

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Markéta Dvořáková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Role proteinu p21 v replikaci DNA

Bakalářská práce

Markéta Dvořáková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: Mgr. Katarína Chromá, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Markéta DVORÁKOVÁ**
Osobní číslo: **R18639**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Role proteinu p21 v replikaci DNA**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

Replikace chromozomální DNA je základní proces vyžadující striktní regulaci pro zajištění přesné a účinné syntézy DNA, která duplikuje celý genom (Masai *et al.*, 2010). Společná aktivita proteinů PARP1, p53 a p21 je zásadní pro regulaci DNA polymeráz a udržení optimální rychlosti syntézy DNA (Maya-Mendoza *et al.*, 2018).

Protein p21 je členem rodiny inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CKIs), který byl dlouho známý výhradně pro svou schopnost regulace pozastavení buněk v G₁ a G₂ fázích buněčného cyklu v důsledku poškození DNA (Brugarolas *et al.*, 1995). Nicméně bylo zjištěno, že endogenní fyziologická hladina proteinu p21, je esenciální pro optimální průběh replikace DNA v cyklujících buňkách i během nenarušené S fáze. (Avkin *et al.*, 2006; Galanos *et al.*, 2016a, 2016b; Mansilla *et al.*, 2013, 2016; Soria *et al.*, 2006)

Naše nová data ukázala, že úbytek proteinu p21 zvyšuje rychlost replikačních vidlic podobně, jako je to popsáno v případě inhibice poly (ADP-ribosa) polymerázy (Maya-Mendoza *et al.*, 2018). Naším cílem je stanovit, zda snížení hladiny proteinu p21 pomocí siRNA (sip21) transfekce vede k fenotypu spojovanému s rychlým postupem replikačních vidlic, zahrnujícím replikační stres, aktivaci odpovědi na poškození DNA (DDR), nestabilitu genomu a akumulaci buněk v pozdní S fázi. Navíc budou tyto fenotypy sledované v buňkách po sip21, siTICRR a inhibici PARP porovnány s buňkami po inhibici p21 užitím inhibitoru p21.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Avkin, S., Sevilya, Z., Toubé, L., Geacintov, N., Chaney, S.G., Oren, M., and Livneh, Z. (2006). p53 and p21 regulate error-prone DNA repair to yield a lower mutation load. *Mol. Cell* 22, 407 – 413.

Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G.J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377, 552 – 557.

Galanos, P., Vougas, K., Walter, D., Polyzos, A., Maya-Mendoza, A., Haagensen, E.J., Kokkalis, A., Roumelioti, F.-M., Gagos, S., Tzetis, M., et al. (2016a). Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing. *Nat. Cell Biol.* 18, 777 – 789.

Galanos, P., Pappas, G., and Gorgoulis, V.G. (2016b). p21WAF1/Cip1 – PCNA: Fatal attraction. *Cell Cycle* 15, 3153 – 3154.

Mansilla, S.F., Soria, G., Vallerga, M.B., Habif, M., Martínez-López, W., Prives, C., and Gottifredi, V. (2013). UV-triggered p21 degradation facilitates damaged-DNA replication and preserves genomic stability. *Nucleic Acids Res.* 41, 6942 – 6951.

Mansilla, S.F., Bertolin, A.P., Bergoglio, V., Pillaire, M.-J., González Besteiro, M.A., Luzzani, C., Miriuka, S.G., Cazaux, C., Hoffmann, J.-S., and Gottifredi, V. (2016). Cyclin Kinase-independent role of p21CDKN1A in the promotion of nascent DNA elongation in unstressed cells. *Elife* 5.

Maya-Mendoza, A., Moudry, P., Merchut-Maya, J.M., Lee, M., Strauss, R., and Bartek, J. (2018). High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. *Nature* 559, 279 – 284.

Soria, G., Podhajcer, O., Prives, C., and Gottifredi, V. (2006). P21Cip1/WAF1 downregulation is required for efficient PCNA ubiquitination after UV irradiation. *Oncogene* 25, 2829 – 2838.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Katarína Chromá, Ph.D.**
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání bakalářské práce: **28. dubna 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. července 2021**

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Hlavenec
tel.: +420 585 634 900
-2-

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 28. dubna 2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Markéta Dvořáková

Název práce: Role proteinu p21 v replikaci DNA

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Katarína Chromá, Ph.D. (Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP v Olomouci)

Rok obhajoby práce: 2021

Abstrakt:

Bakalářská práce je zaměřena na popis replikace DNA, role proteinu p21 v replikaci DNA a jeho vlivu na rychlost replikace. Dále je zdůrazněn význam regulace rychlosti replikace DNA v souvislosti s proteinem PARP1, jehož inhibice byla v nedávné studii popsána ve spojení se zvýšením replikační rychlosti. p21 je 21kDa protein, který se v buňce účastní řady procesů, jako jsou regulace buněčného cyklu, senescence, apoptóza, replikace a oprava DNA. Protein p21 je také definován jako negativní regulátor rychlosti replikace DNA.

Experimentální část práce se zabývá detekcí fenotypů asociovaných se zvýšenou rychlostí replikace v buňkách při poklesu hladiny proteinu p21, zahrnujících replikační stres, aktivaci odpovědi na poškození DNA, nestabilitu genomu a akumulaci buněk v pozdní S fázi buněčného cyklu. Přítomnost fenotypů v buňkách U2OS a RPE1 se sníženou hladinou proteinu p21 pomocí siRNA transfekce byla srovnána s buňkami se sníženou hladinou Treslinu a inhibicí PARP1, kde byly tyto fenotypy charakterizovány. Z výsledků našich experimentů je zřejmé, že nedostatek proteinu p21 nemá za následek vznik poškození DNA (aktivaci opravních drah DNA), nevede k nestabilitě genomu ani ke změnám v průběhu S fáze buněčného cyklu, jako je tomu v případě inhibice PARP1 a úbytku Treslinu.

Klíčová slova: protein p21, replikace DNA, rychlost replikace DNA, siRNA transfekce, PARP1, Treslin

Počet stran: 53

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographic identification

Author's first name and surname: Markéta Dvořáková

Title: The role of p21 in DNA replication

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Supervisor: Mgr. Katarína Chromá, Ph.D. (Institute of Molecular and Translation Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University in Olomouc)

The year of presentation: 2021

Abstract:

The bachelor thesis is focused on DNA replication, the role of p21 protein in DNA replication and its impact on DNA replication speed. Further, we discuss the importance of DNA replication speed regulation in connection to PARP1 protein, that was recently described to be closely associated with increased speed of DNA replication. p21 is protein of 21kDa, playing role in many cellular processes including cell cycle regulation, senescence, apoptosis, DNA replication and DNA repair. p21 protein is also known as negative regulator of DNA replication speed.

The experimental part of my thesis reports phenotypes associated with increased DNA replication speed in cells having decreased level of p21. These comprise detection of replication stress, activation of DNA damage response, genome instability and accumulation of cells in late S phase. The phenotypes in U2OS and RPE1 cells with low level of p21 reached by siRNA transfection were compared to cells with reduced level of Treslin and PARP1 inhibition, both models for studied phenotypes linked to high replication speed. Our results clearly show, that decreased level of p21 does not induce DNA damage (DNA damage response), genome instability and does not result into changes during S phase as already described in connection to PARP1 inhibition and reduction of Treslin.

Keywords: p21 protein, DNA replication, DNA replication speed, siRNA transfection, PARP1, Treslin

Number of pages: 53

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Kataríny Chromé, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Mgr. Kataríně Chromé, Ph.D. za vedení bakalářské práce a čas, který mi věnovala. Poděkování také patří všem pracovníkům Laboratoře integrity genomu na Ústavu molekulární a translační medicíny za cenné rady a pomoc při práci v laboratoři. Projekt byl financován Grantovou agenturou České republiky (20-03457Y).

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Replikace DNA u eukaryot	3
3.1.1	Zahájení replikace DNA.....	4
3.1.2	Průběh syntézy DNA na vedoucím vlákně.....	6
3.1.3	Průběh syntézy DNA na opožďujícím se vlákně.....	7
3.2	Regulace rychlosti replikace DNA.....	9
3.2.1	PARylace a rychlost replikace DNA.....	10
3.2.2	Protein p21 v regulaci rychlosti replikace DNA	12
3.2.3	Fenotypy asociované se zvýšenou rychlostí replikace DNA.....	18
4	MATERIÁL A METODY	19
4.1	Biologický materiál	19
4.2	Chemikálie, roztoky, soupravy.....	19
4.3	Použité přístroje.....	22
4.4	Kultivace buněčných linií.....	23
4.5	Počítání buněk s použitím Vi-CELL	23
4.6	RNA interference	24
4.7	Inhibice p21 s použitím UC2288.....	24
4.8	Kvantitativní stanovení koncentrace proteinů pomocí Pierce Detergent Compatible Bradford Assay.....	25
4.9	Western blotting a příprava polyakrylamidových gelů	25
4.10	Imunofluorescence	26
4.11	Analýza replikace a detekce fokusů EdU.....	28
4.12	Kvantitativní mikroskopická analýza za použití ScanR	28
5	VÝSLEDKY	29
6	DISKUZE.....	38

7	ZÁVĚR.....	41
8	SEZNAM LITERATURY	42

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

53BP1	tumor suppressor p53-binding protein 1
ADP	adenosine diphosphate (adenosindifosfát)
AP2	adipocyte protein 2
APS	ammonium persulfate (peroxodisíran amonný)
ARH3	ADP ribosyl-acceptor hydrolase 3
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	adenosine triphosphate (adenosintrifosfát)
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related kinase
BRCA1	breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCA2	breast cancer type 2 susceptibility protein
BSA	bovine serum albumin (bovinní sérový albumin)
CCD	charge-coupled device camera
Cdc45	cell division control protein 45
Cdc6	cell division cycle 6
CDK	cyclin-dependent kinase (cyklin-dependentní kináza)
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (inhibitor cyklin-dependentních kináz 1A)
Cdt1	Cdc10-dependent transcript 1 protein
Cip1	CDK-interacting protein 1 (CDK-interagující protein 1)
CMG	Cdc45-MCM-GINS
Con	control (kontrola)
CpG	cytosine-phosphate-guanine (cytosin-fosfát-guanin)
CRL4	cullin-RING

Cy1	cyclin-binding motif 1 (cyklin-vazebný motiv 1)
Cy2	cyclin-binding motif 2 (cyklin-vazebný motiv 2)
ddH₂O	deionizovaná voda
DDK	Dbf4-dependent kinase (Dbf4-dependentní kináza)
DDR	DNA damage response (odpověď na poškození DNA)
DMSO	dimethyl sulfoxide (dimethyl sulfoxid)
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate (deoxyribonukleosidtrifosfát)
DSB	double-strand breaks (dvouvláknové zlomy DNA)
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine (5-ethynyl-2'-deoxyuridin)
EM	electron multiplying
FBS	fetal bovine serum (fetální bovinní sérum)
FEN	flap endonuclease
GINS	Go-Ichi-Ni-San (5-1-2-3)
HRP	horseradish peroxidase (křenová peroxidáza)
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
Chk1	checkpoint kinase 1
Chk2	checkpoint kinase 2
IDCL	interdomain connecting loop
LSB	Laemmli sample buffer (lyzační pufr)
MCM2 – 7	minichromosome maintenance proteins 2–7
Mock	neovlivněná kontrola
NAD⁺	nicotinamide adenine dinucleotide (nikotinamidadenindinukleotid) – oxidovaný
ORC	origin recognition complex (počátek rozpoznávající komplex)
p21i	p21 inhibition (inhibice p21)

PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu)
PAR	poly (ADP-ribose)
PARG	poly (ADP-ribose) glycohydrolase
PARP1	poly (ADP-ribose) polymerase
PARPi	PARP inhibition / PARP inhibitor (inhibice PARP / PARP inhibitor)
PBS	phosphate buffer solution (fosfátový pufr)
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PFA	paraformaldehyde (paraformaldehyd)
pChk1 S317	phosphorylated Chk1 on serine 317 (fosforylovaný Chk1 na serinu 317)
pChk2 T68	phosphorylated Chk2 on threonine 68 (fosforylovaný Chk2 na threoninu 68)
PIR	PCNA-interacting region (PCNA-interagující oblast)
pRb	retinoblastoma protein
pre-RC	pre-replication complex (pre-replikační komplex)
pRPA32 S33	phosphorylated RPA32 on serine 33 (fosforylovaný RPA32 na serinu 33)
pRPA32 S4/S8	phosphorylated RPA32 on serine 4 and 8 (fosforylovaný RPA32 na serinech 4 a 8)
pRPA32 T21	phosphorylated RPA32 on threonine 21 (fosforylovaný RPA32 na threoninu 21)
RAD51	RAD51 recombinase (RAD51 rekombináza)
Rf-C	replication factor C (replikační faktor C)
RPA	replication protein A (replikační protein A)
RPE1	retinal pigmented epithelial cells (pigmentové epiteliální buňky retiny)
RS	replication stress (replikační stres)
SAPK	stress-activated protein kinase
SDS	sodium dodecyl sulfate (dodecylsírán sodný)

shRNA	short hairpin RNA
siP21	siRNA transfection of p21 (siRNA transfekce p21)
siRNA	small interfering RNA (malé interferující RNA)
siTICRR	siRNA transfection of Treslin (siRNA transfekce Treslinu)
SMC1	structural maintenance of chromosomes 1
Sp1	specific protein 1
ssDNA	single stranded DNA (jednovláknová DNA)
STAT	signal transducer and activator of transcription
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamine (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin)
TICRR	TopBP1-interacting checkpoint and replication regulator
TopBP1	DNA topoisomerase II-binding protein 1
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
U2OS	human bone osteosarkoma epithelial cells (epiteliální buňky lidského osteosarkomu)
Waf1	wild type p53-activated fragment 1
γH2AX	fosforylovaný histon H2AX – z rodiny H2A, člen X

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Inicie replikace DNA.....	6
Obr. 2: Zjednodušené schéma replikační vidlice a průběhu syntézy DNA na vedoucím a opoždujícím se vlákně.....	8
Obr. 3: Schéma funkčních domén proteinu PARP1	11
Obr. 4: Role PARP1 v buňce.....	11
Obr. 5: Schéma funkčních domén proteinu p21	13
Obr. 6: Role p21 v buňce.....	14
Obr. 7: Funkce p21 a PARP1 během A: nenarušené S fáze, B: poškození DNA	17
Obr. 8: Schématické znázornění interakcí mezi PARP1, p53 a p21	17
Obr. 9: Snížení hladiny proteinu p21 u linie U2OS neaktivuje opravné dráhy DNA	31
Obr. 10: siRNA transfekce p21 nevede k aktivaci opravných drah DNA ani u linie RPE1.....	33
Obr. 11: siRNA transfekce p21 u linie U2OS nezpůsobuje výrazné změny v buněčném cyklu ani zvýšenou tvorbu mikrojader	34
Obr. 12: siRNA transfekce p21 a změny v buněčném cyklu v buňkách RPE1	35
Obr. 13: p21 inhibitor UC2288 je pro buňky toxický	36

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Použité chemikálie	19
Tab. 2: Použité roztoky a jejich příprava.....	20
Tab. 3: Použité soupravy	22
Tab. 4: Použité siRNA.....	24
Tab. 5: Příprava 10% a 8% dělicího polyakrylamidového gelu	25
Tab. 6: Příprava zaostřovacího polyakrylamidového gelu	26
Tab. 7: Seznam použitých protilátek	27

1 ÚVOD

Během každého buněčného dělení je nezbytné replikovat celý genom. Replikace DNA je přesně řízený proces, který umožňuje zdvojení genetické informace a její následné předání do dceřiných buněk. Pro zajištění správného průběhu syntézy DNA je důležitá regulace její rychlosti. Mezi negativní regulátory rychlosti replikačních vidlic patří proteiny p21 a PARP1.

Řada výzkumných týmů se v současnosti věnuje použití a objasnění funkce PARP inhibitorů v léčbě nádorových onemocnění. Mezi inhibitory PARP neboli poly (ADP-ribóza) polymeráz patří olaparib, veliparib, rucaparib a další, které jsou studovány v léčbě některých typů nádorů, jako např. rakoviny prsu, vaječníků nebo prostaty. Vlivem PARP inhibitorů dochází ke zrychlení replikačních vidlic, replikačnímu stresu, poškození DNA a nestabilitě genomu a změnám v průběhu S fáze buněčného cyklu, což může být pro buňky fatální.

Protein p21 je známý především pro svoji schopnost inhibovat komplexy cyklin-dependentních kináz s cykliny a tedy schopnost regulovat buněčný cyklus. p53 je transkripčním faktorem proteinu p21 a řídí tak prostřednictvím p21 aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu vedoucí ke zpomalení buněčného cyklu a jeho zastavení. Proteiny p53, p21 a PARP1 se společně podílejí na regulaci replikace a jejich aktivita je důležitá pro udržení ideální replikační rychlosti. Nedostatek p21 má stejně jako inhibice PARP1 za následek zrychlení replikačních vidlic. Zda v důsledku indukce zrychlení replikace snížením hladiny p21 dochází k replikačnímu stresu, poškození DNA, nestabilitě genomu a akumulaci buněk v pozdní S fázi buněčného cyklu, stejně jako vlivem inhibice PARP1, je předmětem této práce.

2 CÍLE

Naším cílem je stanovit, zda snížení hladiny proteinu p21 pomocí siRNA (sip21) transfekce vede k fenotypu spojovanému s rychlým postupem replikačních vidlic, zahrnujícím replikační stres, aktivaci odpovědi na poškození DNA (DDR), nestabilitu genomu a akumulaci buněk v pozdní S fázi. Navíc budou tyto fenotypy sledované v buňkách po sip21, siTICRR a inhibici PARP porovnány s buňkami po inhibici p21 užitím inhibitoru p21.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Replikace DNA u eukaryot

Replikace DNA je zásadní buněčný proces, během kterého je zdvojená molekula DNA. To je podmínkou pro následující buněčné dělení – tedy pro vznik dvou dceřiných buněk z jedné mateřské buňky (Alberts et al., 2014). K replikaci DNA dochází v S fázi buněčného cyklu, která v lidských buňkách trvá 6–8 h, a celá replikace proběhne jednou během jednoho buněčného cyklu (Masai et al., 2010).

Syntéza nového vlákna DNA je katalyzována DNA polymerázami, které k 3' konci polynukleotidového vlákna připojují další deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP z angl. deoxyribonucleoside triphosphate). dNTP obsahující dusíkaté báze adenin, guanin, cytosin nebo thymin (A, G, C, T) jsou k nově syntetizovanému vláknu přiřazovány podle pořadí bází v templátovém vlákně. DNA polymeráza rozpozná bázi v templátovém řetězci a podle pravidel komplementarity bází, podle kterých se páruje adenin s thyminem a cytosin s guaninem, přiřadí správnou bázi (Alberts et al., 2014). Replikace DNA je semikonzervativní. To znamená, že každé rodičovské vlákno slouží jako templát pro syntézu nového vlákna a je zachováno v dceřině dvoušroubovici. Každá nově syntetizovaná molekula DNA tedy obsahuje jeden původní řetězec rodičovské dvoušroubovice a druhý řetězec nově syntetizovaný (Snustad et Simmons, 2017).

Při rozplétání dvoušroubovice DNA a její replikaci vzniká struktura, která se díky svému tvaru nazývá replikační vidlice. Na obou templátových vláknech DNA probíhá syntéza nových vláken současně a to tak, že se replikační vidlice pohybují opačnými směry od místa, kde replikace začala – od tzv. replikačního počátku (Bell et Dutta, 2002). Protože jsou DNA polymerázy schopny přidávat nukleotidy pouze ve směru 5'–3', probíhá replikace na jednom vlákně kontinuálně (vedoucí vlákno) a na druhém diskontinuálně (opoždující se vlákno) za tvorby tzv. Okazakiho fragmentů. Replikační vidlice je tudíž asymetrická (Okazaki et al., 1968). U eukaryot se procesu replikace DNA účastní množství enzymů: DNA polymerázy, DNA helikázy, DNA topoizomerázy, DNA primázy, ribonukleázy, DNA ligázy (Turchi et al., 1994; Masai et al., 2010).

Během duplikace DNA dochází k chybám jen velmi zřídka. Chyby v párování bází mohou být způsobeny přítomností báze s nadbytečným protonem, kolísáním bází, kdy určitý posun nukleotidů v prostoru umožní chybné párování, nebo tautomerními přesmyky (Pray, 2008). Adenin a cytosin se obvykle nacházejí v amino formě, thymin a cytosin v keto formě. Někdy u nukleotidů může dojít k přesunu atomu vodíku a dvojně vazby, kdy báze vyskytující se v amino formě, přejdou do keto formy a naopak. Obě formy jedné sloučeniny jsou pak označovány jako tautomery (Pray, 2008). Díky této změně konformace nukleotidů DNA polymeráza chybně rozpozná dusíkatou bázi a přiřadí k ní nukleotid, se kterým by se standardně podle pravidel komplementarity nepárovala. Samotná DNA

polymeráza předchází vzniku chybného párování díky vyšší afinitě ke správné konformaci nukleotidu, což je energeticky výhodnější než navázání neobvyklého tautomeru. Při vazbě nukleotidů DNA polymeráza snadněji mění svoji konformaci, pokud je přítomen správný nukleotid a to je klíčem další kontroly (Ganai et Johansson, 2016). I přesto DNA polymerázy chybují, avšak v buňce jsou přítomny i další mechanismy, které vznik chyb redukují nebo chyby následně opravují (Pray, 2008).

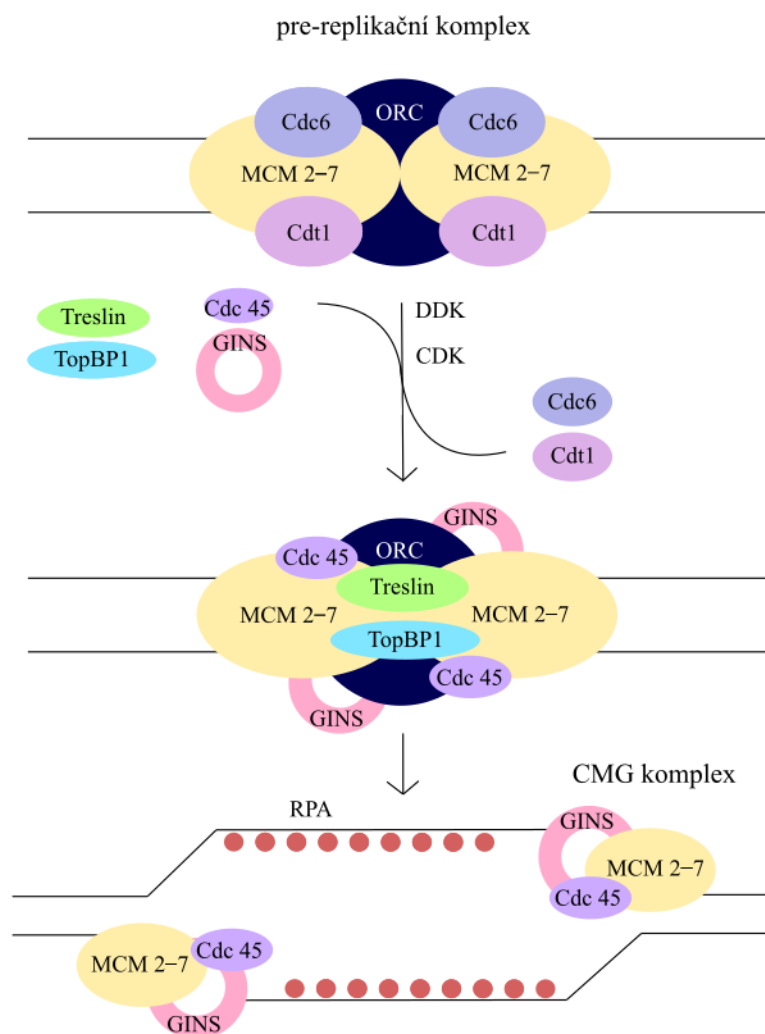
3.1.1 Zahájení replikace DNA

Syntéza DNA je zahájena pouze na určitých úsecích označovaných jako replikační počátky (Bell et Dutta, 2002). Eukaryotické chromozomy jsou mnohem delší než ty prokaryotické – např. velikost lidského genomu je přibližně $3,2 \times 10^9$ bp (Makałowski, 2001), zatímco u *E. coli* $4,6 \times 10^6$ nukleotidů (Cho et al., 2009). Proto není replikace eukaryotické DNA iniciována z jednoho replikačního počátku jako u prokaryot, ale je třeba aktivace velkého množství replikačních počátků. U člověka je během každé replikace aktivováno asi 30 000–50 000 replikačních počátků (Cadoret et al., 2008; Sequeira-Mendes et al., 2009; Cayrou et al. 2011; Costas et al., 2011). V genomu eukaryot jsou potenciální replikační počátky v nadbytku, z něhož je během buněčného cyklu aktivována jen jejich část (Cayrou et al., 2011). Aby došlo k aktivaci daného replikačního počátku a následné replikaci, vážou se do oblasti replikačního počátku DNA helikázy. Ne všechny replikační počátky s navázanými helikázami jsou následně aktivovány. Replikační počátky, které obvykle nejsou aktivní, a jsou aktivovány až během replikačního stresu (Ge et al., 2007; Ibarra, 2008) nebo např. při embryogenezi (Branzei et Foiani 2005; Woodward et al. 2006; Blow et al. 2011) se označují jako dormantní replikační počátky. Díky nadbytku potenciálních replikačních počátků může být vždy aktivován alespoň jeden počátek na replikon (úsek duplikovaného vlákna DNA z jednoho replikačního počátku) (Karschau et al., 2012) s cílem zabezpečení dokončení replikace DNA (Blumenthal et al. 1974; Ge et al., 2007; Ibarra, 2008).

Molekulární struktura replikačních počátků u eukaryot dosud není zcela objasněna. Na rozdíl od prokaryot, kde je replikační počátek dán především specifickou sekvencí nukleotidů, jsou replikační počátky eukaryot (kromě kvasinek a jejich příbuzných) ovlivněny spíše okolním prostředím (Gilbert, 2004). Konzervativní specifické sekvence nukleotidů v eukaryotických replikačních počátcích identifikovány nebyly. V lidských buňkách proteinový komplex ORC (z angl. origin recognition complex), který se váže do oblastí replikačních počátků, nerozpoznává žádnou specifickou sekvenci (Vashee et al., 2003). Replikační počátky eukaryot jsou určeny lokální topologií DNA, pozicí, některými strukturálními vlastnostmi DNA a prostředím okolního chromatinu (Gilbert, 2004; Prioleau a MacAlpine, 2016; Aladjem a Redon, 2017). Zároveň jsou s replikačními počátky spojovány sekvence bohaté na A, T a CpG ostrůvky (z angl. cytosine-phosphate-guanine). CpG ostrůvky jsou oblasti DNA s nadbytkem opakující se sekvence dinukleotidů C, G. (Delgado et al. 1998; Cadoret et al. 2008; Sequeira-Mendes et al. 2009; Cayrou et al. 2011). Selektce replikačních počátků může

souviset s aktivními promotory v transkripci, které korelují s nashromážděním replikačních počátků (Sequeira-Mendes et Gomez, 2012). S replikačními počátky jsou spojovány oblasti promotorů bez nukleozomů nebo s úseky, kde je chromatin nestabilní. V těchto místech se mohou tvořit pre-replikační komplexy (MacAlpine et al. 2010; Stroud et al. 2012).

První krok iniciace replikace spočívá v navázání hexamerního proteinového komplexu MCM2–7 (z angl. minichromosome maintenance proteins 2–7), který nese helikázovou aktivitu, na replikační počátek. Tento krok probíhá během pozdní M a brzké G₁ fáze (Geraghty et al., 2000; Bell et Dutta, 2002). K navázání MCM2–7 je potřebný ORC se svými kofaktory Cdc6 (z angl. cell division cycle 6) a Cdt1 (z angl. Cdc10-dependent transcript 1 protein) (Nishitani et al., 2000; Matsunaga et al., 2010). MCM2–7 se neváže na jednovláknovou DNA, ale na celý duplex DNA ve formě dvojitého hexameru (Remus et al., 2009; Gambus et al., 2011). Navázáním replikativní helikázy je vytvořen tzv. pre-replikační komplex (pre-RC z angl. pre-replication complex) skládající se z ORC, MCM2–7, Cdc6 a Cdt1 (viz obr. 1) (Bell et Dutta, 2002). Pre-replikační komplex může být následně aktivován cyklin-dependentní kinázou (CDK z angl. cyclin-dependent kinase) a DDK (z angl. Dbf4-dependent kinase) za současného přechodu z G₁ do S fáze. Aktivita kináz umožňuje navázání dalších proteinů k pre-RC (Bell et Dutta, 2002). U savců to jsou proteiny Cdc45 (z angl. cell division control protein 45), GINS (z japonského Go-Ichi-Ni-San tj. 5-1-2-3), které jsou součástí aktivní DNA helikázy, Treslin (z angl. TopBP1-interacting checkpoint and replication regulator) a TopBP1 (z angl. DNA topoisomerase II-binding protein 1) (viz obr. 1) (Mimura et Takisawa, 1998; Kanemaki et al., 2003; Kumagai et al., 2010). DDK fosforyluje komplex MCM2–7 DNA a umožní tak navázání koaktivátoru helikázy Cdc45 (Sheu et Stillman, 2006). Po fosforylaci pre-RC disociují Cdc6 a Cdt1, které nejsou pro další aktivitu helikázy potřebné (Bell a Dutta, 2002). Mechanismus zodpovědný za přeměnu dojitého hexameru helikázy, který je navázaný na dsDNA, na dva hexamery, z nichž se každý váže na jedno vlákno DNA, není zcela objasněn. Aktivní DNA helikáza tvoří tzv. CMG komplex, který se skládá z MCM2–7, Cdc45 a GINS (Moyer et al., 2006; Pacek et al., 2006) (viz obr. 1). Aktivovaný CMG komplex rozrušuje vodíkové vazby mezi bázemi obou vláken a rozvíjí molekulu DNA. Jednotlivá vlákna DNA jsou pokryta proteinem RPA (z angl. replication protein A). Tento protein udržuje DNA v její rozvinuté jednovláknové formě a umožňuje navázání komplexu DNA primázy a DNA polymerázy α , který je zodpovědný za syntézu RNA primerů a krátkého úseku DNA u eukaryot (viz obr. 1) (Burgers et al., 2017). Soubor všech proteinů v replikační vidlici nezbytných k syntéze DNA se nazývá replizom.



Obr. 1: Iniciacie replikace DNA

Legenda: ORC (počátek rozpoznávací komplex), Cdc6 (cell division cycle 6), Cdt1 (Cdc10-dependent transcript 1 protein), MCM2-7 (minichromosome maintenance proteins 2-7), CDK (cyklin-dependentní kináza), DDK (Dbf4-dependentní kináza), GINS (Go-Ichi-Ni-San tj. 5-1-2-3), Cdc45 (cell division control protein 45), TopBP1 (DNA topoisomerase II-binding protein 1), RPA (replikační protein A), CMG komplex (Cdc45-MCM-GINS).

DNA polymerázy katalyzující elongaci řetězců DNA neumí syntetizovat DNA de novo. Proto DNA primázy nejprve syntetizují krátké úseky DNA – DNA primery o velikosti asi 10 nukleotidů (Snustad et Simmons, 2017), které na 3' konci poskytují DNA polymeráze volné -OH skupiny pro přidávání nukleotidů. Tímto způsobem je syntetizovaný krátký RNA primer komplementární k vláknu DNA, který je později odstraněn a nahrazen DNA (Alberts et al., 2014).

3.1.2 Průběh syntézy DNA na vedoucím vlákně

Na vedoucím vlákně je přidávání dNTP katalyzováno DNA polymerázou ϵ , která se vyskytuje v komplexu s PCNA (z angl. proliferating cell nuclear antigen) a Rf-C (z angl. replication factor C) (viz obr. 2) (Tsurimoto et Stillman, 1990). PCNA zodpovídá za udržení DNA polymerázy na vlákně DNA a znemožňuje její předčasné uvolnění. PCNA je na vlákno DNA vázán díky konformační změně

vyvolané navázáním Rf-C. Zatímco v roztoku má PCNA uzavřenou prstencovitou strukturu znemožňující vazbu na DNA, po navázání Rf-C se PCNA otevře a naváže na DNA (Fukuda et al., 1995). Oba proteiny jsou tedy nezbytné pro správné fungování DNA polymeráz. Po nasyntetizování primeru přidává DNA polymeráza k volné 3'-OH skupině ribonukleotidu deoxyribonukleotidy a vytváří nové vlákno DNA ve směru 5'–3', tedy kontinuálně. Přidávání nukleotidů je dáno templátovým vláknem, které na základě komplementarity určuje přesné pořadí jednotlivých bází v nově nasyntetizované DNA. Pokud je DNA polymerázou rozpoznán dNTP komplementární k templátovému vláknem, dochází k nukleofilnímu útoku 3'-OH skupiny nukleotidu primeru (resp. nově syntetizovaného vlákna) na vnitřní atom fosforu přicházejícího dNTP. Nukleofilní kyslík, který má dostatek elektronů, napadá fosfor za vzniku fosfodiesterové vazby a uvolnění pyrofosfátu (Snustad et Simmons, 2017).

Rozvíjení DNA pomocí DNA helikázy jako i samotná replikace vyžadují, aby se molekula DNA otáčela. Vlákna DNA zůstávají před i za replikační bublinou vzájemně spojena vodíkovými můstky, což znemožňuje jejich volnou rotaci. Kvůli rozvolňování vláken v replikační bublině by tedy vznikaly na DNA superspiralizované úseky. Tento problém v buňce řeší DNA topoizomerázy: topoizomeráza I a topoizomeráza II. DNA topoizomeráza I vytváří jednovláknové zlomy na DNA, Toto rozrušení jednoho vlákna umožní, že kolem sebe úseky dvoušroubovice mohou rotovat a tím odstraňovat nadšroubovicové smyčky vzniklé během replikace (Poccia et al., 1978). DNA topoizomeráza II váže obě vlákna DNA a způsobuje dvouvláknové zlomy DNA (DSB z angl. double-strand breaks). Topoizomeráza II se kovalentně váže na jeden z duplexů, štěpí obě jeho vlákna a tvoří bránu, kterou prochází nerozštěpená dvoušroubovice. Tímto způsobem je schopná odstraňovat pozitivní i negativní nadšroubovicové otáčky (Berger et al., 1996).

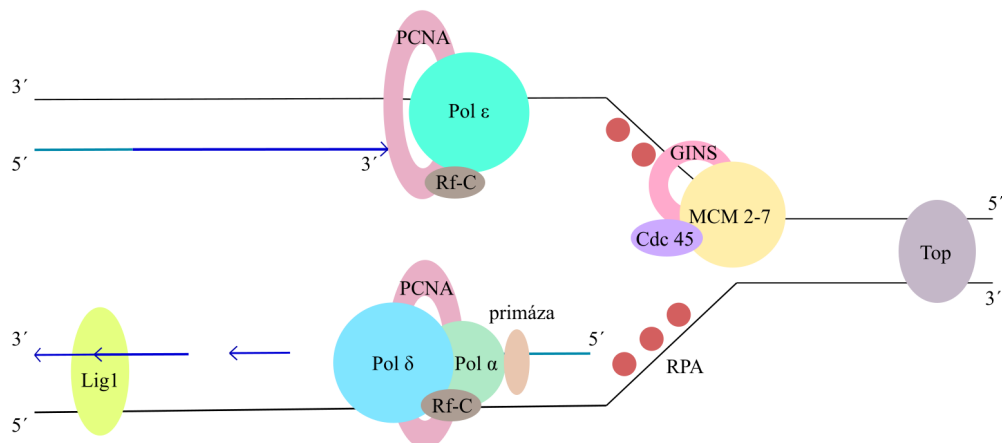
Protože eukaryotické chromozomy obsahují komplexy histonů, kolem kterých se váže vlákno DNA (tzv. nukleozomy), nastává problém, jak DNA vázanou na histony replikovat. Průchodu replizomu přes histony napomáhají chromatinové remodelační komplexy, které vazbu mezi DNA a histony uvolňují. Oktamery histonů se rozpadají na tetramery a dimery, uvolněná DNA je replikovaná a následně jsou opět seznarovány nukleozomy s již replikovanou DNA (Annunziato et Seale, 1983).

3.1.3 Průběh syntézy DNA na opožďujícím se vlákně

Syntéza DNA na opožďujícím vlákně probíhá diskontinuálně za tvorby Okazakiho fragmentů (viz obr. 2) (Okazaki et al., 1968). Syntézu DNA katalyzují DNA polymeráza α a DNA polymeráza δ . DNA polymeráza α se nachází v komplexu s DNA primázou a společně zahajují replikaci syntézou krátkých RNA-DNA vláken. DNA primáza syntetizuje RNA primer, ke kterému DNA polymeráza α připojuje několik dNTP. DNA polymeráza δ dosyntetizuje vlákno DNA až k následujícímu RNA primeru (Wang 1991; Bambara et Murante, 1997). RNA primery mohou být u eukaryot odstraněny třemi mechanismy zahrnujícími působení nukleáz.

Prvním z mechanismů je působení RNázy H a FEN1 (z angl. flap endonuclease 1). RNáza H degraduje nukleotidy RNA primeru pravděpodobně kromě posledního nukleotidu, který je odštěpen FEN1 (Turchi et Bambara, 1993; Turchi et al., 1994; Waga et Stillman, 1994). Dalším mechanismem je přemístění RNA primeru komplexem DNA polymerázy a PCNA za vzniku krátkého 5' přečnívajícího konce, který obsahuje asi 2–10 nukleotidů (Bambara et al., 1997) FEN1 rozpoznává toto rozvětvení DNA a RNA primeru a 5' přečnívající konec RNA primeru odštěpí (Zheng a Shen, 2011). Třetím mechanismem jsou odstraňovány dlouhé 5' přečnívající konce RNA, které nemohou být odštěpeny jen FEN1. Tyto asi 30 nukleotidů dlouhé přečnívající konce mohou být rozpoznány proteinem RPA, který štěpení FEN1 inhibuje (Bae et al., 2001; Chai et al., 2003). V tomto případě se odštěpení RNA primeru a DNA účastní DNA2 nukleáza (Bae et al., 2001), která rozpozná 5' přečnívající konec a odstraňuje jeho prostřední část, čímž je 5' přečnívající konec zkrácen. RPA se pak na krátké přečnívající vlákno už neváže a to může být odštěpeno pomocí FEN1 (Zheng a Shen, 2011). Štěpení pomocí DNA2 se pravděpodobně týká jen nižších eukaryot, nikoli savců a člověka (Zheng et al., 2008; Zheng et Shen, 2011).

Jednotlivé Okazakiho fragmenty nejsou po nasyntetizování a odstranění primerů vzájemně spojeny. Propojení úseku nově syntetizované DNA zajistí DNA ligáza, která katalyzuje vznik fosfodiesterové vazby mezi nukleotidy. DNA ligáza spojuje 3'konec jednoho Okazakiho fragmentu s 5' koncem následujícího fragmentu. Reakce probíhá za dodání ATP, který poskytuje fosfát k aktivaci 5' vlákna navázáním druhého fosfátu. 3' -OH skupina reaguje s 5' koncem za uvolnění anorganického fosfátu a tvorby fosfodiesterové vazby (Alberts et al., 2014).



Obr. 2: Zjednodušené schéma replikační vidlice a průběhu syntézy DNA na vedoucím a opoždujícím se vlákně

Legenda: PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Pol ϵ (DNA polymeráza ϵ), Pol δ (DNA polymeráza), Pol α (DNA polymeráza α), Rf-C (replikační faktor C), RPA (replinační protein A), MCM2–7 (minichromosome maintenance proteins 2–7), GINS (Go-Ichi-Ni-San tj. 5-1-2-3), Cdc45 (cell division control protein 45), Top (topoizomeráza), Lig 1 (ligáza 1), zeleně: RNA primer, modře: nové vlákno DNA.

U lineárních chromozomů nastává na opožďujícím se vlákně problém se syntézou konců chromozomů – tzv. telomer. Protože DNA polymerázy pracují pouze ve směru 5'–3' a nejsou schopny syntetizovat vlákno DNA de novo, zůstávala by koncová část chromozomu po odstranění posledního primeru nedosyntetizovaná, a tudíž by docházelo během každého buněčného dělení ke ztrátě koncové sekvence a zkracování molekuly DNA. Telomery v lidských chromozomech obsahují tandemově se opakující repetice. Problém syntézy DNA na koncích telomer řeší enzymy telomerázy. Telomerázy obsahují molekulu RNA komplementární k repetitivním sekvencím TTAGGG, rozeznávají na 3'konci templátového vlákna oblast bohatou na G a prodlužují 3'konec templátového vlákna. Podle RNA telomerázy je syntetizována sekvence telomer na templátovém vlákně, poté se telomeráza posune a celý proces se několikrát opakuje. Po dostatečném prodloužení templátového vlákna je syntetizován RNA primer poskytující volnou 3'-OH skupinu DNA polymeráze, která dosyntetizuje zbývající fragment na opožďujícím se vlákně (Greider et Blackburn, 1987).

3.2 Regulace rychlosti replikace DNA

Pro správný průběh replikace DNA je důležitá regulace její rychlosti. Rychlost replikačních vidlic nemůže být příliš nízká ani vysoká. Vychýlení rychlosti replikace DNA o 40 % vede k poškození DNA, naopak s méně výraznými výkyvy rychlosti je buňka schopná se vyrovnat (Maya-Mendoza et al., 2018).

V důsledku působení různých endogenních a exogenních činitelů jsou replikační vidlice často vystaveny řadě problémů. Odchytky od správného průběhu replikace se označují jako replikační stres (RS z angl. replication stress) a v konečném důsledku mohou vést až k nestabilitě genomu (Halazonetis et al., 2008). Příčinou replikačního stresu jsou události, které narušují replikační program. Patří mezi ně neadekvátní aktivace replikačních počátků, nevhodné metabolické podmínky pro replikaci, překážky, které brání průchodu replikačních vidlic (DNA léze, sekundární struktury DNA, komplexy DNA a proteinů) nebo střet s transkripcí probíhající na stejném vlákně DNA (Magdalou et al., 2014).

Na replikační stres buňka odpovídá vysoce specifickou buněčnou odpovědí, čímž stimuluje návrat k přesné replikaci DNA, chrání buňku před nádorovou transformací a zabezpečuje její přežití. Replikační stres je spojen s tvorbou ssDNA, která je stabilizována navázáním RPA. ssDNA slouží také k navázání a aktivaci ATR kinázy (z angl. ataxia telangiectasia and Rad3 related kinase), která spouští odpověď na RS (Zou et Elledge., 2003). To zahrnuje vazbu opravných proteinů DNA, zablokování aktivace dormantních replikačních počátků, zabezpečení stability replikačních vidlic a jejich opětovné spuštění (Lopes et al., 2001; Chanoux et al., 2009). Fosforylace RPA v důsledku poškození DNA je signálem k zastavení S fáze buněčného cyklu, což poskytuje čas pro opravu DNA a správné obnovení replikace (Zou et Elledge., 2003; Olson et al., 2006). Transduktory signálu k zastavení buněčného

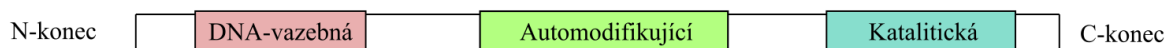
cyklu jsou kinázy Chk1 (z angl. checkpoint kinase 1) a Chk2 (z angl. checkpoint kinase 2) a jejich fosforylace proteiny ATR nebo ATM (z angl. ataxia-telangiectasia mutated) vede k aktivaci S fázového kontrolního bodu (Zhao et al., 2001; Ahn et al., 2000). Chybná odpověď na RS může mít za následek kolaps replikačních vidlic, definovaný jako stav, kdy už není možný návrat k replikaci a v buňce dochází k nejtoxičtějšímu poškození DNA – dvouvláknovým zlomům (Petermann et al., 2010). Signalizace a samotné opravy dvouvláknových zlomů DNA se účastní proteiny γ H2AX (fosforylovaný histon H2AX), 53BP1 (z angl. tumor suppressor p53-binding protein 1) a RAD51 (RAD51 rekombináza), které jsou tedy znakem přetrvávajícího RS (Shinohara et al., 1992; Xie et al., 2007; Dimitrova et al., 2008).

Pokud je replikační rychlost příliš nízká např. kvůli vyčerpání nukleotidů, histonů nebo ostatních komponentů, které jsou pro průběh replikace nezbytné, je výsledkem replikační stres (Anglana et al., 2003; Poli et al., 2012; Sørensen et al., 2012; Aguilera et al., 2013). Nová studie Maya-Mendoza et al. (2018) poukazuje na zcela nový fenomén, kterým je asociace replikačního stresu i se zvýšenou rychlostí replikace. Tato práce dále popisuje důležitou roli proteinů PARP1 a p21 v regulaci rychlosti replikace.

3.2.1 PARylace a rychlost replikace DNA

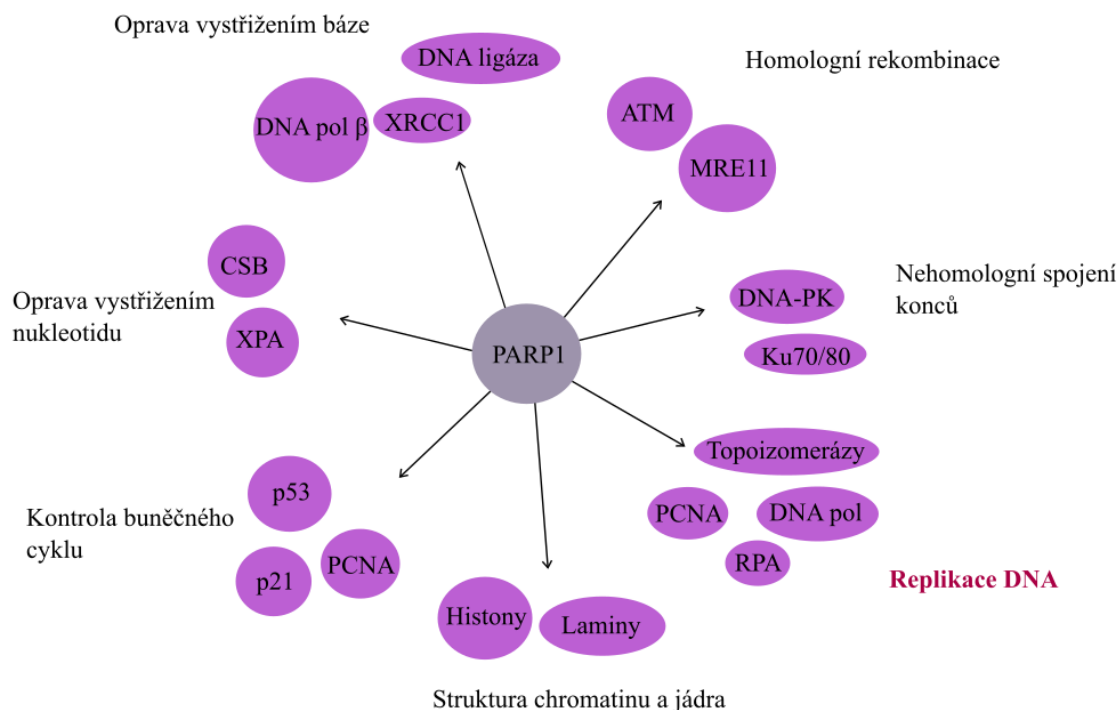
PARylace neboli poly (ADP-ribosylace) je posttranslační modifikace, kdy jsou na protein navazovány jednotky ADP-ribózy. Donorem ADP-ribózy je NAD^+ (nikotinamidadenindinukleotid – oxidovaná forma) (Chambon et al., 1966). Jednotlivé ADP-ribózy tvoří polymery ADP-ribózy (PAR), které mají záporný náboj, a slouží jako transduktory signálu. (D'Amours et al., 1999; Amé et al., 2004). Reakce je katalyzovaná poly (ADP-ribóza) polymerázami (PARP z angl. poly (ADP-ribose) polymerase) a často dochází k této modifikaci na samotných PAR polymerázách, které tak signalizují poškození DNA (D'Amours et al., 1999). Kovalentně vázané PAR mohou být pak hydrolyzovány na volné poly (ADP-ribózy) nebo na mono (ADP-ribózy) PARP glykohydrolázou (PARG z angl. poly (ADP-ribose) glycohydrolase) nebo PAR hydrolázou (ARH3 z angl. ADP ribosyl-acceptor hydrolase 3) (Oka et al., 2006; Min et Wang, 2009).

Rodina poly (ADP-ribóza) polymeráz má nejméně 18 členů, kteří jsou konzervativní v katalytické doméně (Amé et al., 2004). Nejznámějšími izomorfami jsou PARP1 a PARP2 (Morales et al., 2014). PARP1 je protein o molekulové hmotnosti 116 kDa schopný katalyzovat vazbu ADP-ribózy na cílový protein (D'Amours et al., 1999). Obsahuje DNA-vazebnou doménu na N-konci umožňující vazbu na DNA, katalytickou doménu na C-konci zodpovědnou za katalýzu syntézy PAR a centrální automodifikující doménu, díky které jsou přidávány PAR na samotný PARP (viz obr. 3).



Obr. 3: Schéma funkčních domén proteinu PARP1 (převzato z Toss et Cortezi, 2013)

PARylace proteinem PARP1 je významnou součástí dějů jako oprava poškozené DNA, replikace DNA, transkripce, rekombinace, modulace chromatinu a apoptóza (viz obr. 4). PARP1 rozeznává dvouvláknové zlomy, ssDNA a jednovláknové zářezy na vlákně DNA, kde není fosfodiesterová vazba (angl. tzv. nick) (D'Amours et al., 1999; Malanga et Althaus, 2004), na které se váže prostřednictvím DNA-vazebné domény. To stimuluje jeho katalytickou aktivitu. PARP1 syntetizuje řetězce PAR na substrátových proteinech a tím přispívá ke správné lokalizaci a aktivitě opravných proteinů v místě poškození DNA. Nadměrná autoPARylace PARP1 vede kvůli negativnímu náboji PAR polymeru k uvolnění PARP1 z vlákna DNA (D'Amours et al., 1999; Huambachano et al., 2011).



Obr. 4: Role PARP1 v buňce (převzato z Mangerich et Bürkle, 2012)

Legenda: PARP1 (poly (ADP-ribóza) polymeráza 1), ATM (ataxia-telangiectasia mutated kinase), MRE11 (nukleáza opravující dvouvláknové zlomy), DNA-PK (katalytická podjednotka DNA-dependentní protein kinázy), Ku70/80 (protein Ku tvořený doménami Ku70 a Ku80), PCNA (proliferating cell nuclear antigen), DNA pol (DNA polymerázy), RPA (replikační protein A), p21 (protein p21), p53 (protein p53), XPA (Xeroderma pigmentosum complementation group A), CSB (cockayne syndrome group B), DNA pol β (DNA polymeráza β), XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1).

U normálně se dělících buněk probíhá PARylace zejména v S fázi buněčného cyklu. PARylace ovlivňuje aktivitu enzymů, účastnících se replikace, mezi které patří DNA polymerázy, topoizomerázy, RPA a PCNA (Simbulan-Rosenthal et al., 1998; Bauer et al., 2001). PARP je nezbytný pro správnou syntézu Okazakiho fragmentů, protože díky schopnosti rozpoznat zářezy

na vláknech DNA rozpoznává nespojené Okazakiho fragmenty (Lönn et Lönn, 1985; Hanzlíková et al., 2018).

Kvůli zásadní roli proteinu PARP1 v replikaci a opravě DNA se mnoho současných experimentálních studií věnuje právě inhibici PARP1 jako novému terapeutickému přístupu v léčbě rakoviny (Ledermann et al., 2014; de Bono et al., 2020; Kuemmel et al., 2020). Inhibice PARP1 je toxická pro buňky, ve kterých nejsou aktivní tumorsupresorové proteiny BRCA1 (z angl. breast cancer type 1 susceptibility protein) a BRCA2 (z angl. breast cancer type 2 susceptibility protein), které se účastní opravy DNA. Proto tento způsob léčby dobře funguje u nádorů defektních v BRCA1 a BRCA2 (Farmer et al., 2005), jako jsou nádory prsu, vaječníků, prostaty a slinivky břišní (Fong et al., 2009; Golan et al., 2019). Původně se předpokládalo, že citlivost BRCA1-deficitních nádorů vůči PARP inhibitorům (PARPi z angl. PARP inhibitor) vychází z nedostatečné ochrany replikačních vidlic, zastavení nebo kolapsu replikačních vidlic v těchto buňkách (Bryant et al., 2005).

V rozporu s tímto pozorováním je nedávna studie, která poprvé ukazuje, že PARPi nezpůsobuje zastavení replikace, ale naopak vede ke zvýšení replikační rychlosti (Maya-Mendoza et al., 2018). U buněčné linie U2OS ovlivněné Olaparibem (PARPi) o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ sledovali autoři 60% nárůst rychlosti replikačních vidlic. Avšak v kontrastu s dříve přijímaným modelem nevyvolal PARPi žádné zastavení a kolaps replikační vidlice. Působením PARPi v BRCA-deficitních tumorech by místo zastavení replikačních vidlic mohlo tedy docházet k natolik markantnímu zrychlení replikace, po kterém by vznikalo množství poškození DNA, jež by nebyla v důsledku nefunkčního PARP1 a nepřítomných BRCA1 a BRCA2 rozpoznána a opravena (Maya-Mendoza et al., 2018).

Ve stejné studii (Maya-Mendoza et al., 2018) byl navrhnout model tzv. ‚fork speed regulatory network‘, podle kterého proteiny PARP1, p53 a p21 společně negativně regulují rychlost replikace DNA v S fázi buněčného cyklu. Replikační stres vyvolaný poškozením DNA je zaznamenán PARP1, PARylace potlačí postup replikačních vidlic, aktivuje p53 a následně je akumulován p21, který může zastavit defektní replikační vidlice (viz. obr. 7). Spolupráce PARP1, p53 a p21 je důležitá pro zachování optimální rychlosti a průběhu replikace DNA (Maya-Mendoza et al., 2018).

3.2.2 Protein p21 v regulaci rychlosti replikace DNA

Protein p21 známý také jako $p21^{\text{CDKN1A}}$ (z angl. cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), $p21^{\text{Cip1}}$ (z angl. Cdk-interacting protein 1) nebo $p21^{\text{Waf1}}$ (wild type p53-activated fragment 1) je malý protein o molekulové hmotnosti 21 kDa. p21 je kódovaný genem CDKN1A, který se nachází na krátkém raménku chromozomu 6 (Gene-NCBI, 2021), a významně přispívá k regulaci buněčného cyklu. Díky schopnosti inhibovat cyklin-dependentní kinázy může zpomalovat buněčný cyklus a popř. ho zastavit při přechodech z G1 do S nebo z G2 do M fáze (Gartel et al., 1996). Transkripčním faktorem p21 je protein p53, který prostřednictvím p21 řídí kromě zastavení buněčného cyklu také buněčnou

senescenci. Kromě aktivace proteinem p53 může být p21 aktivován také nezávisle na p53 a to faktory Sp1 (z angl. specific protein 1), STAT (z angl. signal transducer and activator of transcription) a AP2 (z angl. adipocyte protein 2) (Karimian et al., 2016).

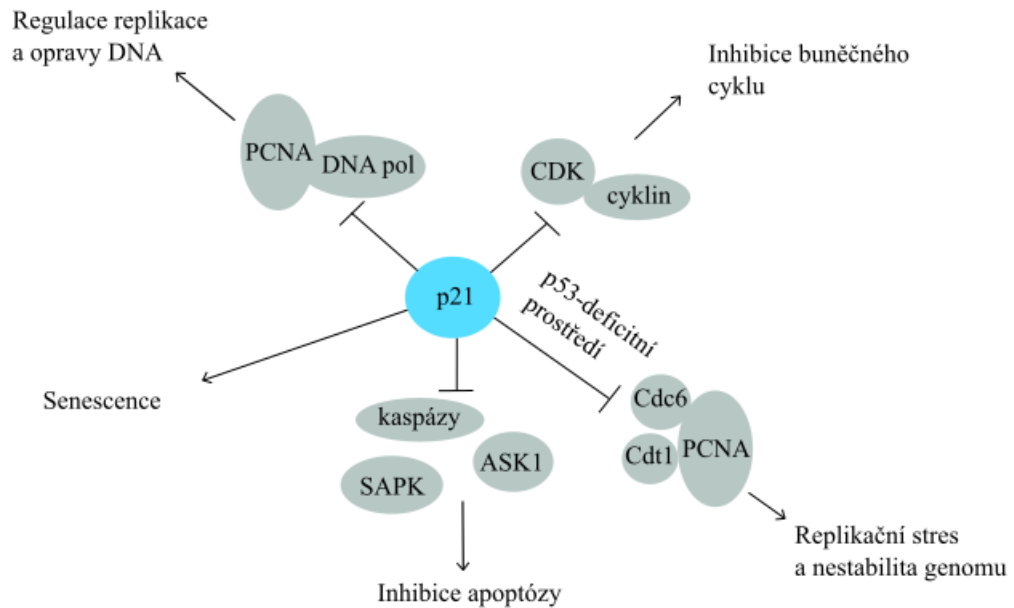
p21 je tvořen 165 aminokyselinami. Pro jeho funkci jsou zásadní domény na N- a C-konci. Regulaci buněčného cyklu a tedy interakci s cyklin-CDK komplexem zajišťuje především N-terminální doména p21, která inhibuje aktivitu cyklin-dependentní kinázy a tím zamezí dalšímu postupu buněčným cyklem. (Fotadar et al., 1996). N-terminální doména p21 váže CDK a motiv Cy1 (z angl. cyclin-binding motif 1) na N-koci váže cyklin. Tato interakce je navíc podpořena Cy2 (z angl. cyclin-binding motif 2) motivem na C-konci, který také slabě váže cyklin (Chen et al., 1995; Goubin et Ducommun, 1995; Chen et al., 1996; Fotadar et al., 1996). Na C-konci p21 je PCNA-vazebná doména – tzv. PIR (z angl. PCNA-interacting region), která má vysokou afinitu k PCNA (viz obr. 5). Prostřednictvím PIR váže p21 protein PCNA v oblasti zvané IDCL (z angl. interdomain connecting loop). Do stejné oblasti na PCNA se vážou i DNA polymerázy (Warbrick, 1998; Moldovan et al., 2007).



Obr. 5: Schéma funkčních domén proteinu p21

Legenda: Cy1 (cyklin-vazebný motiv 1), CDK (CDK-vazebná doména), PIR (PCNA interagující oblast), Cy2 (cyklin-vazebný motiv 2).

Protein p21 se účastní v buňce mnoha procesů: regulace buněčného cyklu, apoptózy, senescence, replikace a opravy DNA (viz obr. 6). Buněčný cyklus je pozitivně regulován fosforylací pRb (z angl. retinoblastoma protein) aktivními cyklin-dependentními kinázami v komplexu s cykliny (Beijersbergen et Bernards, 1996). Nadměrná aktivita CDK je inhibována p21 a tím je zabráněno postupu buněčným cyklem a nádorové transformaci (Harper et al., 1995). p21 interaguje s komplexy cyklin A/CDK1, cyklin A/CDK2, cyklin E/CDK2, cyklin D1/CDK4 a cyklin D2/CDK4. Exprese p53 a následně p21 po poškození DNA vede k inhibici komplexu cyklin E/CDK2 a zamezení přechodu z G1 do S fáze, který je komplexem cyklin E/CDK2 pozitivně regulován. Tím je zabráněno replikaci poškozené DNA. Interakce p21 s cyklinem A/CDK1 a cyklinem A/CDK2 pak inhibuje buněčný cyklus přímo v S fázi (Sherr et Roberts, 1999; Bertoli et al., 2013; Karimian et al., 2016).



Obr. 6: Role p21 v buňce

Legenda: p21 (protein p21), CDK (cyklin-dependentní kinázy), Cdc6 (cell division cycle 6), Cdt1 (Cdc10-dependent transcript 1 protein), PCNA (proliferating cell nuclear antigen), SAPK (stress-activated protein kinase), ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), DNA pol (DNA polymeázý).

Významným transkripčním faktorem p21 je tumor-supresorový protein p53 (Finlay et al., 1989; Baker et al., 1990; El-Deiry et al., 1993). Aktivace p53 obecně vede k zastavení buněčného růstu, senescenci, nebo apoptóze. p53 indukované zastavení buněčného cyklu probíhá přes expresi p21 (Deng et al., 1995). Po poškození DNA je proteinem p53 indukována exprese p21. Za podmínek, kdy funguje signální dráha p53 správně, je p21 exprimován díky zpětné regulaci jen dočasně a výsledkem je zastavení buněčného cyklu, které poskytuje čas pro opravu DNA, nebo nevratný přechod do senescence (El-Deiry et al., 1994; Campisi et al., 2007). Tento proces brání existenci a proliferaci poškozených buněk, a tudíž je nezbytný pro potlačení vzniku nádoru. Avšak kromě ochrany stability genomu a potlačení onkogeneze se v p53-deficitním prostředí ukazuje i opačná role proteinu p21. Bylo zjištěno, že nadměrná exprese p21 v prostředí chybějícího p53 umožní subpopulaci buněk uniknout ze stádia podobného senescenci a vede k replikačnímu stresu (Galanos et al., 2016). Tato subpopulace buněk se zvýšenou a prodlouženou expresí p21 vykazuje nestabilitu genomu a chemorezistenci k protinádorovému léku doxorubicinu (Galanos et al., 2016). V p53-deficitním prostředí je p21 déle exprimován a váže PCNA, který se kvůli interakci s p21 nemůže účastnit odbourávání replikaci iniciujících faktorů Cdc6 a Cdt1 (Galanos et al., 2016). Iniciace replikace je odbouráváním faktorů Cdc6 a Cdt1 regulována tak, aby aktivace replikačního počátku a celá replikace proběhly jen jednou během S fáze. Jejich vysoká hladina má za následek re-replikaci – stav, kdy replikace DNA proběhne více než jednou během jednoho cyklu buňky (Galanos et al., 2016). Neschopnost PCNA odbourávat Cdc6 a Cdt1 má tedy za následek replikační stres (Galanos et al., 2016), akumulaci DSB a přechod z opravy homologní rekombinací na více chybové opravné dráhy

(Galanos et al., 2016; Mansilla et al., 2020). Re-replikace i oprava DNA náchylná na chyby vedou k nestabilitě genomu a ukazují na pro-onkogení roli p21 v p53-deficitním prostředí (Mansilla et al., 2020).

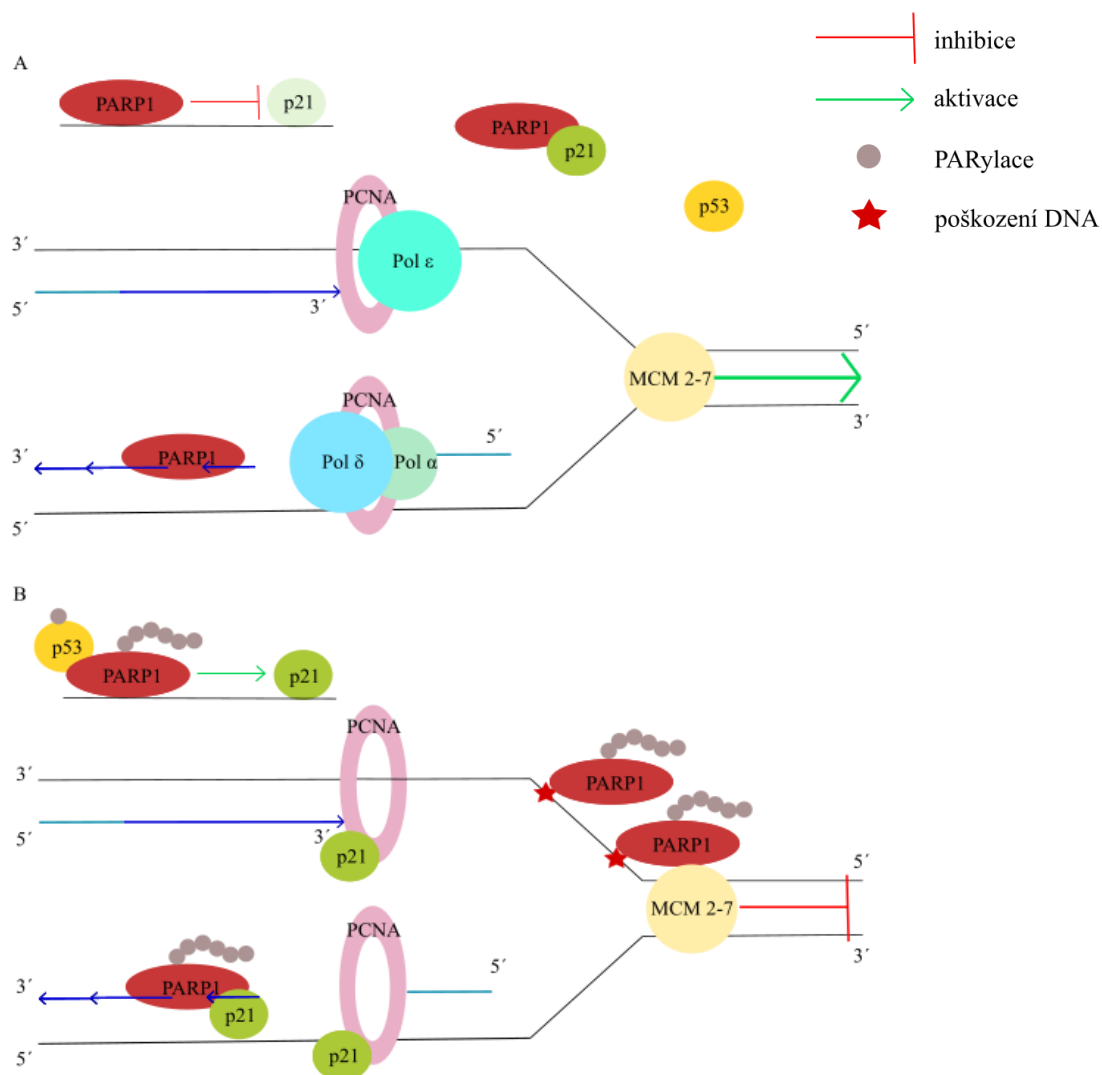
p21 může vykazovat různé funkce v závislosti na své lokalizaci v buňce. Pokud je přítomen v jádře, vyazuje spíše tumor-supresorovou funkci díky schopnosti inhibovat buněčný růst. Naopak pokud se nachází ve vyšší koncentraci v cytoplazmě, projeví se jeho antiapoptotický efekt a tím podporuje onkogenezi (Romanov et al., 2012; 2016). V cytoplazmě p21 inhibuje proteiny, které indukují apoptózu včetně prokaspázy 3, kaspázy 8, kaspázy 10, SAPK (z angl. stress-activated protein kinase) a ASK1 (z angl. apoptosis signal-regulating kinase 1) (Dotto, 2000; Roninson, 2002). Inhibici růstu kontroluje p21 dvěma způsoby. Prvním z nich je výše zmíněná interakce komplexu cyklin/CDK a CDK/cyklin inhibující domény na N-konci. Druhým mechanismem je potlačení syntézy DNA prostřednictvím PCNA-vazebné domény na C-konci. p21 soutěží o PCNA s dalšími PCNA-vazebnými proteiny, které jsou potřebné pro syntézu DNA. Mezi ně patří i DNA polymerázy a tak p21 ovlivňuje replikaci a opravu DNA (Gulbis et al., 1996; Moldovan et al., 2007).

V S fázi buněčného cyklu je hladina p21 výrazně nižší než během ostatních fází a p21 tak není schopný inhibovat CDK (Mansilla et al., 2020). Ovšem bylo pozorováno, že i malé změny nízké koncentrace p21 mohou ovlivnit průběh replikace a p21 je i při těchto nízkých koncentracích v S fázi důležitý pro zachování stability genomu v nestresovaných buňkách (Mansilla et al., 2016). Ztráta p21 vede k defektům během replikace, které ukazují nutnost p21 pro správnou elongaci replikačních vidlic (Mansilla et al., 2016). Následující poznatky ukazují, že p21 v S fázi ovlivňuje funkce, které jsou závislé na PCNA, a to kompeticí s ostatními proteiny, které interagují s PCNA. Právě PIR doména p21, která váže PCNA, je esenciální při prevenci nestability genomu a replikačních defektů (Mansilla et al., 2016). p21 je negativní regulátor alternativních DNA polymeráz, které se účastní translézní syntézy DNA (TLS z angl. translesion synthesis) (Avkin et al., 2006). p21 předchází méně vhodnému použití translézních polymeráz κ , η , ι a Rev1 během replikace nepoškozené DNA (Mansilla et al., 2016). Alternativní polymerázy se účastní replikace v případě poškození DNA (např. UV-zářením) a jsou méně přesné než replikativní polymerázy. Pokud na DNA nejsou žádné léze, aktivita alternativních polymeráz je nežádoucí. Aby se alternativní polymerázy mohly navázat na DNA, PCNA musí být nejprve ubikvitinovaný (Choe et Moldovan, 2017; Ripley et al., 2020). Samotná ubikvitinace PCNA je ovlivněná hladinou p21. V případě potřeby translézní syntézy je tedy nutná degradace p21 prostřednictvím E3 ubikvitin ligázy CRL4 (z angl. cullin-RING) a následně se do replizomu mohou vázat alternativní DNA polymerázy (Mansilla et al., 2016). p21 těmito způsoby reguluje výběr adekvátní DNA polymerázy (Mansilla et al., 2016) a přispívá tak k regulaci stability genomu.

Role p21 v replikaci DNA je založená na jeho schopnosti přerušit interakci PCNA-vazebných partnerů s PCNA. Díky PIR doméně má p21 nejvyšší afinitu k PCNA (Bruning et Shamoo, 2004) a může tak

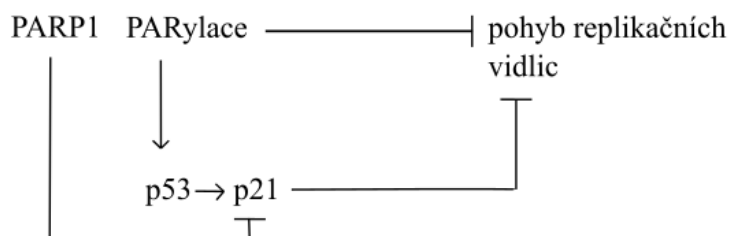
soutěžit s těmito proteiny a vázat PCNA místo nich. Endogenní zbytková hladina p21 během S fáze může kontrolovat elongaci DNA a ovlivňovat rychlost syntézy DNA (Mansilla et al., 2016; Maya-Mendoza et al., 2018).

Ve studii Maya-Mendoza et al. (2018) byl p21 popsán jako negativní regulátor rychlosti replikace DNA. Po siRNA (z angl. small interfering RNA) nebo shRNA (z angl. short hairpin RNA) transfekci p21 buněčné linie U2OS bylo pozorováno zrychlení replikačních vidlic bez ovlivnění hladiny PARP1. Během nenarušené S fáze inaktivovaný PARP1 inhibuje p21 (Frouin et al., 2003) a zároveň je korepresorem promotoru CDKN1A (Madison et Lundbland, 2010) (viz obr. 7A). Aktivací PARP1 v důsledku poškození DNA je aktivována transkripce p21 a zároveň je p21 uvolněn z komplexu PARP1-p21 (Maya-Mendoza et al., 2018). p21 tak může vázat PCNA, blokovat přítomnost replikativních polymeráz v replizomu, tím i syntézu DNA (Waga et al., 1994), a zastavit postup poškozených replikačních vidlic. Autoparylovaný PARP1 navíc interaguje s p53, který pak také aktivuje expresi p21 (Maya-Mendoza et al., 2018) (viz obr. 7B, 8).



Obr. 7: Funkce p21 a PARP1 během **A:** nenarušené S fáze, **B:** poškození DNA (převzato z Maya-Mendoza et al., 2018)

Legenda: p21 (protein p21), p53 (protein p53), PCNA (proliferating cell nuclear antigen), PARP1 (poly (ADP-ribóza) polymeráza 1), Pol α (DNA polymeráza α), Pol ϵ (DNA polymeráza ϵ), Pol δ (DNA polymeráza δ).



Obr. 8: Schématické znázornění interakcí mezi PARP1, p53 a p21 (převzato z Maya-Mendoza et al., 2018)

3.2.3 Fenotypy asociované se zvýšenou rychlostí replikace DNA

Maya-Mendoza et al. (2018) popsali v nedávné studii následky zrychlené replikace DNA. Zvýšená replikační rychlost je spojená s akumulací poškození DNA a indukci opravných drah, s nestabilitou genomu a se změnami v buněčném cyklu.

Nadměrným zrychlením se replikační vidlice dopouštějí více chyb, mohou se dostat přes poškozenou DNA a přes meziproducty rekombinace. Autoři výše zmíněného článku pozorovali PARP inhibitorem vyvolané zrychlení replikace DNA vedoucí k poškození DNA a k indukci DNA opravných drah (Maya-Mendoza et al., 2018). S využitím imunofluorescenčních technik a kvantitativní analýzy sledovali autoři studie změny v tvorbě fokusů proteinů opravných drah – subnukleárních struktur na vláknu DNA, které vznikají po jejím poškození a podílejí se na signalizaci a opravě DNA. U buněčné linie U2OS vystavené na 24 h působení PARPi o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ významě vzrůstá počet fokusů proteinů γH2AX , 53BP1, RAD51 a RPA32. To ukazuje na zvýšený výskyt ssDNA a přetrvávající replikační stres vedoucí až ke vzniku dvouvláknových zlomů DNA. Na imunoblotu autoři pozorovali zvýšenou fosforylaci proteinů RPA32, Chk1 a Chk2 (pRPA32 S4/S8, pRPA32 S33, pChk1 S317 a pChk2 T68). Tyto posttranslační modifikace vedou k zastavení buněčného cyklu v důsledku replikačního stresu. Zrychlená replikace DNA po PARPi dále vyvolává změny distribuce buněk v buněčném cyklu. V rámci S fáze se buňky ovlivněné PARPi shromažďují v pozdní S fázi buněčného cyklu. Analýza buněk ovlivněných PARPi poukazuje na výskyt jednovláknových zářezů a dvouvláknových zlomů DNA a narušení stability genomu (Maya-Mendoza et al., 2018). Jako markery nestability genomu byla kvantifikována tzv. mikrojádra, která vznikají z fragmentů nebo i z celých chromozomů, které se při buněčném dělení nedostaly do dceřiné buňky, a tvoří malé struktury v blízkosti buňky (Fenech et al., 2016).

Kromě mechanismu působení PARPi Maya-Mendoza et al. (2018) sledovali následky vyčerpání dalšího z proteinů účastnících se replikace DNA – Treslinu. Treslin se podílí na aktivaci replikačních počátků obratlovců, kde interaguje s TopBP1 (Kumagai et al., 2010). Nedostatek Treslinu vyvolává zrychlení replikačních vidlic a aktivuje dráhy odpovědi na poškození DNA. Po úbytku Treslinu se buňky akumulují v pozdní S fázi buněčného cyklu stejně jako po PARPi (Maya-Mendoza et al., 2018). Autoři popisované studie pozorovali fenotyp zrychlené replikace i v důsledku nedostatku proteinu p21, dosaženého pomocí siRNA, nebo shRNA transfekce. Tímto také poukázali na schopnost p21 negativně regulovat rychlost replikace DNA (Maya-Mendoza et al., 2018). Fenotypy asociované se zrychlením replikace DNA po snížení hladiny p21 doposud nejsou známe a dále se jimi zabývám ve své práci, kde jsou srovnávány s již popsányými fenotypy pozorovanými po snížení hladiny Treslinu.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Experimenty byly provedeny na 2 buněčných liniích: lidský osteosarkom U2OS (ATCC HTB-96) a lidská imortalizovaná nenádorová linie epitelu sítnice RPE1 s aktivním enzymem prodlužujícím telomery hTERT (ATCC CRL-4000). U buněk byla provedena siRNA transfekce, nebo byly ovlivňovány inhibitorem proteinu p21 UC2288.

4.2 Chemikálie, roztoky, soupravy

Tab. 1: Použité chemikálie

Název	Výrobce	Katalogové číslo
30% Akrylamid / Bis solution 29:1	Bio-Rad	1610156
4% paraformaldehyd	Sigma-Aldrich	HT501128-4L
Aceton	Penta	10050-11000
Azid sodný	Sigma-Aldrich	SAFS71289-5G
Bovinní sérový albumin	Sigma-Aldrich	A7906-100G
Deionizovaná voda	-	-
Dimethyl sulfoxide Cell culture grade	PanReac AppliChem	A3672,0250
DMEM high glucose	Biosera	LM-D1111/500
Dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma-Aldrich	11667289001
Ethanol 96%	Penta	70390-12501
Ethanol 70%	-	-
Fetální bovinní sérum	Gibco	26140079
Hoechst 33342	Molecular probes	H1399
Inhibitor p21 UC2288	Sigma-Aldrich	5328130001
Izopropanol	Penta	17500-20005
Kyselina octová 99,8%	Penta	19990-11000
Lipofectamin RNAiMAX transfection reagent	Invitrogen	13778075
Methanol	Penta	21210-12500
Montovací médium Vectashield	Vector laboratories	H-1000
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich	T9281-25ML
Odtučněné sušené mléko	Samatha	1559
OptiMEM	Thermo Fisher Scientific	31985062

Pokračování Tab. 1: Použité chemikálie

Název	Výrobce	Katalogové číslo
Penicilin-Streptomycin	Sigma-Aldrich	P4333-100ML
Peroxodisíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich	A3678-25G
Pierce detergent compatible Bradford assay reagent	Thermo Fisher Scientific	23246S
Ponceau S	Sigma-Aldrich	P3504-10G
Precision plus protein dual color standard	Bio-Rad	1610394
siRNA Con	Ambion	AM4635
siRNA p21	Ambion	4390824
siRNA TICRR 1#	Ambion	4392420
siRNA TICRR 2#	Ambion	4392420
siRNA TICRR 3#	Ambion	4392420
Triton X-100	Carl Roth	3051.4
TrypLE Express	Gibco	12305-028

Tab. 2: Použité roztoky a jejich příprava

Název roztoku	Příprava roztoku
1.5 M Tris (pH 8,8)	18,17 g Tris rozpustit v 80 ml ddH ₂ O upravit pH na 8,8 doplnit do 100 ml ddH ₂ O
1.5M Tris (pH 6,8)	18,17 g Tris rozpustit v 80 ml ddH ₂ O upravit pH na 6,8 doplnit do 100 ml ddH ₂ O
1× elektrodový pufr	100 ml 10× elektrodový pufr doplnit do 1000 ml ddH ₂ O
1× PBS	10 ml 10× PBS doplnit do 100 ml ddH ₂ O
1× přenosový pufr	100 ml 10× přenosový pufr 100 ml MetOH doplnit do 1000 ml ddH ₂ O

Pokračování Tab. 2: Použité roztoky a jejich příprava

Název roztoku	Příprava roztoku
10% APS	1 g APS rozpustit v 8 ml ddH ₂ O doplnit do 10 ml ddH ₂ O
10% SDS	10 g SDS rozpustit v 90 ml ddH ₂ O doplnit do 100 ml ddH ₂ O
10× elektroodový pufr	144,1 g glycin 30,3 g Tris 10 g SDS doplnit do 1000 ml ddH ₂ O
10× PBS (pH 7,4)	80 g NaCl 2 g KCl 32,1 g Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ upravit pH na 7,4–7,5 doplnit ddH ₂ O do 1000 ml
10× přenosový pufr	144,1 g glycin 30,3 g Tris doplnit do 1000 ml ddH ₂ O
10× TBS	24,2 g Tris 80 g NaCl upravit pH na 7,6 doplnit do 1000 ml ddH ₂ O
5% mléko v TBS s 0,1% Tween-20	5 g sušeného mléka doplnit do 100 ml TBS s 0,1% Tween-20
Barvicí roztok Ponceau S	0,5 g Ponceau S 5 ml 99,8% kyselina octová doplnit do 100 ml ddH ₂ O
DMEM high glucose + 10% FBS + 0,02% azid sodný	5 ml FBS 100 µl 10% azidu sodné doplnit do 50 ml DMEM high glucose

Pokračování Tab. 2: Použité roztoky a jejich příprava

Název roztoku	Příprava roztoku
LSB	8 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8) 3,2 g SDS 16 ml Glycerol 700 µl 10% roztok bromfenolové modři 2,7 g DTT doplnit do 40 ml ddH ₂ O
TBS s 0,1% Tween-20	100 ml 10× TBS 1 ml Tween-20 doplnit do 1000 ml ddH ₂ O

Tab. 3: Použité soupravy

Název	Dodavatel	Katalogové číslo
Click-iT plus EdU Fluor 594 Imaging Kit	Molecular probes	C10639
Pre-diluted protein assay standards: BSA set	Thermo Fisher Scientific	23208
SuperSignal west femto plus chemiluminescent substrate	Thermo Fisher Scientific	34095
SuperSignal west pico plus chemiluminescent substrate	Thermo Fisher Scientific	34580

4.3 Použité přístroje

Aparatura na elektroforézu Mini-Protean Tetra systém (Bio-Rad)

Blotovací aparatura Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad)

Centrifuga Scanspeed 1236R (Labgene)

Fluorescenční mikroskop Imager.A2 (Carl Zeiss)

Inkubátor Hera Cell 150i (Thermo Fisher Scientific)

Invertovaný fluorescenční mikroskop ScanR IX81 (Olympus) s EM CCD kamerou C9100 (Hamamatsu Photonics)

Laminární box Msc-Advantage (Thermo Fisher Scientific)

Mikroskop CKX53 (Olympus) s kamerou DS126621 (Canon)

Mikroskop Primo Vert (Carl Zeiss)

Mrazicí box -80 °C Ultra-Low Temperature Freezer U725 (New Brunswick)

Napájecí zdroj EV202 (Consort)

Orbitální třepačka PSU-10i (Biosan)

Počítačka buněk Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer (Beckman coulter life sciences)

Stolní mikrocentrifuga FLV-2400N (Biosan)

Temperovaná třepačka Thermo Mixer C (Eppendorf)

Termoblok Dry bath incubator (Major science)

Vodní lázeň (Mettler)

Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

Výrobník ledu

Zobrazovací a dokumentační systém ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad)

4.4 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie byly kultivovány v živném médiu DMEM high glucose s 10% FBS a 1% směsí antibiotik penicilin, streptomycin v kultivačních lahvích (75 cm²) v inkubátoru při 37 °C. 2–3× týdně byly buňky pasážovány – po odsátí živného média byly promyty 2 ml PBS, při 37 °C 5 min trypsinizovány v 1 ml trypsinu (TrypLE Express), který byl následně neutralizován 9 ml živného média. V kultivační láhvi byl ponechán požadovaný objem buněčné suspenze, ke kterému bylo přidáno živné médium pro doplnění na 10 ml. Všechny používané chemikálie byly před prací s živými buňkami ohřáté na 37 °C ve vodní lázni a pracovalo se za sterilních podmínek v laminárním boxu.

4.5 Počítání buněk s použitím Vi-CELL

Do vialky bylo odebráno 500 µl dobře promíchané buněčné suspenze a vialka byla vložena do přístroje Vi-CELL. Z přístroje byl odečten počet živých buněk v 1 ml buněčné suspenze.

4.6 RNA interference

24 h před siRNA transfekcí byl nasazen takový počet buněk, aby v den transfekce byly z 50 % až 70 % konfluentní. Na každou z Petriho misek o průměru 6 cm bylo nasazeno přibližně 700 000 buněk napipetováním homogenní buněčné suspenze příslušné buněčné linie (U2OS, RPE1) v 5 ml média DMEM high glucose obsahujícího 10 % FBS a 1 % směsi penicilin, streptomycin. V den experimentu byla připravena mikrozkuhavka obsahující 500 μ l OPTIMEM a 10 μ l Lipofectaminu RNAiMAX a druhá mikrozkuhavka obsahující 500 μ l OPTIMEM a 2 μ l kontrolní siRNA (siCon) o koncentraci 20 μ mol \cdot l⁻¹. Po 5 min byly obsahy těchto mikrozkuhovek smíchány a inkubovány 15 min při laboratorní teplotě. Stejným postupem byla připravena transfekční směs obsahující siRNA pro p21 (sip21) nebo TICRR (siTICRR). Z Petriho misek byly odebrány 3 ml média a do každé misky bylo přidáno po 1 ml transfekční směsi pro siCon, sip21, nebo siTICRR. Po 8 hodinách bylo vyměněno kultivační médium a po 24 h byly buňkami porostlé Petriho misky (siCon, sip21, siTICRR) trypsinizovány a rozděleny na další dvě Petriho misky – jedna miska byla určena pro přípravu celobuněčných lyzátů, ve druhé misce byla rozmístěna mikroskopická sklíčka pro následnou imunofluorescenci. Po 48–72 hodinách od transfekce byly buňky fixovány, nebo lyzovány. Použité siRNA jsou uvedeny v tab. 4. Pro transfekci TICRR byla použita směs tří siRNA (viz tab. 4).

Tab. 4: Použité siRNA

siRNA	siRNA ID	Sekvence
siCon	AM4635	5'-AGUACUGCUUACGAUACGGTT-3'
sip21	s416	5'-GCACCCUAGUUCUACCUCATT-3'
siTICRR 1#	s40362	5'-GUACCUCUCUUGAAACGAATT-3'
siTICRR 2#	s40361	5'-CAGAUGUUGUGGAUAGUAUTT-3'
siTICRR 3#	s40363	5'-GACUCACCAUUGGAUUCAATT-3'

4.7 Inhibice p21 s použitím UC2288

24 h před použitím p21 inhibitoru UC2288 bylo na každou ze tří Petriho misek o průměru 6 cm vysazeno 700 000 buněk v 5 ml živného média DMEM high glucose obsahujícího 10 % FBS a 1 % směsi penicilin, streptomycin. Další den byl do dvou misek přidán p21 inhibitor UC2288 o výsledných koncentracích 10 μ mol \cdot l⁻¹ a 30 μ mol \cdot l⁻¹. Buňky ve třetí misce sloužily jako negativní kontrola (Mock). Petriho misky s buňkami byly 24 h kultivovány při 37 °C v inkubátoru. Po 24 h byly buňky lyzovány.

4.8 Kvantitativní stanovení koncentrace proteinů pomocí Pierce Detergent Compatible Bradford Assay

Do jamek 96 jamkové mikroděstičky bylo napipetováno po 10 μ l deionizované vody, standardů Pre-diluted protein assay standards: BSA set, nebo 2 \times ředěného (v ddH₂O) vzorku lyzovaných proteinů – vše ve třech opakováních. Do každé jamky bylo přidáno 300 μ l Pierce Detergent Compatible Bradford Assay Reagent zahřátého na laboratorní teplotu a obsah jamky byl propipetován. Vzorky byly inkubovány 10 min při laboratorní teplotě. Spektrofotometrem Tecan Infinite MP200PRO byly při 595 nm stanoveny absorbance blanku (deionizované vody), všech standardů a příslušných vzorků. Z hodnot absorbancí byla v programu Microsoft Excel sestavena kalibrační křivka a byly vypočítány koncentrace proteinů ve vzorcích.

4.9 Western blotting a příprava polyakrylamidových gelů

Pro elektroforetickou separaci proteinů za denaturujících podmínek byly používány 10% a 8% polyakrylamidové gely. Všechny složky dělicího gelu byly v digestoři smíchány (viz tab. 5), napipetovány mezi dvě skla a převrstveny několika kapkami isopropanolu. Po ztuhnutí byl odstraněn izopropanol a prostor mezi skly byl promyt deionizovanou vodou. Smícháním příslušných složek byl připraven zaostřovací gel (viz tab. 6), který byl napipetován mezi skla na vrstvu dělicího gelu. Ihned po napipetování zaostřovacího gelu byl mezi skla vložen hřebínek. Pro pozdější využití byly gely po ztuhnutí uchovávány v navlhčeném ubrousku s elektrodoým pufrem v lednici při 4 °C.

Tab. 5: Příprava 10% a 8% dělicího polyakrylamidového gelu

	10% dělicí gel [ml]	8% dělicí gel [ml]
Celkový objem	5	5
ddH ₂ O	2	2,3
30% Akrylamid / Bis solution 29:1	1,7	1,3
Tris 1,5 mol·l ⁻¹ (pH 8,8)	1,3	1,3
10% SDS	0,05	0,05
10% APS	0,05	0,05
TEMED	0,002	0,003

Tab. 6: Příprava zaostřovacího polyakrylamidového gelu

	Zaostřovací gel [ml]
Celkový objem	3
ddH ₂ O	2,1
30% Akrylamid / Bis solution 29:1	0,5
Tris 0,5 mol·l ⁻¹ (pH 6,8)	0,38
10% SDS	0,03
10% APS	0,03
TEMED	0,003

Buňky konfluentní ze 70 % až 90 % na Petriho miskách o průměru 6 cm byly 1× promyty studeným PBS (4 °C). Celobuněčné extrakty byly připraveny ve 100–350 µl LSB za krouživých pohybů Petriho miskou, odpipetovány do mikrozkušavek a 5 min povařeny při 95 °C v termobloku. Buněčné lyzáty byly elektroforeticky separovány v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) při proudu 20 mA na 1 gel v elektrodevém pufru (přibližně 1 hod a 30 min). Do každé jamky bylo nanášeno stejné množství vzorků (13–15 µl v závislosti na koncentraci proteinů a velikosti jamek). Jako marker molekulových hmotností byl použit Precision plus protein dual color standard (4 µl do jamky). Proteiny z gelu byly přebírány na nitrocelulosovou membránu (Bio-Rad) při napětí 12 V (45 min). Proteiny na nitrocelulosové membráně byly vizualizovány pomocí barvicího roztoku Ponceau S a poté 3× promyty deionizovanou vodou. Následně byly nitrocelulosové membrány blokovány 1 h v 5% mléku v TBS s 0,1% Tween-20 na orbitální třepačce při pokojové teplotě a inkubovány s primární protilátkou v 5% mléku v TBS s 0,1% Tween-20 přes noc v lednici (4 °C). Další den byly membrány 3× promyty v TBS s 0,1% Tween-20 a inkubovány 1 h za pokojové teploty se sekundární protilátkou označenou křenovou peroxidázou ředěnou v 5% mléku v TBS s 0,1% Tween-20. Po opětovném promývání v TBS s 0,1% Tween-20 (3× po 5 min) byl na membrány napipetován chemiluminiscenční substrát (SuperSignal west pico plus chemiluminescent substrate a SuperSignal west femto plus chemiluminescent substrate) křenové peroxidázy. Signál detekovaných proteinů byl měřen chemiluminiscenčně za použití zobrazovacího a dokumentačního systému ChemiDoc XRS+ a softwaru Image Lab. Použité protilátky jsou uvedeny v tab. 7.

4.10 Imunofluorescence

Buňky nasazené na mikroskopických sklíčkách o průměru 13 mm v Petriho misce byly na ledu 1× promyty PBS vychlazeným na 4 °C. Pouze pro vizualizaci proteinu RPA32 byla před fixací provedena preextrakce buněk 0,2% Tritonem X (5 min) a sklíčka byla 3× promyta studeným PBS (4 °C). Buňky určené pro pozorování proteinů γ H2AX a 53BP1 preextrahovány nebyly. Buňky byly 15 min fixovány 4% PFA při teplotě 4 °C, permeabilizovány 0,5% tritonem X (5 min za pokojové

teploty), 3× promyty PBS a 1 h blokovány v roztoku DMEM high glucose + 10% FBS + 0,02% azid sodný při pokojové teplotě. Následně byly přes noc inkubovány s primární protilátkou v lednici (4 °C). Další den byla sklíčka s buňkami 4× promyta PBS a inkubována s Alexa Fluor 568 nebo 488 konjugovanou sekundární protilátkou 1 h ve tmě při pokojové teplotě (viz tab. 7). Všechny protilátky byly ředěné v roztoku DMEM high glucose + 10% FBS + 0,02% azid sodný. Po inkubaci byla sklíčka 3× promyta PBS a pro vizualizaci DNA byl na 5 min přidán Hoechst 33342 (Molecular probes) ředěný v PBS v poměru 1:1000 (ve tmě), poté PBS (5 min, ve tmě) a sklíčka byla promyta ddH₂O. Po vysušení byla sklíčka přenesena na kapku montovacího média Vectashield (Vector Laboratories) na podložním sklíčku (buňkami směrem dolů). Buněčná jádra byla nafocena na mikroskopu ScanR a analyzována pomocí ScanR Analysis. Získaná data byla zpracována v programu GraphPad Prism 8.

Tab. 7: Seznam použitých protilátek

Antigen	Původ	Dodavatel	Katalogové číslo	Ředění
primární protilátky (western blotting)				
Chk1	myš	Santa Cruz	sc-8408	1:500
fosorylovaný Chk1 S317	králík	Cell Signaling	2344S	1:250
Chk2	myš	Santa Cruz	sc-5278	1:500
fosorylovaný Chk2 T68	králík	Cell Signaling	2661S	1:500
p21	králík	Cell Signaling	2947	1:1000
PARP1	myš	Santa Cruz	sc-8007	1:1000
RPA32	myš	Abcam	ab2175	1:500
fosorylovaný RPA32 S4/S8	králík	Bethyl	A300-245A	1:500
fosorylovaný RPA32 T21	králík	Abcam	ab61065	1:500
SMC1	králík	Abcam	ab9262	1:1000
Treslin	králík	Division of Biology 147-75 California Institute of Technology Pasadena, CA 91125, USA (Kumagai et al, 2010)		1:200
β-actin	myš	Santa Cruz	sc-47778	1:500
γH2AX	myš	Millipore	05-636	1:500
primární protilátky (imunofluorescence)				
53BP1	králík	Santa Cruz	sc-22760	1:500
RPA32	myš	Abcam	ab2175	1:200
γH2AX	myš	Millipore	05-636	1:1000
sekundární protilátky (western blotting – značené HRP)				
kozí IgG	myš	Santa Cruz	sc-2354	1:500
králíčí IgG	myš	Santa Cruz	sc-2357	1:1000

Pokračování Tab. 7: Seznam použitých protilátek

Antigen	Původ	Dodavatel	Katalogové číslo	Ředění
myší IgG	králík	Santa Cruz	sc-358914	1:1000
sekundární protilátky (imunofluorescence – Alexa Fluor 488/568 konjugované)				
králičí IgG (488)	koza	Invitrogen	A11034	1:1000
myší IgG (568)	koza	Invitrogen	A11004	1:1000

4.11 Analýza replikace a detekce fokusů EdU

K buňkám pěstovaným na sklíčkách bylo za sterilních podmínek v laminární boxu přidáno na 30 min EdU (z angl. 5-ethynyl-2'-deoxyuridine) o výsledné koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Poté byly misky s buňkami přeneseny na led, $3\times$ promyty studeným PBS (4°C), preextrahovány 5 min 0,2% Tritonem X, opět $1\times$ promyty studeným PBS (4°C) a fixovány 15 min ve 4% PFA v digestoři na ledu. Po fixaci byla sklíčka $2\times$ promyta roztokem DMEM high glucose + 10% FBS + 0,02% azid sodný a permeabilizována 20 min 0,5% Tritonem-X za pokojové teploty. Podle návodu od výrobce komerčně dodávaného kitu Click-IT® EdU Alexa Fluor 568 Imaging Assay kit (Molecular probes) byl připraven reakční koktejl obsahující $1\times$ Click-IT® reakční pufr, CuSO_4 , Alexa Fluor azid a aditivum k reakčnímu pufru. Po odstranění 0,5% Tritonu X byla sklíčka $2\times$ promyta roztokem DMEM high glucose + 10% FBS + 0,02% azid sodný, na každé sklíčko bylo nanášeno 100 μl čerstvě připraveného reakčního koktejlu a sklíčka byla 30 min ve tmě inkubována. Poté byly buňky promyty $1\times$ roztokem DMEM high glucose + 10% FBS + 0,02% azid sodný, $1\times$ PBS a inkubovány 30 min s Hoechstem 33342 v PBS (ředění 1:2000) ve tmě. Sklíčka byla promyta $2\times$ PBS, $1\times$ ddH₂O a po usušení ve tmě přenesena na kapku montovacího média Vectashield (Vector Laboratories) na podložní sklíčko (buňkami směrem dolů). Buněčná jádra byla nafocena na mikroskopu ScanR a analyzována pomocí ScanR Analysis. Ze závislosti intenzity signálu inkorporovaného EdU na intenzitě jaderného signálu byl analyzován průběh S fáze buněčného cyklu.

4.12 Kvantitativní mikroskopická analýza za použití ScanR

Kvantitativní obrazová analýza připravených vzorků byla provedena ze 150 náhodně nasnímaných polí s buňkami na mikroskopu ScanR IX81 (Olympus) s EM CCD kamerou C9100 (Hamamatsu Photonics) pomocí softwaru ScanR Acquisition. Počty fokusů opravných proteinů, inkorporace EdU a jaderný signál DNA byly kvantitativně hodnoceny pomocí ScanR Analysis (Olympus).

5 VÝSLEDKY

Jak již zminuji výše v teoretické části práce, Maya-Mendoza et al. (2018) popsal asociaci PARPi-indukovaného zvýšení rychlosti replikace se vznikem poškození DNA, aktivací opravných drah, nestabilitou genomu a změnami v průběhu S fáze buněčného cyklu. Ve stejném článku bylo publikováno, že podobně jako PARPi i siRNA transfekce p21 vede ke zvýšené rychlosti replikace, a tudíž by p21 mohl negativně regulovat rychlost replikačních vidlic. Cílem mojí bakalářské práce bylo zjistit, zda pozorovaná zvýšená rychlost replikace po siRNA transfekci p21 vede ke stejným fenotypům, jaké byly popsány v souvislosti s PARP inhibitorem a siRNA transfekcí TICRR – konkrétně zvýšená formace opravných fokusů proteinů RPA32, γ H2AX, 53BP1, změny v signalizaci odpovědi na poškození DNA, zvýšená tvorba mikrojader a změny v S fázi buněčného cyklu. Analogicky, ke snížení hladiny proteinu p21 pomocí siRNA transfekce byl k objasnění přítomnosti sledovaných fenotypů použit inhibitor p21 – UC2288.

S cílem pozorovat výše zmíněné změny v buňce při nedostatku proteinu p21 byla provedena siRNA transfekce p21 („knockdown“ p21), nebo byly buňky vystaveny na 24 h působení inhibitoru p21 UC2288. Na nádorové epiteliální buněčné linii U2OS byla siRNA transfekce p21 provedena ve dvou opakováních. Ve druhém opakování experimentu na linii U2OS byla jako pozitivní kontrola přidána již charakterizovaná siRNA transfekce TICRR. Pro následné ověření specifity sledovaných fenotypů byly experimenty opakovány na další buněčné linii – imortalizované epiteliální linii RPE-1 získané z buněk retiny. Fenotypy sledované po snížení hladiny p21 pomocí siRNA transfekce (sip21) byly srovnávány s nedávno popsanými fenotypy vyvolanými zrychlením replikace DNA (Maya-Mendoza et al., 2018) – s siRNA transfekcí Treslinu (siTICRR) v kontrastu ke kontrolní siRNA transfekci (siCon). Fenotypy pozorované v buňkách ovlivněných různými koncentracemi UC2288 byly srovnávány s p21 inhibitorem neovlivněnou kontrolou (Mock). Vzorky byly analyzovány a vyhodnoceny pomocí metody western blotting a imunofluorescence s využitím mikroskopu ScanR a následné kvantitativní analýzy.

Snížení hladiny p21 nezpůsobuje tvorbu dvouvláknových zlomů DNA a nespouští signalizaci opravných drah

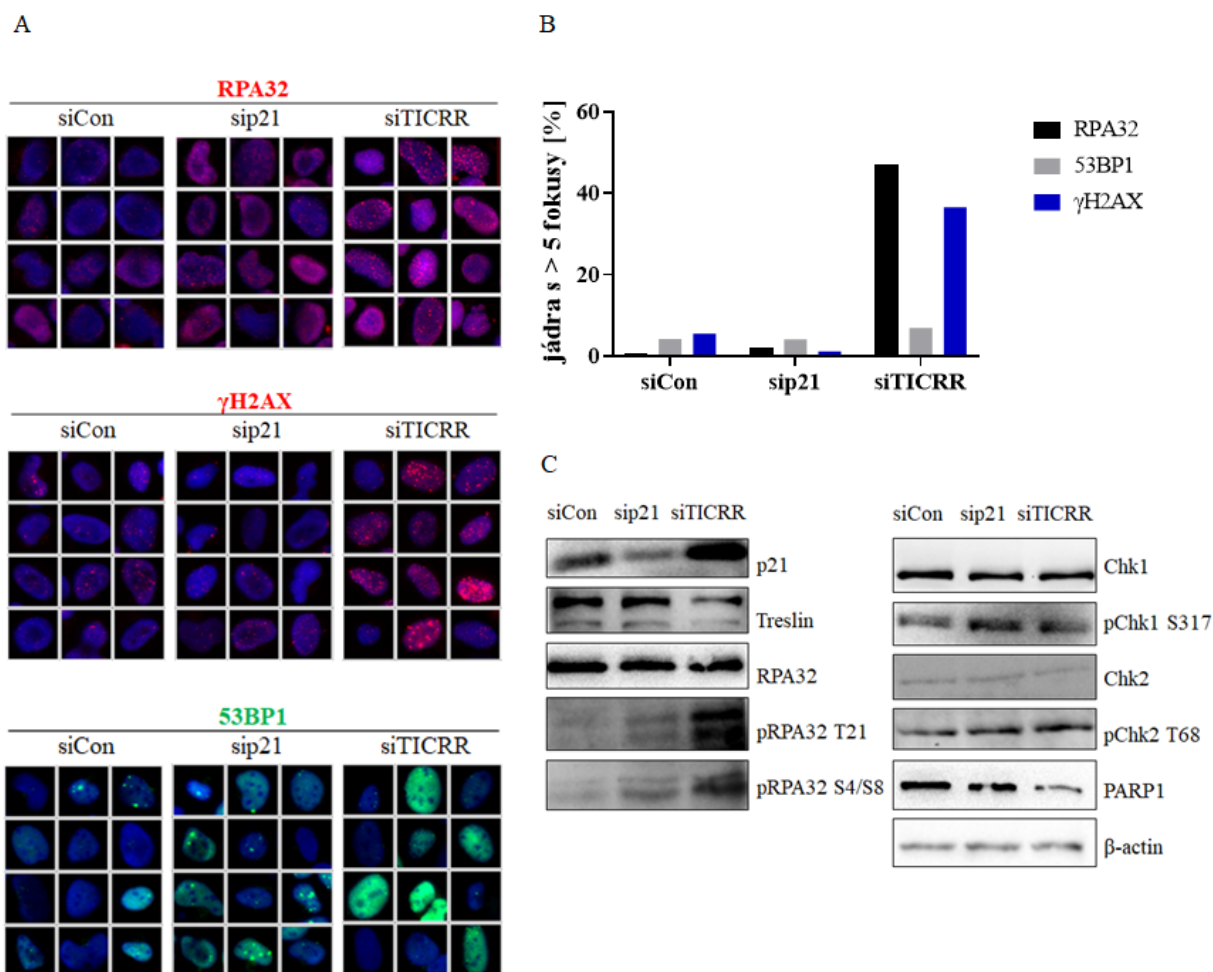
Z experimentálních dat imunofluorescence získaných pomocí ScanR analýzy je zřejmé, že siRNA transfekce p21 nezpůsobuje výrazný nárůst tvorby fokusů analyzovaných opravných proteinů (viz obr. 9A, B). Ze snímku 9A a kvantifikace jader s více než 5 fokusy opravných proteinů v grafu 9B je patrné, že po účinném „knockdownu“ p21 (viz obr. 9C) nedochází k téměř žádnému nárůstu tvorby fokusů RPA32, který se váže na jednovláknovou DNA. Stejně tak celková hladina proteinu RPA32 (viz obr. 9C) sledovaná prostřednictvím imunoblotu zůstává po „knockdownu“ p21 nezměněná. Snížení hladiny p21 tedy nemá za následek zvýšený výskyt ssDNA. Naopak, po účinné siRNA

transfekci Treslinu (viz obr. 9C) dochází k nárůstu tvorby fokusů RPA32, tedy k signalizaci replikačního stresu. Dále se po úbytku Treslinu zvedá hladina fosforylovaných forem RPA32 a to pRPA32 T21 a pRPA32 S4/S8 (viz obr. 9C) a dochází tak k aktivaci opravných drah DNA. Ve srovnání s ‚knockdownem‘ Treslinu jsou po ‚knockdownu‘ p21 fosforylované formy RPA32 jen nepatrně zvýšeny. V buňkách s nižší hladinou p21 tedy nebyla přítomná ssDNA ve zvýšené míře, což neukazuje na přítomnost replikačního stresu v důsledku zrychlení replikace indukované siRNA transfekcí p21.

Podobně jako v publikaci Maya Mendoza et al. (2018) i naše data ukazují po siRNA transfekci Treslinu významný nárůst tvorby fokusů γ H2AX, který je všeobecně uznávaný jako univerzální marker dvojvláknových zlomů DNA (viz obr. 9A, B). Naproti tomu po sip21 byl pozorován mírný úbytek fokusů fosforylovaného histonu γ H2AX (viz obr. 9A). Po snížení hladiny p21 nedochází ani ke zvýšené tvorbě fokusů dalšího opravného proteinu – 53BP1. Z mikroskopických snímků imunofluorescence je ale patrný intenzivnější signál proteinu 53BP1 v jádře po sip21, což může signalizovat zvýšenou translokaci proteinu do jádra buňky. Stejný trend byl pozorován i po úbytku Treslinu, kdy se množství 53BP1 v jádře ještě výrazněji zvyšuje a dochází také k nepatrnému zvýšení tvorby fokusů 53BP1 (viz obr. 9A, B). Tato data ukazují, že v kontrastu k úbytku Treslinu nedostatek proteinu p21 v buňce nezpůsobuje akumulaci dvouvláknových zlomu DNA, na které se vážou proteiny γ H2AX a 53BP1 účastníci se signalizace poškození DNA a její opravy.

Pokles hladiny p21 dále vyvolal mírné zvýšení fosforylovaného Chk1 S317 a Chk2 T68 podobně jako již bylo popsáno v případě siTICRR (Maya-Mendoza et al., 2018). Fosforylované formy proteinů Chk1 a Chk2 jsou signálem k zastavení buněčného cyklu a můžou poukazovat na problém během replikace DNA. Nedostatek Treslinu měl podle imunoblotu za následek úbytek PARP1 a zajímavý je současný významný nárůst p21 (viz obr. 9C).

U2OS



Obr. 9: Snížení hladiny proteinu p21 u linie U2OS neaktivuje opravné dráhy DNA

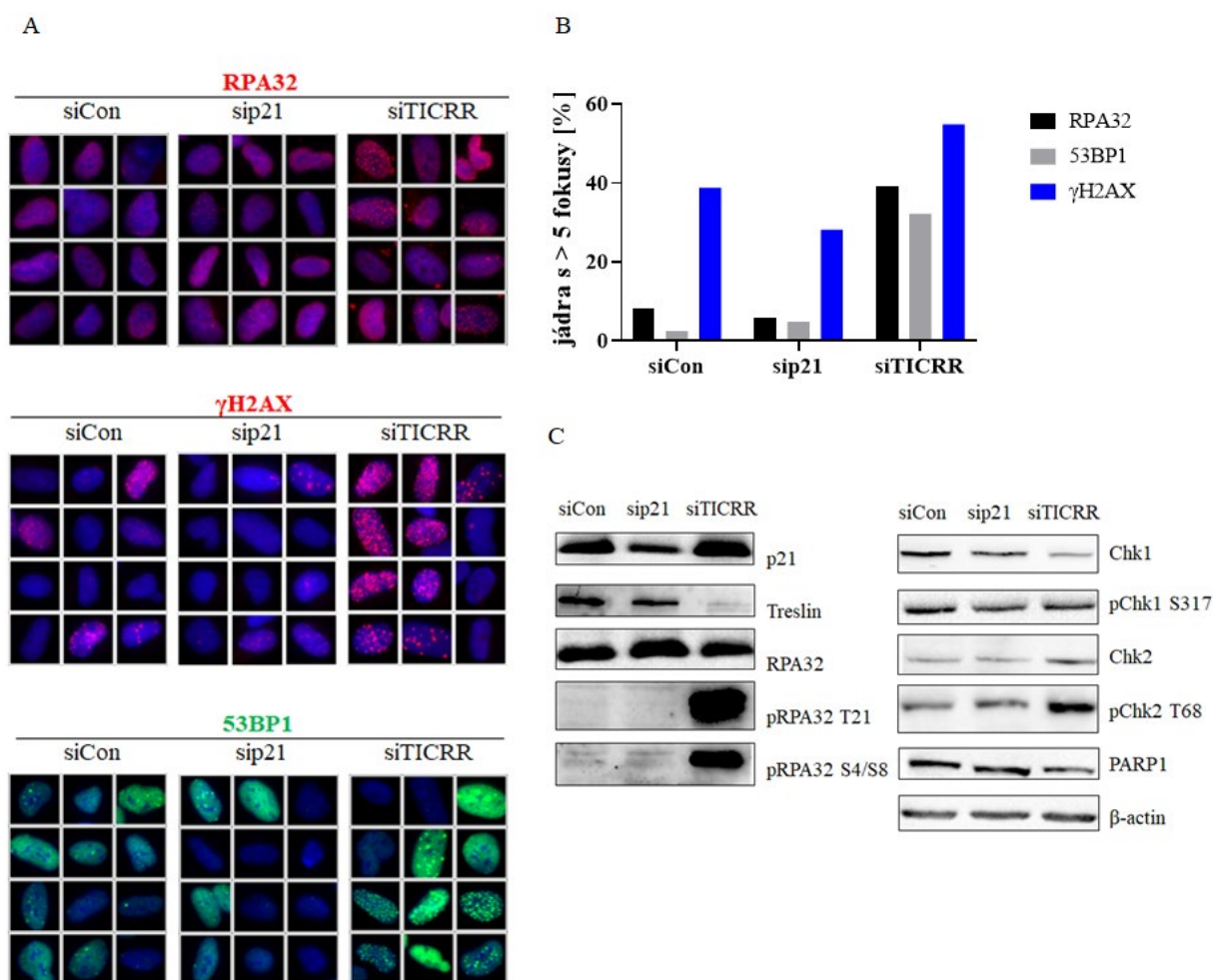
A: Tvorba fokusů opravných proteinů. Srovnání kontrolního vzorku (siCon), siRNA transfekce p21 (sip21) a siRNA transfekce TICRR (siTICRR). Snímky byly zhotoveny na mikroskopu ScanR a kvantitativně analyzovány pomocí ScanR analýzy. **B:** Graf srovnávající procentuální podíl jader, ve kterých se formovalo více než 5 fokusů opravných proteinů v siCon a ve vzorcích sip21 a siTICRR. Hodnoty byly získány ze ScanR analýzy. **C:** Srovnání hladiny proteinů signalizujících odpověď na poškození DNA v siCon, sip21 a siTICRR. β -actin slouží jako kontrola nanesení stejného množství proteinů.

S cílem ověřit, zda jsou pozorované fenotypy po sip21 u nádorové linie U2OS stejné i u nenádorové primární linie, experimenty byly provedeny s epitelálními buňkami sítnice RPE1. Počet jader s více než pěti fokusy RPA32 po transfekci p21 zůstal u buněčné linie RPE1 téměř nezměněný stejně jako v experimentu na linii U2OS. Podobně jako u U2OS byl u linie RPE1 po snížení hladiny p21 zaznamenán mírný pokles tvorby fokusů γ H2AX (viz obr. 10A, B). Vlivem nedostatku Treslinu v buňkách RPE1 byla zvýšena tvorba fokusů všech tří analyzovaných opravných proteinů. Tento efekt byl pozorován u proteinů RPA32 a γ H2AX i v buňkách U2OS, avšak počet fokusů 53BP1 u U2OS

zůstává přibližně stejný pro siCon, sip21 i siTICRR. Kromě toho, že u linie RPE1 se tvoří po siTICRR výrazně více fokusů 53BP1, dochází také ke zvýšení celkového signálu 53BP1 uvnitř jádra stejně jako u U2OS. (viz obr. 10A, B).

V linii RPE1 siRNA transfekce p21 téměř neovlivňuje množství jednotlivých proteinů signalizujících poškození DNA. S úbytkem Treslinu byl protein RPA32 fosforylován ještě intenzivněji než v případě U2OS. Dále byl u RPE1 pozorován významný nárůst hladiny fosforylovaného Chk2 T68 signalizující změny v průběhu buněčného cyklu podobně jako v linii U2OS. „Knockdown“ p21 způsobil mírný úbytek Chk1 a fosforylovaného Chk1 S317. Vzhledem k tomu, že byla tlumena exprese negativního regulátoru buněčného cyklu je pochopitelné, že dochází ke změnám v regulaci kontrolních bodů – „checkpointů“ buněčného cyklu. Nicméně nárůst pChk1 S317 a pChk2 T68, který je spojován s siTICRR u U2OS, v nenádorových buňkách RPE1 pozorován nebyl. Stejně jako v buňkách U2OS byl vlivem siRNA transfekce Treslinu zaznamenán úbytek PARP1 a současný nárůst p21. (viz obr. 10C).

RPE1



Obr. 10: siRNA transfekce p21 nevede k aktivaci opravných drah DNA ani u linie RPE1

A: Tvorba fokusů opravných proteinů. Srovnání kontrolního vzorku (siCon), siRNA transfekce p21 (sip21) a siRNA transfekce TICRR (siTICRR). Snímky byly nafoceny pomocí mikroskopu ScanR a analyzovány s využitím ScanR analýzy. **B:** Graf srovnávající procentuální podíl jader, kde se formovalo více než 5 fokusů opravných proteinů v siCon, sip21 a siTICRR. Hodnoty byly získány ze ScanR analýzy. **C:** Imunoblotty proteinů signalizujících poškození DNA pro siCon, sip21 a siTICRR. β -actin slouží jako kontrola nanesení stejného množství proteinů.

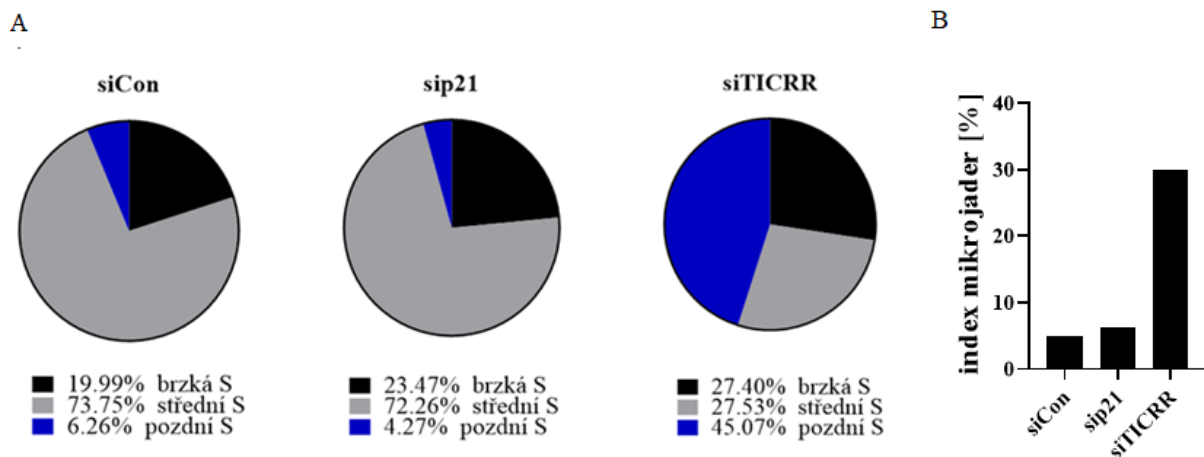
Nedostatek proteinu p21 nezpůsobuje akumulaci buněk v pozdní S fázi a nevede k nestabilitě genomu

S cílem sledovat změny v buněčném cyklu byly buňky po siCon, sip21 a siTICRR značeny thymidinovým analogem EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin). EdU se inkorporuje do DNA během její replikace – tedy v S fázi buněčného cyklu. Na základě ScanR analýzy, kde byla hodnocena intenzita jaderné DNA a intenzita signálu inkorporovaného EdU, byla zjištěna distribuce buněk v rámci S fáze buněčného cyklu. V distribuci buněk linie U2OS v rámci S fáze byly pozorovány

poměrně nevýrazné odchylky mezi kontrolou a sip21 (viz obr. 11A). V buňkách s ‚knockdownem‘ p21 nebyla pozorována akumulace buněk v pozdní S fázi – fenotyp asociovaný se zrychlením replikace. Naproti tomu úbytek Treslinu v buňkách U2OS způsobuje výrazné změny v průběhu S fáze, kdy dochází také k hromadění buněk v pozdní S fázi (viz obr. 11A).

Problémy během S fáze a mitózy mohou podněcovat vznik mikrojadér jako jednoho z markeru genomové nestability. Nestabilita genomu byla v našich experimentech hodnocena pomocí kvantifikace mikrojadér, která se formovala v blízkosti buněčných jader. Jaderná DNA byla barvela Hoechstem 33342 a pomocí ScanR analýzy byly kvantifikovány předdefinované malé objekty poblíž jader pozitivní na Hoechst 33342. Snížení hladiny Treslinu vyvolává nárůst tvorby mikrojadér – poměr mikrojadér ku celkovému počtu jader byl 30 %. Tento zvýšený výskyt mikrojadér, a tedy ani nestabilita genomu po poklesu hladiny proteinu p21 ale pozorovány nebyly (viz obr. 11B). To je v souladu s výše zmíněnými daty, která neukazují na poškození DNA a vznik dvouvláknových zlomů v důsledku úbytku p21.

U2OS

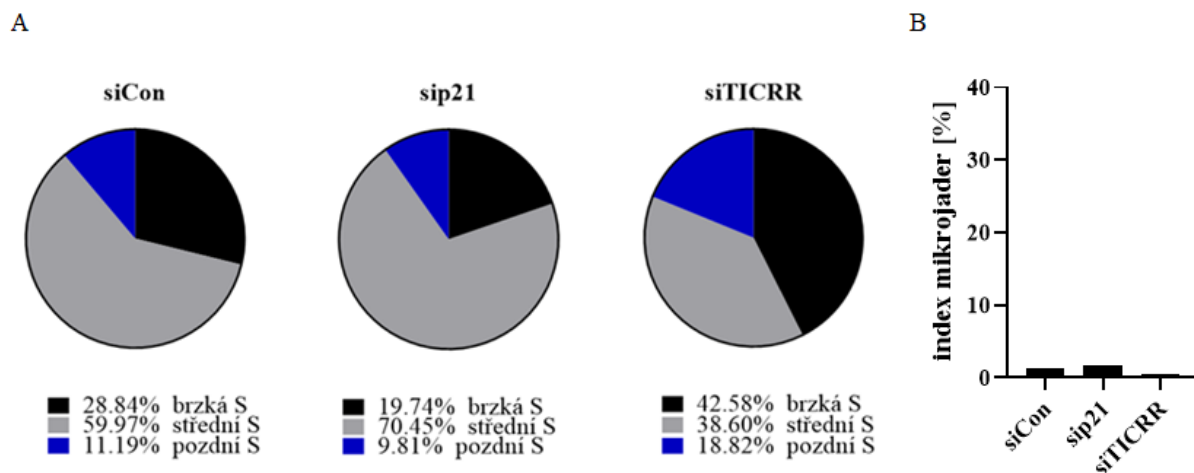


Obr. 11: siRNA transfekce p21 u linie U2OS nezpůsobuje výrazné změny v buněčném cyklu ani zvýšenou tvorbu mikrojadér

A: Rozložení buněk v S fázi buněčného cyklu. **B:** Srovnání tvorby mikrojadér. Data byla získána po nafocení jader a ScanR analýze.

V kontrastu s působením ‚knockdownu‘ Treslinu na S fázi v linii U2OS úbytek Treslinu v buňkách RPE1 vede k jejich akumulaci v brzké S fázi, nikoli v pozdní. Nedostatek klíčového regulátoru buněčného cyklu p21 může mít za následek změny během S fáze, avšak ani tyto změny nejsou příliš výrazné (viz obr. 12A). Tvorba mikrojadér po ‚knockdownu‘ p21, podobně jako v nádorové linii U2OS, ovlivněna nebyla. Avšak v porovnání s U2OS nedochází v linii RPE1 ke zvýšenému výskytu mikrojadér ani po ‚knockdownu‘ TICRR (viz obr. 12B).

RPE1



Obr. 12: siRNA transfekce p21 a změny v buněčném cyklu v buňkách RPE1

A: Distribuce buněk v rámci S fáze. **B:** Tvorba mikrojadér po siRNA transfekci p21. Data byla získána po nafocení jader na mikroskopu s využitím ScanR analýzy.

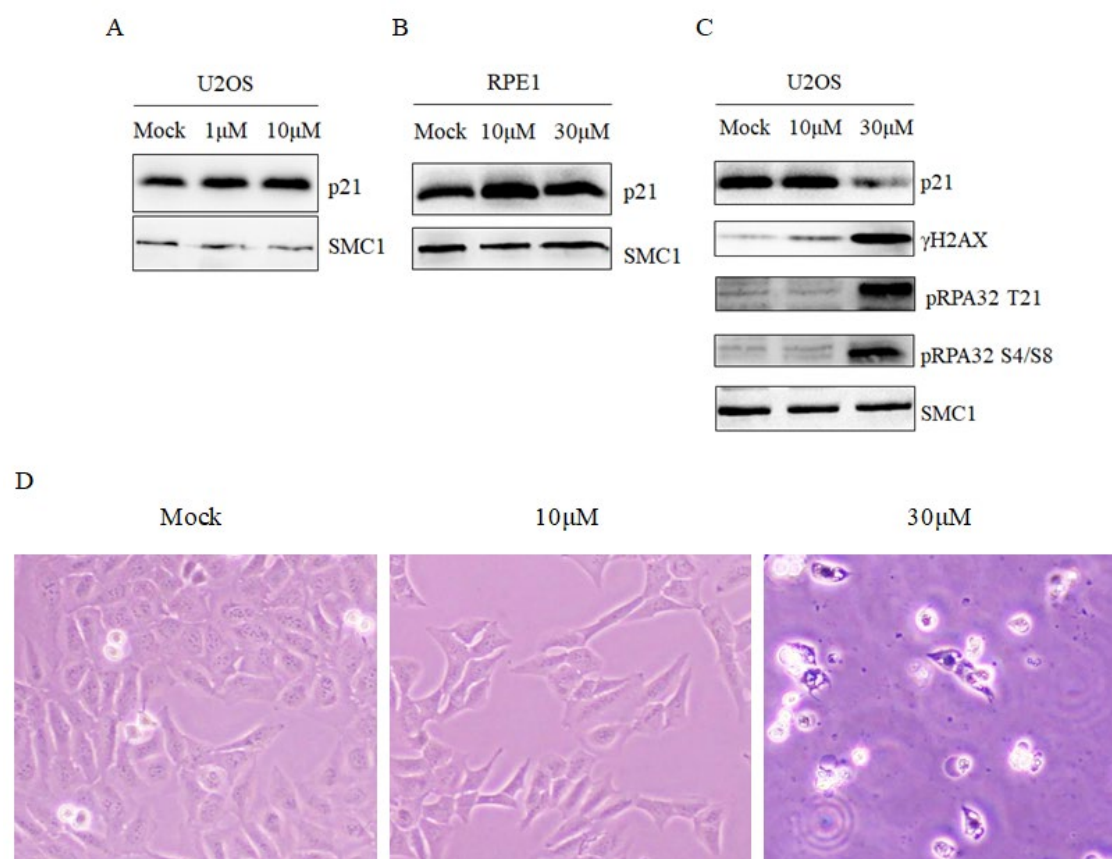
Inhibitor p21-UC2288 má na buňky U2OS i RPE1 výrazně toxický efekt

S cílem ověřit sledované fenotypy po snížení hladiny proteinu p21 pomocí siRNA transfekce i dalším způsobem, byly buňky U2OS i RPE1 vystaveny inhibitoru p21 UC2288.

Wettersten et al. (2013) publikovali článek o novém inhibitoru p21 UC2288, který syntetizovali, a který snižuje expresi p21 mRNA bez ovlivnění stability proteinu p21 (Wettersten et al., 2013). Autoři studie testovali p21 inhibitor na několika buněčných liniích: HK2 (primární epiteliální buněčná linie odvozená od buněk proximálních tubulů lidských ledvin), 786-O (karcinom ledviny), Caki-1 (světlobuněčný karcinom ledviny), ACHN (metastatický renální karcinom) a HEY (karcinom epitelu vaječníku). Buněčné linie byly ovlivněny p21 inhibitorem UC2288 po dobu 24 h a snížení hladiny p21 bylo pozorováno pomocí western blotu při koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

p21 inhibitor UC2288 jsme nejprve testovali na buněčné linii U2OS. Buňky byly po dobu 24 h vystaveny UC2288 o koncentracích $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Při těchto koncentracích ale nebyl pozorován žádný efekt inhibitoru na množství proteinu p21 (viz obr. 13A). Ke zvýšení potenciálního

efektu UC2288, byl experiment s U2OS opakován za použití vyšších koncentrací UC2288 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a zároveň byl p21 testován i na další buněčné linii – RPE1. p21i dosahoval při koncentraci $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vysoké toxicity, kdy byl pozorován enormní úbytek živých buněk (viz obr. 13D). U linie RPE1 nebylo ani působením p21 inhibitoru o koncentraci $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dosaženo snížení hladiny p21 (viz obr. 13B). V buňkách U2OS použitím UC2288 o koncentraci $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ již k poklesu p21 došlo. V těchto buňkách vzrostla hladina γH2AX a fosforylovaných forem RPA32 – pRPA32 T21, pRPA32 S4/S8 (viz obr. 13C). Na rozdíl od buněčných linií sledovaných v publikaci Wettersten et al. (2013) je použití inhibitoru UC2288 o koncentracích $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro analyzované linie U2OS a RPE1 toxické. Extrémní snížení životaschopnosti buněk bylo pozorováno v kulturách obou použitých buněčných linií po přidání UC2288 o koncentraci $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na 24 h. Ve srovnání s kontrolou, kde jsou buňky U2OS konfluentní, dochází působením UC2288 po 24 h ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) k jejich úbytku. Při vyšší koncentraci UC2288 ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), bylo po 24 h dno focené misky téměř bez buněk a pozorovali jsme zde především mrtvé buňky plavající v médiu (viz obr. 13D). Z těchto důvodů nebyl UC2288 dále používán v dalších experimentech pro ověření pozorovaných fenotypů popsaných výše pro sip21.



Obr. 13: p21 inhibitor UC2288 je pro buňky toxický

A: Účinek UC2288 na hladinu p21 v buňkách U2OS ovlivněných 24 h UC2288 o koncentracích $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ p21 inhibitor) ve srovnání s kontrolou (Mock). **B:** Účinek UC2288 o koncentracích $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$) na linii RPE1. **C:** Účinek

koncentrací $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ UC2288 na buněčnou linii U2OS. SMC1 slouží jako kontrola naneseného množství proteinů. **D:** Srovnání buněčných kultur U2OS neovlivněných p21 inhibitorem a po působení UC2288 o koncentracích $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

6 DISKUZE

Pojem replikační stres zahrnuje odchylky od správného průběhu replikace. Obecně bylo přijímáno, že RS je způsobený zpomalením nebo zastavením replikačních vidlic (Zeman et Cimprich, 2014). Stejně tak se předpokládalo, že citlivost buněk k PARP inhibitorům je navozená zpomalením a případným zastavením replikace DNA (Bryant et al., 2005). V kontrastu s těmito předpoklady je studie Maya-Mendoza et al., (2018), podle které je příčinou replikačního stresu také vysoká rychlost replikace DNA. Podle současného modelu působení PARPi vede inhibice PARP ke zrychlení replikačních vidlic, což má za následek replikační stres. Zrychlenou replikací indukovaný replikační stres pak vede k tvorbě dvouvláknových zlomů DNA a nestabilitě genomu (Maya-Mendoza et al., 2018). Avšak nejnovější studie Cong et al. (2019), Nayak et al. (2019) a Panzarino et al. (2021) popisují zcela nový fenomén, který jako příčinu senzitivity k PARPi uvádí vznik jednovláknových mezer na DNA (ssDNA gaps). Data Cong et al. (2019) naznačují, že samotné zrychlení replikace není dostatečné k vyvolání senzitivity buněk k PARPi. Autoři popisují zvýšenou tvorbu jednovláknových mezer po PARPi právě v BRCA1-deficitních buňkách (Cong et al., 2019). Z literatury je známo, že tvorba jednovláknových mezer DNA může být potlačena translézní syntézou (Goodman, 2002; Rattray et Strathern, 2003), kdy TLS polymerázy dosyntetizují jednovláknové mezery a chrání tak buňku před jejich genotoxickým účinkem (Nayak et al., 2019).

Inhibice PARP i siRNA transfekce TICRR mají za následek zrychlení replikace DNA, tvorbu dvouvláknových zlomů, mikrojadér a akumulaci buněk v pozdní S fázi buněčného cyklu (Maya-Mendoza et al., 2018). Stejně tak snížení hladiny p21 vede k výraznému zrychlení replikačních vidlic (Maya-Mendoza et al., 2018). V kontrastu s fenotypy pozorovanými po PARPi (Maya-Mendoza et al., 2018) nebo siTICRR nebylo v našich experimentech vlivem siRNA transfekce p21 pozorováno zvýšení formace fokusů RPA32, γ H2AX ani 53BP1, které by ukazovaly na přítomnost poškození DNA a aktivaci opravných drah. Na rozdíl od PARPi (Maya-Mendoza et al., 2018) a siTICRR pokles hladiny p21 nevyvolal ani vznik mikrojadér nebo změny v zastoupení buněk v S fázi. Přestože nedostatek p21 vyvolává zvýšení replikační rychlosti, fenotypy spojované se zvýšenou replikační rychlostí vlivem PARPi nebo siTICRR nebyly pozorovány. Možným vysvětlením může být role p21 během aktivace enzymů translézní syntézy – translézních DNA polymeráz. p21 negativně reguluje TLS zabráněním ubikvitinace PCNA, která je potřebná pro vazbu translézních polymeráz na DNA (Mansilla et al., 2016). Ubikvitinací PCNA je umožněna vazba alternativních DNA polymeráz (pol η , pol ι , pol κ , REV1, pol ζ , pol θ a pol ν), které katalyzují syntézu DNA přes léze (Vaisman et Woodgate, 2017).

Vlivem snížení p21 by mohla být umožněna ubikvitinace PCNA a následná aktivace translézních DNA polymeráz. Těmito alternativními polymerázami by byly v buňkách s nedostatkem p21 dosyntetizované rozsáhlé jednovláknové mezery DNA a nedocházelo by tak k akumulaci

jednovláknových mezer DNA, ke vzniku poškození DNA a nestabilitě genomu, jako bylo popsáno u PARPi a siTICRR. Naše hypotéza koreluje i s nedávnou studií Cong et al. (2019), ve které autoři ukazují signifikantní úbytek počtu jednovláknových mezer DNA v linii U2OS po snížení hladiny p21 prostřednictvím shRNA (z angl. short hairpin) pro p21. V souladu s naší hypotézou je i studie Nayak et al. (2019), kde autoři popisují v buňkách U2OS ovlivněných hydroxymočovinou pokles výskytu ssDNA po shp21 ve srovnání s buňkami ovlivněných samotnou hydroxymočovinou, která vede ke zvýšenému výskytu ssDNA.

Stejně jako ve studii Maya-Mendoza et al., (2018) byla u linie U2OS s tlumenou expresí TICRR pozorována výrazná tvorba mikrojadér ukazující na nestabilitu genomu – index mikrojadér vzrostl z přibližně 5 % u siCon na 30 % u siTICRR. Avšak nenádorová linie RPE1 po siRNA transfekci TICRR nárůst vzniku mikrojadér nevykazovala. Nádorové buňky mají pravděpodobně vyšší index mutagenity a různé chromozomové přestavby se u nich mohou projevit rychleji. Je tedy možné, že se v buňkách RPE1 efekt siTICRR na nestabilitu genomu v pozorovaném čase nestihl projevit. S našimi dosavadními výsledky koreluje také distribuce buněk v rámci S fáze buněčného cyklu. Na rozdíl od popsané akumulace buněk v pozdní S fázi asociované se zrychlenou replikací DNA indukovanou ‚knockdownem‘ Treslinu se distribuce buněk v jednotlivých částech S fáze po úbytku p21 téměř nemění, což neukazuje na stejné problémy s poškozením DNA a s tím spojenou buněčnou odpovědí jako u siTICRR.

Vlivem úbytku Treslinu v buňkách U2OS i RPE1 významně vzrostlo množství p21. To by mohlo souviset se současným poklesem PARP1 u buněk s siRNA transfekcí TICRR. PARP1 inhibuje p21 a je i korepresorem genu CDKN1A (Maya-Mendoza et al., 2018). V důsledku snížení hladiny Treslinu klesá v buňce přítomnost PARP1. Transkripce CDKN1A by tak nebyla PARP1 inhibována a p21 by byl bez negativní regulace PARP1 zvýšeně exprimován. Dalším vysvětlením může být reakce na přítomnost buněčného stresu v buňkách po siTICRR.

Na rozdíl od Wettersten et al. (2013) jsme použitím p21 inhibitoru UC2288 o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nedosáhli poklesu hladiny proteinu p21. Působením UC2288 o koncentraci $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byla hladina p21 u linie U2OS snížena, nicméně tato koncentrace byla pro buňky vysoce toxická a nebylo možné ji použít při dalších experimentech. V buňkách U2OS ovlivněných UC2288 o koncentraci $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ došlo k nárůstu proteinů γH2AX , pRPA32 T21 a pRPA32 S4/S8. Tyto fenotypy nebyly pravděpodobně způsobeny specifickým účinkem nedostatku p21, ale celkovou cytotoxicitou p21 inhibitoru, kdy byli zlyzováni a analyzováni spíše apoptotické nebo již mrtvé buňky. Wettersten et al. (2013) testovali p21 inhibitor na několika buněčných liniích, mezi kterými nebyly zařazeny U2OS ani RPE1. Pro ověření námi pozorovaných fenotypů po siRNA transfekci p21 by bylo vhodné použít inhibitor p21, který funguje na liniích U2OS a RPE1, nebo provedené experimenty zopakovat také na liniích, na kterých funguje UC2288.

K lepšímu objasnění a pochopení naší hypotézy o asociaci p21 se zvýšenou rychlostí replikace a současné absenci dříve popsaných fenotypů (Maya-Mendoza et al., 2018) by mohly přispět další experimenty. Detekce ubikvitinace PCNA (tj. podmínky pro aktivaci TLS) v buňkách s sip21, siTICRR a v buňkách ovlivněných PARPi by přispěla k vysvětlení závislosti fenotypů asociovaných se zvýšenou rychlostí replikace na aktivaci translézní syntézy. Podle našich pozorování a současných prací zmíněných výše by k ubikvitinaci PCNA, a tedy i k aktivaci TLS, mělo docházet pouze v případě sip21. Zároveň by k potvrzení naší teorie mohl sloužit i experiment, kde by byla pomocí imunofluorescence nebo immunoblotu sledována hladina translézní polymerázy po sip21, siTICRR a PARPi. K dalšímu potvrzení našich předpokladů by mohly analogicky k již výše popsaným experimentům přispět také experimenty s funkčním inhibítozem p21, který by bez extrémní toxicity vedl k významnému poklesu hladiny p21.

7 ZÁVĚR

V teoretické části této práce jsem popsala proces replikace DNA, význam regulace její rychlosti v souvislosti s proteinem PARP1 a roli proteinu p21 v replikaci DNA.

S použitím siRNA pro p21 byly sledovány fenotypy navozené v důsledku nedostatku proteinu p21. Účinek siRNA transfekce p21 byl hodnocen pomocí western blottingu a imunofluorescence s kvantitativní ScanR analýzou.

Přestože podle Maya-Mendoza et al. (2018) dochází vlivem snížení hladiny proteinu p21 ke zrychlení replikace DNA stejně jako po siRNA transfekci Treslinu nebo PARP inhibici, v souvislosti s nedostatkem p21 nebyly pozorovány stejné fenotypy jako po siRNA transfekci Treslinu a PARP inhibitoru. siRNA transfekce p21 nevede ke zvýšené formaci fokusů proteinů RPA32, který je signálem přítomnosti jednovláknové DNA, ani γ H2AX a 53BP1, které ukazují na vznik dvouvláknových zlomů DNA. Úbytek p21 nemá za následek ani zvýšený výskyt mikrojader nebo akumulaci buněk v pozdní S fázi buněčného cyklu. Snížení hladiny p21 tedy na rozdíl od PARPi a siTICRR nevede k poškození DNA, replikačnímu stresu a nestabilitě genomu.

Možným vysvětlením pro naše pozorování může být aktivace translézní syntézy v nepřítomnosti p21. Pokud by v důsledku snížení hladiny p21 docházelo k ubikvitinaci PCNA potřebné pro vazbu translézních polymeráz, mohly by být dosyntetizovány jednovláknové mezery DNA, které jsou pravděpodobně příčinou toxicity PARPi. Nedostatek p21 by tedy i přes přítomnost zvýšené rychlosti replikace neohrožoval stabilitu genomu, ale naopak by vedl k vyřešení problému výskytu jednovláknových mezer.

8 SEZNAM LITERATURY

Aguilera, A., García-Muse, T. (2013). Causes of genome instability. *Annual Review of Genetics* 47, 1–32.

Ahn, J.Y., Schwarz, J.K., Piwnica-Worms, H., Canman, C.E. (2000). Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Research* 60, 5934–5936.

Aladjem, M.I., Redon, C.E. (2017). Order from clutter: selective interactions at mammalian replication origins. *Nature Reviews Genetics* 18, 101–116.

Amé, J.-C., Spenlehauer, C., de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* 26, 882–893.

Anglana, M., Apiou, F., Bensimon, A., Debatisse, M. (2003). Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell* 114, 385–394.

Annunziato, A.T., and Seale, R.L. (1983). Chromatin replication, reconstitution and assembly. *Molecular and Cellular Biochemistry* 55, 99–112.

Avkin, S., Sevilya, Z., Toubé, L., Geacintov, N., Chaney, S.G., Oren, M., Livneh, Z. (2006). p53 and p21 regulate error-prone DNA repair to yield a lower mutation load. *Molecular Cell* 22, 407–413.

Bae, S.H., Bae, K.H., Kim, J.A., Seo, Y.S. (2001). RPA governs endonuclease switching during processing of Okazaki fragments in eukaryotes. *Nature* 412, 456–461.

Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., Willson, J.K.V., Vogelstein, B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249, 912–916.

Bambara, R.A., Murante, R.S., Henricksen, L.A. (1997). Enzymes and Reactions at the Eukaryotic DNA Replication Fork. *Journal of Biological Chemistry* 272, 4647–4650.

Bauer, P.I., Chen, H.J., Kenesi, E., Kenessey, I., Buki, K.G., Kirsten, E., Hakam, A., Hwang, J.I., Kun, E. (2001). Molecular interactions between poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I) and topoisomerase I (Topo I): identification of topology of binding. *FEBS Letters* 506, 239–242.

Beijersbergen, R.L., Bernards, R. (1996). Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1287, 103–120.

Bell, S.P., Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry* 71, 333–374.

- Berger, J.M., Gamblin, S.J., Harrison, S.C., and Wang, J.C. (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* *379*, 225–232.
- Bertoli, C., Skotheim, J.M., de Bruin, R.A.M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *14*, 518–528.
- Blow, J.J., Ge, X.Q., Jackson, D.A. (2011). How dormant origins promote complete genome replication. *Trends in Biochemical Science* *36*, 405–414.
- Blumenthal, A.B., Kriegstein, H.J., Hogness, D.S. (1974). The units of DNA replication in *Drosophila melanogaster* chromosomes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* *38*, 205–223.
- Branzei, D., Foiani, M. (2005). The DNA damage response during DNA replication. *Current Opinion in Cell Biology* *17*, 568–575.
- Bruning, J.B., Shamo, Y. (2004). Structural and thermodynamic analysis of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase-delta p66 subunit and flap endonuclease-1. *Structure* *12*, 2209–2219.
- Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* *434*, 913–917.
- Burgers, P.M.J., Kunkel, T.A. (2017). Eukaryotic DNA Replication Fork. *Annual Review of Biochemistry* *86*, 417–438.
- Cadoret, J.-C., Meisch, F., Hassan-Zadeh, V., Luyten, I., Guillet, C., Duret, L., Quesneville, H., Prioleau, M.-N. (2008). Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 15837–15842.
- Campisi, J. (2007). Aging and cancer cell biology, 2007. *Aging Cell* *6*, 261–263.
- Cayrou, C., Coulombe, P., Vigneron, A., Stanojcic, S., Ganier, O., Peiffer, I., Rivals, E., Puy, A., Laurent-Chabalier, S., Desprat, R., et al. (2011). Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. *Genome Research* *21*, 1438–1449.
- Cong, K., Kousholt, A., Peng, M., Panzarino, N., Lee, W., Nayak, S., Kraus, J., Calvo, J., Bere, M., Rothenberg, E., et al. (2019). PARPi synthetic lethality derives from replication-associated single-stranded DNA gaps. *BioRxiv* 781989

- Costas, C., Sanchez, M. de la P., Sequeira-Mendes, J., Gutierrez, C. (2011). Progress in understanding DNA replication control. *Plant Science* 181, 203–209.
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., Poirier, G.G. (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochemical Journal* 342 (Pt 2), 249–268.
- de Bono, J., Mateo, J., Fizazi, K., Saad, F., Shore, N., Sandhu, S., Chi, K.N., Sartor, O., Agarwal, N., Olmos, D., et al. (2020). Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine* 382, 2091–2102.
- Delgado, S., Gómez, M., Bird, A., Antequera, F. (1998). Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *The EMBO Journal* 17, 2426–2435.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675–684.
- Dimitrova, N., Chen, Y.-C.M., Spector, D.L., Lange, T. de (2008). 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* 456, 524–528.
- Dotto, G.P. (2000). p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochimica et Biophysica Acta* 1471, M43-56.
- el-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Research* 54, 1169–1174.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817–825.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N.J., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., et al. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917–921.
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., Palitti, F., Natarajan, A.T., Kirsch-Volders, M. (2016). Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation Research* 770, 12–25.
- Finlay, C.A., Hinds, P.W., Levine, A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083–1093.

Fong, P.C., Boss, D.S., Yap, T.A., Tutt, A., Wu, P., Mergui-Roelvink, M., Mortimer, P., Swaisland, H., Lau, A., O'Connor, M.J., et al. (2009). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *The New England Journal of Medicine* 361, 123–134.

Fotedar, R., Fitzgerald, P., Rousselle, T., Cannella, D., Dorée, M., Messier, H., Fotedar, A. (1996). p21 contains independent binding sites for cyclin and cdk2: both sites are required to inhibit cdk2 kinase activity. *Oncogene* 12, 2155–2164.

Frouin, I., Maga, G., Denegri, M., Riva, F., Savio, M., Spadari, S., Prosperi, E., Scovassi, A.I. (2003). Human proliferating cell nuclear antigen, poly(ADP-ribose) polymerase-1, and p21waf1/cip1. A dynamic exchange of partners. *Journal of Biological Chemistry* 278, 39265–39268.

Fukuda, K., Morioka, H., Imajou, S., Ikeda, S., Ohtsuka, E., and Tsurimoto, T. (1995). Structure-function relationship of the eukaryotic DNA replication factor, proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Biological Chemistry* 270, 22527–22534.

Galanos, P., Vougas, K., Walter, D., Polyzos, A., Maya-Mendoza, A., Haagensen, E.J., Kokkalis, A., Roumelioti, F.-M., Gagos, S., Tzetis, M., et al. (2016). Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing. *Nature Cell Biology* 18, 777–789.

Gambus, A., Khoudoli, G.A., Jones, R.C., Blow, J.J. (2011). MCM2-7 form double hexamers at licensed origins in *Xenopus* egg extract. *Journal of Biological Chemistry* 286, 11855–11864.

Ganai, R.A., Johansson, E. (2016). DNA Replication—A Matter of Fidelity. *Molecular Cell* 62, 745–755.

Gartel, A.L., Serfas, M.S., Tyner, A.L. (1996). p21--negative regulator of the cell cycle. *Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine* 213, 138–149.

Ge, X.Q., Jackson, D.A., Blow, J.J. (2007). Dormant origins licensed by excess Mcm2–7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes & Development* 21, 3331–3341.

Geraghty, D.S., Ding, M., Heintz, N.H., Pederson, D.S. (2000). Premature structural changes at replication origins in a yeast minichromosome maintenance (MCM) mutant. *Journal of Biological Chemistry* 275, 18011–18021.

Gilbert, D.M. (2004). In search of the holy replicator. *Nat Rev Molecular and Cellular Biology* 5, 848–855.

Golan, T., Hammel, P., Reni, M., Van Cutsem, E., Macarulla, T., Hall, M.J., Park, J.-O., Hochhauser, D., Arnold, D., Oh, D.-Y., et al. (2019). Maintenance olaparib for germline BRCA-mutated metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine* 381, 317–327.

- Goodman, M.F. (2002). Error-Prone Repair DNA Polymerases in Prokaryotes and Eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry* 71, 17–50.
- Goubin, F., Ducommun, B. (1995). Identification of binding domains on the p21Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Oncogene* 10, 2281–2287.
- Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1987). The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51, 887–898.
- Gulbis, J.M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M., Kuriyan, J. (1996). Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell* 87, 297–306.
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., Bartek, J. (2008). An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science* 319, 1352–1355.
- Hanzlikova, H., Kalasova, I., Demin, A.A., Pennicott, L.E., Cihlarova, Z., Caldecott, K.W. (2018). The Importance of Poly(ADP-Ribose) Polymerase as a Sensor of Unligated Okazaki Fragments during DNA Replication. *Molecular Cell* 71, 319-331.e3.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* 6, 387–400.
- Huambachano, O., Herrera, F., Rancourt, A., Satoh, M.S. (2011). Double-stranded DNA binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and molecular insight into the regulation of its activity. *Journal of Biological Chemistry* 286, 7149–7160.
- Chai, Q., Zheng, L., Zhou, M., Turchi, J.J., Shen, B. (2003). Interaction and stimulation of human FEN-1 nuclease activities by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in alpha-segment processing during Okazaki fragment maturation. *Biochemistry* 42, 15045–15052.
- Chambon, P., Weill, J.D., Doly, J., Strosser, M.T., Mandel, P. (1966). On the formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 25, 638–643.
- Chanoux, R.A., Yin, B., Urtishak, K.A., Asare, A., Bassing, C.H., Brown, E.J. (2009). ATR and H2AX Cooperate in Maintaining Genome Stability under Replication Stress. *Journal of Biological Chemistry* 284, 5994–6003.
- Chen, J., Jackson, P.K., Kirschner, M.W., Dutta, A. (1995). Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 374, 386–388.

- Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., Dynlacht, B.D., Dutta, A. (1996). Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Molecular and Cellular Biology* 16, 4673–4682.
- Cho, B.-K., Zengler, K., Qiu, Y., Park, Y.S., Knight, E.M., Barrett, C.L., Gao, Y., Palsson, B.Ø. (2009). The transcription unit architecture of the *Escherichia coli* genome. *Nature Biotechnology* 27, 1043–1049.
- Choe, K.N., Moldovan, G.-L. (2017). Forging Ahead through Darkness: PCNA, Still the Principal Conductor at the Replication Fork. *Molecular Cell* 65, 380–392.
- Ibarra, A., Schwob, E., Méndez, J. (2008). Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 8956–8961.
- Kanemaki, M., Sanchez-Diaz, A., Gambus, A., Labib, K. (2003). Functional proteomic identification of DNA replication proteins by induced proteolysis in vivo. *Nature* 423, 720–725.
- Karimian, A., Ahmadi, Y., Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair* 42, 63–71.
- Karschau, J., Blow, J.J., de Moura, A.P.S. (2012). Optimal placement of origins for DNA replication. *Physical Review Letters* 108, 058101.
- Kuemmel, S., Harrach, H., Schmutzler, R.K., Kostara, A., Ziegler-Löhr, K., Dyson, M.H., Chiari, O., Reinisch, M. (2020). Olaparib for metastatic breast cancer in a patient with a germline PALB2 variant. *NPJ Breast Cancer* 6.
- Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Dunphy, W.G. (2010). Treslin Collaborates with TopBP1 in Triggering the Initiation of DNA Replication. *Cell* 140, 349–359.
- Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., Scott, C.L., Meier, W., Shapira-Frommer, R., Safra, T., et al. (2014). Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncology* 15, 852–861.
- Lönn, U., Lönn, S. (1985). Accumulation of 10-kilobase DNA replication intermediates in cells treated with 3-aminobenzamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 104–108.
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C.S., Foiani, M. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* 412, 557–561.

- MacAlpine, H.K., Gordân, R., Powell, S.K., Hartemink, A.J., and MacAlpine, D.M. (2010). *Drosophila* ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading. *Genome Research* 20, 201–211.
- Madison, D.L., Lundblad, J.R. (2010). C-terminal binding protein and poly(ADP)ribose polymerase 1 contribute to repression of the p21(waf1/cip1) promoter. *Oncogene* 29, 6027–6039.
- Magdalou, I., Lopez, B.S., Pasero, P., Lambert, S.A.E. (2014). The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 30, 154–164.
- Makałowski, W. (2001). The human genome structure and organization. *Acta Biochimica Polonica* 48, 587–598.
- Malanga, M., Althaus, F.R. (2004). Poly(ADP-ribose) reactivates stalled DNA topoisomerase I and Induces DNA strand break resealing. *Journal of Biological Chemistry* 279, 5244–5248.
- Mangerich, A., Bürkle, A. (2012). Pleiotropic cellular functions of PARP1 in longevity and aging: genome maintenance meets inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012, 321653.
- Mansilla, S.F., Bertolin, A.P., Bergoglio, V., Pillaire, M.-J., González Besteiro, M.A., Luzzani, C., Miriuka, S.G., Cazaux, C., Hoffmann, J.-S., Gottifredi, V. (2016). Cyclin Kinase-independent role of p21CDKN1A in the promotion of nascent DNA elongation in unstressed cells. *Elife* 5.
- Mansilla, S.F., de la Vega, M.B., Calzetta, N.L., Siri, S.O., Gottifredi, V. (2020). CDK-Independent and PCNA-Dependent Functions of p21 in DNA Replication. *Genes (Basel)* 11.
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., Oda, M. (2010). Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annual Review of Biochemistry* 79, 89–130.
- Matsunaga, F., Takemura, K., Akita, M., Adachi, A., Yamagami, T., Ishino, Y. (2010). Localized melting of duplex DNA by Cdc6/Orc1 at the DNA replication origin in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Extremophiles* 14, 21–31.
- Maya-Mendoza, A., Moudry, P., Merchut-Maya, J.M., Lee, M., Strauss, R., Bartek, J. (2018). High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. *Nature* 559, 279–284.
- Mimura, S., Takisawa, H. (1998). *Xenopus* Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk. *The EMBO Journal* 17, 5699–5707.

Min, W., Wang, Z.-Q. (2009). Poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) and its therapeutic potential. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)* *14*, 1619–1626.

Moldovan, G.-L., Pfander, B., Jentsch, S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* *129*, 665–679.

Morales, J., Li, L., Fattah, F.J., Dong, Y., Bey, E.A., Patel, M., Gao, J., Boothman, D.A. (2014). Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* *24*, 15–28.

Moyer, S.E., Lewis, P.W., Botchan, M.R. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 10236–10241.

Nayak, S., Calvo, J.A., Cong, K., Berthiaume, E., Jackson, J., Dash, R.C., Vindigni, A., Hadden, K.M., Cantor, S.B. (2019). Replication gaps are a cancer vulnerability counteracted by translesion synthesis. *BioRxiv* 781997.

Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T., and Nurse, P. (2000). The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* *404*, 625–628.

Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T., Nurse, P. (2000). The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* *404*, 625–628.

Oka, S., Kato, J., Moss, J. (2006). Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 705–713.

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*, 598–605.

Olson, E., Nievera, C.J., Klimovich, V., Fanning, E., Wu, X. (2006). RPA2 is a direct downstream target for ATR to regulate the S-phase checkpoint. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 39517–39533.

Pacek, M., Tutter, A.V., Kubota, Y., Takisawa, H., Walter, J.C. (2006). Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Molecular Cell* *21*, 581–587.

Panzarino, N.J., Krais, J.J., Cong, K., Peng, M., Mosqueda, M., Nayak, S.U., Bond, S.M., Calvo, J.A., Doshi, M.B., Bere, M., et al. (2021). Replication Gaps Underlie BRCA Deficiency and Therapy Response. *Cancer Research* *81*, 1388–1397.

- Petermann, E., Helleday, T. (2010). Pathways of mammalian replication fork restart. *Nat Rev Molecular and Cellular Biology* *11*, 683–687.
- Poccia, D.L., LeVine, D., and Wang, J.C. (1978). Activity of a DNA topoisomerase (nicking-closing enzyme) during sea urchin development and the cell cycle. *Developmental Biology* *64*, 273–283.
- Poli, J., Tsaponina, O., Crabbé, L., Keszthelyi, A., Pantesco, V., Chabes, A., Lengronne, A., Pasero, P. (2012). dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *The EMBO Journal* *31*, 883–894.
- Pray, L. (2008). DNA replication and causes of mutation. *Nature Education* *1*, 214
- Prioleau, M.-N., MacAlpine, D.M. (2016). DNA replication origins—where do we begin? *Genes & Development* *30*, 1683–1697.
- Rattray, A.J., Strathern, J.N. (2003). Error-prone DNA polymerases: when making a mistake is the only way to get ahead. *Annual Review of Genetics* *37*, 31–66.
- Remus, D., Beuron, F., Tolun, G., Griffith, J.D., Morris, E.P., Diffley, J.F.X. (2009). Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell* *139*, 719–730.
- Ripley, B.M., Gildenberg, M.S., Washington, M.T. (2020). Control of DNA Damage Bypass by Ubiquitylation of PCNA. *Genes (Basel)* *11*.
- Romanov, V.S., Pospelov, V.A., Pospelova, T.V. (2012). Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. *Biochemistry (Moscow)* *77*, 575–584.
- Romanov, V.S., Rudolph, K.L. (2016). p21 shapes cancer evolution. *Nature Cell Biology* *18*, 722–724.
- Roninson, I.B. (2002). Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Letters* *179*, 1–14.
- Sequeira-Mendes, J., Díaz-Uriarte, R., Apedaile, A., Huntley, D., Brockdorff, N., Gómez, M. (2009). Transcription initiation activity sets replication origin efficiency in mammalian cells. *PLoS Genetics* *5*, e1000446.
- Sequeira-Mendes, J., Gómez, M. (2012). On the opportunistic nature of transcription and replication initiation in the metazoan genome. *BioEssays* *34*, 119–125.

- Sherr, C.J., Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development* 13, 1501–1512.
- Sheu, Y.-J., Stillman, B. (2006). Cdc7-Dbf4 phosphorylates MCM proteins via a docking site-mediated mechanism to promote S phase progression. *Molecular Cell* 24, 101–113.
- Shinohara, A., Ogawa, H., Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69, 457–470.
- Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal, D.S., Boulares, A.H., Hickey, R.J., Malkas, L.H., Coll, J.M., Smulson, M.E. (1998). Regulation of the expression or recruitment of components of the DNA synthesome by poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemistry* 37, 9363–9370.
- Sørensen, C.S., Syljuåsen, R.G. (2012). Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic Acids Research* 40, 477–486.
- Stroud, H., Otero, S., Desvoyes, B., Ramírez-Parra, E., Jacobsen, S.E., Gutierrez, C. (2012). Genome-wide analysis of histone H3.1 and H3.3 variants in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 14, 5370-5375.
- Toss, A., Cortesi, L. (2013). Molecular mechanisms of PARP inhibitors In BRCA-related ovarian cancer. *Journal of Cancer Science and Therapy* 5, 409–416.
- Tsurimoto, T., Stillman, B. (1990). Functions of replication factor C and proliferating-cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage T4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 1023–1027.
- Turchi, J.J., Bambara, R.A. (1993). Completion of mammalian lagging strand DNA replication using purified proteins. *Journal of Biological Chemistry* 268, 15136–15141.
- Turchi, J.J., Huang, L., Murante, R.S., Kim, Y., Bambara, R.A. (1994). Enzymatic completion of mammalian lagging-strand DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9803–9807.
- Vaisman, A., Woodgate, R. (2017). Translesion DNA polymerases in eukaryotes: what makes them tick? *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 52, 274–303.
- Vashee, S., Cvetic, C., Lu, W., Simancek, P., Kelly, T.J., Walter, J.C. (2003). Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes & Development* 17, 1894–1908.

Waga, S., Stillman, B. (1994). Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature* 369, 207–212.

Wang, T.S.-F. (1991). Eukaryotic dna polymerases. *Annual Review Biochemistry* 60, 513–552.

Warbrick, E. (1998). PCNA binding through a conserved motif. *BioEssays* 20, 195–199.

Wettersten, H.I., Hee Hwang, S., Li, C., Shiu, E.Y., Wecksler, A.T., Hammock, B.D., Weiss, R.H. (2013). A novel p21 attenuator which is structurally related to sorafenib. *Cancer Biology Therapy* 14, 278–285.

Woodward, A.M., Göhler, T., Luciani, M.G., Oehlmann, M., Ge, X., Gartner, A., Jackson, D.A., Blow, J.J. (2006). Excess Mcm2–7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *Journal of Cell Biology* 173, 673–683.

Xie, A., Hartlerode, A., Stucki, M., Odate, S., Puget, N., Kwok, A., Nagaraju, G., Yan, C., Alt, F.W., Chen, J., et al. (2007). Distinct Roles of Chromatin-Associated Proteins MDC1 and 53BP1 in Mammalian Double-Strand Break Repair. *Molecular Cell* 28, 1045–1057.

Zeman, M.K., Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology* 16, 2–9.

Zhao, H., Piwnicka-Worms, H. (2001). ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Molecular and Cellular Biology* 21, 4129–4139.

Zheng, L., Shen, B. (2011). Okazaki fragment maturation: nucleases take centre stage. *J Molecular and Cellular Biology* 3, 23–30.

Zheng, L., Zhou, M., Guo, Z., Lu, H., Qian, L., Dai, H., Qiu, J., Yakubovskaya, E., Bogenhagen, D.F., Demple, B., et al. (2008). Human DNA2 is a mitochondrial nuclease/helicase for efficient processing of DNA replication and repair intermediates. *Molecular Cell* 32, 325–336.

Zou, L., Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542–1548.

Knihy:

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2014). *Molecular biology of the cell*. 6th ed. (New York: Garland Science Taylor & Francis).

Snustad, D.P., Simmons, M.J. (2017). *Genetika*. 2., aktualizované vydání (Brno: Masarykova univerzita).

Internetové zdroje:

Gene [online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 – [navštíveno 26. 12. 2020]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=1026>