průchod buněčným cyklem rovněž podléhá regulacím v kontrolních bodech (Funk, 2006). První kontrolní bod, který je označován jako restriční, se nachází ve fázi G1. Pro průchod restričním bodem je nezbytná přítomnost růstových faktorů. Po jeho překročení již nejsou růstové faktory potřeba (Pardee, 1974). Následující kontrolní bod je v G1/S fázi. Pro jeho překonání je nutná absence poškození DNA (Barnum *et al.*, 2014). Poškození DNA rovněž limituje průchod kontrolním bodem na přechodu G2

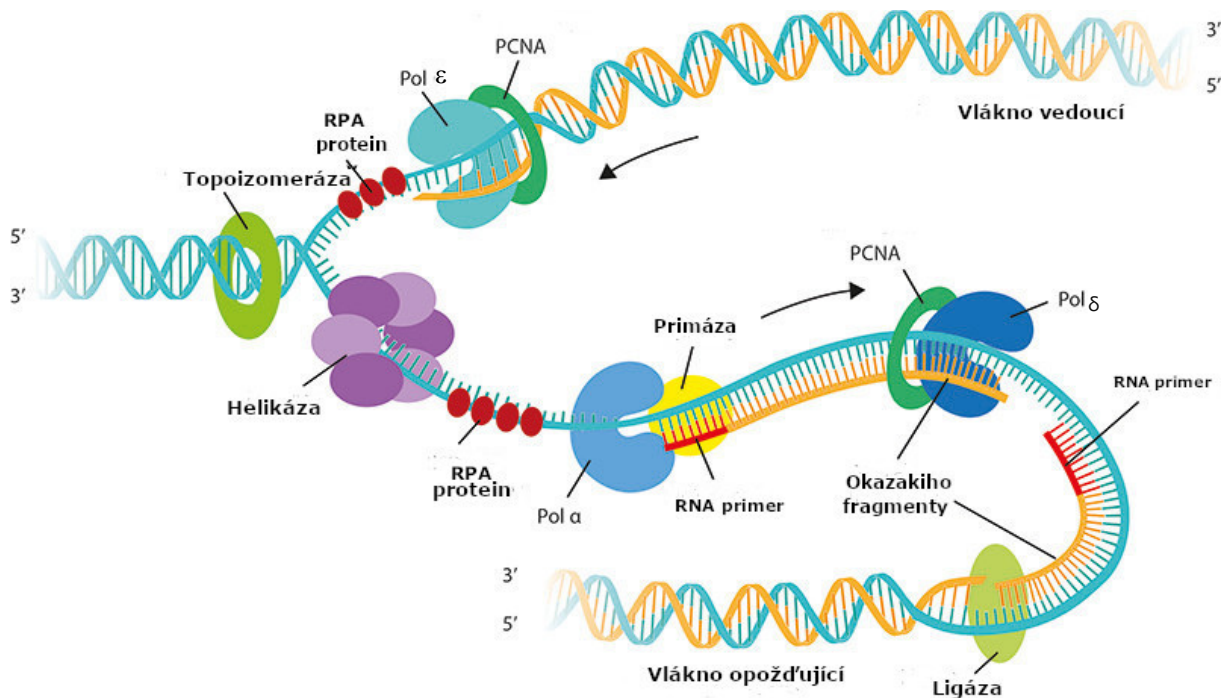
a M fáze (Yam *et al.*, 2022). V posledním kontrolním bodě se kontroluje uspořádání dělicího vřeténka ve fázi M. Pro průchod buňky tímto bodem je důležité bezchybné připojení kinetochorů chromozomů k mikrotubulům dělicího vřeténka (Lara-Gonzalez *et al.*, 2012).

Syntéza DNA (viz obr. 2) začíná ve specifických místech genomu zvaných replikační počátky, kterých se v eukaryotických organismech nachází velké množství (O'Donnell *et al.*, 2013). Již během G1 fáze dochází k vytváření tzv. pre-replikačních komplexů. Tento proces se nazývá licencování replikačních počátků (Moldovan *et al.*, 2007). Nejdříve se k replikačním počátkům váže komplex šesti proteinů – tzv. origin recognition complex (ORC1-6) (Chesnokov, 2007). K ORC se pak váže Cdc6 protein a spolu pak tvoří platformu pro Cdt1 a MCM2-7 (minichromosome maintenance protein complex) komplex. Tato reakce vyžaduje ATP a jejím výsledkem je vytvoření komplexu Orc-Cdc6-Cdt1-MCM2-7 (OCCM). Po následné hydrolýze ATP dochází k uvolnění Cdt1 proteinu (Yuan *et al.*, 2017). K aktivaci MCM2-7 helicázy, která zajišťuje rozvolnění dvoušroubovice DNA, dochází až v S fázi buněčného cyklu, kdy jsou replikační počátky aktivovány vlivem CDK/DDK kináz (cyklin dependentní kinázy/ Dfb4 dependentní protein kinázy) (Stillman, 1996; Bell *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2017). MCM2-7 helicáza je aktivována vazbou dalších proteinů, Cdc45 proteinu a GINS komplexu (z japonského výrazu go-ichi-ni-san, v překladu 5-1-2-3, po čtyřech podjednotkách komplexu Sld5, Psf1, Psf2 a Psf3) a vytvořením tzv. CMG komplexu (Dang *et al.*, 2011; Onesti *et al.*, 2013; Langston *et al.*, 2014). Pro počáteční rozvolnění DNA v místě počátku je nutný rovněž protein – MCM10 (Baxley *et al.*, 2017). Rozvolněním dvoušroubovice DNA se vytváří replikační vidlička obsahující dva jednovláknové templátové řetězce. Při rozvolňování dvoušroubovice hrají důležitou roli topoisomerázy, které snižují tenze šroubovice DNA (Champoux, 2001).

V průběhu replikace jsou jednovláknové úseky DNA stabilizovány pomocí heterotrimerního proteinového komplexu označovaného jako replikační protein A (RPA) (Wold *et al.*, 1988). Komplex proteinů zabezpečující duplikaci DNA se souhrnně nazývá jako replizom (Jones *et al.*, 2021).

Syntéza DNA je zahájena syntézou krátkého RNA primeru (10-200 bp), který je později odbourán. DNA polymerázy umí syntetizovat řetězce pouze ve směru od 5' konce ke 3' konci, přičemž ve směru 3'→5' vykazují opravnou (tzv. proofreading) aktivitu (Běbenek *et al.*, 2018). Vazbu DNA polymeráz na vlákno DNA zajišťuje proliferační antigen buněčného jádra (PCNA) (Stillman, 2008). V případě syntézy vedoucího řetězce (s předlohovým řetězcem orientovaným směru 3'→5') probíhá syntéza DNA pomocí polymerázy ϵ kontinuálně. Druhé vlákno, označované jako opoždující, je syntetizováno diskontinuálně polymerázou δ . Opoždující vlákno je syntetizováno po krátkých úsecích, tzv. Okazakiho fragmentech (Okazaki *et al.*, 1968). Nejprve komplex primáza a DNA polymeráza α syntetizují krátký RNA primer (primáza) a krátký řetězec DNA (polymeráza α) (Núñez-Ramírez *et al.*, 2011). Následně DNA polymeráza δ dosyntetizuje vlákno DNA k sousednímu RNA primeru (McElhinny *et al.*, 2008) a RNA primery jsou odstraněny pomocí enzymů RNáza H a FEN1 (Balakrishnan *et al.*, 2013). Části nasyntetizované DNA jsou poté spojeny DNA ligázou I (Goulian *et al.*, 1990).

Během každého replikačního cyklu dochází ke zkracování koncových částí chromosomů - telomer (Whittemore *et al.*, 2019). Důvodem je fakt, že DNA polymerázy nejsou schopny zahájit syntézu DNA na jednovláknové předloze. Telomery představují DNA-proteinové komplexy a chrání genom před degradací a interchromozomální fúzí. Telomerická lidská DNA je tvořena opakujícími se sekvencemi TTAGGG, které interagují se specifickými proteiny a vytvoří smyčkovou konformaci, která chrání chromozomální konce (Shammas, 2011). Jelikož každým dělením se telomerická DNA zkracuje, došlo by postupně k degradaci chromozomů a buněčné smrti. Proto v případě některých buněk (například zárodečné nebo hematopoetické buňky) dochází k prodlužování telomer pomocí reverzní transkriptázy označované jako telomeráza (Shammas, 2011).



Obrázek 2 Schéma replikace jaderné DNA

Převzato a upraveno z: How is DNA replicated? [online] [navštíveno 15. 10. 2022]. Dostupné z: <https://www.mechanobio.info/genome-regulation/how-is-dna-replicated/>

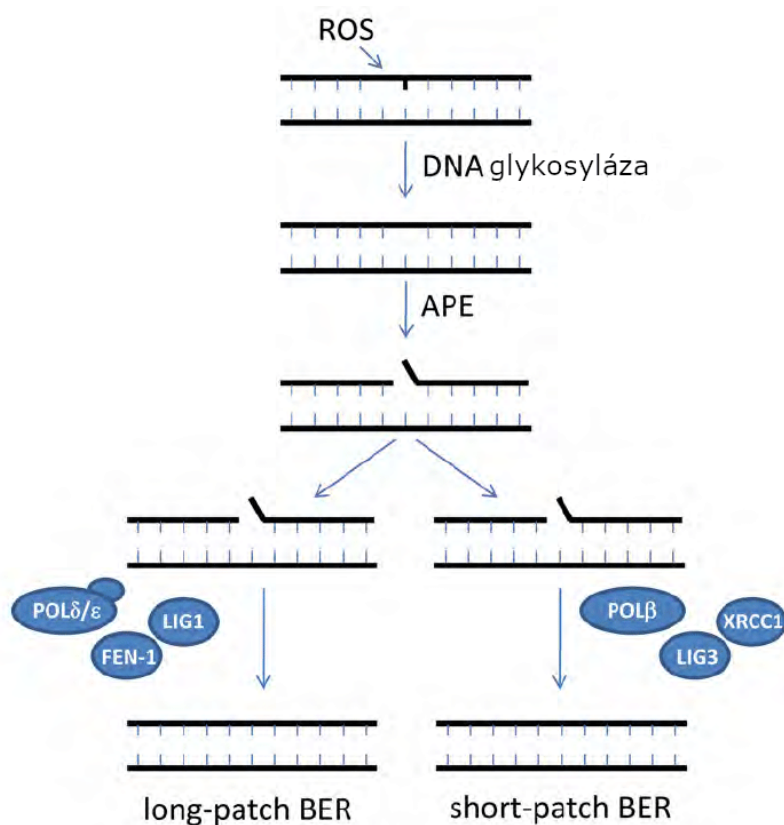
3.3 Opravy DNA

DNA buněk je neustále vystavena různým exogenním a endogenním vlivům vedoucím k velkému množství poškození a mutací, které mohou vyústit ve vytvoření maligních buněk (Jackson *et al.*, 2001). K exogenním vlivům patří například působení fyzikálních nebo chemických mutagenů, které vedou např. ke vzniku jedno (SSB) nebo dvouvláknových zlomů (DSB) v DNA (Lindahl, 1993). K poškození DNA vede rovněž celá řada endogenních vlivů. Typickým příkladem je působení reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a dalších reaktivních metabolitů (Epe, 2002). To má za následek např. depurinaci/depyrimidinaci (Lindahl *et al.*, 1972) nebo ztrátu aminových skupin z adeninu, guaninu a cytosinu, kdy následně vzniká hypoxantin, xantin a uracil. Vznik uracilové báze může tak během následné replikace způsobit např. bodovou mutaci, kdy je místo guaninu do řetězce zařazen

adenin (Frederico *et al.*, 1990). Kromě toho mohou vznikat tzv. adukty (části DNA, které jsou kovalentně připojeny k chemickému činidlu – např. acetaldehydu) (Rajalakshmi *et al.*, 2015), rovněž dochází ke vzniku vazeb mezi proteiny a DNA (Martin, 2008). V závislosti na rozsahu poškození je spuštěn konkrétní typ opravy (Sirbu *et Cortez*, 2013), kterých v buňkách existuje několik – excizní opravy (bázová excizní oprava a nukleotidová excizní oprava) (Hoeijmakers, 2001; David *et al.*, 2007), homologní rekombinace (San Filippo *et al.*, 2008), korekce párování bází (MMR) (Jiricny, 2006), nebo nehomologní spojování konců (NHEJ) (Lieber, 2008). Kromě toho je řada chyb vzniklých během replikace DNA opravena korekční aktivitou DNA polymerázy („proofreading“) (Bębenek *et Ziuzia-Graczyk*, 2018). Chyby v DNA, které nejsou opraveny, mohou vést ke genomovým aberacím a mutacím ovlivňujícím buněčnou funkci (Jackson *et Bartek*, 2009) a jsou hlavním původcem vzniku nádorových onemocnění (Alhmoud *et al.*, 2020).

3.3.1 Bázová excizní oprava

Jednou z hlavních strategií odstraňování a oprav jedné až několika bází (Sung *et Demple*, 2006) je bázová excizní oprava (BER; viz obr. 3). Zpravidla se jedná o poškození vzniklé deaminací, oxidací nebo metylací. Ve většině případů se však jedná o spontánní poškození molekuly DNA (Lindahl, 1993). Celý proces zahrnuje řadu enzymů, které zabezpečují odstranění a nahrazení poškozené nukleotidové báze. Na základě délky opravovaného fragmentu a proteinů účastníků se celé kaskády rozlišujeme takzvanou „short-patch BER“ (oprava jednoho nukleotidu) a „long-patch BER“ (oprava 2-6 nukleotidů) (Sattler *et al.*, 2003). Klíčovými enzymy BER jsou DNA glykosylázy (Jacobs *et Schär*, 2011). Ty rozeznávají a odstraňují poškozenou bázi hydrolýzou *N*-glykosidické vazby za vzniku abazického místa (AP-místo). AP-endonukleáza 1 (APE1) štěpí fosfodiesterové vlákno na 5' konci AP-místa a deoxyribonukleázový zbytek na 5' konci je odstraněn 5' deoxyribofosfatázou (dRPase) (Beard *et al.*, 2006; Dianov *et Hübscher*, 2013; Ligasová *et al.*, 2021). Vlákno DNA tak obsahuje zlom, který má na svém 3' konci hydroxylovou skupinu a na 5' konci deoxyribosylfosfát bez báze. Souhrnně tyto enzymy iniciují bázovou excizní opravu velkého množství lézí, kdy je každá rozeznávána jednou nebo několika glykosylázami s překrývajícími se specifickými funkcemi (Krokan *et Bjoras*, 2013, Almeida *et Sobol*, 2007). Dalším důležitým enzymem BER je DNA polymeráza β , která vkládá do řetězce DNA na základě párování bází správný nukleotid. Vlákno je následně spojeno DNA ligázou III (Srivastava *et al.*, 1998). Popsaný způsob představuje tzv. „short-patch“ BER.



Obrázek 3 Schéma báze excizní opravy
Převzato a upraveno z Biedermann *et al.*, 2011.

V druhé zmiňované strategii - „long-patch“ BER, je nahrazována část vlákna DNA s minimální délkou dvou nukleotidů, běžně 2-6 nukleotidů (Fortini *et al.*, 1998). V tomto případě může být syntéza DNA katalyzována DNA polymerázou β nebo DNA polymerázou δ/ε (Fortini *et al.*, 1998, Pascucci *et al.*, 1999). Pro tento způsob BER opravy je důležitý taky PCNA protein, který zajišťuje stabilizaci dlouhých nukleotidových sekvencí (Fortini *et al.*, 1998). Nukleotidová sekvence je odstraněna flap endonukleázou (FEN-1) a vlákno je poté spojeno DNA ligázou I (Lindahl, 1999).

3.3.2 Další způsoby oprav DNA

Kromě BER existuje řada dalších strategií oprav poškozené DNA. Například oprava velkých lézí na molekule DNA způsobených UV zářením, mutageny nebo chemoterapeutiky, probíhá pomocí nukleotidové excizní opravy (NER). Celý průběh NER zabezpečuje nejméně třicet proteinů (Koellner *et al.*, 2018). Jako první rozeznávají poškození v DNA proteiny Xenoderma pigmentosum C (XPC), replikační protein A (RPA) a Xenoderma pigmentosum A (XPA), které pomáhají navázat opravný komplex transkripčního faktoru II H (TFIIH) k poškozenému místu DNA (Volker *et al.*, 2001). Tento komplex disponuje helikázovou aktivitou a odděluje od sebe vlákna DNA (Sancar, 1996). Proteiny Xenoderma pigmentosum F (XPF) a Xenoderma pigmentosum G (XPG) pak pomocí endonukleázové aktivity (Graf *et al.*, 2011) odstraňují oligodeoxynukleotid. Na základě komplementarity následně zaplní vzniklou mezeru DNA polymeráza. V případě proliferujících buněk tuto roli plní DNA

polymeráza δ/ϵ , v případě neproliferujících buněk, DNA polymeráza κ/λ (Wood, 1997; Lehmann, 2011). Vlákno nakonec spojí DNA ligáza (Araújo *et al.*, 2001).

Chyby, které vznikají během replikace DNA, a které uniknou kontrolnímu čtení polymerázy (proofreading), jsou často opravovány pomocí korekce párování bazí (Kunkel *et al.*, 2005). Nesprávně zařazený nukleotid je rozeznáván proteinem MutS α nebo MutS β , přičemž protein PCNA reaguje s dalšími komponenty dráhy MMR včetně homologů MutS a MutL, exonukleázou I a polymerázou δ . Vlivem exonukleázy I dochází k odstranění nesprávně zařazeného nukleotidu (Hsieh *et al.*, 2017) a polymerázou δ je následně zařazen správný nukleotid (Goellner *et al.*, 2015). Řetězec je spojen DNA ligázou I (Bleichert *et al.*, 2017).

Dalším způsobem opravy poškozené DNA je homologní rekombinace (HR), která se uplatňuje v případě oprav dvouvláknových zlomů nebo tzv. křížových vazeb v DNA (interstrand crosslinks) (Hashimoto *et al.*, 2016). Cílem této opravy je zachování genetické informace, kterou nesou sesterské chromatidy nebo homologní chromozomy (Wright *et al.*, 2018). HR využívá homologní sekvenci na sesterské chromatidě, která slouží jako templát (Kadyk *et al.*, 1992). Nejdůležitější roli zde hraje protein Rad51, který katalyzuje vyhledávání homologní sekvence a výměnu vlákna DNA (Li *et al.*, 2008). Tento způsob opravy se uplatňuje pouze v pozdní S a G2 fázi buněčného cyklu. HR probíhá v několika fázích (Krejci *et al.*, 2012). V presynaptické fázi se Rad51 protein naváže na jednovláknovou DNA (ssDNA) vzniklou odstraněním vlákna na 5' konci na DSB nebo křížové vazby v DNA (Hinz, 2010). V synaptické fázi Rad51 protein usnadňuje vytvoření spojení mezi homologním duplexem DNA, který slouží jako templát, a vláknem DNA, které tento duplex napadá. Vzniká heteroduplex DNA (tzv. D-smyčka). Následuje fáze post-synapse, kdy je podle 3' konce napadajícího vlákna syntetizována DNA. Rad51 protein se odpojí od molekuly DNA a dojde k odhalení 3' OH konce, který je nutný pro syntézu DNA (Krejci *et al.*, 2012). DSB jsou rovněž velmi často opravovány pomocí nehomologního spojování konců. NHEJ opravuje téměř všechny DSB mimo S a G2 fázi a kolem 80 % DSB v S a G2 fázi, pokud DSB nejsou v blízkosti replikační vidličky (Pannunzio, 2017). Rovněž nevyžaduje žádného homologa jako HR. Důležitým proteinem v této opravné dráze je heterodimerní protein Ku (Ku70/80), který rozeznává DSB a váže se k jejich koncům. Protein Ku zároveň váže katalytickou podjednotku DNA dependentní protein kinázy (DNA-PKcs), kterou zároveň aktivuje. Tím dojde ke vzniku holoenzymu DNA-dependentní protein kinázy (DNA-PK) (Gottlieb *et al.*, 1993). Konce zlomu, které jsou pokryty DNA-PK jsou vystaveny působení nukleázy Artemis společně s polynukleotidovou kinázou/fosfatázou (PNKP), Aprataxinu a PNKP podobnému proteinu (APLF) (Lieber, 2010; Gazo *et al.*, 2020). Následně dochází ke spojení zlomu pomocí proteinu umožňujícímu interakce DNA ligázy IV během NHEJ (XRCC4; X-ray repair cross-complementing protein 4) a DNA ligázy IV (Reid *et al.*, 2015).

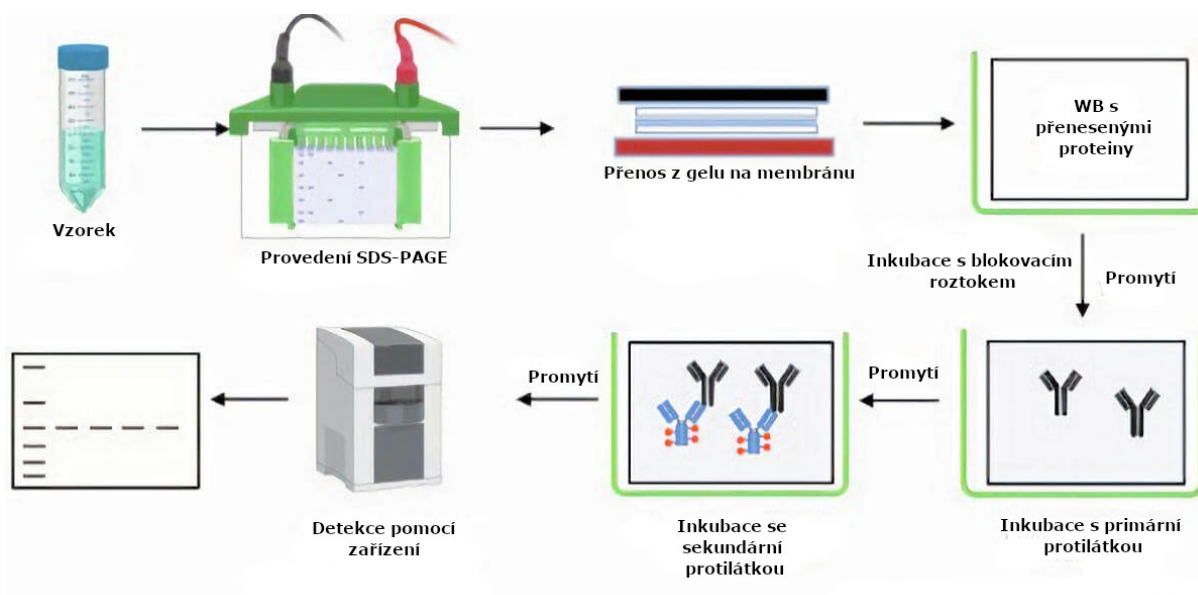
3.4 Způsoby hodnocení obsahu proteinů a aktivity uracilové DNA glykosylázy

3.4.1 Analýza obsahu proteinů

Proteinová analýza je nezbytná pro určení funkce proteinů. Její velmi důležitou součástí je kvantifikace proteinů (Boodhun, 2018).

3.4.1.1 SDS-PAGE a Western blot

SDS-PAGE je jednou z nejpoužívanějších metod pro rozdělení jednotlivých proteinů z proteinových směsí (Walker, 2002). Studované proteiny jsou smíchány s dodecylsulfátem sodným (SDS), který je rozvolní a dodá jim záporný náboj. Díky elektrickému proudu dochází k pohybu proteinů skrz pórovitý akrylamidový gel a jejich rozdělení na základě molekulové hmotnosti (Walker, 2002). Tento krok je nedílnou součástí Western blotu (WB) (viz obr. 4), který je často používanou metodou pro kvantifikaci a identifikaci proteinů (Degasperi *et al.*, 2014). V případě western blotu se detekují proteiny přenesené na membránu pomocí vazby specifických protilátek. Western blot byl vyvinut z metody Southern blotu používané pro detekci specifických sekvencí DNA separovaných gelovou elektroforézou (Klionsky, 2017).



Obrázek 4 Schématické znázornění jednotlivých kroků western blotu

Převzato a upraveno z: Western blot – Aquaportail. [online] [navštíveno 20. 10. 2022]. Dostupné z: <https://www.aquaportail.com/definition-9337-western-blot.html>.

Ještě před samotným elektroforetickým rozdělením proteinů je nutné připravit vzorky proteinů, například extrakcí proteinů ze studované tkáně/buněk a následným rozbitím buněčných membrán pomocí homogenizačních technik (Goldberg, 2008). Tkáň/buňky by měly být homogenizovány v pufru, který současně zajistí rozpuštění a zachování cílových proteinů. Lyze buněčných membrán

homogenizací současně uvolňuje proteázy, kinázy a fosfatázy. Z toho důvodu jsou součástí lyzačních roztoků inhibitory, které snižují aktivitu těchto enzymů (Grabski, 2009). Následně je nutné stanovit množství proteinů v připravených lyzátech. Měření obsahu proteinů je zpravidla založeno na determinaci dusíku, peptidových vazeb nebo aromatických aminokyselin pomocí různých metod (Chang *et al.*, 2017). Příkladem je Biuretova metoda, Lowryho metoda, stanovení koncentrace proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA) nebo stanovení koncentrace proteinů v UV spektru (Chang *et al.*, 2017; Okutucu *et al.*, 2007). Přehled některých metod pro stanovení množství proteinů ve vzorcích je uveden v tabulce 1.

Western blot se provádí ve čtyřech základních po sobě následujících krocích (viz obr. 4). Prvním krokem je nanesení vzorků. Ještě před samotným nanesením na gel je ke vzorkům přidán Laemmliho pufr (Laemmli, 1970) obsahující β -merkaptoetanol, který rozrušuje disulfidické vazby (Anfinsen, 1973). Současně je ke vzorkům přidán SDS. Ten dodává proteinům záporný náboj a umožňuje jejich separaci v elektrickém poli. Jednotlivé proteiny se pak dělí na základě své molekulové hmotnosti (Smith, 1984). Druhým krokem je samotná separace vzorků v polyakrylamidové gelové elektroforéze. Polyakrylamidový gel je tvořen polymerizovanými akrylamidovými monomery s monomery zesíťovaného *N,N'*-metylenbisakrylamidu (Raymond *et al.*, 1959). K rozdělení proteinových vzorků dochází v průběhu průchodu proteinů póry v gelu (Ornstein, 1964). Gel je tvořen ze separačního a zaostřovacího gelu. Zaostřovací gel tvoří horní vrstvu a slouží k zaostření proteinů do úzké zóny před vstupem do separačního gelu. K rozdělení proteinů dochází až v separačním gelu. Celkově toto uspořádání zajišťuje dostatečnou separaci a vysoké rozlišení rozdělených proteinů (Davis, 1964; Ornstein, 1964). Migrace proteinů gelem je určována velikostí pórů, nábojem a velikostí proteinů (Gallagher, 2007). V následném, třetím kroku, jsou proteiny elektroforeticky přeneseny na membránu (Towbin *et al.*, 1979). Nejčastěji jsou používány membrány polyvinylidendifluoridové (PVDF) nebo nitrocelulózové (Towbin *et al.*, 1979). Nitrocelulózová membrána má vyšší schopnost vázat proteiny s malými molekulovými hmotnostmi (Xiang *et al.*, 2021). Oproti PVDF membráně je s ní ovšem složitější manipulace. Pokud dojde k vyschnutí membrány, snadno se zlomí (Goldman *et al.*, 2016). Pro zhodnocení efektivity přenosu proteinů je možné gel nebo membránu obarvit například pomocí Coomassie nebo Ponceau S (Welinder *et al.*, 2011).

Velmi důležitou součástí WB je blokování membrány, které zabraňuje nespecifické vazbě protilátek na membránu, a tím dochází ke snížení pozadí (Jensen, 2012). K tomuto účelu je možné použít například nízkotučné sušené mléko nebo hovězí sérový albumin (BSA, z anglického, „bovine serum albumin“, Mahmood *et al.*, 2012). Posledním krokem WB je detekce proteinů pomocí specifických protilátek. Používá se zejména systém detekce založený na dvou protilátkách. Nejdříve je membrána s přenesenými proteiny inkubována s primární protilátkou (Bass *et al.*, 2017). Ta by měla být citlivá a natolik specifická, aby dokázala detekovat sledovaný protein (Tino *et al.*, 2000). Následně se inkubuje membrána se sekundární protilátkou, která se váže na protilátku primární. Sekundární protilátka bývá

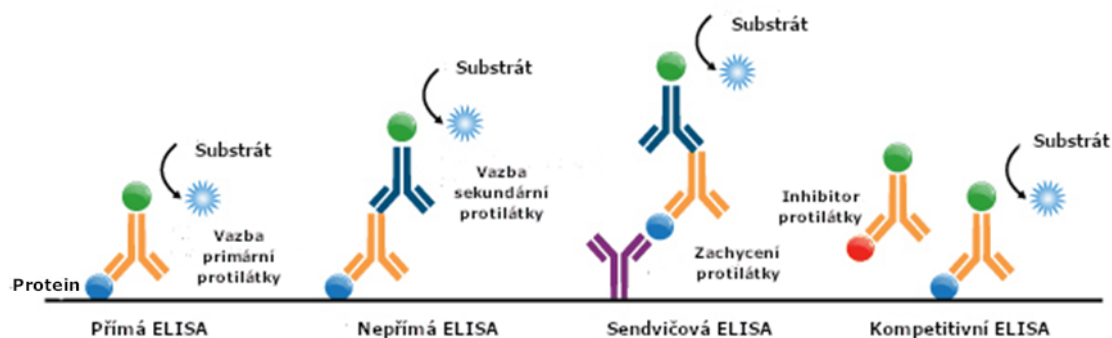
Tabulka 1 Porovnání některých metod pro stanovení množství celkových proteinů v buněčných lyzátech

Metoda	Princip	Výhody	Nevýhody
Biuretova	Chelatace měďnatého iontu imidovými strukturami ionizovanými v silně alkalickém prostředí za vzniku biuretu, který vytváří červeno-fialový komplex s mědí (Fine, 1935; Peč <i>et al.</i> , 2008).	Vysoká přesnost, nezávislá na aminokyselinovém složení, malé množství interferujících látek (Kumbar <i>et Vrsanská</i> , 2015; Okutucu <i>et al.</i> , 2007)	Potřeba velkého množství vzorku (2 ml) (Gornall <i>et al.</i> , 1949)
Lowryho	Založena na biuretové reakci, navíc využívá Folin-Ciocalteuovo činidlo (Lowry <i>et al.</i> , 1951)	Vyšší citlivost než Biuretova metoda (Shen, 2019)	Komplikovaná a časově náročná metoda, vyžaduje více kroků a reagensů než BCA, mnoho interferentů (Shen, 2019, Kumbar <i>et Vrsanská</i> , 2015)
BCA	Redukce Cu^{2+} iontů na Cu^+ v alkalickém roztoku, ke které dochází v přítomnosti zbytků aminokyselin tyrosinu, cysteinu nebo tryptofanu v proteinovém vzorku. BCA reaguje s redukovanými Cu^+ ionty za vzniku modro-fialového komplexu (Walker, 1996).	Dobrá citlivost (0,5-10 μg), s reakcí neinterferují neionogenní detergenty a pufové soli (Chang <i>et Zhang</i> , 2017, Walker, 1996)	Barva není stabilní – přítomnost složek schopných redukce Cu^{2+} na Cu^+ vede ke změně barvy. Mezi interferenty patří redukující sacharidy (Chang <i>et Zhang</i> , 2017)
UV (280 nm)	Proteiny, které obsahují vedlejší řetězce tyrosinu a tryptofanu, absorbují světlo v UV oblasti při 275-280 nm a je možné je stanovit spektrofotometricky (Peč <i>et al.</i> , 2008).	Rychlá a nedestruktivní metoda, relativně citlivá (je potřeba 100 μg proteinu) (Chang <i>et Zhang</i> , 2017)	Vyžaduje relativně čisté, bezbarvé vzorky (Chang <i>et Zhang</i> , 2017; Olson <i>et Markwell</i> , 2007)

značena fluorescenčně nebo enzymaticky, například křenovou peroxidázou (HRP) nebo alkalickou fosfatázou (AP) (Bronstein *et al.*, 1989; Kricka, 1991; Bass *et al.*, 2017). Použití sekundární protilátky umožňuje zvýšení signálu (Bass *et al.*, 2017). V případě enzymaticky značených protilátek přidáním vhodného substrátu dochází v místě sledovaného proteinu ke vzniku produktu, který je detekován pomocí dokumentačního zařízení. V případě HRP se jako substrát často používají látky založené na luminolu. V přítomnosti HRP luminol oxiduje a vytváří excitovaný produkt, který emituje světlo při návratu do původního stavu. Jakmile je substrát vyčerpán, dochází k úbytku signálu. Signál je následně vyhodnocen pomocí zobrazovacích technik (Alegria-Schaffer, 2014). V případě alkalické fosfatázy je jako substrát využíván 1,2-dioxetan, který je defosforylován alkalickou fosfatázou. Vzniká dioxetanový anion a dochází k emisi světla, která je detekována pomocí spektrofluorometru (Bronstein *et al.*, 1989). K detekci proteinů je možné také použít fluorescenční DNA aptamery. Jedná se o krátké oligonukleotidy, které se váží k cílovým strukturám s vysokou afinitou a specifitou, čímž vytvářejí terciární struktury (Wang *et al.*, 2020). Proužky vzniklé separací jsou porovnávány se standardem molekulové hmotnosti. Podle integrované intenzity proužku lze odhadnout množství proteinu ve vzorku (Mahmood *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014).

3.4.1.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Kvantifikace proteinů může být provedena rovněž pomocí ELISA (imunoenzymatická analýza) (Engvall *et al.*, 1971). Tato metoda umožňuje analýzu proteinů vzorků imobilizovaných na mikrodestičce pomocí specifických protilátek. Existuje několik typů ELISA provedení – přímá, nepřímá, sendvičová a kompetitivní (viz obr. 5). V případě přímé ELISA, je protilátka přímo konjugována s enzymem. Signál může být amplifikován přidáním sekundární protilátky, což je případ nepřímé ELISA metody (Lin, 2015). Nejpoužívanějším provedením je sendvičová analýza, kdy je zkoumaný analyt umístěn mezi dvěma primárními protilátkami detekujícími různé epitopy antigenu (Fernando *et al.*, 1992). Tento přístup umožňuje nejvyšší citlivost pro detekci antigenu v komplexním vzorku (Lin, 2015). V případě kompetitivní ELISA je na pevný nosič přichycen specifický antigen a ten je následně rozeznáván analyzovanou protilátkou. Poté, co je specifický antigen navázán na nosič, dojde k promytí a je přidán analyzovaný vzorek společně s protilátkou, která nese enzym. Pokud vzorek obsahuje protilátku, která reaguje s přichyceným antigenem, tak tato protilátka soutěží se značenou protilátkou o vazbu na přichyceném antigenu. Čím více protilátky vzorek obsahuje, tím více se tato protilátka váže na antigen, a tím menší signál poskytují enzymem značené protilátky (Moštek, 2020).



Obrázek 5 Schéma provedení různých typů metody ELISA

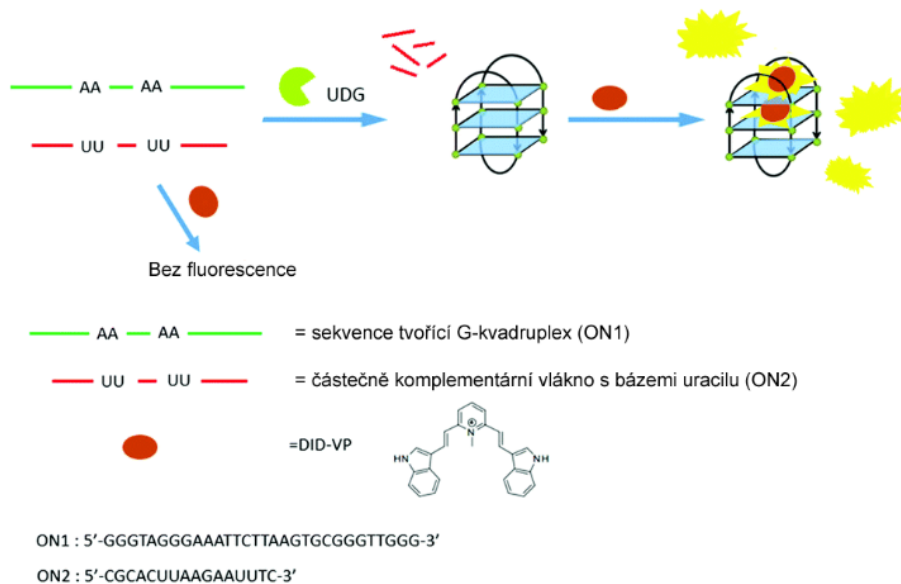
Převzato a upraveno z: Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). [online] [navštíveno 22. 10. 2022]. Dostupné z: <https://www.creative-proteomics.com/pronalyse/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa-service.html>.

3.4.2 Analýza aktivity glykosyláz vyštěpujících uracil

Uracilové DNA glykosylázy jsou enzymy účastníci se bázové excizní opravy (viz podkapitola 3.3.1). Pro měření jejich aktivity byla vyvinuta celá řada metod zahrnující například radioaktivní značení využívající substráty DNA obsahující $[^3\text{H}]$ -dUMP a schopnost UNG štěpit uracil v těchto substrátech (Krokan *et al.*, 1981). Krokan a Wittwer zjistili, že UNG nejlépe štěpila DNA obsahující $[^3\text{H}]$ -dUMP uvnitř řetězce, na rozdíl od jeho umístění na 3'-OH konci. Vyštěpování $[^3\text{H}]$ -dUMP se výrazně snížilo, když byl deoxynukleosid monofosfát (dNMP) nahrazen odpovídajícími ribonukleosid monofosfáty (rNMP) (Krokan *et al.*, 1981; Grin *et al.*, 2009). Nevýhodou popsané metody je nutnost použití radioaktivních izotopů vodíku.

Některé metody využívají pro analýzu glykosylázové aktivity fluorescenční sondy. Například Maksimenko s kolektivem (Maksimenko *et al.*, 2004) vyvinul metodu využívající tzv. molekulární maják. Jedná se o jednovláknový DNA oligonukleotid značený na 5'-konci fluoresceinem a na 3'-konci dabcylem (zhášec fluorescence). Tento oligonukleotid má současně na obou koncích krátké komplementární sekvence, které obsahují cílovou bázi, např. uracil. Působením enzymu s glykosylázovou aktivitou dochází k odstranění modifikované báze, následně ke vzdálení fluoroforu od zhášec a ke zvýšení fluorescence. Výhodou této metody je rychlost provedení a možnost vyhodnocení pomocí běžné čtečky destiček. Na druhé straně je tato metoda méně vhodná pro analýzu strukturálních aspektů jako například vliv zlomů v molekule DNA na aktivitu uracilové glykosylázy (Ligasová *et al.*, 2021).

Lu a kolegové (Lu *et al.*, 2015), analyzovali aktivitu UNG měřením luminiscence po vytvoření G-kvadruplexu z neznačené dvouvláknové sondy a navázání malé organické molekuly (DID-VP) na oligonukleotid (viz obr. 6) (Lu *et al.*, 2015). Jedná se o rychlou a jednoduchou metodu. Teoreticky je možné tuto metodu použít pro identifikaci inhibitorů UNG.



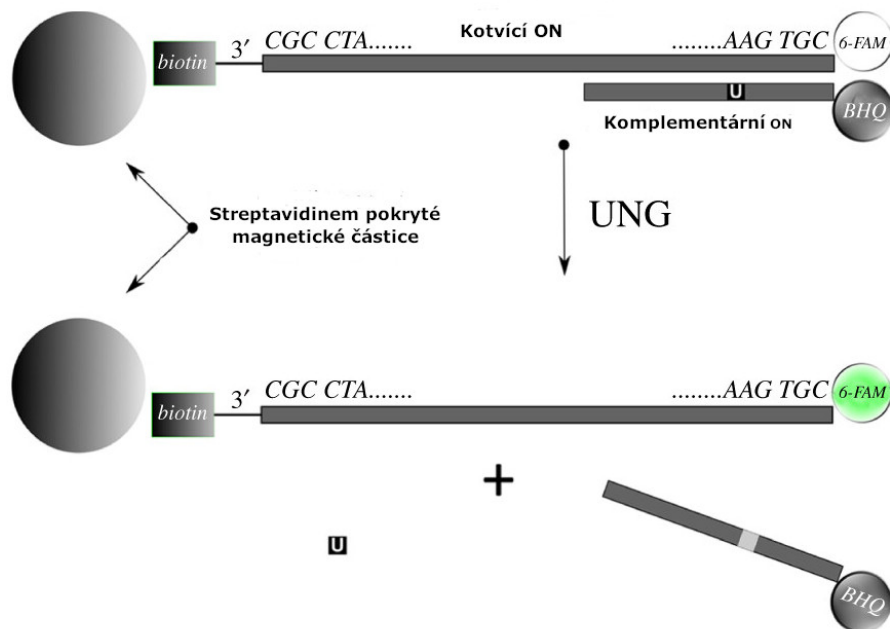
Obrázek 6 Schéma metody pro analýzu glykosylázové aktivity

Na obrázku je znázorněno schéma pro analýzu aktivity uracilových glykosyláz pomocí G-kvadruplex selektivní luminiscentní sondy DID-VP. U a A označují uracil a adenin. Převzato a upraveno z Lu *et al.*, 2015.

Aktivitu UNG je také možné monitorovat pomocí inkorporovaných nukleotidů jako je 2-aminopurin (Stivers, 1998) nebo pyren (Ono *et al.*, 2012). V prvním případě je do duplexu DNA vedle uracilu inkorporován 2-aminopurin. Vyštěpení uracilu vede ke změně fluorescence 2-aminopurinu. Velikost této změny pak slouží k analýze aktivity UNG (Stivers, 1998; Bellamy *et al.*, 2001). Nevýhodou metody je její vysoká závislost na teplotě (Stivers, 1998). V případě použití pyrenu se využívá schopnosti uracilu efektivně zhášet fluorescenci pyrenu (Ono *et al.*, 2012). Tuto metodu je možné použít například pro *in vitro* analýzu UNG aktivity s purifikovanými enzymy, nebo pro analýzu UNG aktivity u bakteriálních buněk. Navíc, fluorescenční vlastnosti pyrenu umožňují přímé sledování buněčných opravných aktivit pomocí mikroskopie (Ono *et al.*, 2012).

Velice rychlým způsobem měření glykosylázové aktivity je metoda využívající fluorescenčně značené oligonukleotidy (ON) ukotvené na povrchu magnetických kuliček pokrytých streptavidinem (viz obr. 7). Oligonukleotidová sonda je složena z kotvícího a kratšího komplementárního oligonukleotidu. Kotvící oligonukleotid obsahuje biotin na 3' konci a fluorochrom 6-FAM (6-karboxyfluorescein) na svém 5' konci. Komplementární oligonukleotid má na svém 3' konci zhášecí fluorescence – Black Hole Quencher 1 (BHQ-1). Současně má ve svém řetězci uracil. Oligonukleotidová sonda je inkubována v roztoku obsahujícím enzym s glykosylázovou aktivitou (například buněčný nebo jaderný lyzát). Aktivitou tohoto enzymu je z oligonukleotidového řetězce vyštěpen uracil, čímž dojde k destabilizaci oligonukleotidového komplexu a oddálení molekul fluorochromu 6-FAM a zhášecí fluorescence BHQ-1. Výsledkem je postupný nárůst fluorescence v čase (Ligasová *et al.*, 2021). Tato metoda umožňuje například měření glykosylázové aktivity v reálném čase, a to jak v roztocích s purifikovanými enzymy, tak i v buněčných lyzátech. Navíc, signál

je možné analyzovat pomocí čtečky destiček nebo pomocí fluorescenční mikroskopie. Oproti molekulárním majákům nebo volným sondám poskytuje tato metoda využívající ukotvené sondy mnohem spolehlivější výsledky v případě analýzy buněčných lyzátů (Ligasová *et al.*, 2021).



Obrázek 7 Schéma metody pro analýzu glykosylázové aktivity

Na obrázku je znázorněna schéma sondy a principu metody pro analýzu glykosylázové aktivity pomocí streptavidinem pokrytých magnetických částic a oligonukleotidů s uracilem v řetězci. Převzato a upraveno z: Ligasová *et al.*, 2021.

Další metodou, která využívá pro analýzu aktivity UNG zhášení fluorescence je použití oxidu grafenu (GO). Metoda byla vyvinuta Chenem a kolektivem (Chen *et al.*, 2019) a využívá ke stanovení aktivity UNG štěpící reakci pomocí exonukleázy I, modifikovanou DNA sondu s FAM na 3' konci a zhášecí efekt GO. Na DNA sondě se v komplementární oblasti vlásenky nachází dva uracilové deoxyribonukleotidy. Tato vlásenková struktura je odbourána působením UNG za vzniku jednovláknové DNA (ss-DNA). Následně působením exonukleázy I dochází k odbourání ss-DNA, což vede k uvolnění molekuly FAM a vysokému signálu fluorescence v přítomnosti GO. Nevýhodou metody je nutnost použití dalšího enzymu - exonukleázy I (Chen *et al.*, 2019).

Kladova a kolektiv (Kladova *et al.*, 2020) vyvinuli metodu pro měření aktivity glykosyláz založené na fluorescenci. V tomto případě obsahovaly fluorescenčně značené DNA sondy modifikované nukleotidy specifické pro studované enzymy. Jeden typ DNA sondy obsahoval FAM a BHQ1 na 5' koncích oligonukleotidů a druhý typ DNA sondy obsahoval FAM na 5' konci a BHQ1 na 3' konci oligonukleotidového duplexu. V případech obou sond byla DNA glykosylázou odstraněna poškozená báze a došlo ke vzniku AP místa. Toto místo bylo štěpeno endonukleázou APE1, čímž došlo k uvolnění krátkého oligonukleotidového fragmentu z duplexu a vzdálení FAM od BHQ. To bylo doprovázeno zvýšením signálu (Kladova *et al.*, 2020). Jelikož tato metoda využívá působení jak glykosylázové, tak i

APE1 endonukleázové aktivity, neumožňuje analýzu samotné glykosylázové aktivity (Kladova *et al.*, 2020).

Jinou metodou využívanou k měření aktivity UNG glykosylázy je povrchová plasmonová rezonance (SPR). Metoda je založena na oligonukleotidovém duplexu přichyceném k streptavidinem pokrytému povrchu senzoru pomocí biotinu. Oligonukleotidové sondy jsou přichyceny k čipu na senzoru SPR. Senzor využívá dvouvláknové uspořádání, kde ON duplex je přichycen ke streptavidinem pokrytému povrchu senzoru. Důsledkem štěpící aktivity UNG je ON duplex destabilizován a komplementární oligonukleotid je uvolněn. To vede ke změně v odpovědi senzoru (Ligasová *et al.*, 2021). Výhodou uvedené metody je, že není potřebná příprava fluorescenčně značených sond. Navíc využívá průtokový systém, a tím umožňuje velice rychlou výměnu jednotlivých roztoků. Proto je vhodná například pro kinetické studie (Ligasová *et al.*, 2021).

3.5 Buněčná senescence

Poškození DNA je spolu se zkracováním telomer nebo aktivací onkogenů považováno za spouštěče buněčné senescence (Alimonti *et al.*, 2010; Childs *et al.*, 2017). Po dosažení určitého počtu dělení (obvykle 40–60) (Hayflick *et Moorhead*, 1961) podstupují normální lidské buňky zastavení buněčného růstu. Tento proces je známý jako replikační senescence a je považován za tumor supresorový mechanismus (Childs *et al.*, 2015). Jedná se o proces, jehož počátečním krokem je zastavení buněčného cyklu. To obvykle zahrnuje inhibici aktivity Cdk a cyklinů pomocí proteinů p21 a p16^{Ink4a}. Protein p16^{Ink4a} inhibuje Cdk4 a Cdk6, které regulují postup buněk buněčným cyklem v G1 fázi tím, že se podílejí na fosforylaci pRB (Hara *et al.*, 1996). Protein p21 inhibuje Cdk1 a Cdk2 (Abbas *et Dutta*, 2009). Buňky s natolik poškozenou DNA, že není možná její oprava, mohou zastavit svůj růst v G1 nebo v G2 fázi a vstoupit do senescence nebo apoptózy (Feringa *et al.*, 2018; Kumari *et Jan*, 2021). Senescentní buňky nejsou schopny exprimovat geny nezbytné pro buněčnou proliferaci (Dimri *et al.*, 1994) a zůstávají díky interakci p53 p16^{Ink4a}-Rb permanentně netečné vůči mitogenním signálům (Takahashi *et Hara*, 2007), což zastavuje jejich růst (van Deursen, 2014). Buňky vstupující do stavu senescence prochází dramatickými změnami v morfologii – dochází ke zvětšení objemu nebo změně původního tvaru buňky, které je doprovázeno změnami ve struktuře jádra, genové expresi, zpracování proteinů a metabolismu. V některých buněčných typech je senescence spojována se změnami ve struktuře chromatinu (Sitte *et al.*, 2000; Narita *et al.*, 2003). Narušení procesu senescence může vést k transformaci buněk v nádorové (Dimri *et al.*, 1995).

3.5.1 Indukovaná senescence

Kromě přirozené senescence (viz podkapitola 3.5) existuje i senescence indukovaná. Senescence může být indukována například ionizujícím zářením, genotoxickými látkami, oxidativním stresem nebo demetylačními a acetylačními činidly (Hernandez-Segura *et al.*, 2018). Expresí genů

nezbytných pro senescenci je kontrolována acetylací histonů a DNA metylací. V tomto ohledu např. inhibitory histon deacetylázy mohou zahájit senescenci u jinak normálních buněk (Pazolli *et al.*, 2012).

Senescence může být indukována také onkogeny. Jedná se o rozsáhlou antiproliferační odpověď na onkogenní signalizaci způsobenou mutací onkogenu nebo inaktivací tumor supresorového genu. Ačkoli dráhy zajišťující onkogeny indukovanou senescenci jsou velice komplexní, mezi hlavní regulátory, které se podílejí na zastavení proliferace, patří proteiny pRb a p53 (Chandek *et Mooi*, 2010).

3.5.1.1 Detekce senescentních buněk

Zastavení buněčného cyklu, jakožto jeden z nejnápadnějších znaků senescence (viz podkapitola 3.5), je charakterizováno ztrátou replikační aktivity. Pro rozlišení senescentních buněk a buněk proliferujících se používají například modifikované nukleosidy jako je 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) nebo etynyl-2'-deoxyuridin (EdU). Tyto nukleosidy pak do své DNA inkorporují v průběhu replikace pouze proliferující buňky (González-Gualda *et al.*, 2020).

Jedním ze znaků senescentních buněk je rovněž typická změna chromatinu a vytváření se senescencí asociovaných heterochromatinových ohnisek (SAHFs). V těchto ohnisečích se nachází heterochromatinové markery jako je např. histon H3, který je metylován na lysinu 9 (trimetylace, H3K9me3) nebo heterochromatin protein 1 (HP1). Rovněž zde dochází k akumulaci nehistonových proteinů HMGA (Narita *et al.*, 2003). SAHFs mohou být detekovány pomocí značení DAPI anebo protilátkami proti histonům, které tvoří komponenty SAHFs (Aird *et Zhang*, 2013).

V senescentních buňkách lze detekovat přítomnost struktur, jako jsou promyelocytická leukemická tělíska (PML), která se nacházejí ve větším množství v senescentních buňkách (Van Damme *et al.*, 2010). Tato tělíska jsou součástí buněčného jádra a podílejí se na regulaci řady procesů jako je replikace DNA, transkripce nebo epigenetické umlčování genů (Stuurman *et al.*, 1990; Lallemand-Breitenbach *et de Thé*, 2010). PML jsou rovněž schopny regulovat řadu buněčných procesů jako je apoptóza, senescence nebo odpověď na poškození DNA (Wang *et al.*, 1998; Ferbeyre *et al.*, 2000). PML tělíska jsou nejčastěji detekována pomocí imunofluorescenčního značení (Dellaire, 2006).

Senescentní a nesenescentní buňky lze rozlišit podle řady znaků, které lze detekovat pomocí světelné mikroskopie (Hooten *et Evans*, 2017). Jedním z nich je například velikost buněk. Podle González-Gualda a kolegů dochází u senescentních buněk k nárůstu jejich velikosti (González-Gualda *et al.*, 2020). Dalším detekovatelným znakem je autofluorescence senescentních buněk. V těchto buňkách dochází k metabolickým změnám (například v mitochondriích byly pozorovány změny v poměru NAD⁺/NADH) (Wiley *et Campisi*, 2021) a hromadění lipopigmentů (jedná se o molekuly, které se v buňkách vyskytují přirozeně, např. lipofuscin). Ty jsou detekovány pomocí jejich autofluorescence (Zhai *et al.*, 2021). Senescentní buňky rovněž vykazují zvýšené množství nesprávně složených proteinů (Cuanalo-Contreras, *et al.*, 2023), které je doprovázeno změnami vnitřních struktur jako je zvětšení velikosti jádra nebo zvýšení počtu lysosomů (Lipetz *et Cristofalo*, 1972).

Jedním z velice často používaných způsobů detekce senescentních buněk je analýza se senescencí asociované β -galaktosidázy (SA- β -Gal) (Childs *et al.*, 2019). V tomto případě se buňky kultivují se substrátem obsahujícím 5-bromo-4-chloro-indolyl-galaktopyranosid (SA-Gal). Jedná se o bezbarvou sloučeninu obsahující galaktózu spojenou s indolem. Pokud se senescentní buňky nachází v roztoku s chromogenním substrátem obsahujícím SA-Gal, pak při pH 6 dochází k aktivaci hydrolázy a následně vzniká modrý produkt (Dimri *et al.*, 1995). Ten je zpravidla detekován světelnou mikroskopií (Dimri *et al.*, 1995).

Jinou možností detekce senescence může být kombinace proliferačních markerů Ki-67 a PCNA (Correia-Melo *et al.*, 2012). Princip je založen na nepřítomnosti těchto proteinů a přítomnosti proteinu γ H2X, který je markerem poškození DNA.

Pro detekci senescentních buněk byly rovněž použity nanočástice, (Ekpenyong-Akiba *et al.*, 2019). Nanočástice byly použity k detekci epitopu β_2 mikroglobulinu (B2M), který je specifický pro senescentní buňky.

V souhrnu lze říci, že ačkoli existuje celá řada metod pro analýzu senescentních buněk, ani jedna z nich neumožňuje přesné odlišení senescentních a proliferujících buněk. Proto se v současnosti používá kombinace alespoň tří způsobů detekce senescentních buněk. Příkladem je současné použití detekce SA- β -Gal aktivity a SAHFs v kombinaci s analýzou replikační aktivity.

Tabulka 2 Přehled vybraných metod detekce senescentních buněk

Metoda	Princip	Výhoda	Nevýhoda
Inkorporace modifikovaných nukleosidů nebo nukleotidů	Nukleosidy inkorporují pouze replikující buňky (González-Gualda <i>et al.</i> , 2021).	Jednoduchá a rychlá metoda (González-Gualda <i>et al.</i> , 2021).	V případě použití EdU jeho vysoká cytotoxicita (Haskins <i>et al.</i> , 2020). V případě primárních linií je nutné kontrolovat, zda nedošlo ke kontaktní inhibici.
Detekce SAHFs	Typická změna chromatinu v senescentních buňkách – SAHFs. Detekce pomocí DAPI a protilátek proti histonům (Aird <i>et Zhang</i> , 2013).	Rychlá metoda (Aird <i>et Zhang</i> , 2013).	SAHFs se nevytvářejí ve všech typech senescentních buněk (Xiao <i>et al.</i> , 2018).
Detekce PML	Zvýšený počet PML tělísek v senescentních buňkách (Ivanschitz <i>et al.</i> , 2013).	Jednoduchá a rychlá metoda pomocí imunofluorescence (Bourdeau, 2009).	Metoda ukazuje pouze poměrově, že se v senescentních buňkách nachází více PML tělísek než v buňkách nesenescenčních. Není zde daný přesný počet těchto tělísek typický pro senescentní buňky (Wenger <i>et al.</i> , 2014).
SA-β-Gal	SA-β-Gal je přítomna v senescentních buňkách. Buňky jsou pěstovány na substrátu X-gal. Ty, ve kterých je SA-β-Gal přítomna, vykazují modrou barvu (Itahana <i>et al.</i> , 2007).	Levná metoda, nenáročná na vybavení (Herrmann <i>et al.</i> , 2020). Detekce z heterogenní skupiny buněk (Itahana <i>et al.</i> , 2007).	Lze detekovat i u buněk, které nejsou senescentní (Itahana <i>et al.</i> , 2007).

Tabulka 2 Pokračování

Metoda	Princip	Výhoda	Nevýhoda
Detekce pomocí proteinů	Principem metody je detekce senescence s využitím markerů proliferace, kterými jsou proteiny Ki-67 nebo PCNA. V případě senescence tyto proteiny nejsou detekovány, a naopak je detekována přítomnost proteinu γ H2AX, který je markerem poškození DNA (Correia-Melo <i>et al.</i> , 2012).	Snadno proveditelná na tkáních v parafinu (Correia-Melo <i>et al.</i> , 2012).	Mnohokroková metoda (Correia-Melo <i>et al.</i> , 2012).
Detekce pomocí nanočástic	Metoda je založena na nanočásticích, které rozeznávají B2M. Ten je membránovým znakem senescentních buněk (Dong <i>et al.</i> , 2016) a jejich vazba umožňuje detekci senescentních buněk (Ekpenyong-Akiba <i>et al.</i> , 2019)	Metoda nemá toxické účinky na organismus. Na nanočástice může být navázána látka, která specificky vyhledá a odstraní senescentní buňky (Ekpenyong-Akiba <i>et al.</i> , 2019).	Metoda zahrnuje mnoho kroků, příprava komponentů je časově a materiálně náročná (Ekpenyong-Akiba <i>et al.</i> , 2019).

3.5.1.2 Využití indukce senescence v terapii

Senescence a její indukce může hrát významnou roli v terapii nádorových onemocnění, kdy se jedná o tzv. terapii indukovanou senescencí (TIS) (Roninson, 2003). Cílem těchto terapií je indukce buněčné smrti a senescence v rakovinných buňkách (Fitsiou *et al.*, 2021). Na onkogenní úrovni může dojít k blokaci buněčné proliferace a usnadnění infiltrace imunitních buněk, což funguje jako tumor supresorový mechanismus (Fitsiou *et al.*, 2021).

TIS představuje novou metodu, která může vylepšit léčbu rakoviny. V rakovinných buňkách může být indukována protirakovinnými látkami nebo radiací (Ewald *et al.*, 2010). TIS může rovněž vykazovat toxické vedlejší účinky, a tím zvýšenou odpověď imunitního systému vůči tumorům (Ewald *et al.*, 2010). Některé terapie, např. terapie zahrnující inhibici CDK4/6 indukují senescenci bez genotoxického vlivu (Bousset *et Gil*, 2022).

Senescence může být rovněž indukována inhibicí aurora kináz patřících do skupiny serin/threoninových kináz, které regulují řadu procesů probíhajících v mitóze jako je uspořádání vřeténka, oddělení centrozomů nebo připojení kinetochorů k mikrotubulům (Lioutas *et Vernos*, 2013). Terapie rakovinných onemocnění indukují ovšem senescenci i v jiných než rakovinných buňkách. Indukce senescence ve zdravé tkáni bývá také spojována s vedlejšími účinky chemoterapie (Demaria *et al.*, 2017) a akumulace senescentních buněk hraje roli ve vývoji dalších patologických projevů (Ekpenyong-Akiba *et al.*, 2019).

3.5.2 Nádorové bujení

V případě, že dojde k narušení buněčných regulací, jako např. k narušení signální dráhy RTK/RAS/MAP-Kinázy nebo PI3K/Akt v buněčném cyklu (Sanchez-Vega *et al.*, 2018) nebo k narušení oprav DNA, může dojít k nekontrolovatelnému buněčnému dělení, které je charakteristické pro nádorové buňky (Cooper, 2000). Důležitou roli v těchto regulacích hrají tzv. protoonkogeny. Jedná se o skupinu genů, které mohou způsobit změnu zdravých buněk na buňky nádorové. Příkladem protoonkogenu je například protein p53 nebo proteiny RAS, které hrají důležitou roli při signalizaci pomocí růstových faktorů (Finlay *et al.*, 1989; Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011). Jejich funkce spočívá v přenosu signálu zajišťujícím buněčnou proliferaci. Funkce protoonkogenů může být narušena chromosomální aberací nebo mutací. Následkem je jejich změna v onkogeny, které vedou ke vzniku nádorového onemocnění (Kontomanolis *et al.*, 2020).

Dalšími regulátory jsou tumor supresorové geny. Ty, na rozdíl od protoonkogenů, omezují buněčný růst a dělení. Jedním z nejlépe prostudovaných supresorů je pRb, který je součástí kontrolního bodu fáze G1 (viz podkapitola 3.2). Tento protein brání vstupu buňky do S fáze a hraje důležitou roli v kontrole buněčného cyklu (Weinberg, 1995). Po jeho vazbě k transkripční doméně E2F proteinu pRB blokuje genovou transkripci genů nezbytných pro postup buněk z G1 do S fáze (Giacinti *et*

Giordano, 2006). Inaktivace proteinu pRB má za následek nekontrolovatelné buněčné dělení a tím vznik nádorového onemocnění (Lohmann, 1999).

Důležitou roli v těchto regulacích hraje protein p53, který vykazuje tumor supresorovou funkci (Finlay *et al.*, 1989; Zilfou *et al.*, 2009). p53 je indukovaný stresovými signály jako je poškození DNA, aktivace onkogenů nebo nedostatek živin. Výsledkem jeho aktivace je apoptóza nebo zastavení buněčného cyklu. Nejčastější mutace v rakoviných buňkách je právě v proteinu p53 (Lawrence *et al.*, 2014; Hafner *et al.*, 2019).

3.5.3 Apoptóza

Apoptóza neboli programová buněčná smrt, se běžně vyskytuje u zdravých buněk v důsledku jejich stárnutí, a slouží k udržení zdravé buněčné populace (Norbury *et al.*, 2001). K apoptóze dochází mimo jiné v důsledku takového poškození DNA, že není možná její oprava (Elmore, 2007).

Poruchy v buněčné signalizaci mohou vést k narušení průběhu apoptózy a vzniku nádorového onemocnění v důsledku nekontrolovaného dělení (viz podkapitola 3.5.1) (Wang *et al.*, 1997). Proces buněčné smrti může být také inaktivován různými mechanismy včetně genetických nebo epigenetických změn, případně virovými onkogenními proteiny způsobujícími tumorogenezi (Elmore, 2007). Apoptotické buňky jsou typické určitými biochemickými modifikacemi jako je štěpení proteinů nebo fragmentace DNA (Hengartner, 2000).

Hlavními enzymy, které se apoptózy účastní jsou kaspázy. Jsou rozlišovány dvě kaspázové dráhy – vnější a vnitřní. Vnější dráha je spouštěna vazbou ligandu k tzv. receptorům smrti (DR), které patří do superrodiny tumor nekrotizujícího faktoru (TNF) (Hussar, 2022). Tato dráha je obvykle zahájena signálem pocházejícím z prostředí mimo buňku, nejčastěji se jedná o NK lymfocyty (z anglického natural killer cell – „přirozený zabiják“) nebo CD8 pozitivní cytotoxické T lymfocyty. (Yanumula *et al.*, 2022). Vnitřní dráha je zahájena senzory, které detekují poškození DNA, přítomnost virových patogenů, záření, toxinů nebo nedostatku signálů k přežití zprostředkovaný jinými buňkami (Yanumula *et al.*, 2022). Tyto signály způsobují změnu ve vnitřní mitochondriální membráně, které vyústí v uvolnění pro-apoptotických proteinů z vnitřní membrány do cytosolu (Saelens *et al.*, 2004).

b

4 Metodika

4.1 Biologický materiál

V experimentech byly použity následující lidské buněčné linie: HeLa, NCI-H2009, HCT-116, U2-OS, hTERT RPE-1 a IMR-90. HeLa buňky pocházejí z nádorové buněčné linie odvozené z rakoviny děložního čípku. Buněčná linie NCI-H2009 je rovněž nádorového typu a byla odvozena z buněčné linie pocházející z karcinomu plic. Buněčná linie HCT-116 byla odvozena z kolorektálního karcinomu tlustého střeva a buněčná linie U2-OS byla odvozena z osteosarkomu. Další použitou buněčnou linií byla immortalizovaná diploidní buněčná linie hTERT RPE-1 (RPE-1), která pochází z pigmentových epiteliálních buněk sítnice. Tato buněčná linie byla připravena immortalizací buněčné linie RPE-340 pomocí podjednotky lidské telomerázové reverzní transkriptázy (hTERT) transfekované plazmidem exprimujícím pGRN145 hTERT (Bodnar, 1998). Jako poslední byly použity diploidní fibroblasty – IMR-90. Tato buněčná linie byla odvozena z plicní tkáně. V případě IMR-90 byly sledovány jak buňky v rostoucí fázi, tak buňky senescentní. Senescentní buňky byly připraveny z buněk v rostoucí fázi. Ty byly kultivovány tak dlouho, až přirozeně přešly do senescence. Senescence byla kontrolována pomocí detekce se senescencí spojenou β -galaktosidázou (SA-Gal), analýzou replikační aktivity a analýzou vytváření se senescencí spojených heterochromatinových oblastí (SAHFs). Buněčné linie HeLa, NCI-H2009 a RPE-1 byly kultivovány v Dulbecově modifikovaném Eaglově médiu (D-MEM), ke kterému bylo přidáno 10% fetální hovězí sérum (FBS), 7,5% NaHCO_3 a gentamicin ($80 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Buněčné linie U2-OS a HCT-116 byly kultivovány v McCoyově 5A médiu, ke kterému bylo přidáno 10% FBS, $2,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ NaHCO_3 a gentamicin ($80 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Buněčná linie IMR-90 byla kultivována v Eaglově minimálním esenciálním médiu (E-MEM), ke kterému bylo přidáno 20% FBS, $1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaHCO_3 , 1 mmol l^{-1} pyruvát sodný, gentamicin ($80 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

4.2 Použité chemikálie a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- 1- nm magnetické částice pokryté streptavidinem (NanoLink, kat. č. M-1002)
- 5-Etynyl-2'-deoxyuridin (Carbosynth, kat. č. NE08701)
- 5-FAM konjugovaný s azidem (Lumiprobe, kat. č. E4130)
- Azid sodný $\geq 99\%$ (Merck, kat. č. 71290)
- Beta-merkaptóetanol (Merck, kat. č. 805740)
- Bromfenolová modř (Merck, kat. č. B0126)
- CaCl_2 (Lach Ner, kat. č. 30974)
- $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, kat. č. 209198)

- D-MEM (Gibco, kat. č. 52100-039)
- 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) (Merck, kat. č. 055K3447)
- 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI) (ThermoFisher Scientific, kat. č. D3571)
- Deoxycholát sodný (Merck, kat. č. 30970)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, kat. č. 34943)
- Dodecyl sulfát sodný (SDS) (Merck, kat. č. L3771)
- E-MEM (Merck, kat. č. M1018)
- EDTA (Merck, kat. č. E9884)
- Etanol (absolutní, $\geq 99,8\%$) (VWR, kat. č. 20821.321)
- Fenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF) (Merck, kat. č. 78830)
- Fetální hovězí sérum (Gibco, kat. č. 10270-106)
- Fluorid sodný (NaF) (Merck, kat. č. S7920)
- Gentamicin (Sadoz, kat. č. registrační číslo – 15/278/91-B/C)
- Glycerol (Merck, kat. č. G7893)
- Glycin (Merck, kat. č. G8898)
- HCl (35%) (Lach Ner, kat. č. 10033-A35)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Merck, kat. č. A7030)
- Hydrochinon (Merck, kat. č. H9003)
- KCl (Serva, kat. č. 26868)
- KH_2PO_4 (Merck, kat. č. P5655)
- Komplementární kontrolní oligonukleotid obsahující na svém 3' konci BHQ1 (oligonukleotid CT; Generi Biotech, syntetizovaný na zakázku)
- Komplementární oligonukleotid obsahující fluorochrom Cy5 na svém 5' konci a obsahující BHQ1 na 3' konci (Generi Biotech, syntetizovaný na zakázku)
- Komplementární oligonukleotid obsahující uracil a na svém 3' konci BHQ1 (oligonukleotid C1U; Generi Biotech, syntetizovaný na zakázku)
- Kotvící oligonukleotid obsahující biotin na 3' konci a fluorochrom 6-FAM na 5' konci (Generi Biotech, syntetizovaný na zakázku)
- Luminata Forte (Merck, kat. č. WBLUF0500)
- McCoyovo 5A médium (Merck, kat. č. M4892)
- Metanol (VWR, kat. č. 20864.320)
- *N N N' N'* - Tetrametyl-etylendiamin (TEMED) (Merck, kat. č. 87689)
- Na_2HPO_4 (Merck, kat. č. 71649)
- NaCl (Merck, kat. č. S9888)
- NaHCO_3 (Merck, kat. č. S3817)
- NaOH (Merck, kat. č. 06203)

- Paraformaldehyd (Merck, kat. č. 818715)
- Persíran amonný (APS) (Serva, kat. č. 13375)
- Primární protilátka proti endonuclease III-like protein 1 (NTH1) (Abcam, kat. č. ab70726)
- Primární protilátka proti MCM7 (Santa Cruz Biotechnologies, kat. č. sc-9966)
- Primární protilátka proti PCNA (Abcam, kat. č. ab18197)
- Primární protilátka proti RPA32 (Abcam, kat. č. ab2175)
- Primární protilátka proti UNG (Origene, kat. č. TA503563)
- Proteázové inhibitory (Merck, kat. č. P2714)
- Pyruvát sodný (Merck, P5280)
- Sekundární protilátka proti králíkovi konjugovaná s Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch, kat. č. 111-545-144)
- Sekundární protilátka proti králíkovi značená peroxidázou (Jackson ImmunoResearch, kat. č. 115-035-146)
- Sekundární protilátka proti myši konjugovaná s Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch, kat. č. 115-545-146)
- Sekundární protilátka proti myši značená peroxidázou (Jackson ImmunoResearch, kat. č. 115-035-146)
- Standard relativní molekulové hmotnosti Precision Plus Protein™ Dual Colour Standards) (Bio-Rad, kat. č. 1610374)
- Triton X-100 (Merck, kat. č. X100)
- Trizma base (Tris) (Merck, kat. č. T6066)
- Trypsin (Merck, kat. č. T4049)
- Tween 20 (Merck, kat. č. P9416)

4.2.2 Použité soupravy

- Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, kat. č. 23227)
- Sada pro detekci senescence (Abcam, kat. č. ab65351)
- TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit (Bio-Rad, kat. č. 1610183)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

4.2.3.1 Příprava roztoků pro kultivaci buněk

- D-MEM: Do kádinky bylo naváženo 13,42 g práškového D-MEM a 3,7 g NaHCO₃ (konečná koncentrace 3,7 g·l⁻¹). Následně byly všechny věci potřebné pro přípravu média otřeny dezinfekcí a vloženy do laminárního boxu. Do kádinky s naváženými látkami bylo přidáno cca 800 ml sterilní deionizované vody. Poté byla kádinka s roztokem přemístěna na

magnetickou míchačku a médium s dalšími složkami bylo rozpuštěno. Po rozpuštění byla kádinka s roztokem opět otřena dezinfekcí a umístěna do laminárního boxu. Dále bylo k roztoku přidáno 625 μl 80 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ gentamicinu (konečná koncentrace 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 100 ml 100% FBS (konečná koncentrace 10%). Roztok byl doplněn sterilní vodou na objem 1 litr. Roztok byl dvakrát přefiltrován pomocí 20ml stříkačky a Supor filtru o průměru 47 mm s 0,2 μm póry. Po přefiltrování média byla láhev opálena a uzavřena. Roztok byl uchován při 4 °C.

- E-MEM: Do kádinky bylo naváženo 9,61 g práškového E-MEM, 1,5 g NaHCO_3 (konečná koncentrace 1,5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a 0,11 g pyruvátu sodného (konečná koncentrace 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Následně byly všechny věci potřebné pro přípravu média otřeny dezinfekcí a vloženy do laminárního boxu. Do kádinky s naváženými látkami bylo přidáno cca 700 ml sterilní deionizované vody. Poté byla kádinka s roztokem přemístěna na magnetickou míchačku a médium s dalšími složkami bylo rozpuštěno. Po rozpuštění byla kádinka s roztokem opět otřena dezinfekcí a umístěna do laminárního boxu. Dále bylo k roztoku přidáno 625 μl 80 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ gentamicinu (konečná koncentrace 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 200 ml 100% FBS (konečná koncentrace 20%). Roztok byl dvakrát přefiltrován pomocí 20ml stříkačky a Supor filtru o průměru 47 mm s 0,2 μm póry. Po přefiltrování média byla láhev opálena a uzavřena. Roztok byl uchován při 4 °C.
- McCoyovo 5A médium: Do kádinky bylo naváženo 11,9 g práškového McCoyova média a 2,2 g NaHCO_3 (konečná koncentrace 2,2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Následně byly všechny věci potřebné pro přípravu média otřeny dezinfekcí a vloženy do laminárního boxu. Do kádinky s naváženými látkami bylo přidáno cca 800 ml sterilní deionizované vody. Poté byla kádinka s roztokem přemístěna na magnetickou míchačku a médium s dalšími složkami bylo rozpuštěno. Po rozpuštění byla kádinka s roztokem opět otřena dezinfekcí a umístěna do laminárního boxu. Dále bylo k roztoku přidáno 625 μl 80 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ gentamicinu (konečná koncentrace 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), 100 ml 100% FBS (konečná koncentrace 10%). Roztok byl dvakrát přefiltrován pomocí 20ml stříkačky a Supor filtru o průměru 47 mm s 0,2 μm póry. Po přefiltrování média byla láhev opálena a uzavřena. Roztok byl uchován při 4 °C.

4.2.3.2 Příprava buněčných lyzátů

- 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5: K 80 ml deionizované vody bylo přidáno 12,114 g Tris. Pomocí 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl bylo upraveno pH na 7,5. Objem byl doplněn deionizovanou vodou na 100 ml. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8: K 80 ml deionizované vody bylo přidáno 12,114 g Tris. Pomocí 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl bylo upraveno pH na 8. Objem byl doplněn deionizovanou vodou na 100 ml. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.

- 1 mol·l⁻¹ KCl: K 800 ml deionizované vody bylo přidáno 74,55 g KCl. KCl byl rozpuštěn a poté byl roztok doplněn deionizovanou vodou na objem 1 l. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- 1 mol·l⁻¹ NaOH: K 80 ml deionizované vody bylo přidáno 3,99 g NaOH. Po rozpuštění byl objem doplněn deionizovanou vodou na objem 100 ml. Roztok byl uchován při 4 °C.
- 1 mol·l⁻¹ HCl: K 91,25 ml deionizované vody bylo přidáno 8,74 ml 35% HCl ($\rho = 1,18 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- 0,5 mol·l⁻¹ EDTA: K 400 ml deionizované vody bylo přidáno 93,05 g Na₂EDTA·2 H₂O. EDTA bylo rozpuštěno a pH bylo upraveno na 8 pomocí 1 mol·l⁻¹ NaOH. Objem byl doplněn do 500 ml deionizovanou vodou. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- 10x PBS: Ve 400 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 40 g NaCl, 7,1 g Na₂HPO₄, 1 g KCl a 1,22 g KH₂PO₄, pH bylo upraveno na 7,4 pomocí 1 mol·l⁻¹ NaOH a roztok byl doplněn deionizovanou vodou na 500 ml. Roztok byl sterilizován v autoklávu. Připravený roztok byl uchován při 4 °C.
- 1x PBS: K 900 ml deionizované vody bylo přidáno 100 ml 10x PBS. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- 10x proteázové inhibitory: Prášek byl rozpuštěn v 80 ml deionizované vody, rozmíchán a poté doplněn na objem 100 ml. Roztok byl rozplněn do zkumavek a uchován při -20 °C.
- Pufř A: K 9,8 ml deionizované vody bylo přidáno 100 μl 1 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 (konečná koncentrace 10 mmol·l⁻¹) a 100 μl 1 mol·l⁻¹ KCl (konečná koncentrace 10 mmol·l⁻¹). Roztok byl promíchán a ponechán na ledu.
- Pufř B: K 8,79 ml deionizované vody bylo přidáno 100 μl 1 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 (konečná koncentrace 10 mmol·l⁻¹), 100 μl 1 mol·l⁻¹ KCl (konečná koncentrace 10 mmol·l⁻¹), 10 μl 0,5 mol·l⁻¹ EDTA (konečná koncentrace 0,5 mmol·l⁻¹) a 1000 μl 10x proteázového inhibitoru (konečná koncentrace 1x). Roztok byl promíchán a ponechán na ledu.
- Pufř C: K 4334 μl deionizované vody bylo přidáno 60 μl 1 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 (konečná koncentrace 10 mmol·l⁻¹), 1000 μl 1 mol·l⁻¹ KCl (konečná koncentrace 166,6 mmol·l⁻¹), 6 μl 0,5 mol·l⁻¹ EDTA (konečná koncentrace 0,5 mmol·l⁻¹) a 600 μl 10x proteázového inhibitoru (konečná koncentrace 1x). Roztok byl promíchán a ponechán na ledu.
- Pufř D: K 4890 μl deionizované vody bylo přidáno 100 μl 1 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 (konečná koncentrace 10 mmol·l⁻¹), 10 μl 0,5 mol·l⁻¹ EDTA (konečná koncentrace 0,5 mmol·l⁻¹), 1000 μl 10x proteázového inhibitoru (konečná koncentrace 1x) a 4 ml 1 mol·l⁻¹ KCl (konečná koncentrace 400 mmol·l⁻¹). Roztok byl promíchán a ponechán na ledu.

- Pufr RIPA: 15 ml 1 mol·l⁻¹ NaCl (konečná koncentrace 150 mmol·l⁻¹), 1 ml 100% Tritonu X-100 (konečná koncentrace 1%), 0,5 g 0,5% deoxycholátu sodného, 0,1 g 0,1% SDS, 0,5 ml 1 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8 (konečná koncentrace 5 mmol·l⁻¹), 1 ml 100 mmol·l⁻¹ PMSF (konečná koncentrace 1 mmol·l⁻¹) 0,021 g 0,021% NaF bylo rozmícháno v 50 ml deionizované vody. Po rozpuštění byl roztok doplněn deionizovanou vodou na 90 ml. Těsně před použitím bylo přidáno 10 ml roztoku proteázových inhibitorů.
- 0,9% NaCl: Bylo naváženo 0,45 g NaCl a toto množství bylo rozpuštěno v 50 ml deionizované vody. Po promíchání byl roztok a uchován při pokojové teplotě.
- 2 mg·ml⁻¹ BSA v 0,9% NaCl: 100 mg BSA bylo rozmícháno ve 40 ml 0,9% NaCl a následně byl objem doplněn 0,9% NaCl na 50 ml. Roztok byl rozmíchán a uchován při pokojové teplotě.

4.2.3.3 Roztoky použité pro metodu western blot

- 70% etanol: K 364,5 ml ≥ 99,8% etanolu byla doplněna deionizovaná voda na objem 500 ml. Roztok byl ponechán při pokojové teplotě.
- 10x Tris-Glycin-SDS running buffer (TGS): Ve 300 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 5 g SDS (konečná koncentrace 1%), 15 g Trisu (konečná koncentrace 0,25 mol·l⁻¹) a 72 g glycinu (konečná koncentrace 1,92 mol·l⁻¹). Po rozpuštění byl roztok doplněn deionizovanou vodou na 500 ml. Roztok byl uchován při 4 °C.
- 10x Tris-Buffered Saline (TBS), pH 7,6: Ve 400 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 12,1 g Trisu (konečná koncentrace 0,2 mol·l⁻¹) a 40 g glycinu (konečná koncentrace 1,37 mol·l⁻¹). pH roztoku bylo upraveno pomocí 1 mol·l⁻¹ HCl. Roztok byl doplněn deionizovanou vodou na objem 500 ml. Roztok byl uchován při 4 °C.
- 1x TBS: K 2700 µl deionizované vody bylo přidáno 300 µl 10x TBS. Roztok byl promíchán.
- 1x TGS: Ke 450 ml deionizované vody bylo přidáno 50 ml 10x TGS. Roztok byl promíchán.
- Transferový pufr: Ve 400 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 6 g Trisu (konečná koncentrace 0,025 mol·l⁻¹) a 28,8 g glycinu (konečná koncentrace 0,192 mol·l⁻¹). Po rozpuštění bylo k roztoku přidáno 400 ml metanolu (konečná koncentrace 20%). Připravený roztok byl doplněn deionizovanou vodou na objem 2 l. Roztok byl promíchán a vychlazen při 4 °C.
- 10% APS: Do mikrozkuhavky bylo naváženo 0,1 g APS a toto množství bylo rozpuštěno v 1 ml deionizované vody. Roztok byl uchován při 4 °C po dobu tří týdnů.
- 0,25% Bromfenolová modř: Bylo naváženo 25 mg Bromfenolové modře a toto množství bylo rozpuštěno v 5 ml deionizované vody. Po rozpuštění byl objem doplněn na 10 ml.

- 5x Laemmliho vzorkový pufr (pufr L. S.): Bylo smícháno 1,75 ml 0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8 (konečná koncentrace 87,5 mmol·l⁻¹), 4,5 ml glycerolu, (konečná koncentrace 45%), 0,5 g SDS (konečná koncentrace 5%), 0,5 ml 0,25% bromfenolové modře (konečná koncentrace 0,0125%) a 1,25 ml β-merkptoetanolu (konečná koncentrace 12,5%). Roztok byl doplněn deionizovanou vodou na objem 10 ml a uchován při -20 °C.
- 0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8: K 80 ml deionizované vody bylo přidáno 6,057 g Trisu. Následně bylo pomocí 1 mol·l⁻¹ HCl upraveno pH na 6,8. Objem byl doplněn deionizovanou vodou na 100 ml. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- 0,1% Tween 20 v pufru 1x TBS (TBS/T): Nejprve bylo odměřeno 100 ml pufru 10x TBS a k němu byl přidán 1 ml Tween 20. Roztok byl doplněn deionizovanou vodou na objem 1 l.
- Blokovací roztok: Byl navážen 1 g BSA a ten byl rozpuštěn ve 20 ml pufru TBS/T.
- Roztok primární protilátky s 5% BSA, 0,05% Tween 20 v 1x TBS: Bylo naváženo 0,15 g BSA a toto množství bylo rozpuštěno ve 3 ml 1x TBS. K roztoku bylo přidáno 1,5 μl Tween 20. Roztok byl promíchán. Byly odebrány 3 nebo 6 μl roztoku a k zbylému roztoku bylo přidáno množství protilátky uvedené v Tabulce 3. Roztok byl opět promíchán.
- Roztok sekundární protilátky: Byl navážen 1 g BSA a toto množství bylo rozpuštěno ve 20 ml pufru TBS/T. Byly odebrány 2 μl roztoku a přidány 2 μl sekundární protilátky podle rozpisu (viz tabulka 4). Roztok byl promíchán.

4.2.3.4 Roztoky použité pro detekci proteinů a replikační aktivity pomocí mikroskopu

- 2% formaldehyd v 1x PBS: Do kádinky bylo odměřeno 250 ml deionizované vody a k ní bylo přidáno 10 g paraformaldehydu. Kádinka byla umístěna na varnou plotýnku do digestoře. Jakmile byl roztok formaldehydu zahřátý přibližně na 60 °C, bylo k němu přidáno přibližně 8 kapek 1 mol·l⁻¹ NaOH. K vychlazenému formaldehydu bylo přidáno 50 ml pufru 10x PBS a roztok byl doplněn deionizovanou vodou na objem 500 ml. Roztok byl promíchán, rozdělen do 50 ml zkumavek a uchován při -20 °C.
- Příprava 0,2% Tritonu X-100 v 1x PBS: Do falkony bylo odměřeno 49,9 ml 1x PBS a následně k němu bylo přidáno 100 μl 100% Tritonu X-100. Roztok byl umístěn na vortex a byl zde ponechán do úplného rozpuštění Tritonu X-100. Roztok byl připraven těsně před použitím.
- 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ NaCl: K 480,9 ml deionizované H₂O bylo přidáno 12,5 ml 1 mol·l⁻¹ roztoku Tris-HCl, pH 7,5 a 75 ml 1 mol·l⁻¹ NaCl. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- 1 mmol·l⁻¹ DAPI: 10 mg DAPI bylo rozpuštěno v 21,86 ml deionizované vody. Roztok byl promíchán, rozpipetován a uchován při -20 °C.
- Montovací médium (2,5% DABCO, 90% glycerol, 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8): 625 mg DABCO bylo rozmícháno ve 22,5 ml 100% glycerolu. Bylo přidáno 1,25 ml deionizované vody

a roztok byl míchán dvě hodiny na pokojové teplotě. Poté k němu bylo přidáno 1,25 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8. Roztok byl promíchán, centrifugován a rozpipetován do 1,5 ml zkumavek. Jedna zkumavka byla ponechána na pokojové teplotě a zbytek byl uchován při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.3.5 Roztoky pro měření glykosylázové aktivity

- $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl: V 80 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 5,84 g NaCl. Po rozmíchání byl roztok doplněn deionizovanou vodou na 100 ml a uchován při $4 \text{ }^\circ\text{C}$.
- $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CaCl_2 : V 80 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 11,098 g CaCl_2 . Po rozpuštění byl roztok doplněn deionizovanou vodou na 100 ml a uchován při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 20% azid sodný: Byly naváženy 2 g azidu sodného a toto množství bylo rozpuštěno v 10 ml deionizované vody. Roztok byl uchován při $4 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Pufr pro přípravu magnetických částic: Ve 300 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 0,5 g BSA (konečná koncentrace 0,1%). Poté bylo k roztoku přidáno 12,5 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5 (konečná koncentrace $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), 75 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl (konečná koncentrace $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), 250 μl 100% Tween 20 (konečná koncentrace 0,05%) a 100 μl 20% azidu sodného (konečná koncentrace 0,02%). Roztok byl promíchán a doplněn deionizovanou vodou na objem 500 ml. Roztok byl uchován při $4 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Roztok kotvícího oligonukleotidu obsahujícího na svém 3' konci biotin a na svém 5' konci 6-FAM a oligonukleotidu s fluorochromem Cy5 na svém 5' konci a biotinem na 3' konci: Ke 486,25 μl pufru pro přípravu magnetických částic bylo přidáno 12,5 μl $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ kotvícího oligonukleotidu (konečná koncentrace $2,5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 1,25 μl $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Cy5 oligonukleotidu (konečná koncentrace $0,25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).
- Roztok oligonukleotidu C1U obsahujícího uracil a na 3' konci BHQ1: Ve 237,5 μl pufru pro přípravu magnetických částic bylo rozmícháno 12,5 μl $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ C1U oligonukleotidu (konečná koncentrace $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).
- Roztok oligonukleotidu CT obsahujícího tymin a na svém 3' konci BHQ1: Ve 237,5 μl pufru pro přípravu magnetických částic bylo rozmícháno 12,5 μl $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CT oligonukleotidu (konečná koncentrace $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).
- Pufr pro měření glykosylázové aktivity: Ke 46,8 ml deionizované vody bylo přidáno 500 μl $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5 (konečná koncentrace $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), 2500 μl $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl (konečná koncentrace $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), 100 μl $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA (konečná koncentrace $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 100 μl $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CaCl_2 (konečná koncentrace $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Roztok byl promíchán a uchován při $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.3.6 Roztoky použité pro kontrolu buněčné senescence

- Sada pro detekci buněčné senescence obsahující 1x fixační roztok, 100x barvicí podpurný roztok, 1x barvicí roztok a 150 mg SA-gal.
- 20 mg/ml SA-gal: 0,01 g SA-gal bylo rozpuštěno v 0,5 ml DMSO. Zásobní roztok byl skladován v tmavé zkumavce při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a to po dobu nejdéle 1 měsíce. Poté byl připraven nový zásobní roztok.
- Klikací směs: K 187,8 μl deionizované vody byly přidány 2 μl $200\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,2 μl $10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-FAM-azidu a 10 μl $200\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydrochinonu. Připravená směs byla promíchána. Směs byla připravena těsně před použitím.
- Přípravava $200\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydrochinonu: K 400 ml deionizované vody bylo přidáno 11,01 g hydrochinonu. Roztok byl promíchán, rozpipetován do 2ml zkumavek a uchován při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Příprava $1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$: K 800 ml deionizované vody bylo přidáno 249,7 g $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Po rozmíchání byl roztok doplněn deionizovanou vodou na objem 1000 ml. Následně byl roztok promíchán a uchován při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Příprava $200\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$: K 400 ml deionizované vody bylo přidáno 100 ml $1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Roztok byl promíchán a uchován při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Příprava $10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-FAM-azidu: 5 mg 5-FAM azidu bylo rozpuštěno v 1,1 ml DMSO. Roztok byl promíchán, rozpipetován a uchován při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.4 Kultivace použitých buněčných linií

Při pasážování buněk byla kultivační média odsáta z kultivační nádoby a buňky byly opatrně opláchnuty sterilním pufrem (1x PBS, solný fosfátový pufr). Pufr byl odstraněn a k buňkám byl přidán 0,05% roztok Trypsin-EDTA (přidané množství se odvíjelo od použité kultivační nádoby: 0,5 ml nebo 1 ml nebo 2 ml/25 nebo 75 nebo 150 cm^2 kultivační plochy). Poté, co se buňky oddělily od dna kultivačních nádob, byl roztok Trypsin-EDTA neutralizován přidáním kultivačního média s FBS (přidané množství se odvíjelo od použité kultivační nádoby: 4,5 ml nebo 9 ml nebo 18 ml média/25 nebo 75 nebo 150 cm^2 kultivační plochy). Buněčná suspenze byla opatrně rozmíchána. Následně bylo alikvotní množství buněčné suspenze přidáno do nové kultivační nádoby s médiem a buňky byly inkubovány v inkubátoru při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 5% CO_2 (Kabatová, 2021).

4.3 Seznam použitých přístrojů a pomůcek

- Analytické váhy (Kern)
- Aparatura pro nanášení gelu Dual Gel Caster (Hoefler)
- Blotovací papír TE26 (Hoefler)
- Centrifuga Microspin 12 (Biosan)

- Čtečka destiček Infinite M200 Pro (Tecan)
- Digestor PurAir (Air Science)
- Douncerův homogenizátor (Merck)
- Fluorescenční mikroskop Olympus IX83 (Olympus)
- Hlubokomrazicí box Innova U725 (New Brunswick)
- Laboratorní třepačka Mixer Lab Dancer Vortex (IKA)
- Lednice (Liebherr)
- Magnetická míchačka (P-Lab)
- Magnetický stojan (Unitrap)
- Membrána (Bio-Rad, 162-0097; Amersham, GE10600001)
- 96-jamková mikrotitrační deska (Greiner-Bio-One)
- 384-jamková mikrotitrační deska (Greiner-Bio-One)
- pH metr XS pH 8 (Giorgio-Bormac)
- Sada mikropipet (Gilson)
- Termoblok (Major Science)
- Termomixer (Eppendorf)
- Transferová nádoba TE22 (Hoefer)
- Třepačka (P-Lab)
- Vertikální elektroforetická komora SE 260 (Hoefer)
- Výrobník ledu (FrigoPro)
- Zdroj stejnosměrného elektrického proudu EV200 (Consort)
- Zobrazovací systém ChemiDoc MP (Bio-Rad)
- Sterilní 20 ml injekční stříkačky (Chirana)
- Membrány Supor™ PES (polyetylsulfon), 47 mm průměr, 0,2 μm (Cytiva)

4.4 Použité experimentální postupy

4.4.1 Příprava jaderných lysátů

Buňky byly kultivovány v Petriho misce v kultivačním médiu v CO₂ inkubátoru při 5% CO₂ a teplotě 37 °C. Následující den byly buňky zpracovány. Z Petriho misek bylo vylito kultivační médium a buňky byly třikrát promyty 1x PBS. Následně byly rychle promyty 5 ml ledově vychlazeného pufru A. Pufír byl vylit a k buňkám byly přidány 2 ml ledově vychlazeného pufru B. Petriho miska s buňkami byla umístěna na led a vzorky byly inkubovány v pufru B po dobu 20 minut za občasného promíchání. Po uplynutí inkubační doby byly buňky seškrábány škrabkou a v roztoku přeneseny do vychlazeného Douncerova homogenizátoru. Buňky byly 30x homogenizovány. Poté byly přeneseny pomocí skleněné pipety a pipetovacího balónku do 2ml mikrozkušavky a vzorky byly centrifugovány při 4 °C po dobu

10 minut při 12400 x g. Po skončení centrifugace byl supernatant odstraněn. Pelet byl rozsuspendován v 50 µl pufru B. Ke vzorku bylo následně přidáno 200 µl vychlazeného pufru C. Vzorek byl promíchán a inkubován na ledu po dobu 40 minut. Každých 10 minut byl vzorek promíchán na třepačce. Poté byl vzorek centrifugován při 4 °C po dobu 20 minut při 12400 x g. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky a označen jako jaderný lyzát. Jaderné lyzáty byly rozpipetovány do mikrozkušavek (po 60 µl) a skladovány v hlubokomrazícím boxu při -80 °C.

4.4.2 Příprava celobuněčných lyzátů

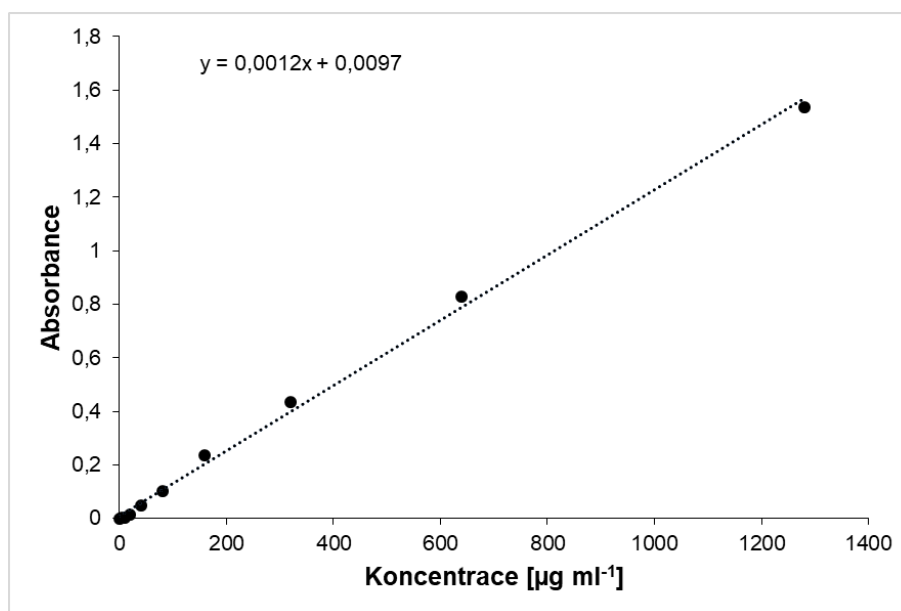
Buňky byly kultivovány v Petriho misce v kultivačním médiu v CO₂ inkubátoru při 5% CO₂ a teplotě 37 °C (Kabotová, 2021). Následující den byly buňky zpracovány. Z Petriho misek bylo vylito médium a buňky byly třikrát opláchnuty 1x PBS. Následně byl k buňkám přidán pufr RIPA (přibližně 0,2 ml na 1 milion buněk). Buňky byly seškrábány škrabkou a buněčná suspenze byla umístěna do 2 ml mikrozkušavky. Vzorek byl inkubován po dobu 30 minut na ledu a poté byl centrifugován při 12400 x g. Supernatant byl přemístěn do nové 2 ml mikrozkušavky. Vzorek byl rozplněn do mikrozkušavek po 400 µl a uchová při -80 °C.

4.4.3 Měření koncentrace proteinů pomocí BCA kitu

Pro měření koncentrace proteinů byla použita souprava Pierce BCA Protein Assay Kit a bylo postupováno dle návodu výrobce. Nejprve byla připravena kalibrační řada se známými koncentracemi BSA. V případě jaderných lyzátů bylo BSA ředěno v pufru D, v případě celobuněčných lyzátů v pufru RIPA. Jednotlivé koncentrace BSA byly připraveny seriálním ředěním zásobního roztoku BSA (2 mg·ml⁻¹) a 0,9% NaCl. Kalibrační řada obsahovala 9 různých koncentrací (od 1280 µg·ml⁻¹ – do 5 µg·ml⁻¹). Poslední vzorek představoval pozadí a obsahoval jenom pufr. Jaderné lyzáty byly naředěny v poměru 1:4 v pufru D. Celobuněčné lyzáty byly ředěny ve stejném poměru v pufru RIPA.

Do jamek mikrotitrační desky byly nanášeny vzorky kalibrační řady ve třech opakováních, do každé jamky bylo nanášeno 25 µl. Dále byly do jamek mikrotitrační destičky nanášeny vzorky, rovněž po 25 µl na jednu jamku. Ke všem vzorkům bylo přidáno 200 µl BCA (bicinchoninová kyselina, viz podkapitola 3.4.1.1) roztoku, který byl připraven smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 50:1. Destička s nanášenými vzorky byla umístěna na třepačku na 30 s, poté vložena do termobloku a inkubována 30 minut při 37 °C. Absorbance vzorků byla změřena na čtečce destiček při vlnové délce 562 nm. K výpočtu koncentrace proteinů z naměřené absorbance byl použit program Microsoft Excel. Z kalibrační řady byla vypočtena průměrná hodnota a následně bylo od ní odečteno pozadí. Pozadí bylo rovno absorbanci pufru D/pufru RIPA bez přídavku BSA. Poté byly vypočteny průměrné hodnoty naměřených absorbancí jednotlivých vzorků lyzátů. Od vypočtených hodnot jednotlivých vzorků lyzátů bylo odečteno pozadí pufru D (u jaderných lyzátů) nebo pufru RIPA (u celobuněčných lyzátů). Z vypočtených hodnot absorbancí jednotlivých kalibračních vzorků byly sestrojeny kalibrační křivky (viz obr. 8). K jejich sestrojení byla použita lineární regrese s rovnicí $y = ax + b$, kde b udává posunutí

přímky na ose y, a směrnici přímky, x hodnotu koncentrace a y hodnotu absorbance. Do rovnice byly dosazeny vypočtené absorbance jednotlivých vzorků a následně byla vypočtena koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích lyzátů.



Obrázek 8 Příklad kalibrační křivky

Na obrázku je zobrazeno vzorové vynesení kalibrační křivky znázorňující závislost koncentrace proteinů na naměřené absorbanci.

4.4.4 Denaturující polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

Veškeré vybavení potřebné pro sestavení elektroforézy a následného western blotu bylo umyto saponátem, opláchnuto deionizovanou destilovanou vodou a následně 70% etanolem. Po usušení byla sestavena aparatura pro nanášení gelů Dual Gel Caster a z kitu TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit byly připraveny gely o tloušťce 1,5 mm. Nejprve byl připraven separační gel, kdy bylo smícháno 6 ml roztoku Resolver A a 6 ml roztoku Resolver B. Po promíchání bylo přidáno 60 μl 10% APS a 6 μl TEMED. Po nanesení separačního gelu byl připraven zaostřovací gel. V tomto případě byly smíchány 2 ml roztoku Stacker A a 2 ml roztoku Stacker B. Po promíchání bylo přidáno 20 μl 10% APS a 4 μl TEMED. Ihned po nanesení obou gelů byl vložen hřeben tak, aby se nevytvořily bubliny. Polymerace gelů probíhala po dobu 90 minut při pokojové teplotě. Následně byl hřeben vyjmut, nalévací aparatura rozebrána, gely přemístěny do buničiny navlhčené deionizovanou vodou a zabaleny do fólie. Takto připravené gely byly umístěny do uzavíratelného plastového sáčku a uchovány při 4 °C přes noc.

Následující den byla sestavena nádoba pro elektroforézu, do které byly umístěny gely předem vytemperované na pokojovou teplotu. Nádoba i elektroforetické komory byly zality pufrům 1x TGS. Vzorky lyzátů byly nejprve ponechány 20 minut na pokojové teplotě, poté byly desetkrát promíchány, a nakonec centrifugovány po dobu 10 minut při 12400 x g a 4 °C. Po centrifugaci byly vzorky lyzátů smíchány s deionizovanou vodou a pak byl přidán pufr L.S. Směs byla připravena v poměru 4:1, kdy 4 díly tvořil připravený vzorek lyzátu a vody a 1 díl tvořil pufr L.S. V případě nádorových buněčných

linií byla použita koncentrace $4 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a v případě diploidních fibroblastů byla použita koncentrace $3 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Kontrolní lyzáty HeLa buněk byly nanášeny v koncentraci $5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Takto připravené vzorky byly promíchány na laboratorní třepačce a inkubovány v termobloku po dobu 10 minut při 95°C . Po ochlazení na pokojovou teplotu byly vzorky opět promíchány a nanесeny do jednotlivých jamek na gelu. Současně se vzorky byly nanесeny $3 \mu\text{l}$ standardu molekulové hmotnosti. Nejprve probíhala elektroforetická separace po dobu 10 minut při napětí 100 V. Následně bylo napětí zvýšeno na 120 V a vzorky byly separovány přibližně 110 minut. Po dokončení separace byla aparatura rozebrána, gely vyjmuty a zaostřovací gel byl odřezán.

4.4.5 Western blot

Gel se separovanými proteiny byl po dobu 15 minut promýván v transferovém pufru. Současně byla v transferovém pufru promývána i nitrocelulósová membrána, a to po dobu 5 minut. Následně byl sestaven blotovací sendvič. Do nádoby byl nalit transferový pufr a do něj byla ponořena kazeta. Do kazety byla vložena houba, na ni filtrační papír, membrána, gel, namočený filtrační papír a jako poslední opět houba. Po sestavení byla kazeta vložena do transferové nádoby. Nádoba byla naplněna transferovým roztokem. Přenos probíhal po dobu 60 minut při napětí 75 V. Po celou dobu byla transferová nádoba umístěna na magnetické míchačce, aby bylo zajištěno konstantní promíchávání roztoku. Po skončení transferu byla kazeta rozebrána a membrána byla promývána v pufru TBS/T po dobu 5 minut na třepačce. Po promytí byla membrána inkubována v blokovacím roztoku po dobu 60 minut na třepačce. Po následném trojím promytí, každé po dobu 5 minut, byla membrána umístěna do uzavíratelného sáčku a byl k ní přidán roztok primární protilátky (viz tabulka 3). Inkubace probíhala přes noc při 4°C na třepačce.

Následující den byla membrána opět promyta v pufru TBS/T na třepačce (třikrát po dobu 10 minut). Poté byla membrána inkubována po dobu 60 minut se sekundární protilátkou (viz tabulka 4). Po dokončení inkubace byla membrána opět třikrát promyta v pufru TBS/T na třepačce. Po promytí byly k membráně přidány 2 ml roztoku Luminata Forte. Membrána byla nasnímána pomocí přístroje ChemiDoc a programu ImageLab. Následné hodnocení bylo provedeno pomocí programu ImageJ, kdy byly změřeny intenzity jednotlivých proužků detekovaných proteinů a současně jejich pozadí (např. Ligasová *et al.*, 2021). Od jednotlivých hodnot naměřených intenzit bylo odečteno pozadí. Výsledné grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Excel. Všechny experimenty byly provedeny ve třech opakováních.

Tabulka 3 Použitá ředění primárních protilátek pro western blot

Primární protilátka proti	Ředění	Zásobní koncentrace	Konečná koncentrace	Použitý objem
UNG	1:1000	0,42 mg·ml ⁻¹	0,42 µg·ml ⁻¹	3 µl
NTH1	1:500	0,1 mg·ml ⁻¹	0,2 µg·ml ⁻¹	6 µl
PCNA	1:1000	1 mg·ml ⁻¹	1 µg·ml ⁻¹	3 µl
RPA32	1:1000	0,1 mg·ml ⁻¹	0,1 µg·ml ⁻¹	3 µl
MCM7	1:500	0,2 mg·ml ⁻¹	0,4 µg·ml ⁻¹	6 µl

Tabulka 4 Použitá ředění sekundárních protilátek pro western blot

Sekundární protilátka	Ředění	Zásobní koncentrace	Konečná koncentrace	Použitý objem
Anti-myší peroxidáza	1:10 000	0,8 mg·ml ⁻¹	0,08 µg·ml ⁻¹	2 µl
Anti-králičí peroxidáza	1:10 000	0,8 mg·ml ⁻¹	0,08 µg·ml ⁻¹	2 µl

4.4.6 Lokalizace proteinů pomocí fluorescenční mikroskopie

HeLa buňky byly kultivovány na kruhových sklech o průměru 12 mm v Petriho misce v kultivačním médiu v CO₂ inkubátoru při 5% CO₂ a teplotě 37 °C a následující den byly zpracovány. Z Petriho misky bylo vylito médium a buňky byly třikrát promyty 1x PBS. Následně byly buňky fixovány 2% formaldehydem v 1x PBS po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Po fixaci byly buňky třikrát promyty 1x PBS a permeabilizovány 0,2% Tritonem X-100 v 1x PBS po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Dále byla skla s buňkami přemístěna na kapku 1x PBS a poté byly buňky třikrát promyty ve 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹. Po promytí byly buňky inkubovány na kapce primární protilátky (viz tabulka 5) (30 µl) po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Po dokončení inkubace byly buňky třikrát promyty ve 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ po dobu 5 minut. Poté byla skla s buňkami přemístěna na kapku (30 µl) směsi sekundární protilátky a DAPI (viz tabulka 6) a buňky byly inkubovány po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Po skončení inkubace byly buňky třikrát promyty ve 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ po dobu 5 minut. Následně byl pufr odsát a skla s buňkami byla umístěna na kapku montovacího média na podložním skle. Poté byly buňky nasnímány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX83 (Olympus) s kamerou Olympus XM10 a objektivem UPLFLN - 2PH, 20x, NA 0,3 (Olympus). Snímky byly snímány při rozlišení 1024 x 1024 pixelů. Ke snímání byl použit program CellSens Dimension (Olympus). Byly snímány fluorescenční signály DAPI a Alexa Fluor 488. Následně byly obrázky zpracovány v programu CellProfiler a GIMP.

Tabulka 5 Použitá ředění primárních protilátek pro detekci protilátek pomocí mikroskopu

Primární protilátka proti	Ředění	Zásobní koncentrace	Konečná koncentrace
UNG	1:100	0,42 mg·ml ⁻¹	4,2 µg·ml ⁻¹
NTH1	1:100	0,1 mg·ml ⁻¹	1 µg·ml ⁻¹
PCNA	1:100	1 mg·ml ⁻¹	10 µg·ml ⁻¹
RPA32	1:200	0,1 mg·ml ⁻¹	0,5 µg·ml ⁻¹
MCM7	1:100	0,2 mg·ml ⁻¹	2 µg·ml ⁻¹

Tabulka 6 Použitá ředění sekundárních protilátek a DAPI pro detekci protilátek pomocí mikroskopu

Sekundární protilátka	Ředění	Zásobní koncentrace	Konečná koncentrace
Anti-myší protilátka konjugovaná s Alexa Fluor 488	1:100	1,5 mg·ml ⁻¹	15 µg·ml ⁻¹
Anti-králičí protilátka konjugovaná s Alexa Fluor 488	1:100	1,5 mg·ml ⁻¹	15 µg·ml ⁻¹
DAPI	1:100	1 mmol·ml ⁻¹	10 µmol·ml ⁻¹

4.4.7 Analýza glykosylační aktivity

4.4.7.1 Příprava magnetických částic s ukotvenými oligonukleotidovými próbami obsahujícími uracil nebo tymin

Nejprve byl připraven pufr pro konjugaci magnetických částic s oligonukleotidy (viz podkapitola 4.2.3.5). Do 2ml zkumavky byl napipetován 1 ml připraveného pufru a 50 µl rozsuspendovaných magnetických částic. Zkumavka byla umístěna do magnetického stojánu. Po přichycení částic k okraji zkumavky byl pufr odsát, přidán 1 ml pufru a částice byly rozsuspendovány. Tento krok byl zopakován ještě dvakrát. Mezitím bylo připraveno 0,5 ml roztoku obsahujícím 2,5 µmol·l⁻¹ kotvícího oligonukleotidu a 0,25 µmol·l⁻¹ Cy5-oligonukleotidu v pufru pro přípravu magnetických částic. Ze zkumavky s magnetickými částicemi byl odsát pufr a byl přidán připravený roztok se směsí oligonukleotidů. Roztok s částicemi byl promíchán a inkubován po dobu 60 minut na vortexu. Během inkubace byly nachystány dvě 2ml zkumavky. Každá obsahovala 237,5 µl pufru. Do jedné zkumavky byl přidán 0,1 mmol·l⁻¹ oligonukleotid C1U a do druhé 0,1 mmol·l⁻¹ oligonukleotid CT. Roztok s částicemi byl umístěn na magnetický stojan. Po přichycení částic na stěnu zkumavky byl roztok odpipetován a částice byly třikrát promyty 1 ml pufru. Po třetím promytí bylo k částicím přidáno 0,5 ml pufru a částice byly rozsuspendovány. Byly nachystány dvě nové 2ml zkumavky. Částice byly rozmíchány pomocí vortexu a rozděleny po 250 µl do dvou připravených zkumavek. Do jedné zkumavky bylo přidáno 250 µl připraveného roztoku obsahujícího 5 µM C1U, do

druhé bylo přidáno 250 μl připraveného roztoku obsahujícího 5 μM CT. Zkumavky byly umístěny na vortex, kde byly inkubovány po dobu 60 minut. Po dokončení inkubace byly roztoky uchovány při 4 °C.

4.4.7.2 Příprava vzorků pro měření glykosylázové aktivity

Nejprve byl připraven pufr pro přípravu vzorků a magnetických částic (viz podkapitola 4.2.3.5). Poté byly připraveny dvě 2ml zkumavky, které byly umístěny do magnetického stojánu. Do každé zkumavky byl napipetován 1 ml připraveného pufru. Do jedné zkumavky bylo následně přidáno 32 μl magnetických částic s oligonukleotidovou próbou s uracilem a do druhé zkumavky bylo přidáno 32 μl magnetických částic s oligonukleotidovou próbou s tyminem. Zkumavky s částicemi byly ponechány na magnetickém stojánu. Pufr byl odsát a k částicím byl přidán 1 ml pufru. Tento krok byl ještě dvakrát zopakován. Po posledním promytí byl pufr odsát, zkumavky byly odebrány z magnetického stojánu a bylo k nim přidáno 1600 μl pufru. Částice byly rozsuspendovány. Vzorky lyzátů byly temperovány při pokojové teplotě po dobu 20 minut, desetkrát promíchány, a nakonec centrifugovány po dobu 10 minut při 12400 x g a 4 °C. Vzorky jaderných lyzátů nádorových buněk byly naředěny na 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a jaderné lyzáty diploidních fibroblastů byly naředěny na 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Takto připravené vzorky byly uchovány na ledu. 50 μl vzorku bylo nanášeno do jamky 384 jamkové destičky. Každý vzorek byl nanášen ve trojím opakování. K připraveným lyzátům bylo přidáno 50 μl roztoku částic s uracilem nebo tyminem. Signál pro 5-FAM byl snímán na čtečce destiček ve 20 cyklech po 2 minutách při teplotě 25 °C. Před každým měřicím cyklem byla destička promíchána při amplitudě 1,5 mm po dobu 10 s. Fluorescenční signál pro 6-FAM byl snímán při excitační vlnové délce 488 nm a emisní vlnové délce 520 nm. Následně byla data hodnocena v programu Microsoft Excel. Pro každý vzorek byla připravena čtyři opakování, z nichž byl vypočítán průměr a od něj bylo odečteno pozadí (pufr). Od naměřených hodnot signálu produkovaného v případě sondy s uracilem byly odečteny hodnoty signálu změřeného pro sondu s tyminem. Ze získaných hodnot byla sestrojena křivka průběhu polynomické funkce s rovnicí $y = x^2 + 2x + 1$. Aktivita UNG byla vypočtena jako první derivace této funkce v čase 0.

4.4.8 Kontrola buněčné senescence

IMR-90 buňky byly kultivovány na kruhových sklech o průměru 12 mm v Petriho miskách v kultivačním médiu v CO₂ inkubátoru při 5% CO₂ a teplotě 37 °C a následující den byly zpracovány.

4.4.8.1 Analýza replikační aktivity

Z Petriho misky bylo vylito médium a buňky byly třikrát promyty 1x PBS. Buňky byly fixovány 2% formaldehydem v 1x PBS po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Skla s buňkami byla třikrát promyta v 1x PBS a buňky byly permeabilizovány 0,2% Tritonem X-100 v 1x PBS po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Skla s buňkami byla přemístěna na kapku 1x PBS. Po promytí byla skla inkubována na kapce klikací směsi (50 μl) po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po dokončení

inkubace byla skla třikrát promyta ve 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ po dobu 3x 10 minut. Poté byla skla s buňkami přemístěna na kapku (30 µl) roztoku DAPI a inkubována po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Skla byla třikrát promyta ve 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ po dobu 5 minut. Následně byl pufr odsát a skla s byla umístěna na kapku montovacího média na podložním skle. Poté byly buňky nasnímány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX83 (Olympus) s kamerou Olympus XM10 a objektivem UPLFLN - 2PH, 10x, NA 0,3 (Olympus). Snímky byly snímány při rozlišení 1024 x 1024 pixelů. Ke snímání byl použit program CellSens Dimension (Olympus). Byly snímány fluorescenční signály DAPI a Alexa Fluor 488. Následně byly obrázky zpracovány v programu ImageJ, ilastik, CellProfiler, Microsoft Excel a Adobe Photoshop.

4.4.8.2 Analýza SAHFs

Z Petriho misky bylo vylito médium a buňky byly třikrát promyty 1x PBS. Buňky byly fixovány 2% formaldehydem v 1x PBS po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Skla s buňkami byla třikrát promyta v 1x PBS a buňky byly permeabilizovány 0,2% Tritonem X-100 v 1x PBS po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Skla s buňkami byla přemístěna na kapku 1x PBS. Poté byly buňky třikrát promyty ve 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ a skla s buňkami byla přemístěna na kapku (30 µl) roztoku DAPI. Buňky byly inkubovány po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po skončení inkubace byly buňky třikrát promyty ve 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ po dobu 5 minut. Následně byl pufr odsát a skla s buňkami byla umístěna na kapku montovacího média na podložním skle. Poté byly buňky nasnímány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX83 (Olympus) s kamerou Olympus XM10 a objektivem UPLSAPO O, 100x, NA 1,4 (Olympus). Snímky byly snímány při rozlišení 1024 x 1024 pixelů. Ke snímání byl použit program CellSens Dimension (Olympus). Byl snímán fluorescenční signál pro DAPI. Následně byly obrázky zpracovány v programu Adobe Photoshop.

4.4.8.3 Analýza SA-Gal

Z Petriho misky bylo vylito médium a buňky byly třikrát promyty 1x PBS. Následně byly buňky fixovány fixačním roztokem ze sady pro detekci SA-Gal, a to po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Po fixaci byly buňky byly třikrát promyty 1x PBS a následně byla skla s buňkami přemístěna do vlhké komůrky na 100µl kapku roztoku pro detekci SA-Gal. Buňky byly v roztoku inkubovány v Thermomixeru přes noc při teplotě 37 °C. Druhý den byla skla s buňkami třikrát promyta ve 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ a skla s buňkami byla přemístěna na kapku (30 µl) roztoku DAPI. Buňky byly inkubovány po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po skončení inkubace byly buňky třikrát promyty ve 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ po dobu 5 minut. Následně byl pufr odsát a skla s buňkami byla umístěna na kapku montovacího média na podložním skle. Poté byly buňky nasnímány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX83 (Olympus) s kamerou Olympus XM10 a objektivem LUCPLFLN - PH, 20x, NA 0,45 (Olympus). Snímky byly snímány při rozlišení 1024 x

1024 pixelů. Ke snímání byl použit program CellSens Dimension (Olympus). Byl snímán signál ve světelném poli (bright field). Následně byly obrázky zpracovány v programu Adobe Photoshop.

4.5 Statistické hodnocení

Pro hodnocení vzájemného vztahu mezi jednotlivými sledovanými proteiny u použitých buněčných linií a rovněž pro zjištění vztahu mezi obsahem UNG2 a aktivitou uracilových glykosyláz bylo použito hodnocení pomocí Pearsnova koeficientu za použití programu Sigma Plot 11.0.

5 Výsledky

5.1 Příprava buněčných lyzátů a měření koncentrace proteinů

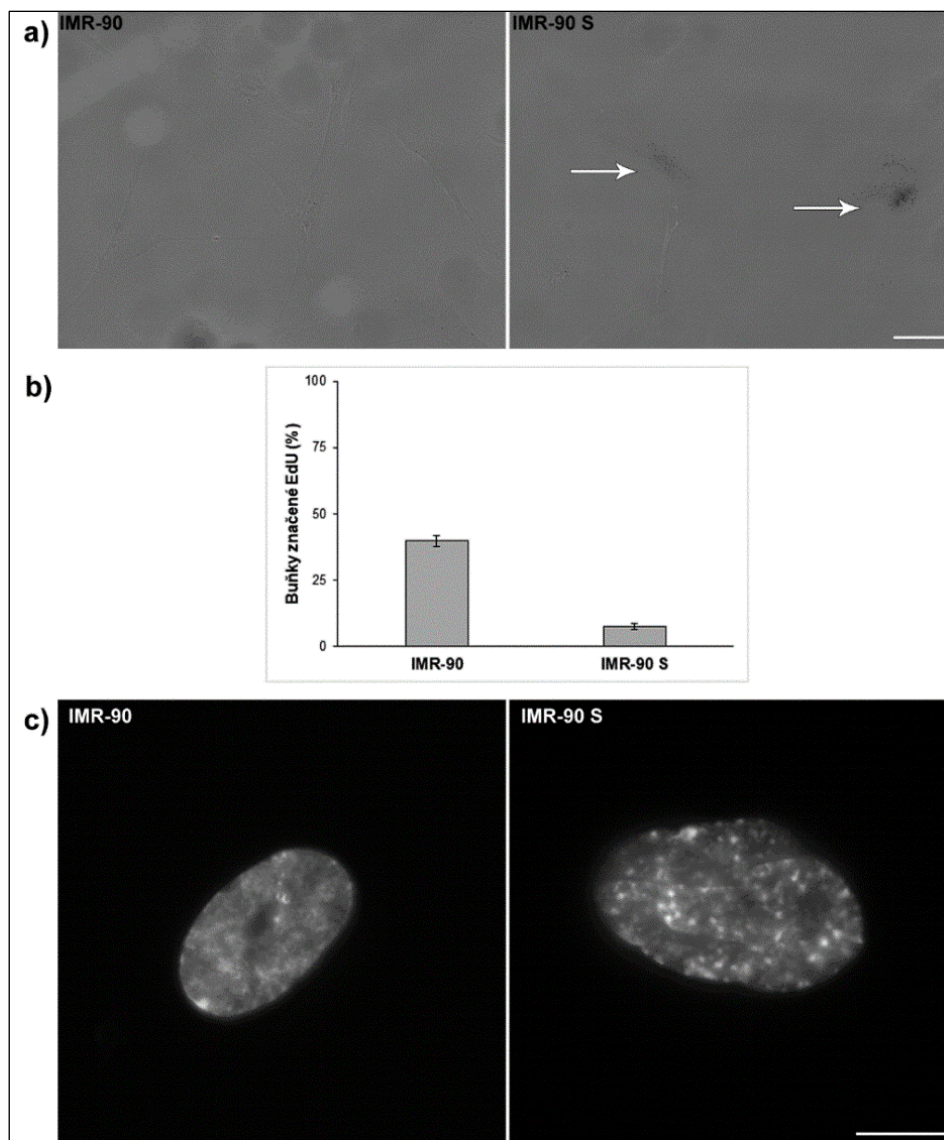
Pro srovnávací analýzu exprese proteinů účastnících se replikace a oprav DNA byly použity tyto buněčné linie: nádorové linie HeLa, NCI-H2009, HCT-116 a U2-OS, diploidní senescentní (IMR-90 S) a rostoucí, nesenescentní, fibroblasty IMR-90 a imortalizované diploidní epitelové buňky sítnice hTERT RPE-1 (RPE-1).

Ze všech uvedených buněčných linií byly připraveny jaderné lyzáty. Kromě toho byly z buněčných linií HeLa a NCI-H2009 připraveny celobuněčné lyzáty. Senescence byla v IMR-90 buňkách monitorována pomocí analýzy aktivity SA-Gal (viz obr. 9a), analýzy replikační aktivity (viz obr. 9b) a pomocí detekce heterochromatinových ohnisek spojených se senescencí (SAHFs) (viz obr. 9c).

Celková koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích připravených lyzátů byla stanovena pomocí BCA metody založené na vytvoření komplexu Cu^{2+} iontů s proteiny a následné redukci na Cu^+ ionty. Kyselina bicinchoninová tvoří s Cu^+ ionty v alkalickém prostředí modro-fialový komplex (Walker, 1996). Koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byla následně vypočtena z naměřených absorbancí za využití kalibrační křivky vytvořené v programu Microsoft Excel (viz obr. 8) a použita pro výpočet množství nanášených proteinů pro western blot analýzu. Průměrné hodnoty koncentrace proteinů pro jednotlivé buněčné linie jsou zobrazeny v tabulce 7.

Tabulka 7 Průměrné naměřené hodnoty koncentrací proteinů ve vzorcích jednotlivých buněčných linií

Buněčná linie	Průměrná koncentrace proteinů v jádře ± směrodatná odchylka [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
HeLa	1302,2 ± 2,2
NCI-H2009	642,28 ± 0,8
HCT-116	979,76 ± 2,2
U2OS	654,5 ± 0,9
IMR-90 S	290,2 ± 0,9
IMR-90	302,96 ± 1,02
RPE-1	552,19 ± 0,9



Obrázek 9 Monitorování senescence u IMR-90 buněk

a) Detekce senescentních (IMR-90 S) a rostoucích IMR-90 buněk pomocí mapování aktivity S-Gal. Šipky označují místa s detekovanou β -galaktosidázovou aktivitou spojenou se senescencí. Měřítko je rovno 50 μ m. **b)** Analýza množství replikujících buněk pomocí značení EdU. **c)** Detekce SAHFů pomocí DAPI. Měřítko odpovídá 10 μ m.

5.2 Porovnání obsahu vybraných proteinů v lidských buněčných liniích

Je známo, že buňky odlišných tkání se mohou v závislosti na jejich funkci lišit v expresi genů některých proteinů (Pontén *et al.*, 2009). V diplomové práci byly analyzovány rozdíly v obsahu vybraných proteinů účastnících se replikace a oprav DNA mezi nádorovými, diploidními a senescentními lidskými buněčnými liniemi.

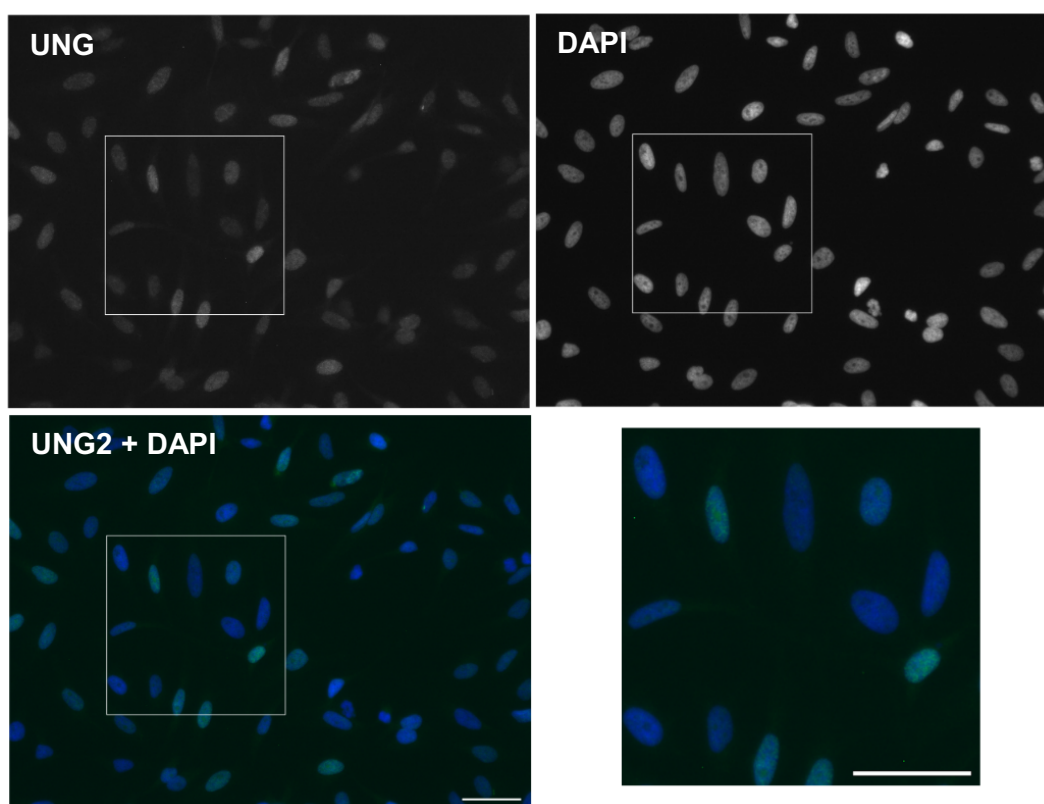
5.2.1 Analýza obsahu vybraných proteinů v nádorových buněčných liniích

Nejdříve byla provedena analýza obsahu vybraných proteinů u nádorových buněčných linií. Kvantifikace vybraných proteinů v připravených jaderných lyzátech byla provedena pomocí western

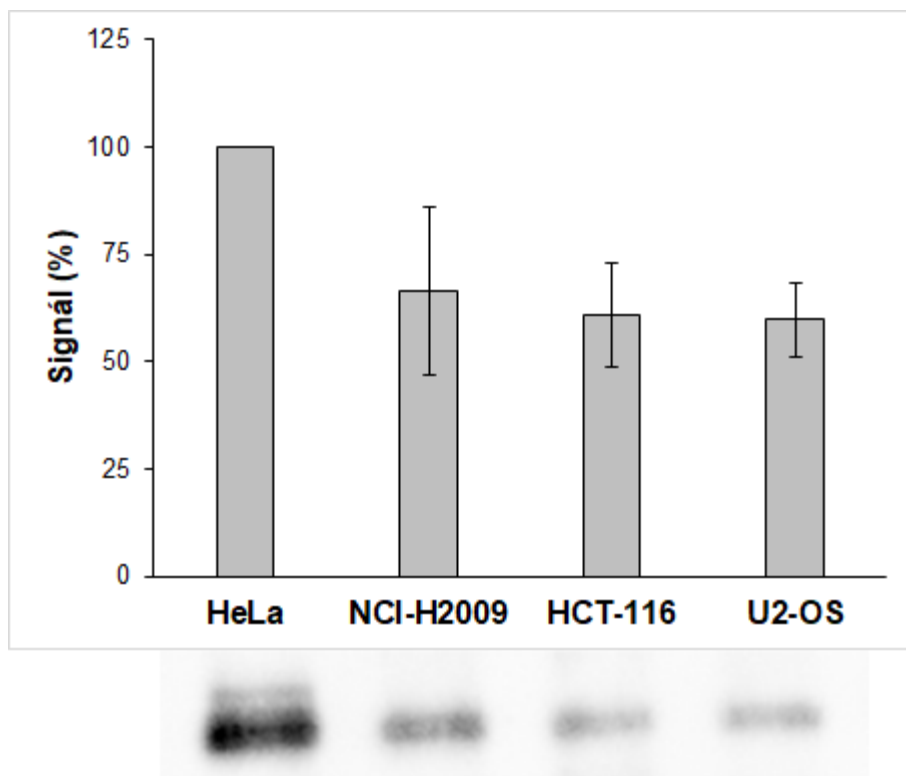
blot analýzy. Jednalo se o proteiny účastnící se replikace a oprav DNA a to UNG2, NTH1, PCNA, RPA32, MCM7, Cdc45 a DNA polymerázu β .

5.2.1.1 Analýza proteinu UNG2

Protein UNG2 patří do skupiny uracilových DNA glykosyláz a jeho úlohou je identifikace a odstranění modifikovaných nukleosidů v molekule DNA (Kara *et al.*, 2019) (viz podkapitola 3.3). Provedená imunofluorescenční analýza potvrdila převážně jadernou lokalizaci UNG proteinu (viz obr. 10). Výsledky western blot analýzy ukázaly významný rozdíl mezi HeLa buňkami a ostatními třemi nádorovými liniemi (viz obr. 11). Jaderné lyzáty HeLa buněk obsahovaly přibližně o 34 % UNG2 proteinu více než buněčná linie NCI-H2009 a o 40 % více než buněčné linie HCT-116 a U2-OS.



Obrázek 10 Imunofluorescenční analýza lokalizace proteinu UNG2 v HeLa buňkách. Fixované a permeabilizované buňky byly značeny primární a sekundární protilátkou a následně nafoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zelený signál odpovídá místům lokalizace proteinu UNG2, modrý signál místům lokalizace jaderné DNA. Měřítka odpovídá 50 μm .

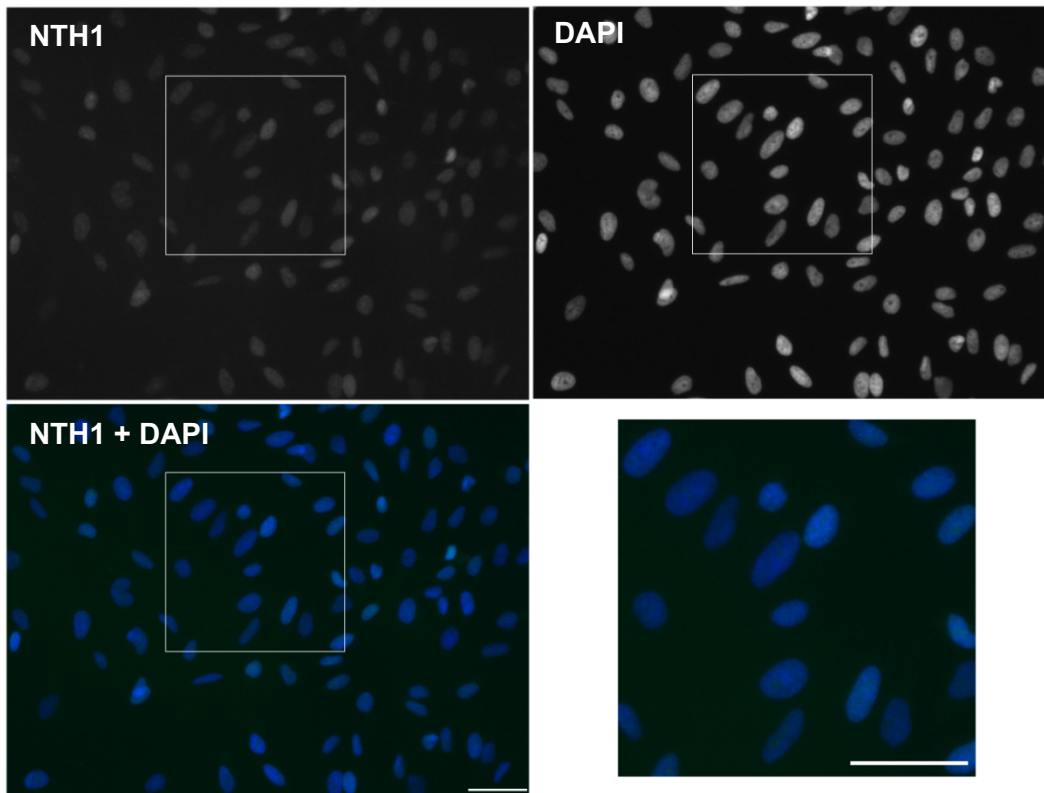


Obrázek 11 Zastoupení proteinu UNG2 v nádorových buňkách

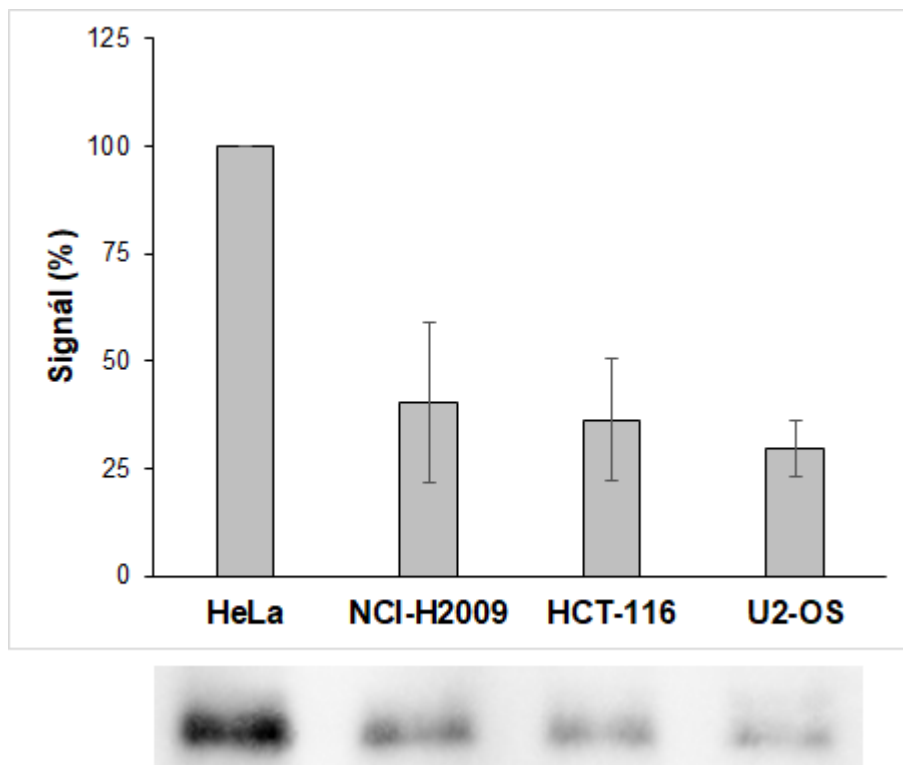
Grafické znázornění procentuálního zastoupení proteinu UNG2 v jednotlivých testovaných nádorových buňkách. Hodnoty signálu byly normalizovány na signál u HeLa buněk, který je roven 100 %. Data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka.; pod grafem je příklad western blot detekce proteinu UNG2 v jaderných lyzátech. Koncentrace nanesených jaderných proteinů byla $4 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

5.2.1.2 Analýza proteinu NTH1

Dalším sledovaným proteinem byla DNA glykosyláza NTH1 sloužící k opravám oxidovaných pyrimidinů jako je například 5-hydroxyuracil nebo 5-hydroxycytosin během bázové excizní opravy (Williams *et* Parsons; 2018). Lokalizace tohoto proteinu pomocí fluorescenční mikroskopie ukázala podobně jako u UNG2 proteinu jeho jadernou lokalizaci (viz obr. 12). V případě analýzy obsahu NTH1 proteinu v různých nádorových buňkách byla jeho nejvyšší koncentrace naměřena podobně jako u UNG2 proteinu u HeLa buněk (viz obr. 13). Oproti ostatním sledovaným buňkám obsahovaly jaderné lyzáty HeLa buněk přibližně o 60 % více proteinu NTH1 než linie NCI-H2009, o 64 % více než linie HCT-116 a o 70 % více než linie U2-OS.



Obrázek 12 Imunofluorescenční analýza lokalizace proteinu NTH1 v HeLa buňkách
 Fixované a permeabilizované buňky byly značeny primární a sekundární protilátkou a následně nafoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zelený signál odpovídá místům lokalizace proteinu NTH1, modrý signál místům lokalizace jaderné DNA. Měřítko odpovídá 50 μm .

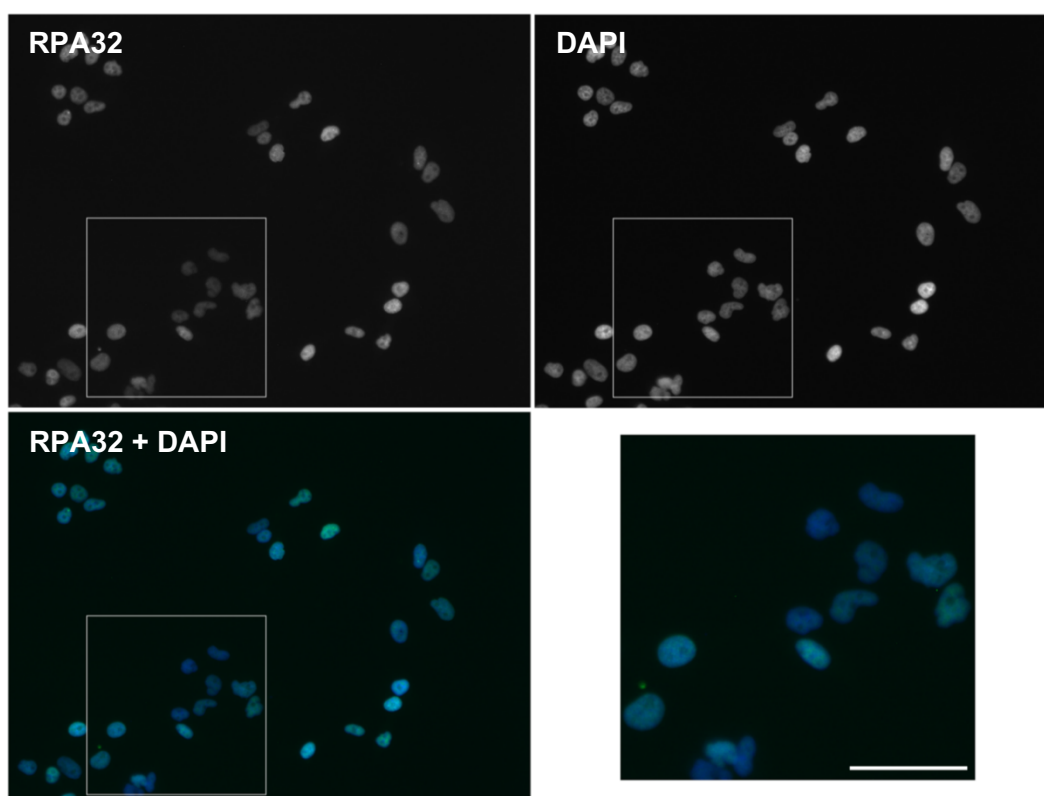


Obrázek 13 Zastoupení proteinu NTH1 v nádorových buňkách
 Grafické znázornění procentuálního zastoupení proteinu NTH1 v jednotlivých testovaných nádorových buňkách. Hodnoty signálu byly normalizovány na signál u HeLa buněk, který je roven 100 %. Data jsou

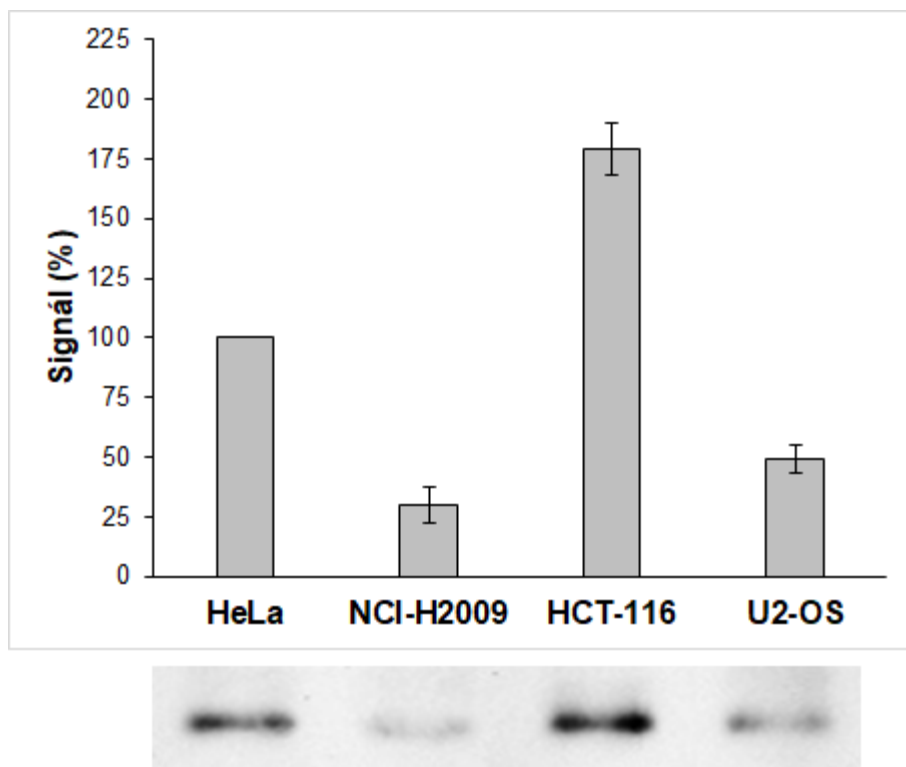
znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka.; pod grafem je příklad western blot detekce proteinu NTH1 v jaderných lyzátech. Koncentrace nanesených jaderných proteinů byla $4 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

5.2.1.3 Analýza proteinu RPA32

Třetím sledovaným proteinem byl protein RPA32. Tento protein je podjednotkou heterotrimerního RPA proteinu, který se váže na jednovláknovou DNA a je důležitou součástí replikace a oprav DNA (Wold, 1997; Zou *et al.*, 2006). Imunofluorescenční analýza ukázala převážně jadernou lokalizaci tohoto proteinu (viz obr. 14). Podle western blot analýzy obsahovaly nejvíce RPA32 proteinu HCT-116 buňky (viz obr. 15), a to o cca 79 % více než HeLa buňky. U NCI-H2009 a U2-OS buněk byl rozdíl oproti buňkám HCT-116 přibližně více než 100 %.



Obrázek 14 Imunofluorescenční analýza lokalizace proteinu RPA32 v HeLa buňkách
Fixované a permeabilizované buňky byly značeny primární a sekundární protilátkou a následně nafoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zelený signál odpovídá místům lokalizace proteinu RPA32, modrý signál místům lokalizace jaderné DNA. Měřítko odpovídá $50 \mu\text{m}$.

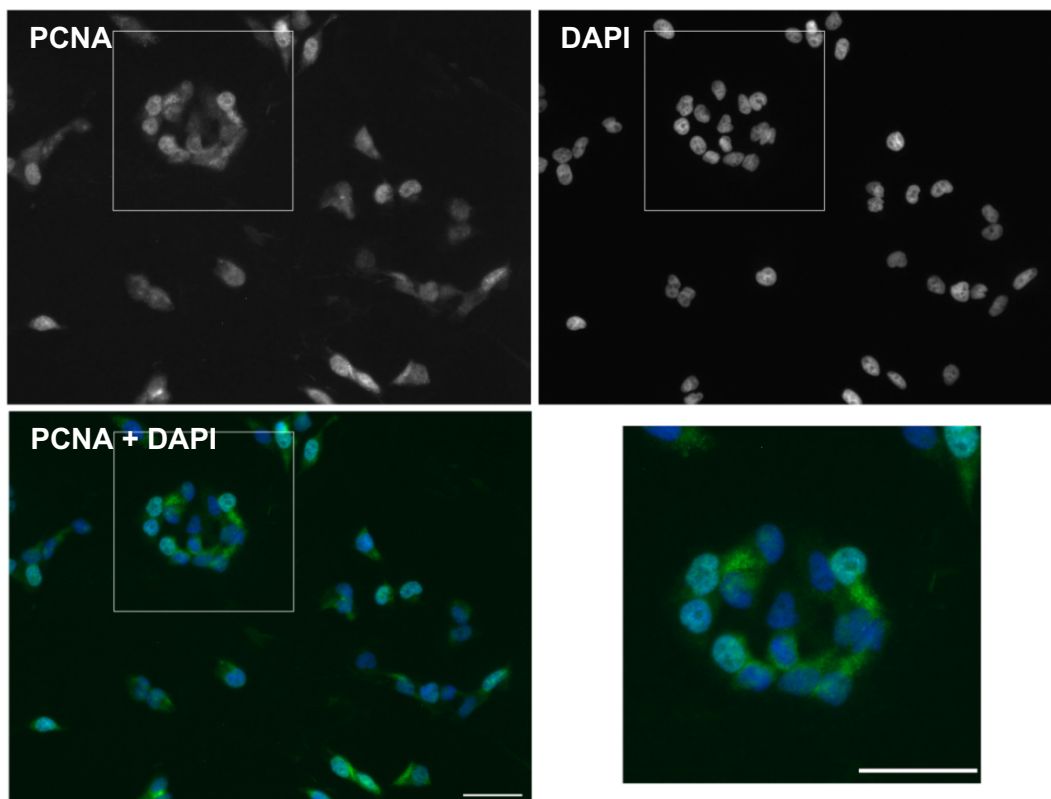


Obrázek 15 Zastoupení proteinu RPA32 v nádorových buňkách

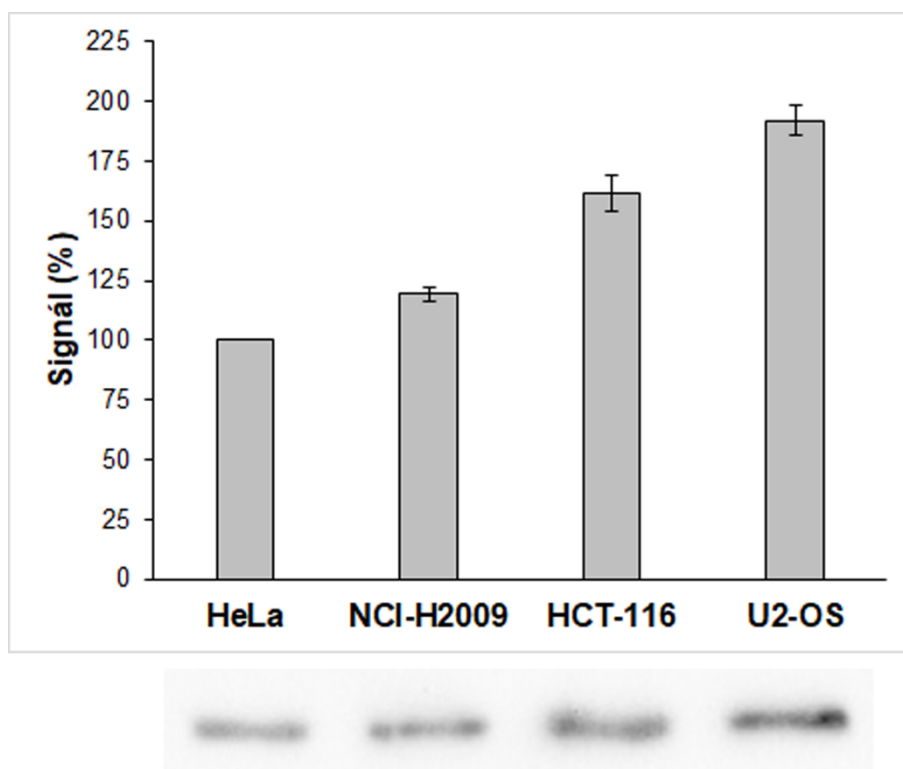
Grafické znázornění procentuálního zastoupení proteinu RPA32 v jednotlivých testovaných nádorových buňkách. Hodnoty signálu byly normalizovány na signál u HeLa buněk, který je roven 100 %. Data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka.; pod grafem je příklad western blot detekce proteinu RPA32 v jaderných lyzátech. Koncentrace nanesených jaderných proteinů byla $4 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

5.2.1.4 Analýza proteinu PCNA

Protein PCNA je důležitý především při syntéze a opravách DNA (Kelman, 1997). Dále se účastní remodelace chromatinu, kontroly buněčného cyklu (Maga *et* Hubsher, 2003) či koheze chromatid (Strzalka *et* Ziemienowicz; 2011). Protein PCNA byl pomocí imunofluorescence lokalizován jak v jádře, tak i v cytoplasmě (viz obr. 16). V souladu s jeho zapojením v replikaci byla některá jádra značena podstatně více než zbytek (nereplikujících) jader (viz obr. 16). Nejvyšší obsah proteinu PCNA vykazovala jádra U2-OS buněk (viz obr. 17). Tyto buňky obsahovaly oproti HeLa buňkám o cca 90 % více, oproti NCI-H2009 buňkám o cca 70 % více a oproti HCT-116 o cca 30 % více proteinu PCNA.



Obrázek 16 Imunofluorescenční analýza lokalizace proteinu PCNA v HeLa buňkách
 Fixované a permeabilizované buňky byly značeny primární a sekundární protilátkou a následně nafočeny pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zelený signál odpovídá místům lokalizace proteinu PCNA, modrý signál místům lokalizace jaderné DNA. Měřítka odpovídá 50 μm .

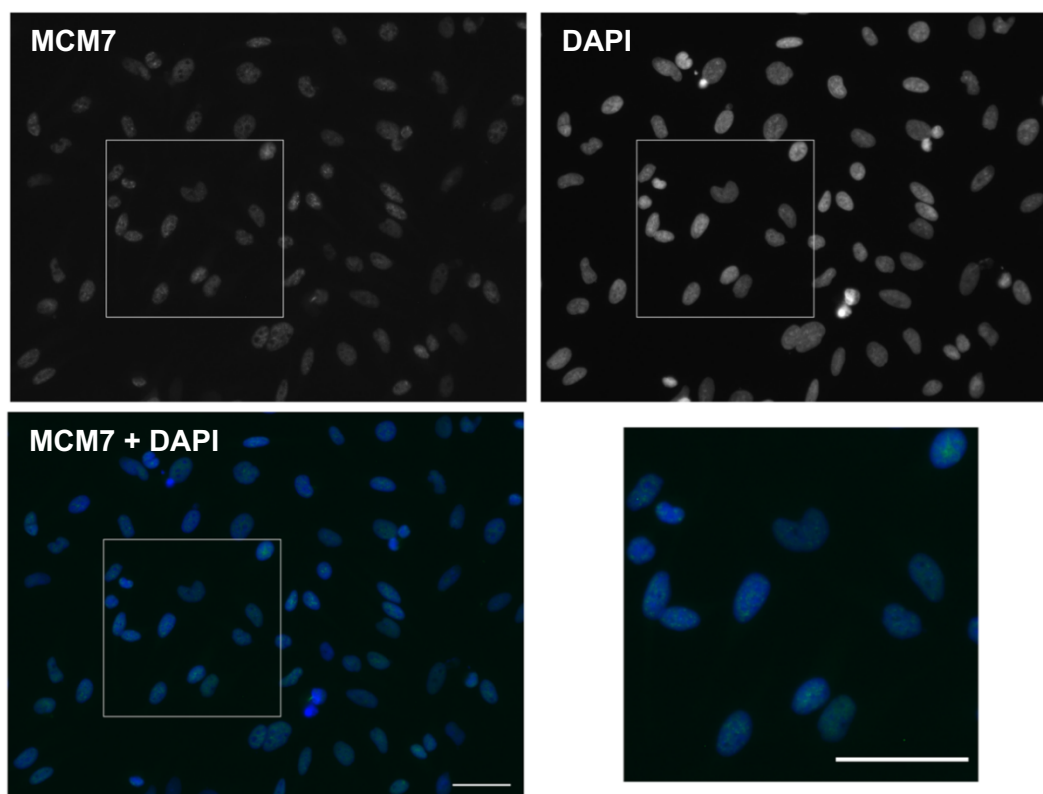


Obrázek 17 Zastoupení proteinu PCNA v nádorových buňkách

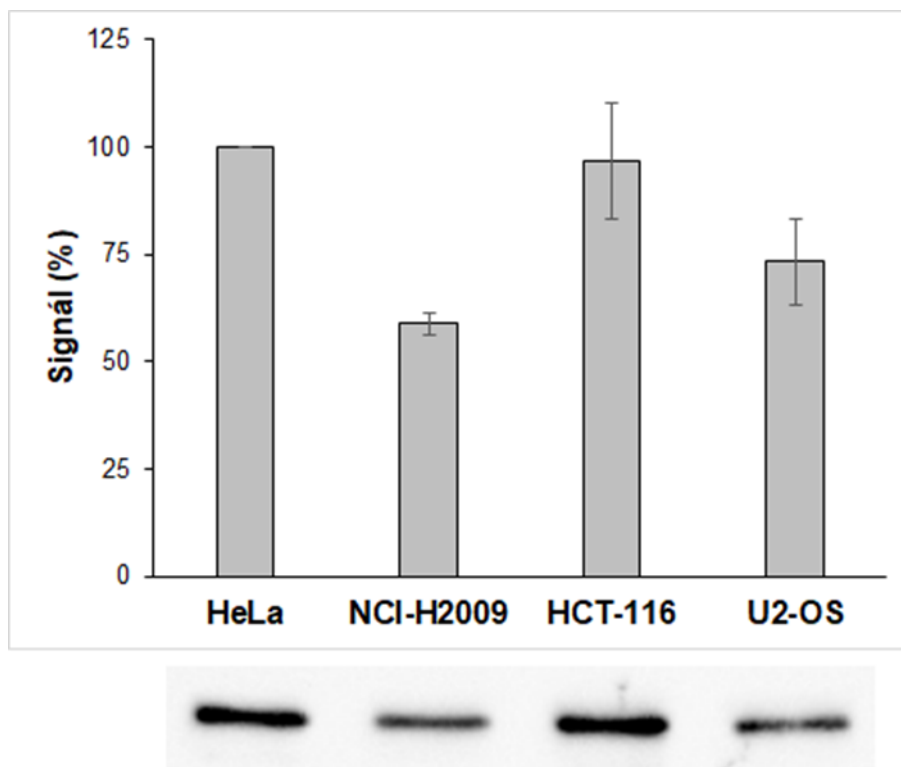
Grafické znázornění procentuálního zastoupení proteinu PCNA v jednotlivých testovaných nádorových buňkách. Hodnoty signálu byly normalizovány na signál u HeLa buněk, který je roven 100 %. Data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka.; pod grafem je příklad western blot detekce proteinu PCNA v jaderných lyzátech. Koncentrace nanesených jaderných proteinů byla $4 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

5.2.1.5 Analýza proteinu MCM7

Dalším sledovaným proteinem byl protein MCM7, který hraje významnou roli v zahájení replikace DNA. Tvorba MCM2-7 komplexu je v počátečním stádiu replikace považována za nezbytnou k formaci pre-replikačního komplexu k rozpletení molekuly DNA a tvorbě replikační vidličky (Labib *et al.*, 2000). V případě imunofluorescence byl tento protein lokalizován převážně v jádře (viz obr. 18). Jeho nejvyšší množství bylo pomocí western blot analýzy zjištěno v jádře HeLa a HCT-116 buněk (viz obr. 19). Obě tyto linie obsahovaly přibližně stejné množství MCM7 proteinu. HeLa a HCT-116 buňky obsahovaly přibližně o 40 % více proteinu než buněčná linie NCI-H2009 a o 26 % více než buněčná linie U2-OS.



Obrázek 18 Imunofluorescenční analýza lokalizace proteinu MCM7 v HeLa buňkách
Fixované a permeabilizované buňky byly značeny primární a sekundární protilátkou a následně nafoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zelený signál odpovídá místům lokalizace proteinu MCM7, modrý signál místům lokalizace jaderné DNA. Měřítko odpovídá $50 \mu\text{m}$.

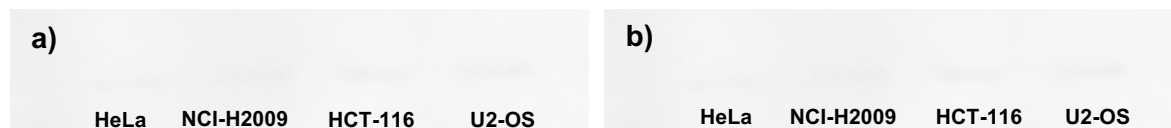


Obrázek 19 Zastoupení proteinu MCM7 v nádorových buňkách

Grafické znázornění procentuálního zastoupení proteinu MCM7 v jednotlivých testovaných nádorových buňkách. Hodnoty signálu byly normalizovány na signál u HeLa buněk, který je roven 100 %. Data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka; pod grafem je příklad western blot detekce proteinu MCM7 v jaderných lyzátech. Koncentrace nanesených jaderných proteinů byla $4\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

5.2.1.6 Analýza proteinů DNA polymerázy β a Cdc45

DNA polymeráza β se účastní oprav DNA (zejména opravy BER). Dále také replikace nebo rekombinace. (Kumar *et al.*, 2022). Protein Cdc45 je důležitý při zahájení replikace, kdy společně s helikázovým komplexem napomáhá rozplétání dvoušroubovice DNA během její replikace (Petojevic *et al.*, 2015). V případě těchto dvou proteinů neposkytla ani jedna z použitých protilátek signifikantní imunofluorescenční signál. Podobně nebyl pozorován signál ani na western blotu (viz obr. 20).



Obrázek 20 Western blot detekce DNA polymerázy β a Cdc45

Na obrázku je zobrazen příklad detekce proteinů DNA polymerázy β (vlevo) a Cdc45 (vpravo) v jaderných lyzátech nádorových buněk. Koncentrace nanesených jaderných proteinů byla $4\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

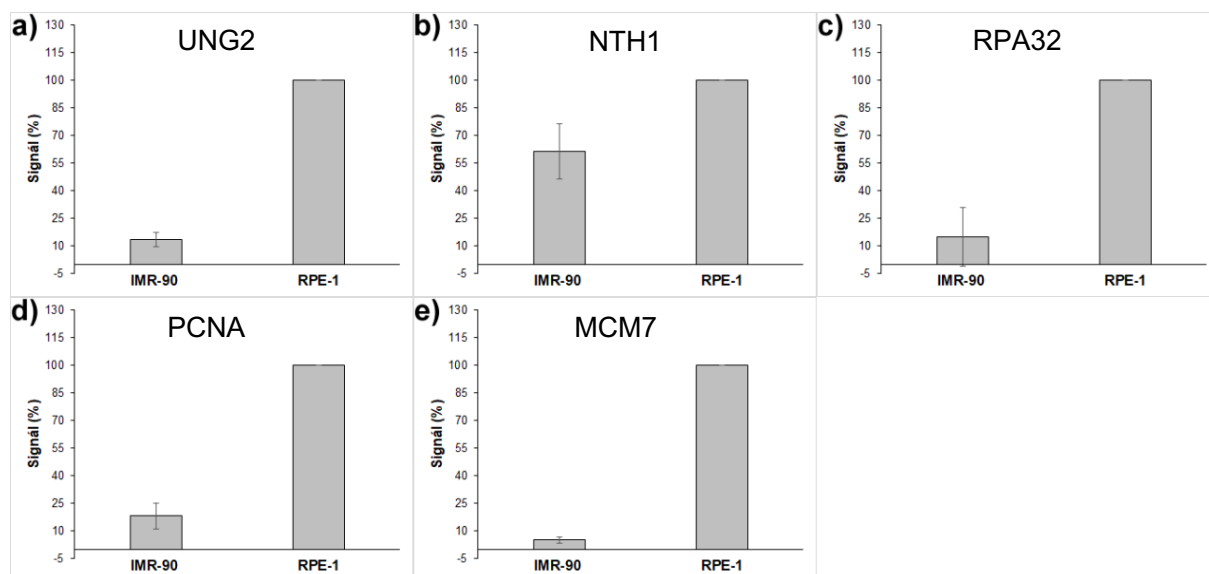
5.2.2 Analýza obsahu vybraných proteinů u lidských diploidních buněk

Podobně jako u nádorových buněk byla i u dvou diploidních buněčných linií provedena analýza obsahu vybraných proteinů s cílem popsat rozdíly mezi obsahem proteinů mezi immortalizovanými a běžnými diploidními buňkami. V experimentech byly použity diploidní fibroblasty IMR-90

a immortalizované diploidní buňky hTERT RPE-1 (RPE-1). V případě linie IMR-90 bylo rovněž sledováno, zda existuje rozdíl v obsahu jednotlivých proteinů u senescentních a rostoucích buněk.

5.2.2.1 Obsah vybraných proteinů u diploidních buněčných liniích

Provedená western blot analýza ukázala, že obsah všech sledovaných proteinů byl mnohem vyšší u immortalizovaných diploidních RPE-1 buněk než u IMR-90 diploidních fibroblastů (viz obr. 21). V případě UNG2, RPA32, PCNA a MCM7 proteinů byl tento rozdíl přibližně 90 % (viz obr. 21a, c, d, e). O něco menší rozdíly byly naměřeny v případě glykosylázy NTH1. U tohoto proteinu byl rozdíl v jeho obsahu přibližně 40 % (viz obr. 21b).

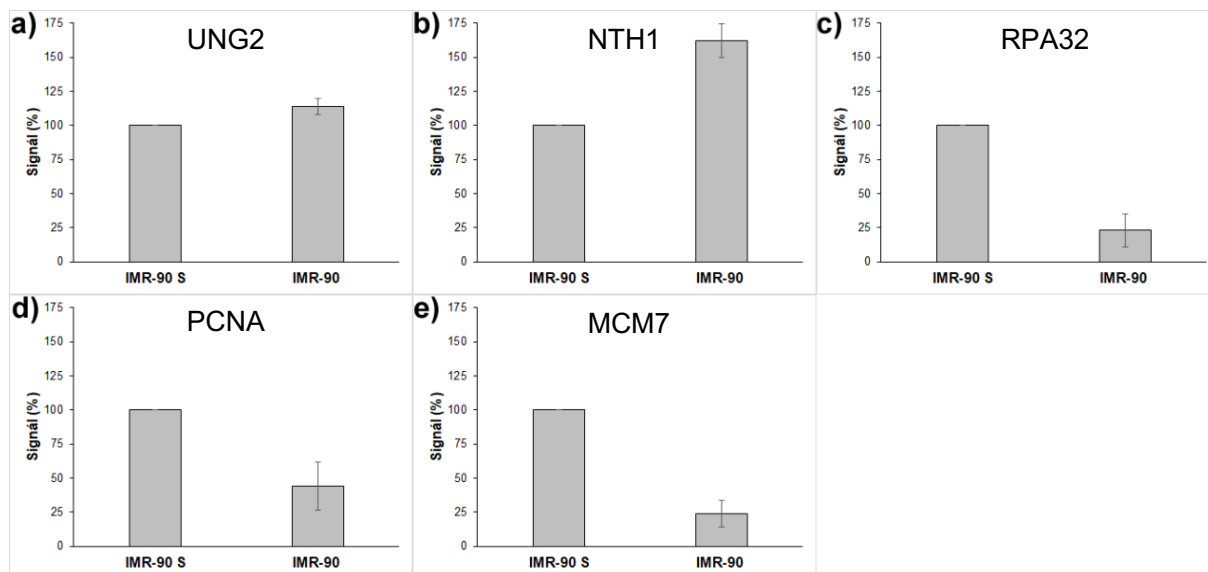


Obrázek 21 Obsah sledovaných proteinů u diploidních buněk

Grafické znázornění procentuálního obsahu sledovaných proteinů u diploidních buněk. Hodnoty signálu byly normalizovány na signál u RPE-1 buněk, který je roven 100 %. Data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka.

5.2.2.2 Obsah vybraných proteinů u rostoucích a senescentních buněk

Dále byl sledován rozdíl v obsahu vybraných proteinů v senescentních a rostoucích IMR-90 buňkách. Z provedených analýz nebyl zjištěn významný rozdíl v obsahu UNG2 proteinu, rozdíl mezi senescentními a rostoucími buňkami byl přibližně 13 % (viz obr. 22a). Naopak, v případě druhé sledované glykosylázy – NTH1, došlo k poklesu obsahu tohoto proteinu u senescentních buněk o cca 60 % (viz obr. 22b). U RPA32, PCNA i MCM7 proteinů došlo naopak u senescentních IMR-90 buněk k výraznému nárůstu jejich obsahu. U proteinů RPA32 a MCM7 byl tento nárůst téměř 80 % (viz obr. 22c, e) a u proteinu PCNA byl nárůst přibližně 55 % (viz obr. 22d).



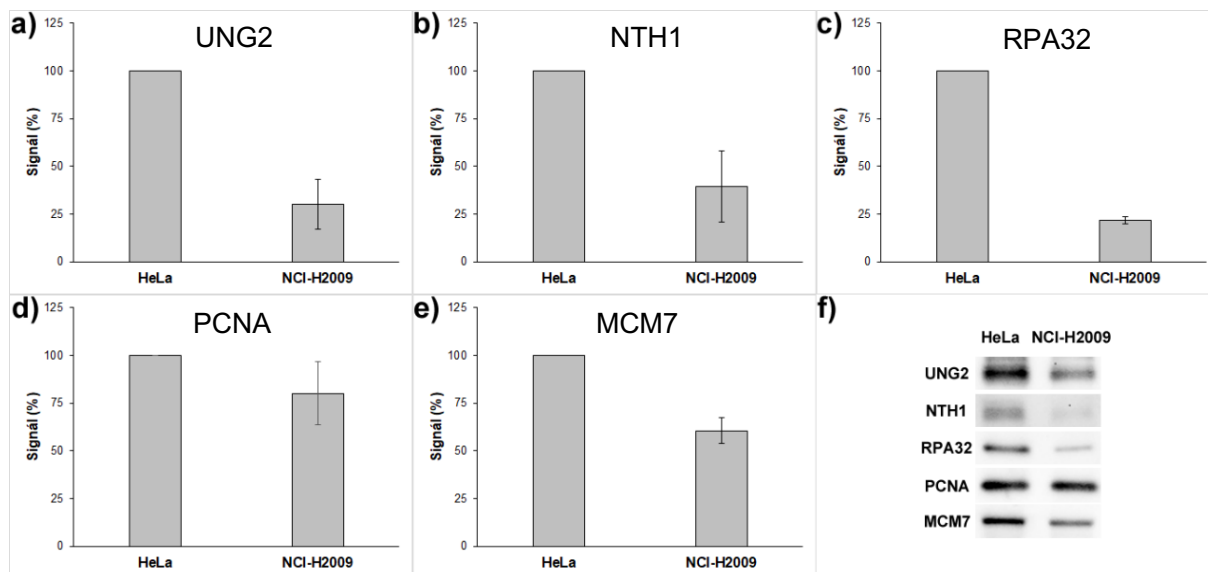
Obrazek 22 Obsah sledovaných proteinů u rostoucích a senescentních fibroblastů

Grafické znázornění procentuálního obsahu proteinů u rostoucích a senescentních (IMR-90 S) fibroblastů. Hodnoty signálu byly normalizovány na signál u IMR-90 S buněk, který je roven 100 %. Data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka.

5.2.3. Analýza obsahu vybraných proteinů u celobuněčných lyzátů HeLa a NCI-H2009 buněk

V další části práce byl sledován obsah vybraných proteinů u celobuněčných lyzátů připravených ze dvou nádorových linií – HeLa a NCI-H2009. Cílem bylo zjistit, nakolik se liší obsah sledovaných proteinů u jaderných a celobuněčných lyzátů.

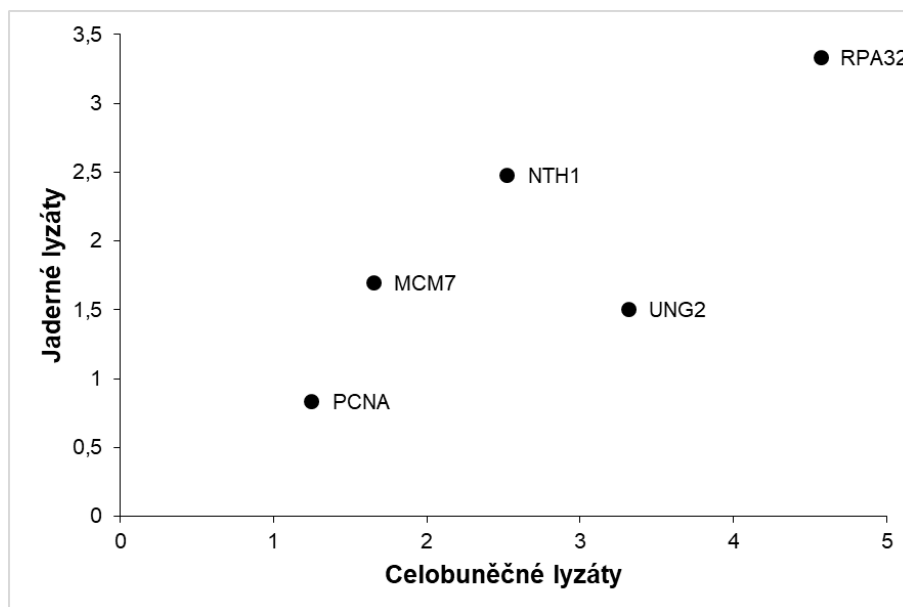
Provedené analýzy ukázaly, že obsah sledovaných proteinů byl ve všech případech vyšší u HeLa buněk než u NCI-H2009 buněk (viz obr. 23). V případě UNG2 a NTH1 glykosylázy byl jeho obsah vyšší o cca 70 % (viz obr. 23a, b, f). Ještě větší byl rozdíl v obsahu RPA32 proteinu. V tomto případě obsahovaly celobuněčné lyzáty HeLa buněk o 80 % více RPA32 než NCI-H2009 buňky (viz obr. 23c, f). U PCNA byl obsah tohoto proteinu u linie HeLa o 22 % vyšší než u buněčné linie NCI-H2009 (viz obr. 23d, f). U MCM7 proteinu byl rozdíl v obsahu cca 40 % (viz obr. 23e, f).



Obrázek 23 Obsah vybraných proteinů v celobuněčných lyzátech

a-e) Grafické znázornění procentuálního obsahu vybraných proteinů v celobuněčných lyzátech HeLa a NCI-H2009 buněk. Použitá koncentrace proteinů na western blotu byla $4 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Hodnoty signálu byly normalizovány na signál u HeLa buněk, který je roven 100 %. Data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka. **f)** Příklad western blot detekce sledovaných proteinů v celobuněčných lyzátech buněk. Koncentrace nanesených jaderných proteinů byla $4 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

V případě určení korelace mezi jednotlivými proteiny u jaderných a celobuněčných lyzátů byl Pearsonův koeficient roven 0,801. Ačkoli se jedná o silnou pozitivní korelaci (viz obr. 24), nebyl tento výsledek statisticky významný ($p = 0,103$). Opět by byla nutná důkladnější analýza s vyšším počtem vzorků.



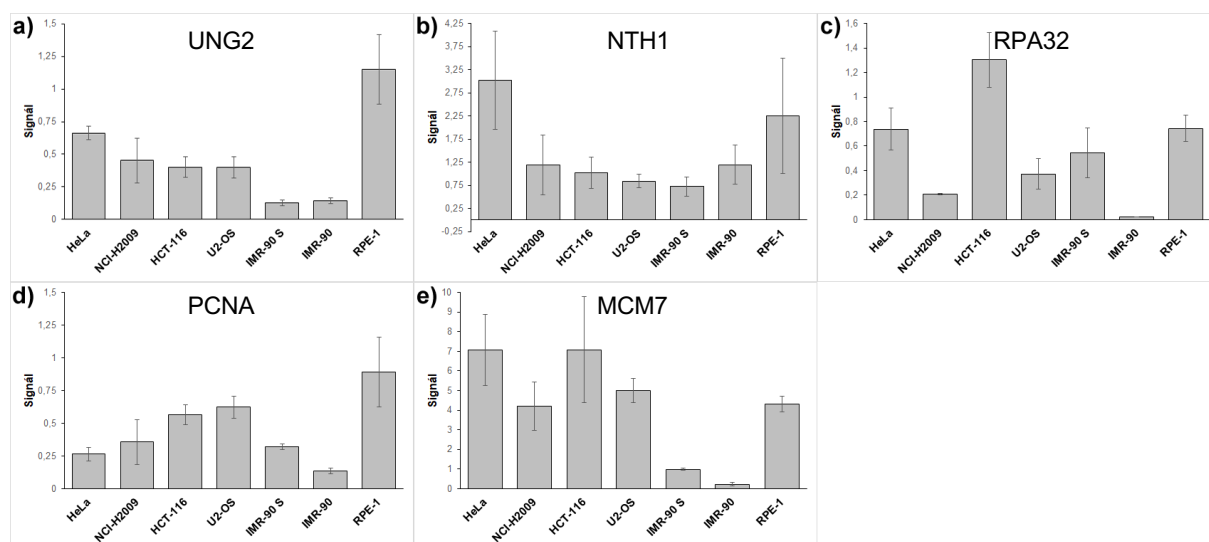
Obrázek 24 Analýza vzájemného vztahu mezi studovanými proteiny u jaderných a celobuněčných lyzátů

Korelační diagram znázorňující vztah mezi proteiny v jaderných a celobuněčných lyzátech. Body v grafu znázorňují jednotlivé hodnoty obsahu sledovaných proteinů.

5.2.4. Porovnání obsahu vybraných proteinů mezi testovanými buněčnými liniemi

Na závěr byl porovnán rozdíl v obsahu proteinů v rámci všech sledovaných buněk. V tomto případě byly vzorky normalizovány pomocí vzorku HeLa buněk. Tento vzorek byl součástí všech analyzovaných gelů. Použitá koncentrace vzorku byla $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ celkového proteinu.

Nejvíce proteinu UNG2 obsahovala buněčná linie RPE-1 (viz obr. 25a). Oproti buněčné linii HeLa bylo v buněčné linii RPE-1 naměřeno přibližně o 40 % tohoto proteinu více. Naopak proteinu NTH1 obsahovaly nejvíce HeLa buňky, a to přibližně o 25 % více než RPE-1 buňky (viz obr. 25b). Ještě větší rozdíly byly naměřeny v obsahu proteinu RPA32, kdy nejvyšší obsah tohoto proteinu byl u HCT-116 buněk (viz obr. 25c). Ve srovnání s HeLa buňkami byl obsah RPA32 u imortalizovaných RPE-1 buněk podobný. U proteinu PCNA byl jeho obsah u HeLa buněk naopak nižší, a to přibližně o 70 % než u buněk RPE-1 (viz obr. 25d). Obsah proteinu MCM7 byl vyšší u HeLa buněk, a to přibližně o 40 % než u buněk RPE-1 (viz obr. 25e). Obecně byl u všech sledovaných proteinů naměřen jejich nejnižší obsah u linie diploidních fibroblastů IMR-90. Největší rozdíl mezi linií IMR-90 a HeLa buňkami byl naměřen v případě proteinů RPA32 a MCM7, tento rozdíl byl přibližně 96 %.



Obrázek 25 Porovnání obsahu proteinů u všech testovaných buněčných linií

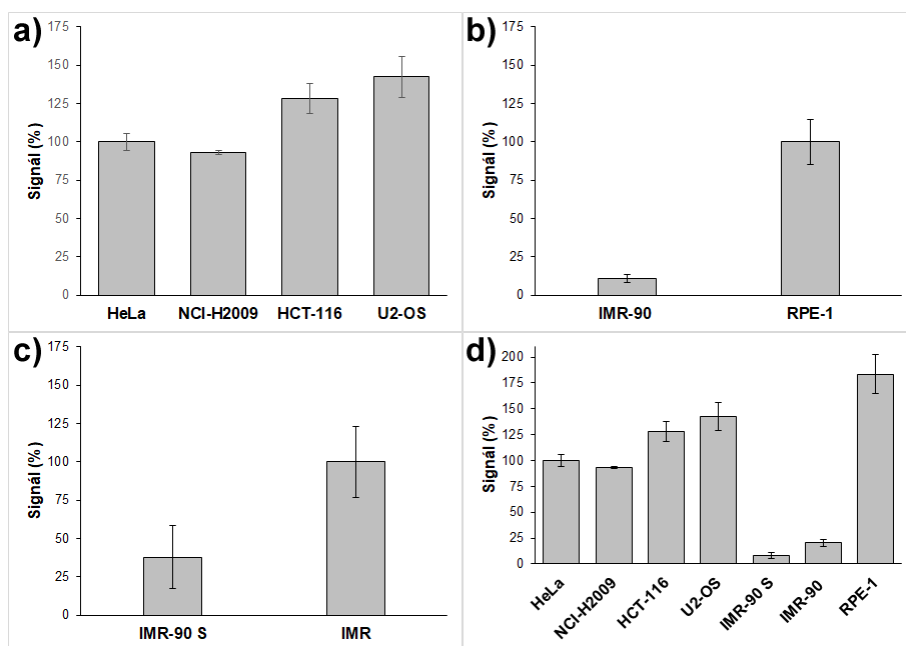
Grafické znázornění procentuálního obsahu vybraných proteinů u všech testovaných buněk. Použitá koncentrace proteinů na western blotu byla $4 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Hodnoty signálu byly normalizovány na signál u kontrolních HeLa buněk, které byly naneseny na všech gelech, tento signál byl roven 1. Data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka.

Vzhledem k ostatním nádorovým buněčným liniím byl obsah proteinů UNG2, NTH1 a MCM7v HeLa buňkách vyšší. U proteinů RPA32 a PCNA byl naopak jejich obsah proteinu nižší v HeLa buňkách než v ostatních buněčných liniích.

5.3 Analýza glykosylázové aktivity

V poslední části práce byla analyzována aktivita buněčných uracilových DNA glykosyláz v jaderných lyzátech jak nádorových, tak i diploidních buněk. Aktivita byla měřena pomocí metody založené na použití fluorescenčně značených oligonukleotidových sond ukotvených na povrchu magnetických částic pokrytých streptavidinem (Ligasová *et al.*, 2021, viz podkapitola 4.4.7). Aktivita byla testována v jaderných lyzátech nádorových buněk - HeLa, NCI-H2009, HCT-116 a U2-OS a v jaderných lyzátech diploidních fibroblastů IMR-90 (senescentních i rostoucích) a immortalizované diploidní linie RPE-1.

Z výsledků je zjevné, že v případě nádorových buněk byla nejvyšší aktivita uracilových DNA glykosyláz u buněčné linie U2-OS (viz obr. 26a). V buněčné linii HCT-116 byla aktivita uracilových DNA glykosyláz o 14 % nižší než v buněčné linii U2-OS. V linii HeLa byla aktivita uracilových DNA glykosyláz nižší o 42 % ve srovnání s buněčnou linií U2-OS. Nejnižší aktivita byla naměřena v linii NCI-H2009. U této linie byla aktivita uracilových DNA glykosyláz přibližně o 49 % nižší než u U2-OS buněk.



Obrázek 26 Analýza aktivity uracilových DNA glykosyláz

a) Grafické znázornění procentuálního zastoupení aktivity uracilových DNA glykosyláz v nádorových buňkách. Hodnoty signálu byly normalizovány na signál u HeLa buněk, který je roven 100 %. Data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka; **b)** Grafické znázornění procentuálního zastoupení aktivity uracilových DNA glykosyláz v diploidních buňkách. Hodnoty signálu byly normalizovány na signál u RPE-1 buněk, který je roven 100 %. Data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka; **c)** Grafické znázornění procentuálního zastoupení aktivity uracilových DNA glykosyláz v buňkách rostoucích a senescentních (IMR-90 S) diploidních fibroblastů. Hodnoty signálu byly normalizovány na signál u IMR-90 S buněk, který je roven 100 %. Data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka; **d)** Grafické znázornění procentuálního zastoupení aktivity uracilových DNA glykosyláz u nádorových buněčných linií a diploidních buněk. Hodnoty signálu byly normalizovány na signál u HeLa buněk, který je roven 100 %. Data jsou znázorněna jako \pm směrodatná odchylka.

V případě porovnání diploidních buněk byla výrazně vyšší aktivita naměřena u immortalizované diploidní buněčné linie RPE-1 (viz obr. 26b). Rozdíl v aktivitě uracilových DNA glykosyláz byl přibližně 89 %. Při porovnání senescentních a rostoucích IMR-90 buněk byla vyšší aktivita naměřena u rostoucích IMR-90 buněk (viz obr. 26c), přičemž rozdíl činil přibližně 62 %. Na závěr byly porovnány rozdíly v aktivitě uracilových DNA glykosyláz mezi všemi testovanými buňkami. V rámci tohoto porovnání byla nejvyšší aktivita uracilových glykosyláz naměřena u buněčné linie RPE-1 (viz obr. 26d). Naopak, u IMR-90 buněk, a to jak rostoucích, tak senescentních byla aktivita uracilových glykosyláz nejnižší. Rozdíl mezi buňkami RPE-1 a U2-OS, které měly v rámci nádorových linií nejvyšší aktivitu uracilových glykosyláz, byl přibližně 41 %.

5.4 Korelativní analýza

5.4.1 Korelativní analýza proteinů v nádorových buněčných liniích

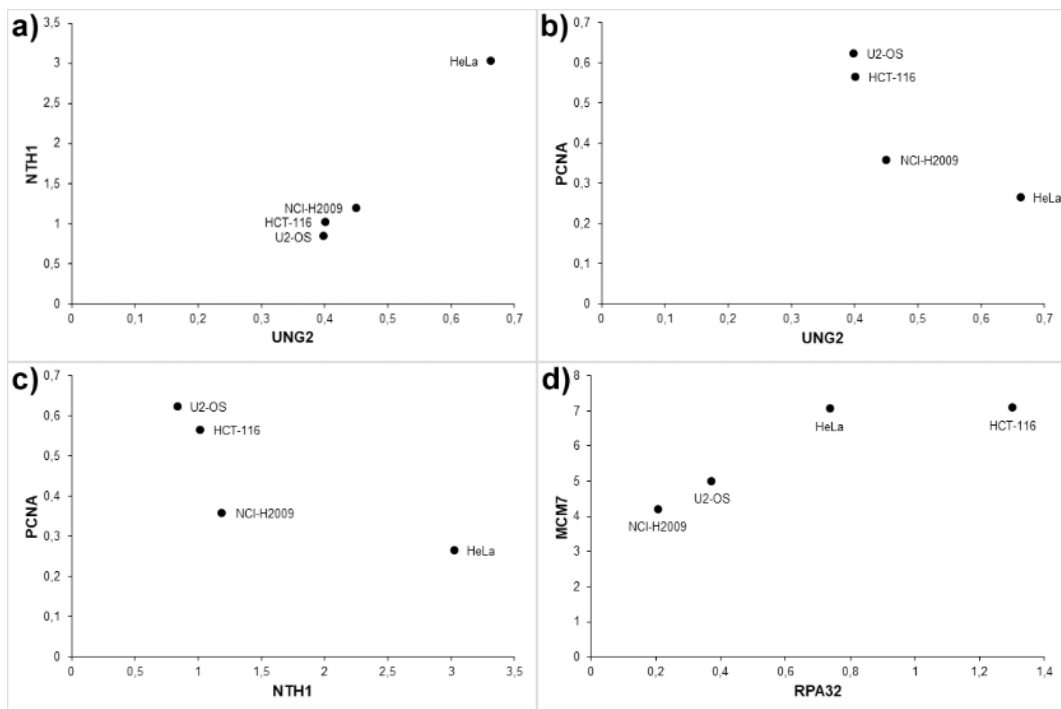
Pro určení vzájemného vztahu mezi jednotlivými proteiny byl použit Pearsonův koeficient (viz tabulka 8). Současně byla pro každý Pearsonův koeficient vypočtena p-hodnota (viz tabulka 8).

Tabulka 8 Korelace mezi jednotlivými sledovanými proteiny v rámci nádorových buněčných linií

Porovnávané proteiny	Pearsonův koeficient	p-hodnota
UNG2/NTH1	0,995	0,005
UNG2/RPA32	0,0004	1
UNG2/PCNA	-0,852	0,148
UNG2/MCM7	0,440	0,560
NTH1/RPA32	0,094	0,906
NTH1/PCNA	-0,821	0,179
NTH1/MCM7	0,524	0,476
RPA32/PCNA	0,213	0,787
RPA32/MCM7	0,880	0,120
PCNA/MCM7	-0,103	0,897

Ze vzájemného porovnání vyplynulo, že u nádorových buněk je mezi proteiny UNG2 a NTH1 velmi silná pozitivní korelace, s obsahem UNG2 roste i obsah NTH1 (Pearsonův koeficient = 0,995; $p = 0,005$). Tato korelace je zřejmá i z bodového grafu na obr. 27a. Mezi proteiny UNG2 a PCNA a rovněž mezi proteiny NTH1 a PCNA byla dle Pearsonova koeficientu záporná korelace, ovšem vzhledem k nízkému počtu sledovaných nádorových linií nebyla tato korelace statisticky významná ($p = 0,148$ pro UNG2/PCNA a $p = 0,178$ pro NTH1 a PCNA; viz tabulka 8 a obrázek 27b, c). Pro jasnější odraz vzájemné korelace by bylo nutné provést tyto analýzy na větším počtu nádorových buněčných liniích. Z vypočtených dat byla rovněž zřejmá pozitivní korelace mezi replikačními proteiny RPA32 a MCM7 (Pearsonův koeficient = 0,880, $p = 0,119$; viz tabulka 8 a obrázek 27d). I v tomto případě by

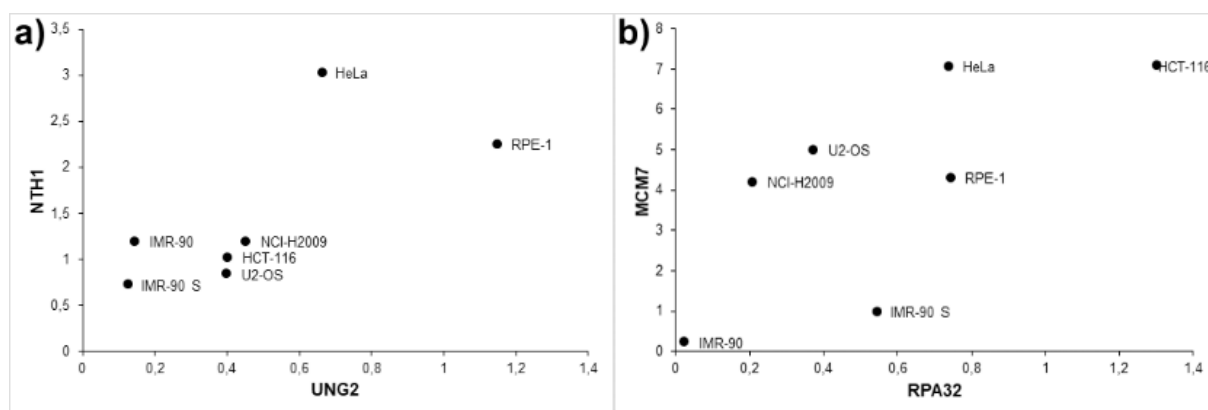
pro přesnější výsledky byla nutná analýza vyššího počtu nádorových buněčných liniích. Mezi zbylými kombinacemi proteinů nebyla nalezena žádná korelace.



Obrázek 27 Analýza vzájemného vztahu mezi některými studovanými proteiny u nádorových buněk. Korelační diagram znázorňující vztah mezi proteiny UNG2 a NTH1 (a), UNG2 a PCNA (b), NTH1 a PCNA (c) a RPA32 a MCM7 (d) u nádorových buněk. Body v grafech znázorňují jednotlivé hodnoty obsahu sledovaných proteinů.

5.4.2 Korelativní analýza proteinů u všech sledovaných buněčných linií

Vztah mezi jednotlivými proteiny byl současně analyzován v rámci všech testovaných buněčných linií - nádorových a diploidních. Pro určení vzájemného vztahu byl opět použit Pearsonův koeficient a p-hodnota (viz tabulka 9). Vzájemné porovnání všech buněk potvrdilo pozitivní korelaci mezi proteiny UNG2 a NTH1 (Pearsonův koeficient = 0,705, $p = 0,077$; viz tabulka 9 a obrázek 28a). Současně se potvrdila pozitivní korelace mezi replikačními proteiny RPA32 a MCM7 (Pearsonův koeficient = 0,693, $p = 0,085$; viz tabulka 9 a obrázek 28b). V obou dvou případech, ale nebyly tyto výsledky statisticky významné a pro jejich potvrzení by byla nutná analýza většího počtu buněčných linií.



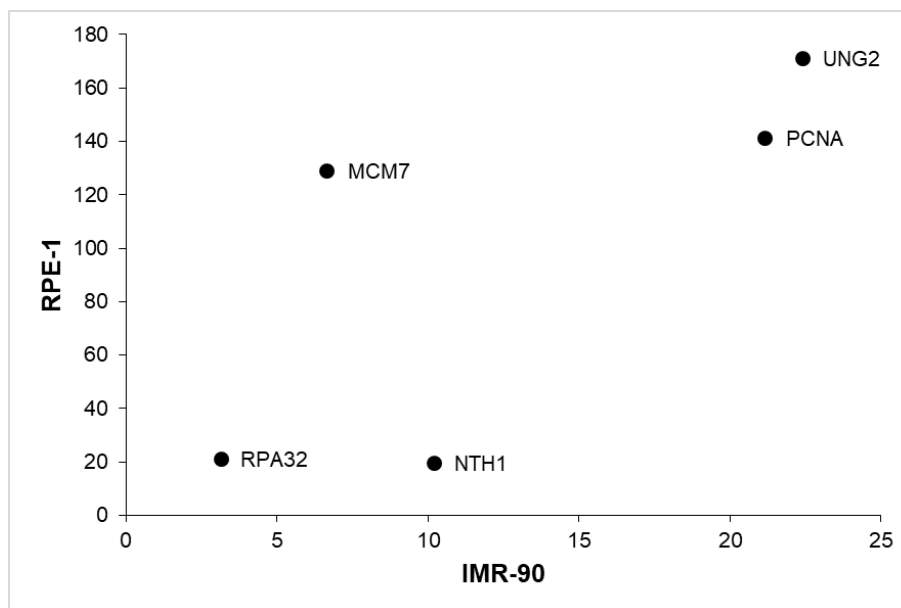
Obrázek 28 Analýza vzájemného vztahu mezi některými studovanými proteiny u všech buněk. Korelační diagram znázorňující vztah mezi proteiny UNG2 a NTH1 (a) a RPA32 a MCM7 (b) u všech sledovaných buněk. Body v grafech znázorňují jednotlivé hodnoty obsahu sledovaných proteinů.

Tabulka 9 Korelace mezi jednotlivými proteiny u všech sledovaných buněk

Porovnávané proteiny	Pearsonův koeficient	p-hodnota
UNG2/NTH1	0,705	0,077
UNG2/RPA32	0,349	0,442
UNG2/PCNA	0,729	0,063
UNG2/MCM7	0,491	0,263
NTH1/RPA32	0,214	0,645
NTH1/PCNA	0,080	0,864
NTH1/MCM7	0,454	0,306
RPA32/PCNA	0,471	0,286
RPA32/MCM7	0,693	0,085
PCNA/MCM7	0,399	0,375

5.4.3 Korelativní analýza proteinů u diploidních buněk

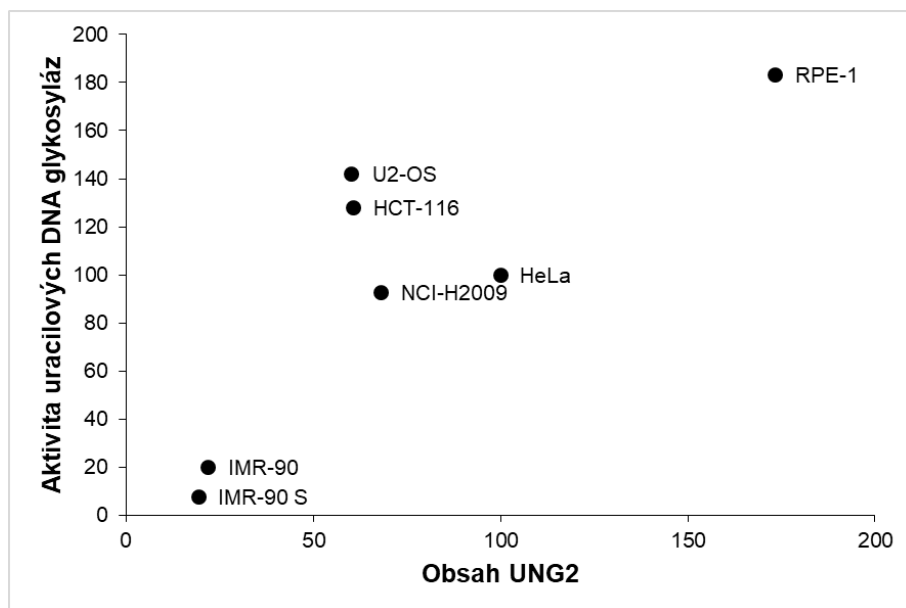
Další korelativní analýza byla provedena s cílem porovnat vztah mezi jednotlivými proteiny u diploidních fibroblastů IMR-90 a immortalizované diploidní linií RPE-1 (viz obr. 29). Na základě provedené analýzy byla zjištěna pozitivní korelace mezi oběma buněčnými liniemi (Pearsonův koeficient = 0,740), ale p-hodnota naznačovala, že se nejedná o statisticky významnou hodnotu ($p = 0,153$). Jelikož se jednalo o porovnání jenom dvou linií, pro přesnější analýzu by bylo nutné testovat větší počet diploidních buněk.



Obrázek 29 Analýza vzájemného vztahu mezi studovanými proteiny u diploidních buněk. Korelační diagram znázorňující vztah mezi sledovanými proteiny u diploidních fibroblastů IMR-90 a imortalizované diploidní linie RPE-1. Body v grafu znázorňují jednotlivé hodnoty obsahu sledovaných proteinů.

5.4.4 Korelativní analýza mezi aktivitou uracilových DNA glykosyláz a obsahem UNG2

Na závěr byl analyzován vzájemný vztah mezi aktivitou uracilových DNA glykosyláz v jednotlivých buněčných liniích a obsahem UNG2 proteinu v těchto buněčných liniích (viz obr. 30) pomocí Pearsonova koeficientu. Na základě výpočtu byla hodnota Pearsonova koeficientu rovna 0,820 ($p = 0,024$). To ukazuje na silnou pozitivní korelaci mezi obsahem UNG2 proteinu a aktivitou uracilových DNA glykosyláz (viz obr. 30).



Obrázek 30 Analýza vzájemného vztahu mezi obsahem UNG2 a aktivitou uracilových DNA glykosyláz
 Korelační diagram znázorňující vztah mezi obsahem UNG2 a aktivitou uracilových DNA glykosyláz u
 nádorových buněčných liniích.

6 Diskuze

V diplomové práci byla provedena srovnávací analýza proteinů účastnících se replikace a oprav DNA z hlediska jejich obsahu v různých buněčných liniích. Sledovanými proteiny byly UNG2, NTH1, RPA32, PCNA, MCM7, DNA polymeráza β a CDC45. Jelikož je DNA syntetizována kromě jádra i v mitochondriích, byly v experimentech primárně používány jaderné lyzáty. Analyzovanými buněčnými liniemi byly nádorové linie HeLa, NCI-H2009, HCT-116 a U2-OS. Dále byly použity diploidní fibroblasty IMR-90, kde byl analyzován rozdíl v obsahu proteinu mezi rostoucími a senescentními buňkami a rovněž byla použita diploidní immortalizovaná linie RPE-1. Kromě jaderných lyzátů byly z buněčné linie HeLa a NCI-H2009 připraveny i celobuněčné lyzáty, které byly využity pro dokumentaci případných rozdílů v obsahu proteinů mezi jadernými a celobuněčnými lyzáty.

Prvním analyzovaným proteinem byla uracilová glykosyláza UNG2, která hraje důležitou roli v báze excizní opravě (např. Pettersen *et al.*, 2007). Provedená fluorescenční analýza prokázala lokalizaci tohoto proteinu v buněčném jádře. Tato pozorování jsou v souladu, s již dříve publikovanými výsledky např. Otterleiho a kolektivu (Otterlei *et al.*, 1999). Z následně provedené analýzy obsahu UNG2 pomocí western blotu bylo zřejmé, že v rámci nádorových buněk obsahovala nejvíce proteinu UNG2 buněčná linie HeLa. V práci Ivelanda a kolektivu (Iveland *et al.*, 2020) byl v buňkách HeLa rovněž naměřen vysoký obsah proteinu UNG2. V diplomové práci se nicméně nejednalo o nejvyšší obsah tohoto proteinu v rámci celého souboru analyzovaných buněčných linií. Nejvyšší obsah UNG2 byl naměřen v immortalizované diploidní linii RPE-1. Tento nálezh mohl souviset s rychlým růstem těchto buněk. To je v souladu se závěry některých dalších studií (např. Robin *et al.*, 2015). Navíc analýzy aktivity uracilových DNA glykosyláz provedené v diplomové práci ukázaly, že aktivita uracilových DNA glykosyláz byla ze všech testovaných buněčných linií nejvyšší právě v buňkách RPE-1.

Naproti tomu běžné neimmortalizované diploidní fibroblasty obsahovaly výrazně nižší množství UNG2. Takto výrazný rozdíl (přibližně 80 %) pravděpodobně souvisel s faktem, že proliferační aktivita těchto buněk byla výrazně nižší než proliferační aktivita ostatních linií. Podobné výsledky byly publikovány i v práci Weekse a kolektivu (Weeks *et al.*, 2013). Autoři zde porovnávali množství UNG proteinu v různých nádorových a diploidních buněčných liniích. I v tomto případě testované diploidní fibroblasty obsahovaly výrazně méně proteinu UNG2 než nádorové buňky, přičemž rozdíl mezi nejvyšší naměřenou hodnotou u nádorových buněk a diploidními fibroblasty byl přibližně 90 %.

V rámci diplomové práce byl dále porovnán obsah proteinu UNG2 u rostoucích a senescentních fibroblastů. V senescentních buňkách bylo naměřeno méně proteinu UNG2 než v buňkách rostoucích a tento pokles byl doprovázen i poklesem aktivity uracilových DNA glykosyláz. V tomto ohledu například Yamamoto a kolektiv sledovali rozdíly v aktivitě UNG u rostoucích a postupně stárnoucích buněk pocházející z fibroblastů Wernerova syndromu. Rovněž jejich výsledky ukázaly pokles obsahu uracilových DNA glykosyláz u senescentních buněk (Yamamoto *et al.*, 1987).

Korelativní analýza obsahu UNG2 a aktivity uracilových DNA glykosyláz provedená v diplomové práci jasně ukázala, že existuje silná pozitivní korelace mezi obsahem UNG2 a aktivitou uracilových DNA glykosyláz (Pearsonův koeficient = 0,8201; p-hodnota = 0,0238). Tato pozorování jsou v souladu s výsledky Ligasové a kolektivu (Ligasová *et al.*, 2021), kteří ve své práci pozorovali silnou korelaci mezi obsahem UNG2 a glykosylázovou aktivitou. Tyto výsledky tak poukazují na dominantní roli UNG2 v opravě chybně zařazeného uracilu do DNA.

Dalším sledovaným proteinem byla glykosyláza NTH1, která hraje roli v báze excizní opravě (Odell *et al.*, 2011). Stejně tak jako UNG2, byl protein NTH1 lokalizován pomocí fluorescenční mikroskopie převážně v buněčném jádře. To je v souladu s dříve publikovanými výsledky lokalizace proteinu NTH1 v HeLa buňkách (Luna *et al.*, 2000). Výsledky analýzy western blotu provedeného v rámci diplomové práce ukázaly, že stejně jako v případě proteinu UNG2, byl nejvyšší obsah proteinu NTH1 v buněčné linii HeLa. Následná korelační analýza ukázala extrémně silný pozitivní vztah mezi obsahem UNG2 a NTH1 u nádorových linií (Pearsonův koeficient = 0,995; p-hodnota = 0,005). Takto silná korelace je v souladu s dříve publikovanými výsledky, které ukázaly, že UNG2 a NTH1 se společně vyskytují na nově vznikající DNA (Bjørås *et al.*, 2017).

Na druhou stranu diploidní buňky vykazovaly oproti UNG2 stejný nebo vyšší obsah proteinu NTH1 než nádorové buněčné linie (s výjimkou buněk HeLa). V tomto ohledu například i Goto a kolektiv (Goto *et al.*, 2009) při sledování exprese proteinu NTH1 u nádorových linií odvozených z nádorů žaludku a u normální žaludeční mukózy zjistili, že exprese NTH1 byla u všech sledovaných nádorových liniích výrazně snížena. Podobně autoři Williams a Parsons (Williams *et al.*, 2018) ve svých pozorování zjistili, že hladina proteinu NTH1 je snížena v prostatických, žaludečních a střevních nádorových buňkách. Tato pozorování ukazují na odlišnosti mezi nádorovými a nenádorovými liniemi v případě organizace báze excizní opravy.

Podobně jako u proteinu UNG2, byl v diplomové práci naměřen vyšší obsah proteinu NTH1 u rostoucích diploidních fibroblastů než u senescentních buněk. Tato pozorování jsou v souladu s výsledky publikovanými například Li a kolektivem (Li *et al.*, 2018), kteří sledovali množství proteinu NTH1 u diploidních fibroblastů, a to u tří různých pasáží. Autoři uvedené studie zjistili nejvyšší obsah NTH1 u rostoucích mladých buněk ve třetí pasáži. Naopak, nejnižší obsah NTH1 naměřili u nejstarších buněk v 50. pasáži (Li *et al.*, 2018).

Dále byly v diplomové práci porovnány obsahy proteinů účastnících se replikace DNA. Jednalo se o proteiny RPA32, PCNA a MCM7. Proteiny RPA32 a MCM7 byly pomocí fluorescence lokalizovány v buněčném jádře, zatímco protein PCNA byl lokalizován jak v buněčném jádře, tak i v cytoplazmě. Jaderná lokalizace proteinů RPA32 a MCM7 je v souladu s jejich funkcí a s dříve publikovanými výsledky (Treuner *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2005; Nowinska *et al.*, 2015). Cytoplazmatická lokalizace PCNA byla pozorována rovněž některými dalšími autory studií zaměřenými na lokalizaci PCNA (např. Naryzhny *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2020).

V rámci srovnání nádorových buněčných linií byl v diplomové práci naměřen nejvyšší obsah proteinu RPA32 v buněčné linii HCT-116, která je odvozena z tkáně pocházející z karcinomu střeva. Z některých publikovaných výsledků (např. Zhang *et al.*, 2020), je zřejmé, že protein RPA32 může být zvýšen v různých typech nádorových onemocnění, jako je právě rakovina střev, jater, nebo močového měchýře. V práci Givalose a kolektivu (Givalos *et al.*, 2007) byla studována úloha proteinu RPA jako prognostického markeru rakoviny střeva, přičemž jeho vyšší hodnoty byly zaznamenány u pacientů s metastázemi.

V rámci této diplomové práce bylo naměřeno vysoké množství proteinu MCM7 u buněčné linie HCT-116 odvozené z nádoru tlustého střeva. Dle publikovaných prací může protein MCM7 a jeho vysoká exprese sloužit rovněž jako prognostický znak rakoviny střev (např. Nishihara *et al.*, 2008). Výsledky srovnávací analýzy nádorových a diploidních linií provedené v rámci diplomové práce ukázaly, že obecně bylo v nádorových liniích a v linii imortalizovaných diploidních buněk RPE-1 naměřeno větší množství proteinu MCM7 než v buňkách diploidních buněk. Tyto výsledky jsou v souladu s pozorováním např. Ishimiho a kolektivu (Ishimi *et al.*, 2003), kteří porovnáním úrovně exprese MCM7 proteinu v nádorové buněčné linii HeLa a diploidních fibroblastů WI-38, přičemž rovněž pozorovali výrazně vyšší expresi proteinu MCM7 v nádorových HeLa buňkách. Podobně Löffler a kolektiv (Löffler *et al.*, 2003) pozorovali vyšší obsah proteinu MCM7 v nádorové linii (př. MCF7 a BT20) než v imortalizované linii HME1.

Korelativní analýza mezi proteiny RPA32 a MCM7 sice naznačovala silný pozitivní vztah (Pearsonův koeficient = 0,880), nicméně se nejednalo o statisticky průkaznou korelaci (p-hodnota = 0,120). Důvodem mohl být nedostatečný počet testovaných linií. U proteinu PCNA nebyla zjištěna korelace ani s proteinem RPA32 ani MCM7 (PCNA/RPA32: Pearsonův koeficient = 0,213, p-hodnota = 0,787; PCNA/MCM7: Pearsonův koeficient = -0,102, p-hodnota = 0,897).

Z hlediska porovnání obsahu proteinů v rostoucích a senescentních buňkách bylo dle výsledků diplomové práce ve většině případů naměřeno vyšší množství proteinu v buňkách senescentních. Jednalo se o překvapivé zjištění, neboť primární role těchto proteinů je spojována s replikací DNA. Nicméně například v práci Hegyi a Skeppera (Hegy *et al.*, 2000) je popisována úloha proteinu PCNA v srdečních buňkách, které nepodstupují syntézu DNA. Taky Ino a Chiba (Ino *et al.*, 2000) sledovali vysokou úroveň exprese proteinu PCNA v neproliferujících mozkových buňkách. Získaná pozorování by tudíž mohla indikovat, že proteiny, které jsou primárně asociovány s replikací, mají v buňkách ještě i další funkce, které vedou v senescentních buňkách k jejich vyšší expresi.

Posledními sledovanými proteiny byly DNA polymeráza β a CDC45. Tyto proteiny ovšem neposkytly signifikantní fluorescenční signál a ani signál na western blotu. Proto byly tyto dva proteiny vyloučeny z dalších analýz.

Současně byla ve vybraných případech provedena srovnávací analýza jaderných a celobuněčných lyzátů. Tato srovnávací analýza proběhla za použití nádorových buněčných linií HeLa

a NCI-H2009. Jaderné lyzáty poskytly s ohledem na obsah proteinů podobné výsledky jako celobuněčné lyzáty (Pearsonův koeficient = 0,801, p-hodnota= 0,103) téměř u všech proteinů. Výrazně rozdílné výsledky byly pozorovány pouze v případě proteinu UNG2. Tento rozdíl lze vysvětlit přítomností mitochondriální UNG1 v celobuněčných lyzátech (např. Blasiak *et al.* 2013), která je rovněž rozeznávána použitou protilátkou. Po odstranění vlivu UNG2 došlo ke zvýšení Pearsonova koeficientu na hodnotu 0,946, přičemž p-hodnota byla 0,05.

Z provedených experimentů bylo zjevné, že analyzované proteiny účastníci se syntézy a oprav DNA se svým obsahem mezi různými buněčnými liniemi lišily. Rovněž bylo patrné, že diploidní linie lidských fibroblastů vykazovala celkově nejnižší úroveň všech sledovaných proteinů s výjimkou proteinu NTH1. Nejedná se však o překvapivé zjištění, jelikož tyto proteiny se účastní buněčných dějů, které jsou důležité pro buněčnou proliferaci. Současně se také obsah jednotlivých sledovaných proteinů lišil v závislosti na jejím stáří. Z provedených analýz bylo zjevné, že mezi proteiny účastníci se oprav DNA je silná pozitivní korelace (UNG2 a NTH1). Současně korelativní analýza ukázala, že s rostoucím obsahem UNG2, roste i aktivita uracilových DNA glykosyláz. Zajímavé výsledky přinesla analýza proteinu MCM7, která indikuje možnost použití tohoto proteinu jako znaku nádorového onemocnění.

7 Závěr

Předkládaná diplomová práce se skládá ze dvou základních částí – teoretické a experimentální. V teoretické části byla vypracována literární rešerše na téma syntézy a opravy DNA a na popis postupů pro analýzu obsahu proteinů a aktivity uracilových glykosyláz. Závěrečná část byla zaměřena na popis základních znaků buněčné senescence a nádorového bujení.

V experimentální části diplomové práce byly porovnávány zejména obsahy vybraných proteinů účastnících se syntézy a oprav DNA mezi různými nádorovými a diploidními buňkami. Kromě obsahu proteinů byla sledována i jejich lokalizace pomocí imunofluorescence. Na závěr byly sledovány rozdíly v aktivitě uracilových glykosyláz u testovaných buněk.

Na základě lokalizačních experimentů provedených na modelových nádorových buňkách HeLa byla prokázána lokalizace proteinů účastnících se replikace a oprav DNA převážně v buněčném jádře. Lokalizace proteinu PCNA byla kromě jádra prokázána také v cytoplazmě.

Získaná data ukázala, že se obsah sledovaných proteinů mezi jednotlivými buněčnými liniemi liší. Obecně je možné říci, že nádorové buněčné linie měly vyšší obsah sledovaných proteinů než buňky diploidní. Výjimkou byly immortalizované diploidní buňky RPE-1, které v některých případech měly dokonce vyšší obsah některých proteinů než nádorové linie (např. UNG2 a PCNA).

Překvapivé výsledky přineslo porovnání obsahu proteinů mezi rostoucí a senescentní linií, kde některé proteiny zúčastněné v syntéze DNA, byly ve větší míře zastoupeny právě u populací buněk se zvýšeným výskytem senescentních buněk. V těchto populacích byla přitom výrazně snížena replikační aktivita.

Zajímavým výsledkem bylo pozorování silné korelace mezi proteiny účastnící se bázové excizní opravy - UNG2 a NTH1 pouze u nádorových linií. Silná korelace mezi obsahem a aktivitou UNG2 mimoto silně indikovala, že UNG2 hraje dominantní úlohu v bázové excizní opravě uracilu.

8 Literatura

- Abbas, T., Dutta, A. (2009): p21 in cancer: Intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, 9(6), 400–414.
- Aird, K. M., Zhang, R. (2013): Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). In Galluzzi, L., Vitale, I., Kepp, O., Kroemer, G. (eds.): *Cell senescence. Methods in Molecular Biology*, 965, pp 185-196, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002): DNA replication mechanisms. [online] [navštíveno 20.10.2022]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26850/>
- Alegria-Shaffer, A. (2014): Western blotting using chemiluminescent substrates. In: Lorsch, J. (ed.): *Methods in Enzymology*, 541, pp 251-259, Academic Press, United Kingdom.
- Alhmod, J. F., Woolley, J. F., Al Moustafa, A. E., Malki, M. I. (2020). DNA damage/repair management in cancers. *Cancers*, 12(4), 1050.
- Alimonti, A., Nardella, C., Chen, Z., Clohessy, J. G., Carracedo, A., Trotman, L. C., Cheng, K., Varmeh, S., Kozma, S. C., Thomas, G., Rosivatz, E., Woscholski, R., Cognetti, F., Scher, H. I. Pandolfi, P. P. (2010): A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(3), 681–693.
- Almeida, K. H., Sobol, R. W. (2007): A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair*, 6(6), 695–711.
- Anfinsen, C. B. (1973): Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181(4096), 223–230.
- Annunziato, A. T. (2008): DNA packaging: nucleosomes and chromatin. [online] [navštíveno 29.10.2022]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-packaging-nucleosomes-and-chromatin-310/>
- Araújo, S. J., Nigg, E. A., Wood, R. D. (2001): Strong functional interactions of TFIIH with XPC and XPG in human DNA nucleotide excision repair, without a preassembled repairosome. *Molecular and Cellular Biology*, 21(7), 2281–2291.
- Balakrishnan, L., Bambara, R. A. (2013): Flap endonuclease 1. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 119–138.
- Barnum, K. J., O'Connell, M. J. (2014): Cell cycle regulation by checkpoints. In: Noguchi, E., Gadaleta, M. (eds.): *Cell Cycle Control. Methods in Molecular Biology*, 1170, pp 29–40, Humana Press, New York.
- Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., Atherton, P. J. (2017): An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 27(1), 4–25.

- Baxley, R. M., Bielinsky, A. K. (2017): Mcm10: A dynamic scaffold at eukaryotic replication Forks. *Genes*, 8(2), 73.
- Beard, W. A., Prasad, R., Wilson, S. H. (2006): Activities and mechanism of DNA polymerase beta. *Methods in Enzymology*, 408, 91–107.
- Bębenek, A., Ziuzia-Graczyk, I. (2018): Fidelity of DNA replication-a matter of proofreading. *Current Genetics*, 64(5), 985–996.
- Bell, S. P., Dutta, A. (2002): DNA Replication in Eukaryotic Cells. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 333–374.
- Bellamy, S. R., Baldwin, G. S. (2001): A kinetic analysis of substrate recognition by uracil-DNA glycosylase from herpes simplex virus type 1. *Nucleic Acids Research*, 29(18), 3857–3863.
- Bjørås, K. Ø., Sousa, M. M. L., Sharma, A., Fonseca, D. M., Søgård, C. K., Bjørås, M., Otterlei, M. (2017): Monitoring of the spatial and temporal dynamics of BER/SSBR pathway proteins, including MYH, UNG2, MPG, NTH1 and NEIL1-3, during DNA replication. *Nucleic Acids Research*, 45(14), 8291–8301.
- Blasiak, J., Glowacki, S., Kauppinen, A., Kaarniranta, K. (2013): Mitochondrial and nuclear DNA damage and repair in age-related macular degeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 2996–3010.
- Bleichert, F., Botchan, M. R., Berger, J. M. (2017): Mechanisms for initiating cellular DNA replication. *Science*, 355(6327), eaah6317.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., Wright, W. E. (1998): Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279(5349), 349–352.
- Boodhun, N. (2018): Protein analysis: key to the future. *BioTechniques*, 64(5), 197–201.
- Bourdeau, V., Baudry, D., Ferbeyre, G. (2009): PML links aberrant cytokine signaling and oncogenic stress to cellular senescence. *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)*, 14(2), 475–485.
- Bousset, L., Gil J. (2022): Targeting senescence as an anticancer therapy. *Molecular Oncology*, 16(21), 3855–3880.
- Bronstein, I., Voyta, J. C., Thorpe, G. H., Kricka, L. J., Armstrong, G. (1989): Chemiluminescent assay of alkaline phosphatase applied in an ultrasensitive enzyme immunoassay of thyrotropin. *Clinical Chemistry*, 35(7), 1441–1446.
- Collins, K., Jacks, T., Pavletich, N. P. (1997): The cell cycle and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 2776–2778.
- Cooper, G. M. (2000): The development and causes of cancer. [online] [navštíveno dne 5.11.2022]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
- Correia-Melo, C., Jurk, D., Passos, J. F. (2012): Robust multiparametric assessment of cellular senescence. In: Galluzzi, L., Vitale, I., Kepp, O., Kroemer, G. (eds.): *Cell Senescence. Methods in Molecular Biology*, 965, pp 409–419, Humana Press, Totowa, New Jersey.

- Cuanalo-Contreras, K., Schulz, J., Mukherjee, A., Park, K. W., Armijo, E., Soto, C. (2023): Extensive accumulation of misfolded protein aggregates during natural aging and senescence. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 1090109.
- Dang, H. Q., Li, Z. (2011): The Cdc45·Mcm2-7·GINS protein complex in trypanosomes regulates DNA replication and interacts with two Orc1-like proteins in the origin recognition complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(37), 32424–32435.
- David, S. S., O'Shea, V. L., Kundu, S. (2007): Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447(7147), 941–950.
- Davis, B. J. (1964): Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121(2), 404–427.
- Degasperi, A., Birtwistle, M. R., Volinsky, N., Rauch, J., Kolch, W., Kholodenko, B. N. (2014): Evaluating strategies to normalise biological replicates of western blot data. *PLoS ONE*, 9(1), e87293
- Dellaire, G., Ching, R. W., Dehghani, H., Ren, Y., Bazett-Jones, D. P. (2006): The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 6), 1026–1033.
- Demaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., Koenig, K., Le, C., Mitin, N., Deal, A. M., Alston, S., Academia, E. C., Kilmarx, S., Valdovinos, A., Wang, B., de Bruin, A., Kennedy, B. K., Melov, S., Zhou, D., Sharpless, N. E., Muss, H., Campisi, J. (2017): Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discovery*, 7(2), 165–176.
- Dianov, G. L., Hübscher, U. (2013): Mammalian base excision repair: the Forgotten Archangel. *Nucleic Acids Research*, 41(6), 3483–3490.
- Dimri, G. P., Hara, E., Campisi, J. (1994): Regulation of two E2F-related genes in presenescent and senescent human fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(23), 16180–16186.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. (1995): A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363–9367.
- Ding, H. D., Zhang, X. H., Xu, S. C., Sun, L. L., Jiang, M. Y., Zhang, A. Y., Jin, Y. G. (2009): Induction of protection against paraquat-induced oxidative damage by abscisic acid in maize leaves is mediated through mitogen-activated protein kinase. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(10), 961–972.
- Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xiong, X., Ao, H., Min Y., Jie L., Qinghua C. (2020): The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1960.

- Dong, X. M., Cai, R., Yang, F., Zhang, Y. Y., Wang, X. G., Fu, S. L., Zhang, J. R. (2016): Predictive value of plasma β 2-microglobulin on human body function and senescence. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20(11), 2350–2356.
- Ekpenyong-Akiba, A., Canfarotta, F., Hatem, B. A., Poblocka, M., Casulleras, M., Castilla-Vallmanya, L., Kocsis-Fodor, G., Kelly, M. E., Janus, J., Althubiti, M., Piletska, E., Piletsky, S., Macip, S.. (2019): Detecting and targeting senescent cells using molecularly imprinted nanoparticles. *Nanoscale Horizons*, 4(3), 757-768.
- Elmore, S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Engvall, E., Perlmann, P. (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874.
- Epe, B. (2002): Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biological Chemistry*, 383(3-4), 467–475.
- Ewald, J. A., Desotelle, J. A., Wilding, G., Jarrard, D. F. (2010): Therapy-induced senescence in cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(20), 1536–1546.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., Lowe, S. W. (2000): PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes & Development*, 14(16), 2015–2027.
- Feringa, F. M., Raaijmakers, J. A., Hadders, M. A., Vaarting, C., Macurek, L., Heitink, L., Krenning L., Medema, R. H. (2018): Persistent repair intermediates induce senescence. *Nature Communications*, 9(1), 3923.
- Fernando, S. A., Wilson, G. S. (1992): Studies of the “hook” effect in the one-step sandwich immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, 151(1-2), 47–66.
- Fine, J. (1935): The biuret method of estimating albumin and globulin in serum and urine. *The Biochemical Journal*, 29(3), 799–803.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., Levine, A. J. (1989): The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 57(7), 1083–1093.
- Fitsiou, E., Soto-Gamez, A., Demaria, M. (2021): Biological functions of therapy-induced senescence in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 81, 5-13.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Sobol, R. W., Wilson, S. H., Dogliotti, E. (1998): Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry*, 37(11), 3575–3580.
- Franklin, R. E., Gosling, R. G. (1953): Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*, 171(4356), 740–741.
- Frederico, L. A., Kunkel, T. A., Shaw, B. R. (1990): A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry*, 29(10), 2532–2537.

- Funk, J. O. (2006). Cell Cycle Checkpoint Genes and Cancer. Encyclopedia of Life Sciences. In eLS, (Ed.). <https://doi.org/10.1038/npg.els.0006046>.
- Gallagher, S. R. (2007). One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Current Protocols in Toxicology*, 32, A3F.1-A3F.38.
- Gazo, I., Franěk, R., Šindelka, R., Lebeda, I., Shivaramu, S., Pšenička, M., Steinbach, C. (2020): Ancient sturgeons possess effective DNA repair mechanisms: Influence of model genotoxicants on embryo development of sterlet, *Acipenser ruthenus*. *International Journal of Molecular sciences*, 22(1), 6.
- Ghannam, J. Y., Wang, J., Jan, A. (2021): Biochemistry, DNA structure. [online] [navštíveno 13.10.2022]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538241/>
- Giacinti, C., Giordano, A. (2006): RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 25(38), 5220–5227.
- Givalos, N., Gakiopoulou, H., Skliri, M., Bousboukea, K., Konstantinidou, A. E., Korkolopoulou, P., Lelouda, M., Kouraklis, G., Patsouris, E., Karatzas, G. (2007): Replication protein A is an independent prognostic indicator with potential therapeutic implications in colon cancer. *Modern Pathology: an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 20(2), 159–166.
- Goellner, E. M., Putnam, C. D., Kolodner, R. D. (2015): Exonuclease 1-dependent and independent mismatch repair. *DNA repair*, 32, 24–32.
- Goldberg, S. (2008): Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue homogenization. In: Posh, A. (ed.): *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation. Methods in Molecular Biology*, 424, pp 3–22, Humana Press, New Jersey.
- Goldman, A., Harper, S., Speicher, D. W. (2016): Detection of proteins on blot membranes. *Current Protocols in Protein Science*, 86, 10.8.1–10.8.11.
- González-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L., Muñoz-Espín, D. (2020): A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *The FEBS Journal*, 288(1), 56–80.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M. (1949): Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 177(2), 751–766.
- Goto, M., Shinmura, K., Igarashi, H., Kobayashi, M., Konno, H., Yamada, H., Iwaizumi, M., Kageyama, I., Tsuneyoshi, T., Tsugane, T., Sugimura, H. (2009): Altered expression of the human base excision repair gene NTH1 in gastric cancer. *Carcinogenesis*, 30(8), 1345–1352.
- Gottlieb, T. M., Jackson, S. P. (1993): The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 72(1), 131–142.
- Goulian, M., Richards, S. H., Heard, C. J., Bigsby, B. M. (1990): Discontinuous DNA synthesis by purified mammalian proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(30), 18461–18471.
- Grabski, A. C. (2009): Advances in preparation of biological extracts for protein purification. *Methods in Enzymology*, 463, 285–303.

- Graf, N., Ang, W. H., Zhu, G., Myint, M., Lippard, S. J. (2011): Role of endonucleases XPF and XPG in nucleotide excision repair of platinated DNA and cisplatin/oxaliplatin cytotoxicity. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 12(7), 1115–1123.
- Grin, I. R., Konorovsky, P. G., Nevinsky, G. A., Zharkov, D. O. (2009): Heavy metal ions affect the activity of DNA glycosylases of the Fpg family. *Biochemistry (Moscow)*, 74(11), 1253–1259.
- Hafner, A., Bulyk, M. L., Jambhekar, A., Lahav, G. (2019): The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(4), 199–210.
- Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., Peters, G. (1996): Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Molecular and Cellular Biology*, 16(3), 859–867.
- Hashimoto, S., Anai, H., Hanada, K. Mechanisms of interstrand DNA crosslink repair and human disorders (2016): *Genes and Environment: the Official Journal of the Japanese Environmental Mutagen Society* 38, 9.
- Haskins, J. S., Su, C., Maeda, J., Walsh, K. D., Haskins, A. H., Allum, A. J., Froning, C. E., Kato, T. A. (2020): Evaluating the genotoxic and cytotoxic effects of thymidine analogs, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine and 5-bromo-2'-deoxyuridine to mammalian cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6631.
- Hayflick, L., Moorhead, P. S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 25, 585–621.
- Hegyí, L., Skepper, J. N. (2000): The significance of expression of proliferating cell nuclear antigen in the cardiovascular system: mitosis or DNA repair? *Circulation*, 101(25), E239–E240.
- Hengartner, M. O. (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-6.
- Herrmann, J., Babic, M., Tölle, M., Eckardt, K. U., van der Giet, M., Schuchardt, M. (2020): A novel protocol for detection of senescence and calcification markers by fluorescence microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3475.
- Hernandez-Segura, A., Brandenburg, S., Demaria, M. (2018): Induction and validation of cellular senescence in primary human cells. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (136), 57782.
- Heuer, B. (2021): Mitochondrial DNA: Unraveling the "other" genome. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 33(9), 673–675.
- Hinz, J. M. (2010): Role of homologous recombination in DNA interstrand crosslink repair. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(6):582-603.
- Hoeijmakers, J. H. (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366–374.
- Hooten, N., Evans, M. K. (2017): Techniques to induce and quantify cellular senescence. *Journal of Visualized Experiments*. 123, e55533.
- Hsieh, P., Zhang, Y. (2017): The devil is in the details for DNA mismatch repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(14), 3552–3554.

- Hussar, P. (2022): Apoptosis regulators Bcl-2 and Caspase-3. *Encyclopedia*, 2(4), 1624-1636.
- Champoux, J. J. (2001): DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 369–413.
- Chandek, C., Mooi, W. J. (2010): Oncogene-induced cellular senescence. *Advances in Anatomic Pathology*, 17(1), 42–48.
- Chang, S. K. C., Zhang, Y. (2017): Protein analysis. In: Nielsen, S. S. (ed.): *Food Analysis*, pp 315–331. Springer International Publishing. Boston, MA.
- Chargaff, E. (1951): Structure and function of nucleic acid as cell constituent. *Federation Proceedings*, 10(3), 654–659.
- Chargaff, E., Vischer E., Doniger R., Green C., Misani F. (1949): The composition of the desoxyribose nucleic acid of thymus and spleen. *The Journal of Biological Chemistry* 177, 405–416.
- Chen, M. J., Li, W. K., Ma C. B., Wu, K. F., He, H. L., Wang K. M. (2019): Fluorometric determination of the activity of uracil-DNA glycosylase by using graphene oxide and exonuclease I assisted signal amplification. *Microchimica Acta* 186, 110.
- Chesnokov, I. N. (2007): Multiple functions of the origin recognition complex. *International Review of Cytology*, 69–109.
- Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., van Deursen, J. M. (2015): Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature Medicine*, 21(12), 1424–1435.
- Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R.-M., Marquess, D., Dananberg, J., van Deursen, J. M. (2017): Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(10), 718–735.
- Childs, B. G., Bussian, T. J., Baker, D. J. (2019): Cellular identification and quantification of senescence-associated β -galactosidase activity in vivo. In: Demaria, M. (ed.) *Cellular Senescence. Methods in Molecular Biology*, 1896, pp 31-38, Humana Press, New York.
- Chotiner, J. Y., Wolgemuth, D. J. Wang, P. J. (2019): Functions of cyclins and CDKs in mammalian gametogenesis. *Biology of Reproduction*, 101(3), 591–601.
- Ino, H., Chiba, T. (2000): Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the adult and developing mouse nervous system. *Brain research. Molecular Brain Research*, 78(1-2), 163–174.
- Ishimi, Y., Okayasu, I., Kato, C., Kwon, H. J., Kimura, H., Yamada, K., Song, S. Y. (2003): Enhanced expression of Mcm proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *European Journal of Biochemistry*, 270(6), 1089–1101.
- Itahana, K., Campisi, J., Dimri, G. P. (2007): Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. In: Tollefsbol, T.O. (ed.) *Biological Aging. Methods in Molecular Biology*, 371, pp 21–31, Humana Press, Totowa, New Jersey.

- Ivanschitz, L., De Thé, H., Le Bras, M. (2013): PML, SUMOylation, and Senescence. *Frontiers in Oncology*, 3, 171.
- Iveland, T. S., Hagen, L., Sharma, A., Sousa, M. M. L., Sarno, A., Wollen, K. L., Liabakk, N. B., Slupphaug, G. (2020): HDACi mediate UNG2 depletion, dysregulated genomic uracil and altered expression of oncoproteins and tumor suppressors in B- and T-cell lines. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 159.
- Jackson, A. L., Loeb, L. A. (2001): The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 477(1-2),7-21.
- Jackson, S. P., Bartek, J. (2009): The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071–1078.
- Jacobs, A. L., Schär, P. (2011): DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma*, 121(1), 1–20.
- Jašková, E. (2010): Inhibitory cyklin-dependentních kináz a transkripční stres. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Jensen, E. C. (2012): The basics of western blotting. *Anatomical Record*, 295(3), 369–371.
- Jiricny, J. (2006): The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(5), 335–346.
- Jones, M. L., Baris, Y., Taylor, M. R. G., Yeeles, J. T. P. (2021): Structure of a human replisome shows the organisation and interactions of a DNA replication machine. *The EMBO Journal*, 40(23), e108819.
- Kabotová, A. (2021): Metody detekce replikační aktivity lidských buněk a standardizace jejich použití pro analýzu buněčného cyklu. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Kadyk, L. C., Hartwell, L. H. (1992): Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 132(2), 387–402.
- Kara, H., Chazal, N., Bouaziz, S. (2019): Is uracil-DNA glycosylase UNG2 a new cellular weapon against HIV-1? *Current HIV Research*, 17(3), 148–160.
- Kelman, Z. (1997): PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14(6), 629–640.
- Kladova, O. A., Iakovlev, D. A., Groisman, R., Ishchenko, A. A., Saparbaev, M. K., Fedorova, O. S., Kuznetsov, N. A. (2020): An assay for the activity of base excision repair enzymes in cellular extracts using fluorescent DNA probes. *Biochemistry (Moscow)*, 85(4), 480–489.
- Klionsky, D. J. (2017): Blame it on Southern, but it's a western blot. *Autophagy*, 13(1), 1–2.
- Koellner, C. M., Mensink, K. A., Highsmith, W. E. (2018): Basic concepts in human molecular genetics. In: Coleman, W. B., Tsongalis, G. J. (eds.), *Molecular Pathology: The Molecular Basis of Human Disease*, pp 99–120. Academic Press, United Kingdom.

- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T., Fasoulakis, Z. (2020): Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: A review. *Anticancer Research*, 40(11), 6009–6015.
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., Zhao, X. (2012): Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Research*, 40(13), 5795–5818.
- Kricka, L. J. (1991): Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clinical Chemistry*, 37(9): 1472–1481.
- Krokan, H. E., Bjoras, M. (2013): Base excision repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a012583 – a012583.
- Krokan, H., Urs Wittwer, C. (1981): Uracil DNA-glycosylase from HeLa cells: general properties, substrate specificity and effect of uracil analogs. *Nucleic Acids Research*, 9(11), 2599–2614.
- Kumar, A., Reed, A. J., Zahurancik, W. J., Daskalova, S. M., Hecht, S. M., Suo, Z. (2022): Interlocking activities of DNA polymerase β in the base excision repair pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(10), e2118940119.
- Kumari, R., Jat, P. (2021): Mechanisms of cellular senescence: Cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 645593.
- Kumbar, V., Vrsanka, M. (2015). A comparison of Biuret, Lowry and Bradford methods for measuring the egg's proteins. In: *Mendel Net*, 11. – 12.11.2015, Brno, Česká republika, pp. 394-8.
- Kunkel, T. A., Erie, D. A. (2005): DNA mismatch repair. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 681–710.
- Labib, K. (2000): Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science*, 288(5471), 1643–1647.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lallemant-Breitenbach, V., de Thé, H. (2010): PML nuclear bodies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a000661.
- Langston, L. D., Zhang, D., Yurieva, O., Georgescu, R. E., Finkelstein, J., Yao, N. Y., Indiani, C., O'Donnell, M. E. (2014): CMG helicase and DNA polymerase ϵ form a functional 15-subunit holoenzyme for eukaryotic leading-strand DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(43), 15390–15395.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G., Taylor, S. S. (2012): The spindle assembly checkpoint. *Current Biology*, 22(22), R966 – R980.
- Lawrence, M. S., Stojanov, P., Mermel, C. H., Robinson, J. T., Garraway, L. A., Golub, T. R., Meyerson, M., Gabriel, S. B., Lander, E. S., Getz, G. (2014): Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*, 505(7484), 495–501.

- Lehmann, A. R. (2011): DNA polymerases and repair synthesis in NER in human cells. *DNA Repair*, 10(7), 730–733.
- Li, M., Yang, X., Lu, X., Dai, N., Zhang, S., Cheng, Y., Zhang, L., Yang, Y., Liu, Y., Zhenzhou, Y., Wang, D., Wilson, D. M. (2018): APE1 deficiency promotes cellular senescence and premature aging features. *Nucleic Acids Research*, 46(11), 5664–5677.
- Li, J., Ouyang, Y. C., Zhang, C. H., Qian, W. P., Sun, Q. Y. (2019): Cyclin B2/CDK1 inhibits separase activity in oocyte meiosis I. *Development*, 146(23), dev182519.
- Li, X., Heyer, W. D. (2008): Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, 18(1), 99–113.
- Lieber, M. R. (2008): The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 1–5.
- Lieber, M. R. (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 181–211.
- Ligasová, A., Rosenberg, I., Bocková, M., Homola, J., Koberna, K. (2021): Anchored linear oligonucleotides: the effective tool for the real-time measurement of uracil DNA glycosylase activity. *Open Biology*, 11(10), 210136.
- Lin, A. V. (2015): Direct ELISA. In: Hnasko, E. (ed.): *ELISA. Methods in Molecular Biology*, 1318, pp 61–67, Humana Press, New York.
- Lindahl, T. (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709–715.
- Lindahl, T. (1999): Quality control by DNA repair. *Science*, 286(5446), 1897–1905.
- Lindahl, T., Nyberg B. (1972): Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*. 11(19), 3610-3618.
- Lioutas, A., Vernos, I. (2013): Aurora A kinase and its substrate TACC3 are required for central spindle assembly. *EMBO Reports*, 14(9), 829–836.
- Lipetz, J., Cristofalo, V. J. (1972): Ultrastructural changes accompanying the aging of human diploid cells in culture. *Journal of Ultrastructure Research*, 39(1-2), 43–56.
- Löffler, H., Syljuåsen, R. G., Bartkova, J., Worm, J., Lukas, J., Bartek, J. (2003): Distinct modes of deregulation of the proto-oncogenic Cdc25A phosphatase in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, 22(50), 8063–8071.
- Lohmann, D. R. (1999): RB1 gene mutations in retinoblastoma. *Human Mutation*, 14(4), 283–288.
- Lowe, S. W., Sherr, C. J. (2003). Tumor suppression by Ink4a–Arf: progress and puzzles. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(1), 77–83.
- Lowry, O. H., Rosebrough N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Lu, Y. J., Hu, D. P., Deng, Q., Wang, Z. Y., Huang, B. H., Fang, Y. X., Zhang, K., Wong, W. L. (2015): Sensitive and selective detection of uracil-DNA glycosylase activity with a new pyridinium luminescent switch-on molecular probe. *Analyst*, 140(17), 5998-6004.

- Maga, G., Hubscher, U. (2003): Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 15), 3051–3060.
- Mahmood, T., Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434.
- Maksimenko, A., Ishchenko, A. A., Sanz, G., Laval, J., Elder, R. H., Saparbaev, M. K. (2004): A molecular beacon assay for measuring base excision repair activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(1), 240–246.
- Malumbres, M. (2014): Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6), 122.
- Martin, L. J. (2008): DNA damage and repair: relevance to mechanisms of neurodegeneration. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 67(5), 377–387.
- McElhinny, S. A. N., Gordenin, D. A., Stith, C. M., Burgers, P. M., Kunkel, T. A. (2008): Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Molecular Cell*, 30(2), 137–144.
- Moldovan, G. L., Pfander, B., Jentsch, S. (2007): PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, 129(4), 665–679.
- Moštek, J. (2020): Základní přístupy analýzy proteinů v buněčných lyzátech a jejich aplikace pro analýzu vybraných proteinů metabolismu a oprav DNA. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., Lowe, S. W. (2003): Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113(6), 703–716.
- Naryzhny, S. N., Lee, H. (2010): Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer. *FEBS Letters*, 584(20), 4292–4298.
- Nishihara, K., Shomori, K., Fujioka, S., Tokuyasu, N., Inaba, A., Osaki, M., Ogawa, T., Ito, H. (2008): Minichromosome maintenance protein 7 in colorectal cancer: implication of prognostic significance. *International Journal of Oncology*, 33(2), 245–251.
- Noguchi, E. (2010): The DNA replication checkpoint and preserving genomic integrity during DNA synthesis. [online] [navštíveno 25.11.2022]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/the-dna-replication-checkpoint-and-preserving-genomic-14157692/>
- Norbury, C. J., Hickson, I. D. (2001): Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41, 367–401.
- Nowinska, K., Chmielewska, M., Piotrowska, A., Pula, B., Pastuszewski, W., Krecicki, T., Podhorska-Okołow, M., Zabel, M., Dziegiel, P. (2015): Correlation between levels of expression of minichromosome maintenance proteins, Ki-67 proliferation antigen and metallothionein I/II in laryngeal squamous cell cancer. *International Journal of Oncology*, 48(2), 635–645.
- Núñez-Ramírez, R., Klinge, S., Sauguet, L., Melero, R., Recuero-Checa, M. A., Kilkenny, M., Perera, R. L., García-Alvarez, B., Hall, R. J., Nogales, E., Pellegrini, L., Llorca, O. (2011): Flexible

- tethering of primase and DNA Pol α in the eukaryotic primosome. *Nucleic Acids Research*, 39(18), 8187–8199.
- O'Donnell, M., Langston, L., Stillman, B. (2013): Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(7), a010108.
- Odell, I. D., Barbour, J. E., Murphy, D. L., Della-Maria, J. A., Sweasy, J. B., Tomkinson, A. E., Wallace, S. S., Pederson, D. S. (2011): Nucleosome disruption by DNA ligase III-XRCC1 promotes efficient base excision repair. *Molecular and Cellular Biology*, 31(22), 4623–4632.
- Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., Sugino, A. (1968): Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 59(2), 598–605.
- Okutucu, B., Dinçer, A., Habib, Ö., Zıhmoğlu, F. (2007): Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(5), 709–711.
- Olson, B. J. S. C., Markwell, J. (2007): Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science*, 3.4.1–3.4.29.
- Onesti, S., MacNeill, S. A. (2013): Structure and evolutionary origins of the CMG complex. *Chromosoma*, 122(1-2), 47–53.
- Ono, T., Wang, S., Koo, C. - K., Engstrom, L., David, S. S., Kool, E. T. (2012): Direct fluorescence monitoring of DNA base excision repair. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(7), 1689–1692.
- Otterlei, M., Warbrick, E., Nagelhus, T.A., Haug, T., Slupphaug, G., Akbari, M., Aas, P.A., Steinsbekk, K., Bakke, O., Krokan, H.E. (1999): Post-replicative base excision repair in replication foci. *European Molecular Biology Organization Journal*, 18(13), 3834–3844.
- Ornstein, L. (1964): Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 321–349.
- Pannunzio, N. R., Watanabe, G., Lieber, M. R. (2017): Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10512–10523.
- Pardee, A. B. (1974): A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), 1286–1290.
- Pascucci, B., Stucki, M., Jónsson, Z. O., Dogliotti, E., Hübscher, U. (1999): Long patch base excision repair with purified human proteins. DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases delta and epsilon. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(47), 33696–33702.
- Pazolli, E., Alspach, E., Milczarek, A., Prior, J., Piwnica-Worms, D., Stewart, S. A. (2012): Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression. *Cancer Research*, 72(9), 2251–2261.

- Peč, P. a kolektiv (2008): *Laboratorní cvičení z biochemie*. 3. doplň. vyd. Olomouc. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc.
- Pettersen, H. S., Sundheim, O., Gilljam, K. M., Slupphaug, G., Krokan, H. E., Kavli B. (2007): Uracil-DNA glycosylases SMUG1 and UNG2 coordinate the initial steps of base excision repair by distinct mechanisms. *Nucleic Acid Research*, 35(12), 3879-3892.
- Petojevic, T., Pesavento, J. J., Costa, A., Liang, J., Wang, Z., Berger, J. M., Botchan, M. R. (2015): Cdc45 (cell division cycle protein 45) guards the gate of the eukaryote replisome helicase stabilizing leading strand engagement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(3), E249 – E258.
- Pontén, F., Gry, M., Fagerberg, L., Lundberg, E., Asplund, A., Berglund, L., Oksvold, P., Björling, E., Hober, S., Kampf, C., Navani, S., Nilsson, P., Ottosson, J., Persson, A., Wernérus, H., Wester, K., Uhlén, M. (2009): A global view of protein expression in human cells, tissues, and organs. *Molecular Systems Biology*, 5, 337.
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., Bar-Sagi, D. (2011): RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer*, 11(11), 761–774.
- Rajalakshmi, T. R., AravindhaBabu, N., Shanmugam, K. T., Masthan, K. M. (2015): DNA adducts-chemical addons. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 7(Suppl 1), S197 – S199.
- Raymond, S., Weintraub, L. (1959): Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science*, 130(3377), 711.
- Reid, D. A., Keegan, S., Leo-Macias, A., Watanabe, G., Strande, N. T., Chang, H. H., Betul Akgol Oksuz, David Fenyo, Michael R. Lieber, Dale A. Ramsden, Rothenberg, E. (2015): Organization and dynamics of the nonhomologous end-joining machinery during DNA double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(20), E2575 – E2584.
- Robin, J. D., Wright, W. E., Zou, Y., Cossette, S. C., Lawlor, M. W., Gussoni, E. (2015). Isolation and immortalization of patient-derived cell lines from muscle biopsy for disease modeling. *Journal of Visualized Experiments*, (95), 52307.
- Roninson, I. B. (2003): Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Research*, 63(11), 2705–2715.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., Vandenabeele, P. (2004): Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23(16), 2861–2874.
- San Filippo, J., Sung, P., Klein, H. (2008): Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 229–257.
- Sancar, A. (1996): DNA Excision repair. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 43–81.
- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W. K., Luna, A., La, K. C., Dimitriadoy, S., Liu, D. L., Kantheti, H. S., Saghafinia, S., Chakravarty, D., Daian, F., Gao, Q., Bailey, M. H., Liang, W. W., Foltz, S. M., Shmulevich, I., Ding, L., Heins, Z., Ochoa, A., Gross, B., Gao, J., Zhang, H., Kundra, R., Kandoth, C., Bahceci, I., Dervishi, U., Zhou, W., Shen, H., Laird, P. W., Way,

- G. P., Greene, C. S., Liang, H., Xiao, Y., Wang, C., Iavarone, A., Berger, A. H., Bivona, T. G., Lazar, A. J., Hammer, G. D., Giordano, T., Kwong, L. N., McArthur, G., Huang, C., Tward, A. D., Frederick, M. J., McCormic, F., Meyerson, M. (2018). Oncogenic signaling pathways in the cancer genome atlas. *Cell*, 173(2), 321–337.e10.
- Sattler, U., Frit, P., Salles, B., Calsou, P. (2003): Long-patch DNA repair synthesis during base excision repair in mammalian cells. *EMBO reports*, 4(4), 363–367.
- Shammas, M. A. (2011): Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 14(1), 28–34.
- Shen, C. H. (2019): Quantification and analysis of proteins. *Diagnostic Molecular Biology*, 187–214.
- Silva, J. M., McMahon, M. (2014): The fastest Western in town: a contemporary twist on the classic Western blot analysis. *Journal of Visualized Experiments*, 84, e51149.
- Sirbu, B. M., Cortez, D. (2013): DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(8), a012724.
- Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Grune, T., Davies, K. J. (2000): Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I--effects of proliferative senescence. *The FASEB Journal*, 14(15), 2495–2502.
- Smith, B. J. (1984): SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: Walker, J. M. (ed.) *Proteins. Methods in Molecular Biology*, 1, pp 41–55, Humana Press, New Jersey.
- Srivastava, D. K., Vande Berg, B. J., Prasad, R., Molina, J. T., Beard, W. A., Tomkinson, A. E., Wilson, S. H. (1998): Mammalian abasic site base excision repair. *Journal of Biological Chemistry*, 273(33), 21203–21209.
- Stein, G., Farber, J. (1972): Role of nonhistone chromosomal proteins in the restriction of mitotic chromatin template activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 69(10), 2918–2921.
- Stillman, B. (1996): Cell cycle control of DNA replication. *Science*, 274(5293), 1659–1663.
- Stillman, B. (2008): DNA polymerases at the replication fork in eukaryotes. *Molecular Cell*, 30(3), 259–260.
- Stivers, J. T. (1998): 2-Aminopurine fluorescence studies of base stacking interactions at abasic sites in DNA: metal-ion and base sequence effects. *Nucleic Acids Research*, 26(16), 3837–3844.
- Strzalka, W., Ziemienowicz, A. (2011): Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany*, 107(7), 1127–1140.
- Stuurman, N., Meijne, A. M., van der Pol, A. J., de Jong, L., van Driel, R., van Renswoude, J. (1990): The nuclear matrix from cells of different origin. Evidence for a common set of matrix proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(10), 5460–5465.
- Sung, J. S., Demple, B. (2006): Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. *FEBS Journal*, 273(8), 1620–1629.

- Takahashi, A., Ohtani, N., Hara, E. (2007): Irreversibility of cellular senescence: dual roles of p16^{INK4a}/Rb-pathway in cell cycle control. *Cell Division*, 2, 10.
- Tang, D., Liu, X., Chen, K., Li, Z., Dai, Y., Xu, J., Zhang, H. T., Gao, X., & Liu, L. (2020): Cytoplasmic PCNA is located in the actin belt and involved in osteoclast differentiation. *Aging*, 12(13), 13297–13317.
- Tino, W. T., Huber, M. J., Lake, T. P., Greene, T. G., Murphy, G. P., Holmes, E. H. (2000): Isolation and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific for Protein Conformational Epitopes Present in Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA). *Hybridoma*, 19(3), 249–257.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354.
- Treuner, K., Eckerich, C., Knippers, R. (1998): Chromatin association of replication protein A. *Journal of Biological Chemistry*, 273(48), 31744–31750.
- Van Damme, E., Laukens, K., Dang, T. H., & Van Ostade, X. (2010): A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *International Journal of Biological Sciences*, 6(1), 51–67.
- van Deursen, J. M. (2014): The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509(7501), 439–446.
- van Holde, K. E. (1988): Chromatin. In: van Holde, K. E. (ed.): *Springer Series in Molecular Biology*, Springer, New York.
- Volker, M., Moné, M. J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H. J., van Driel, R., van Zeeland, A. A., Mullenders, L. H. (2001): Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Molecular Cell*, 8(1), 213
- Walker, J. M. (2002): SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: Walker, J. M. (ed.): *Protein Protocols Handbook*, pp 61–67. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Walker, J. M. (1996): The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. In: Walker, J. M. (ed.): *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks, pp 11-14. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Wang, X. W., Harris, C. C. (1997): p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 173(2), 247–255.
- Wang, Y., Li, Z., Yu, H. (2020): Aptamer-based western blot for selective protein recognition. *Frontiers in Chemistry*, 8, 570528.
- Wang, Z. G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R., Pandolfi, P. P. (1998): PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nature Genetics*, 20(3), 266–272.
- Watson, J. D., Crick, F. H. (1953): Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737–738.
- Weeks, L. D., Fu, P., Gerson, S. L. (2013): Uracil-DNA glycosylase expression determines human lung cancer cell sensitivity to pemetrexed. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(10), 2248–2260.

- Weinberg, R. A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81(3), 323–330.
- Welinder, C., Ekblad, L. (2011): Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *Journal of Proteome Research*, 10(3), 1416–1419.
- Wenger, B., Schwegler, M., Brunner, M., Daniel, C., Schmidt, M., Fietkau, R., Distel, L. V. (2014): PML-nuclear bodies decrease with age and their stress response is impaired in aged individuals. *BMC Geriatrics*, 14, 42.
- Whittemore, K., Vera, E., Martínez-Navado, E., Sanpera, C., Blasco, M. A. (2019): Telomere shortening rate predicts species life span. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201902452.
- Wiley, C. D., Campisi, J. (2021): The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nature Metabolism*, 3(10), 1290–1301.
- Williams, S. C., Parsons, J. L. (2018): NTH1 Is a New Target for Ubiquitylation-Dependent Regulation by TRIM26 Required for the Cellular Response to Oxidative Stress. *Molecular and Cellular Biology*, 38(12), e00616-17.
- Wold, M. S. (1997): Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 61–92.
- Wold, M. S., Kelly, T. (1988): Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(8), 2523–2527.
- Wood, R. D. (1997): Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 23465–23468.
- Wright, W. D., Shah, S. S., Heyer, W. D. (2018): Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10524–10535.
- Wu, X., Yang, Z., Liu, Y., Zou, Y. (2005): Preferential localization of hyperphosphorylated replication protein A to double-strand break repair and checkpoint complexes upon DNA damage. *Biochemical Journal*, 391, 473-480.
- Xiang, Y., Zheng, Y., Liu, S., Liu, G., Li, Z., Dong, W. (2021): Comparison of the sensitivity of Western blotting between PVDF and NC membranes. *Scientific Reports*, 11(1).
- Xiao, Y., Zhang, Y., Xiao, F. (2018): Comparison of several commonly used detection indicators of cell senescence. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(2), 213-218.
- Yam, C., Q., X., Lim, H., H., Surana, U. (2022). DNA damage checkpoint execution and the rules of its disengagement. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 1020643.
- Yamamoto, Y., Fujiwara, Y. (1987): Culture-age effect on uracil-DNA glycosylase activity in normal human skin fibroblasts. *Journal of Gerontology*, 42(5), 470–475.
- Yanumula, A., Cusick, J. K. (2022): Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis. [online] [navštíveno 20.10.2022]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560811/>

- Yuan, Z., Riera, A., Bai, L., Sun, J., Nandi, S., Spanos, C., Chen, Z. A., Barbon, M., Rappsilber, J., Stillman, B., Speck, C., Li, H. (2017): Structural basis of Mcm2-7 replicative helicase loading by ORC-Cdc6 and Cdt1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(3), 316–324.
- Zhai, W., Tan, J., Russell, T., Chen, S., McGonagle, D., Win Naing, M., Yong, D., Jones, E. (2021): Multi-pronged approach to human mesenchymal stromal cells senescence quantification with a focus on label-free methods. *Scientific Reports*, 11(1), 1054.
- Zhang, J., Li, F., Yang, D. (2019): DNA: From Carrier of Genetic Information to Polymeric Materials. *Transactions of Tianjin University*, 25, 301-311.
- Zhang, Y., Yu, C. (2020): Distinct expression and prognostic values of the replication protein A family in gastric cancer. *Oncology Letters*, 19(3), 1831–1841.
- Zilfou, J. T., Lowe, S. W. (2009): Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(5), a001883.
- Zou, Y., Liu, Y., Wu, X., Shell, S. M. (2006): Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses. *Journal of Cellular Physiology*, 208(2), 267–273.