

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Metody detekce ribosomálního stresu**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	Barbara Duchoňová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Zuzana Macečková
Termín odevzdání práce:	2018

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Barbara Duchoňová
Název práce	Metody detekce ribosomálního stresu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Zuzana Macečková
Rok obhajoby práce	2018

## **Abstrakt**

Tvorba a správná funkce ribosomů je klíčová pro život každé buňky. K narušení biogeneze ribosomů může docházet důsledkem vnějších vlivů, jako jsou xenobiotika, záření aj. nebo mutacemi v DNA buňky. V druhém případě hovoříme o tzv. ribosomopatiích. Mutace v genech kódujících ribosomální proteiny vedou ke vzniku jedné z těchto ribosomopatií, Diamond-Blackfanově anémii (DBA). Cílem této diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši na dané téma a zjistit, zda lymfoblastoidní linie (LCL) pacientů s DBA onemocněním jsou vhodné jako DBA buněčný model.

Kultivací LCL kontrolního vzorku zdravého jedince a pacientů s mutacemi v ribosomálních proteinech (RP) RPS26, RPL5 a RPS19 byl získán potřebný materiál k analýzám. Zda jsou LCL linie vhodným buněčným modelem pro DBA onemocnění bylo zjišťováno pomocí: průtokové cytometrie (analýza buněčného cyklu, detekce fosforylace histonu, analýza apoptózy), Northern blot analýzy, Western blot analýzy a konfokálního mikroskopu (dvojitá RNA-FISH analýza a imunofluorescence se značeným nukleolinem a nukleofosminem).

Naměřené výsledky potvrdily informace týkající se tohoto onemocnění zmíněné ve vědeckých publikacích, vyjma analýzy p53 proteinu metodou western blot. Vytvořené LCL linie jsou vhodným buněčným modelem DBA.

Klíčová slova	jadérko, ribosomální biogeneze, ribosomální stres, Diamond-Blackfanova anémie, lymfoblastoidní linie
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's name	Barbara Duchoňová
Title of thesis	The ribosomal stress and its detection methods
Type of thesis	Master
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine Faculty of Medicine and Dentistry Palacký University Olomouc
Supervisor	M.Sc. Zuzana Macečková
The year of presentation	2018

## **Abstract**

The biogenesis and proper functioning of ribosomes is a key to the life of every eukaryotic cell. Disruption of ribosome biogenesis may occur as a result of external influences such as xenobiotics, radiation, etc., or could be caused by mutations in cell DNA. In the latter case, we are talking about so-called ribosomopathies. Mutations in genes encoding ribosomal proteins lead to one of these ribosomopathies, Diamond-Blackfan anemia (DBA). The aim of this Master thesis was to develop a literary review on the given topic. Aim of practical part was confirm that lymphoblastoid cell lines (LCLs) derivated from DBA patients are suitable DBA cellular model.

Material for analysis was obtained from the control sample of a healthy individual and patients with mutations in ribosomal proteins (RP) RPS26, RPL5 and RPS19. Suitability of LCL as DBA cellular model was analysed by following methods: flow cytometry (analysis of cell cycle, histone phosphorylation and apoptosis), Northern blot analysis, Western blot analysis and confocal microscope (double RNA-FISH analysis and immunofluorescence staining with nucleolin and nucleophosmin).

All results, except for p53 western blot analysis, agreed with literature. Taking all together, LCL are suitable DBA cellular model.

Keywords	nucleoli, ribosomal biogenesis, ribosomal stress, Diamond-Blackfan anemia, lymphoblastoid cell lines
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Ráda bych touto cestou poděkovala zaměstnancům Ústavu molekulární a translační medicíny LF a FN Olomouc za jejich pomoc a podporu při práci, výhradně pak mé vedoucí diplomové práce Mgr. Zuzaně Macečkové při vypracovávání teoretické i praktické části za její za odborné vedení, připomínky a rady, trpělivost, laskavost a předané zkušenosti pro práci v laboratoři. V neposlední řadě také děkuji mé rodině za psychickou i finanční podporu po celou dobu mého studia.

## OBSAH

ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....	8
TEORETICKÁ ČÁST .....	9
1 Jádérko .....	10
1.1 Ribosomální biogeneze .....	11
2 Stres .....	16
2.1 p53 a Mdm2 protein .....	16
2.2 Ribosomální stres .....	18
2.2.1 Ribosomální stres závislý na p53 .....	19
2.2.2 Ribosomální stres nezávislý na p53 .....	23
3 Ribosomopatie .....	24
3.1 Diamondova-Blackfanova anémie .....	25
PRAKTICKÁ ČÁST .....	28
4 MATERIÁL A METODY .....	29
4.1 Biologický materiál .....	29
4.2 Izolace RNA .....	29
4.2.1 Chemikálie .....	29
4.2.2 Postup.....	29
4.3 Analýza buněčného cyklu.....	30
4.3.1 Chemikálie .....	30
4.3.2 Postup.....	30
4.4 Detekce fosforylace histonu H3 .....	31
4.4.1 Chemikálie .....	31
4.4.2 Postup.....	31
4.5 Analýza apoptózy .....	31
4.6 Imunofluorescence .....	32

4.6.1	Chemikálie .....	32
4.6.2	Postup.....	32
4.7	Double RNA FISH .....	32
4.7.1	Chemikálie .....	32
4.7.2	Postup.....	33
4.8	Northern blot .....	33
4.8.1	Chemikálie .....	33
4.8.2	Namíchání detekčních sond .....	33
4.8.3	Postup Northern blot metody .....	34
4.9	Western blot.....	35
4.9.1	Chemikálie .....	35
4.9.2	Izolace proteinů.....	36
4.9.3	Změření a výpočet koncentrace .....	36
4.9.4	Postup Western blot metody .....	37
5	VÝSLEDKY .....	39
5.1	Analýza buněčného cyklu.....	39
5.2	Detekce fosforylace histonu H3 .....	40
5.3	Analýza apoptózy .....	41
5.4	Imunofluorescence .....	41
5.5	Double RNA FISH .....	44
5.6	Northern blot .....	46
5.7	Western blot.....	46
6	DISKUZE .....	49
7	ZÁVĚR .....	52
	ABECEDNÍ SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	53
	POUŽITÁ LITERATURA .....	54

## ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Buňka se během svého života setkává s mnoha interními či externími změnami prostředí, které ji určitým způsobem ovlivňují, a je nutné, aby se s nimi vyrovnala. Stres je jedním ze zátěžových faktorů a buňka na to reaguje aktivací drah, díky kterým se snaží přežít či vyvolává programovanou buněčnou smrt, která poškozenou buňku eliminuje.

Při ribosomálním stresu, známém také jako nukleolární stres, dochází povětšinou k narušení jadérka, a to především ke změně jeho struktury, k nižší tvorbě rRNA a ribosomů vlivem mutace v ribosomálních proteinech a k mnoha dalším. Mutace v genech pro biogenezi ribozomů vedou ke vzniku tzv. ribosomopatií, mezi něž patří také onemocnění Diamond-Blackfanova anémie (DBA), která je způsobena mutacemi v ribosomálních proteinech a je předmětem sledování v této diplomové práci.

Cílem této práce bylo vypracovat literární rešerši, která bude užitečná pro pochopení procesů, jež nastávají v buňce během ribosomálního stresu, a pomocí několika laboratorních metod zmapovat DBA onemocnění. Určit rozdíly ve výsledcích mezi pacienty s odlišnými mutacemi v ribosomálních proteinech a porovnat je také s výsledky zdravého jedince. Tato práce by měla pomoci v porozumění procesům, ke kterým dochází v buňce v průběhu tohoto onemocnění, respektive během ribosomálního stresu. A zároveň by také měla říci, zda jsou vytvořené lymfoblastoidní linie (LCL) vhodný model pro DBA onemocnění.



## **TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 Jádérko

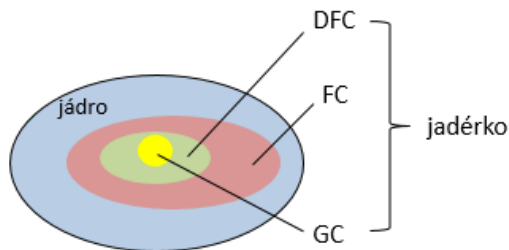
Jádérko je velmi specializovanou funkční částí jádra, tedy buňky, které postrádá fosfolipidovou membránu a bylo identifikováno před více než 200 lety. První řádně zdokumentované záznamy o jadérku byly vytvořeny nezávisle na sobě v letech 1835 (Wagner, 1835) a 1836 (Valentin, 1836). Dnes je známo, že je jadérko vytvářeno v okolí tzv. NOR oblastí (nucleolus organizer regions – jadérkové organizační regiony) vyskytující se u člověka obvykle na ramenech chromosomů 13, 14, 15, 21, a 22 v podobě shluku stovek ribosomálních genů (rDNA). Velmi důležité jsou v genech repetitivní sekvence, které mají za úkol kódovat hlavní části rRNA a hrají také roli v sestavování jadérka (Floutsakou *et. al.*, 2013). O velikosti, tvaru, množství a výskytu jadérek rozhodují faktory, o jaký druh buňky se jedná, v jaké fázi buněčného cyklu (BC) se zrovna nachází a jaký je fyziologický stav sledované buňky.

Ve 20. století bylo jadérko zkoumáno mnoha vědeckými skupinami a postupně byla zjištěna jeho struktura a funkce. Hlavním úkolem jadérka v buňce je ribosomální biogeneze, tedy tvorba ribosomů, což bylo objeveno již v roce 1968 (Brown a Dawid, 1968), čímž se jadérko začalo považovat za velice nepostradatelné místo pro regulaci proteosyntézy a růst buňky. Tvorba ribosomů není ale jediným úkolem jadérka, jak se zprvu předpokládalo (Boisvert *et. al.*, 2007). Je potřeba zmínit také funkci v regulaci mitózy, buněčného cyklu, sestřihu mRNA, proliferace, senescence, reakce na stres a vzhledem k velkému počtu nukleových proteinů, které jsou kódovány dosud neznámými otevřenými čtecími rámci, je pravděpodobné, že v budoucnu budou odhaleny další funkce jadérka.

Ribosomy jsou makromolekuly podílející se na translaci mRNA (mediátorové RNA) do proteinů. Jejich funkcí je pohybovat se po mRNA, vychytávat molekuly tRNA (transferové RNA) komplementární k příslušnému kodonu a vytvářet tak řetězec aminokyselin, ze kterého se následně tvoří protein. Syntéza ribosomů je velice nákladným procesem v buňce vyžadující velké množství metabolitů a energie. Eukaryontní ribosom, 80S, se skládá z velké a malé podjednotky, 60S a 40S. Malá podjednotka 40S je tvořena 18S rRNA (ribosomální RNA) spojením s 33 ribosomálními proteiny (RP) a velká podjednotka 60S vzniká spojením 5.8S, 28S a 5S rRNA s 49 RP (Tschochner, Hurt, 2003).

Tvorba pre-rRNA, ribosomálních proteinů a RNA processing jsou prováděny v jádře. Jadérko, nacházející se uvnitř, je soustředěno do tří odlišných oblastí

(obrázek 1), které je možné pozorovat v interfázi mitózy a jsou nazývány jako fibrilární centrum (FC), hustá fibrilární složka (DFC) a granulární centrum (GC) (Boulon *et. al.*, 2010).



**Obrázek 1:** Nákres jádra s jadérkem a jeho třemi oblastmi, FC = fibrilární centrum, DFC = hustá fibrilární složka, GC = granulární centrum (převzato a upraveno podle Boulon *et. al.*, 2010)

47S pre-rRNA je vytvářena transkripcí rDNA pomocí polymerázy I (Pol I), která se nacházejí v NOR oblastech jadérka. Jednotlivé části jadérka se od sebe liší, v oblasti FC je obsaženo velké množství polymerasy I, na rozhraní FC s DFC je vytvářena pre-rRNA a probíhá zde RNA processing. Modifikace pre-rRNA pak probíhá v oblasti DFC, kde je také vysoká hladina snRNP a proteinu zvaného fibrilarin. V GC oblasti se nachází RPs, protein nukleofosmin a dochází zde k tvorbě pre-ribosomálních podjednotek (Boisvert *et. al.*, 2007, Hernandez-Verdun 2011).

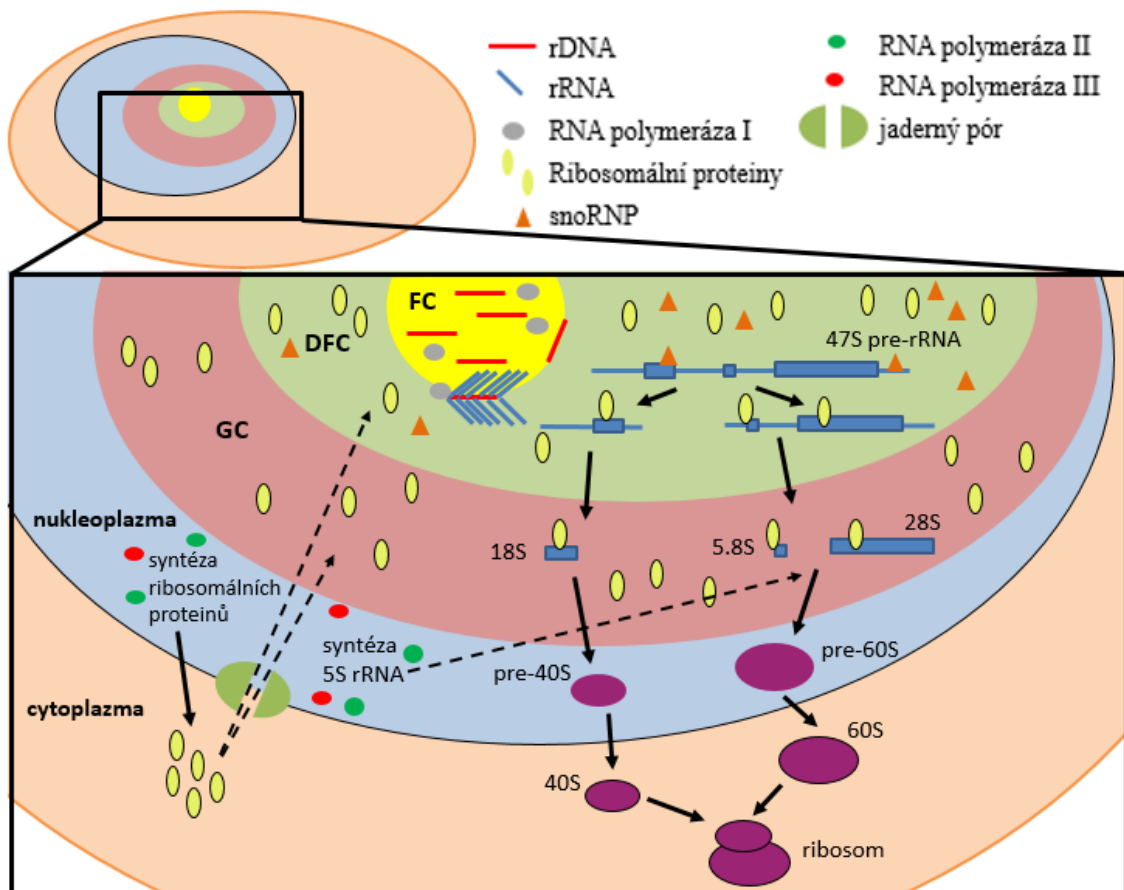
Jadérko samozřejmě mění během života buňky svou strukturu, a to z důvodu odlišné potřeby ribosomů v průběhu buněčného cyklu a také z důvodu potřeby namnožení ribosomů pro rozdělení buňky na dvě dceřiné během mitózy (Sirri *et.al.*, 2000). U zdravé buňky je množství ribosomů nejnižší v profázi, zvyšuje se ve fázi G1 a nejvíce ribosomů obsahuje buňka ve fázi G2.

## 1.1 Ribosomální biogeneze

U eukaryot je ribosomální biogeneze základní buněčný proces, který probíhá v jadérku, nukleoplazmě a cytoplazmě a zahrnuje tři základní kroky: koordinovanou expresi rRNA a ribosomálních proteinů, rRNA processing a sestavení malé a velké ribosomální podjednotky (Tschochner, Hurt, 2003).

Syntéze jednotlivých rRNA a celkovému procesu napomáhají RNA polymerázy I-III. Ribosomální biogeneze začíná transkripcí ribosomální DNA (rDNA) pomocí RNA

polymerázy I na hranici FC a DFC oblasti jadérka. Vzniká tak prekurzor zvaný 47S polycistronická pre-ribosomální RNA (47S pre-rRNA), který je zpracováván pomocí malých nukleolárních RNP (snoRNP) v DFC tzv. RNA processingem, což je podrobněji popsáno dále v textu. V nukleoplazmě se ve stejnou dobu vytváří 5S rRNA pomocí polymerázy III (Pol III) a mRNA pro ribosomální proteiny (RP) pomocí polymerázy II (Pol II). RP jsou poté syntetizovány v cytoplazmě buňky a následně pak, stejně jako 5S rRNA, přeneseny do jadérka pomocí jadérkového lokačního signálu. V GC oblasti se 5.8S rRNA a 28S rRNA spojují s 5S rRNA transkriptem a ribosomálními proteiny za vzniku pre-60S podjednotky, zatímco 18S rRNA vytváří s RP pre-40S ribosomovou podjednotku. Prekurzory ribosomálních podjednotek 40S a 60S jsou pak exportovány do cytoplazmy, kde je dokončena jejich syntéza a vážou se na mRNA za vzniku funkčních ribosomů (Obrázek 2).



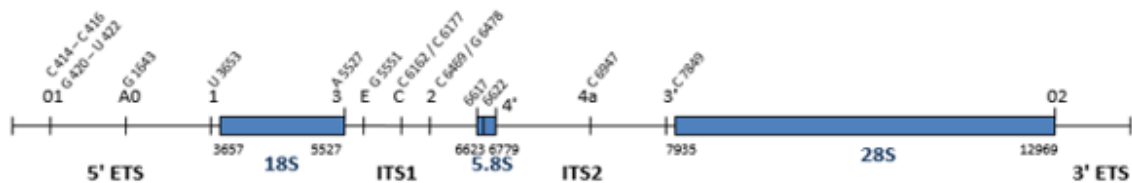
**Obrázek 2:** Obecné schéma shrnující proces ribosomální biogeneze v jadérku, nukleoplazmě a cytoplazmě eukaryot (Převzato a upraveno podle Boisvert et. al., 2007).

*Popis:* Celý proces je odstartován transkripcí rDNA na 47S pre-rRNA pomocí RNA Pol I na hranici FC a DFC a 47S pre-rRNA je zpracováván pomocí snoRNP v DFC RNA processingem. V nukleoplazmě (modrá oblast) je během této doby vytvářena 5S rRNA pomocí Pol III a

mRNA pro RP pomocí Pol II. RP jsou syntetizovány v cytoplazmě a poté, jako 5S rRNA, přeneseny do jádérka. V GC oblasti se 5S rRNA a 28S rRNA spojují s 5.8S rRNA a RP za vzniku pre-60S podjednotky, zatímco 18S rRNA vytváří s RP pre-40S podjednotku. 40S a 60S jsou pak exportovány do cytoplazmy, kde je dokončena jejich syntéza a vážou se na mRNA za vzniku ribosomů.

*Legenda:* FC = fibrilární centrum, DFC = hustá fibrilární složka, GC = granulární centrum

Hlavním krokem ribosomální biogeneze je tvorba 47S pre-rRNA. Ze 47S pre-rRNA vytvořené RNA polymerázou I vznikají 28S, 5.8S a 18S rRNA tvořící základ velké podjednotky 60S a také 5S rRNA, jako základ malé podjednotky 40S (Obrázek 3).



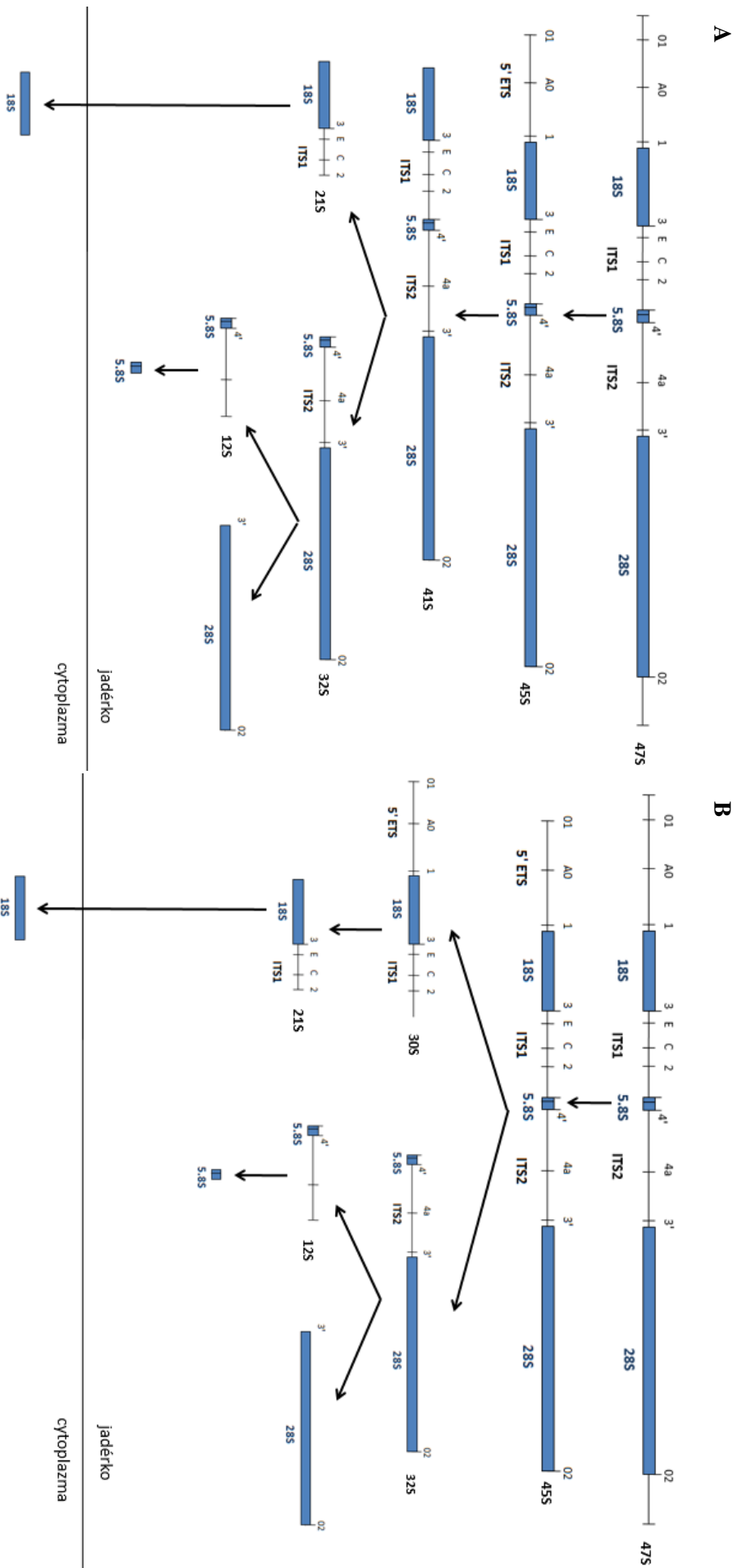
**Obrázek 3:** 47S pre-rRNA řetězec s vyznačenými místy štěpení (převzato a upraveno podle Mulineux, Lafontaine, 2012)

Během tohoto zpracování, rRNA podstoupí rozsáhlou modifikaci, což je převážně v režii nesčetného množství malých nukleolárních RNA (snoRNA). snoRNA jsou metabolicky stabilní, 60-450 nukleotidů dlouhé, malé jaderné RNA, které existují ve formě ribonukleoproteinů (snoRNP) (Yu *et al.*, 1999). Každý snoRNP se skládá ze snoRNA a sady RP. V jádérku existuje více než 200 snoRNP, jež mají mimo jiné na starost zrání 18S, 5.8S a 28S rRNA. Úprava je prováděna dvěma způsoby, metylací 2' hydroxylové skupiny cukerných zbytků (2'-O-methylace), a přeměnou uridinu na pseudouridin (Thomson *et al.*, 2013). Více než 200 nukleotidů je takto přeměněno na 100 až 104 2'-O-methylovaných nukleotidů a asi 95 pseudouridinů, které jsou potřebné pro správnou funkci ribosomu (Maden, 1990).

Jednotlivé rRNA komponenty (5.8S, 28S a 18S) jsou uvolňovány z 47S pre-rRNA po složitém exo- i endo-nukleolytickém štěpení, tzv. RNA processingem (Obrázek 4). Dochází zde k rozdělení vlákna v oblastech zvaných „transcribed spacers“ (TS), a to vnitřních, internal transcribed spacers (ITS) a vnějších, external transcribed spacers (ETS). Prvním štěpením na dvou místech 5' ETS oblasti 47S pre-rRNA (O1 a O2) vzniká 45S pre-rRNA, která může být následně zpracovávána dvěma cestami. Při

první cestě (Obr. 4A) dochází k odstřížení zbylé 5' ETS oblasti 45S pre-rRNA, čímž vzniká 41S a jejím rozstřížením v ITS1 oblasti vznikají 21S (pre-40S) a 32S (pre-60S) rRNA. Konečné zpracování 21S je zahájeno jejím přesunem z jaderka do cytoplazmy, kde vzniká 18S finální podjednotka. 32S rRNA je rozštěpena na již zralou 28S rRNA a na 12S, která podléhá ještě posledním úpravám na finální 5.8S rRNA. Při druhé cestě (Obr. 4B) probíhají restrikce obdobně, pouze v jiném pořadí. 47S pre-rRNA je hned v prvním kroku rozštěpena v ITS1 oblasti na dvě části (30S a 32S). Část 30S podstupuje modifikace z 21S podjednotky na finální 18S podjednotku, která je přesunuta do cytoplazmy. Část druhá (32S) podléhá ještě rozštěpení ITS2 oblasti, které dává za vznik finální 28S podjednotce a 12S podjednotce, která je následně zpracována na 5.8S finální podjednotku.

18S podjednotka je v cytoplazmě spojena s RPS3 ribosomálním proteinem (Schäfer *et. al.*, 2006) a vytváří tak 18S rRNA, ze které vzniká po spojení s dalšími 33 RP malá podjednotka 40S. Spojením 5.8S, 28S a 5S rRNA se 49 RP vzniká velká podjednotka ribosomu 60S a obě vytvořené podjednotky se v cytoplazmě spojí a vytváří již plně funkční ribosom.



**Obrázek 4:** Schéma RNA processingu. Postupné štěpení 47S pre-rRNA řetězce na jednotlivé komponenty cestou 1 (A) a cestou 2 (B) (převzato a upraveno podle Lafontaine, 2015).

## 2 Stres

Obecně je stres považován za jakékoli zátěžové faktory působící na buňku, mezi které patří extrémní teploty, vystavení buňky toxinům, mechanické poškození buňky, poškození DNA (genotoxický stres), zvýšená exprese onkogenů, hypoxie apod. V takovýchto situacích dochází k alteracím na úrovni metabolismu, k narušení DNA (např. vytvořením zlomů), k odlišné produkci proteinů, ke změnám v jejich likvidaci apod.

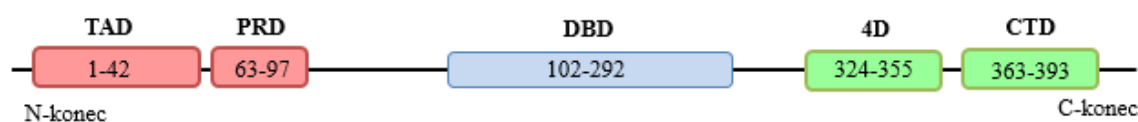
Buňky reagují na stres dvěma hlavními způsoby. Zaprvé aktivací drah, které podporují přežití a poskytují buňce určitou míru odolnosti vůči nepříznivým podmínkám. Či zadruhé, vyvoláním programované buněčné smrti, pomocí níž se eliminují poškozené buňky a tím se minimalizují akutní škody. K druhému ze zmiňovaných způsobů reakcí buněk na stres, buněčné smrti, dochází při dlouhodobějším vystavení škodlivého stimulu na buňky. Apoptóza, označovaná také jako programovaná buněčná smrt, je využívána u fyziologických buněk nejčastěji. Tento proces zahrnuje smršťování buněk, zaoblení a fragmentaci jádra s kondenzací chromatinu a fagocytózu buněčných fragmentů a ve většině případů bez doprovodné zánětlivé reakce (Kerr, *et. al.*, 1972). Buněčná smrt nemusí být jen programovaná, nekróza, termín běžně používaný patologi, se vztahuje na jakékoli úmrtí spojené se ztrátou kontroly iontové rovnováhy, absorpcí vody, vznikajícím otokem a následným rozpadem buněk (Berenbom, *et. al.* 1955). Rozpadem buněčné membrány se uvolní do okolí obsah buňky a přitahuje buňky imunitního systému, což následně vyvolává zánětlivou reakci.

### 2.1 p53 a Mdm2 protein

Hlavním detektorem stresu a obecně změn v buňce je protein p53, jaderný protein a nádorový supresor, který je kódován tumor supresorovým genem *TP53*. Funkcemi p53 proteinu jsou: zastavovat G1 fázi buněčného cyklu ve chvíli, kdy je potřeba opravit poškozenou DNA, a také indukce apoptózy. Za běžného stavu je protein p53 shromažďován v jádře, jeho množství je nízké, jelikož vysoká hladina p53 škodí proliferaci a vývoji buněk. Hladina se markantně zvyšuje při poškození DNA vlivem stresu, který na buňku působí. Tento protein je možné schematicky rozdělit na několik



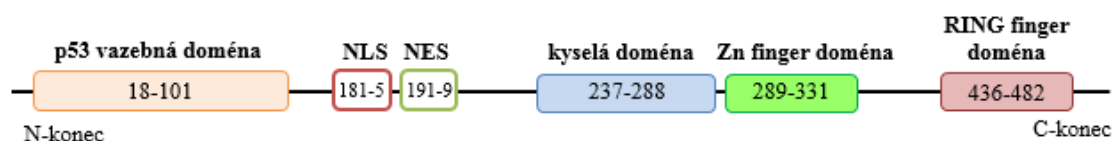
částí (Obrázek 5). První částí je transaktivační doména N-konce (TAD, transactivation domain) interagující s transkripčním aparátem (Walker a Levine, 1996). Na TAD se vážou transkripční koaktivátory. Dále p53 obsahuje doménu bohatou na prolin (PRD, proline-rich domain) podílející se na indukci apoptózy a zastavující buněčný cyklus (Toledo *et. al.*, 2006). V centru proteinu se nachází DNA vazebná doména (DBD, DNA-binding domain), dále pak tetramerizační doména (4D, tetramerization domain), která vytváří funkční tetramer p53 (Jeffrey *et. al.*, 1995), a je ukončena C-koncovou regulační doménou (CTD, C-terminal domain) zajišťující specifickou vazbu p53 na DNA (Hupp *et. al.*, 1992; Weinberg *et. al.*, 2004).



**Obrázek 5:** Schéma p53 proteinu s vyznačenými jednotlivými doménami (převzato a upraveno podle Cheok *et. al.*, 2011) *Legenda:* TAD - transaktivační doména, PRD - doména bohatá na prolin, DBD - DNA vazebná doména, 4D - tetramerizační doména, CTD - C-terminální doména

Množství, a tedy i funkce p53, je fyziologicky v buňce regulováno pomocí proteinu Mdm2 (Murine Double Minute) (Moll, Petrenko, 2003), jehož lidským homologem je Hdm2 (Jin *et al.*, 2004).

Mdm2 jaderný p53 inhibitor se skládá ze 491 aminokyselin a obsahuje jako p53 několik domén (Obrázek 6).



**Obrázek 6:** Schéma Mdm2 proteinu s vyznačenými jednotlivými doménami (převzato a upraveno podle Lipkowitz S. a Weissman A.M., 2011). *Legenda:* NLS - nuclear localization signal (signál pro jadernou lokalizaci), NES - nuclear export sequence (signál pro export z jádra)

Nejdůležitější je doména na N-konci, která interaguje s p53 doménou, maskuje ji a zabraňuje nasednutí ko-aktivátorů (Kruse, Gu, 2009). Dále zde můžeme nalézt oblast zvanou signál pro jadernou lokalizaci (NLS, nuclear localization signal) a signál pro export z jádra (NES, nuclear export sequence), které regulují pohyb Mdm2 z jádra do

cytoplazmy a zpět, díky čemuž dochází k regulaci aktivity p53 (Roth *et. al.*, 1998). V centru Mdm2 nalezneme kyselou oblast a Zn finger oblast, které jsou odpovědné za interakci Mdm2 s ribosomálními proteiny. Celkově bylo prozatím identifikováno 14 RP. RP velké podjednotky: RPL5 (Dai a Lu, 2004; Marechal *et. al.*, 1994), RPL11 (Lohrum *et. al.*, 2003; Zhang *et. al.*, 2003), RPL23 (Zhang *et. al.*, 2003; Dai *et. al.*, 2004; Jin *et. al.*, 2004), RPL26 (Ofir-Rosenfeld *et. al.*, 2008; Zhang *et. al.*, 2010), RPL37 (Daftuar *et. al.*, 2013; Daftuar *et. al.*, 2010). RP malé podjednotky: RPS3 (Yadavilli *et. al.*, 2009), RPS7 (Zhu *et. al.*, 2009; Chen *et. al.*, 2007), RPS14 (Zhou *et. al.*, 2013), RPS15 (Daftuar *et. al.*, 2013), RPS20 (Daftuar *et. al.*, 2013; Frum *et. al.*, 2007), RPS25 (Zhang *et. al.*, 2013), RPS26 (Cui *et. al.*, 2014), RPS27 a RPS27L (Xiong *et. al.*, 2011). Na C-konci Mdm2 se nachází tzv. RING finger doména, což je hlavní místo aktivity ubikvitin ligasy Mdm2 (Marine, Lozano, 2010). Tato doména je také nezbytná pro tvorbu dimeru s druhou molekulou Mdm2 (Sharp *et. al.*, 1999; Tanimura *et. al.*, 1999).

Protein p53 interaguje spolu s Mdm2 a navzájem se ovlivňují. Je známo, že p53 aktivuje Mdm2 a zvyšuje jeho expresi, zatímco Mdm2 protein p53 inhibuje a zastavuje tak jeho funkci při reakci na stres (Moll, Petrenko, 2009).

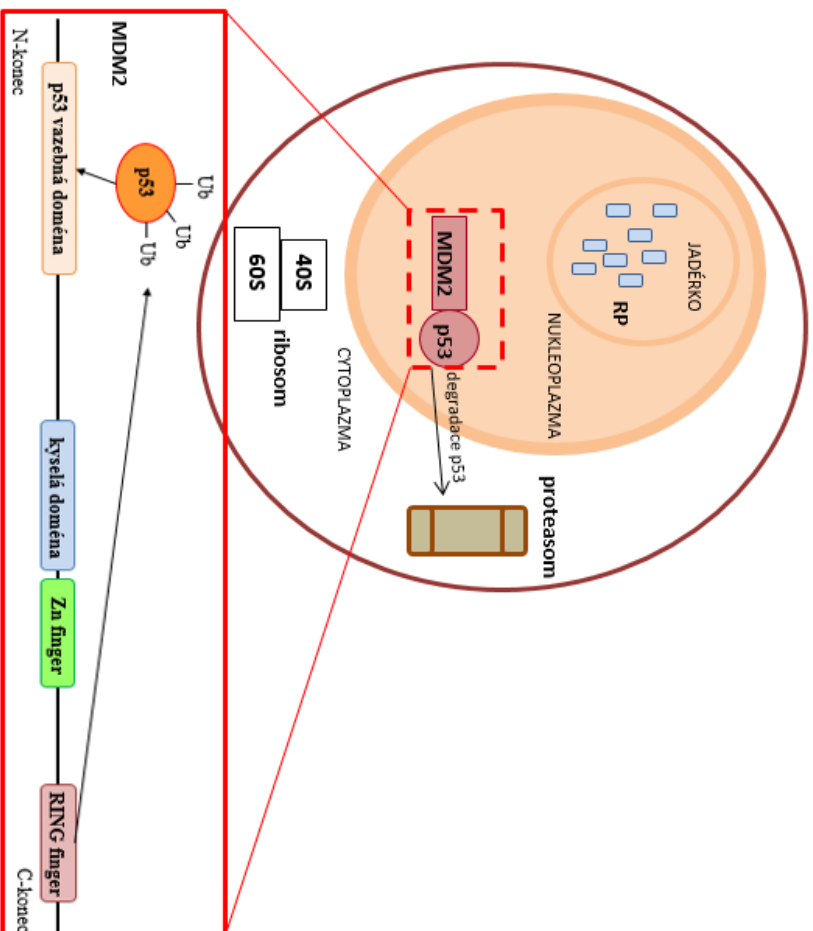
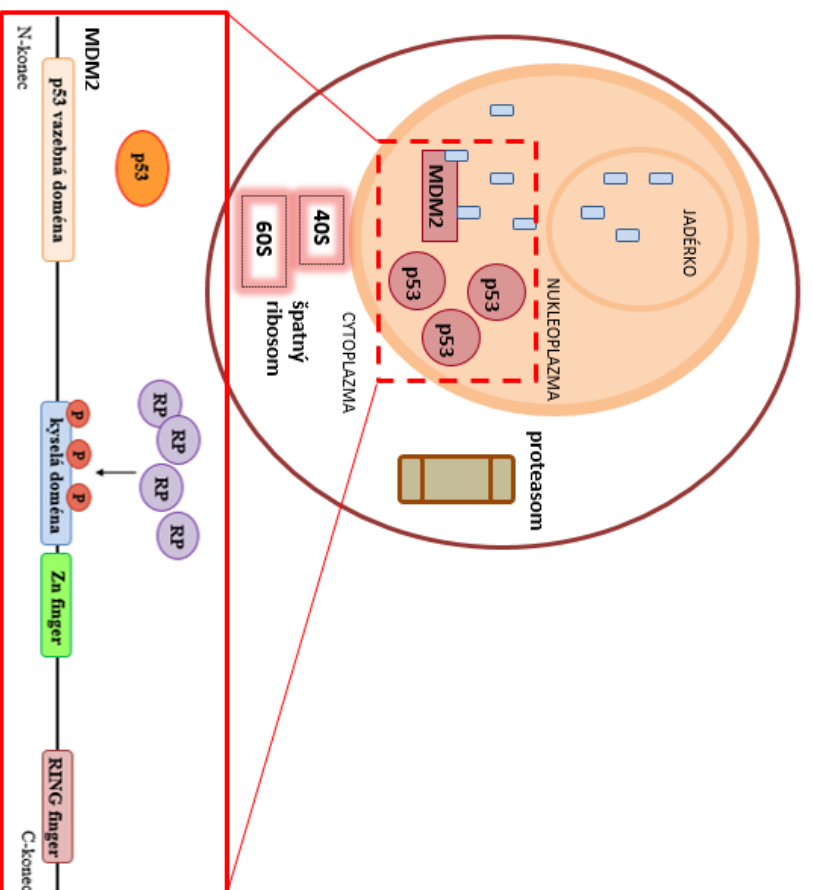
## **2.2 Ribosomální stres**

Ribosomální stres vedoucí k narušení buněčné homeostázy se nazývaný také jako stres nukleolární, a je termínem, který se nyní používá k popisu poruch biogeneze nebo funkce ribosomů. Je charakteristický markantními změnami, jež se týkají jádérka, ať už jeho funkce (nižší tvorba rRNA a ribosomů) či struktury (nukleolární segregace, kdy jsou kondenzovány a separovány FC a GC oblasti jádérka, a zároveň se vytváří tzv. jádérkové čepičky („nucleolar caps“)) (Shav-Tal, *et. al.*, 2005, Boulon *et. al.*, 2010). S takto vzniklými změnami je buňka schopna vypořádat se dvěma způsoby, a to za pomoci p53 proteinu (kap. 2.2.1) či bez něj (kap. 2.2.2).

### 2.2.1 Ribosomální stres závislý na p53

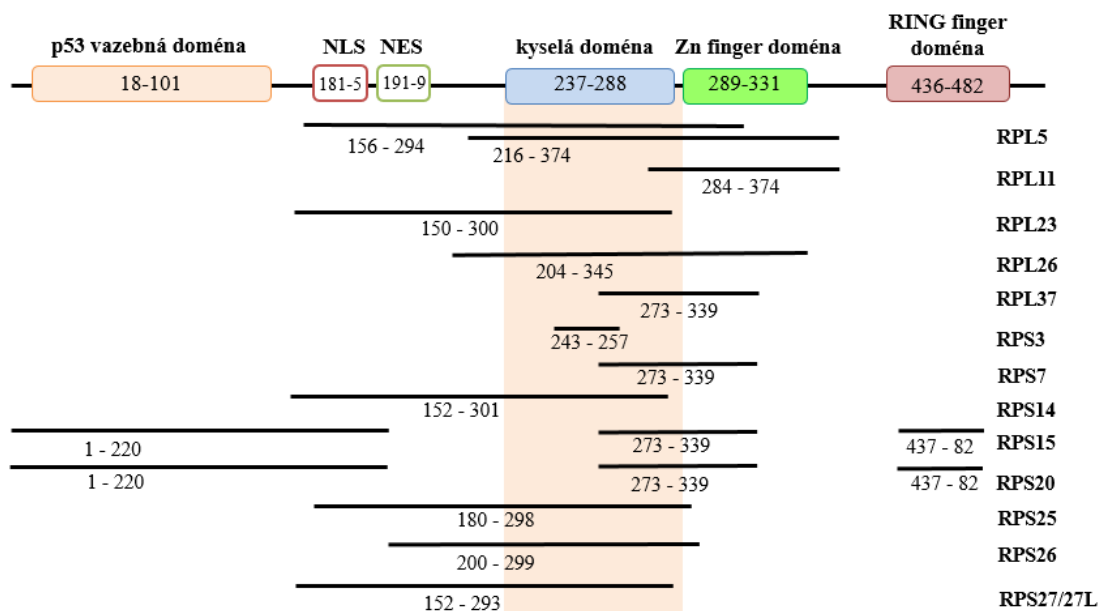
Za fyziologických podmínek se RP nachází během ribosomální biogeneze v jadérku a Mdm2 spolu s p53 jsou v jádře (Kreiner *et. al.*, 2013), kde je protein p53 navázán na N-konec proteinu Mdm2 a RING finger doména Mdm2 poté interaguje s p53 proteinem svou E3 ubikvitinovou ligasou, čímž jej degraduje v proteasomu. RP jsou v buňce použity k sestavení malé a velké podjednotky ribosomu.

V případě vyvolání ribosomálního stresu (narušením rRNA syntézy, rRNA processingu či nerovnováhou RP) dochází k potlačení biogeneze ribosomu, nesestaví se tak malá a velká podjednotka ribosomu a dochází ke změně struktury jadérka. To umožňuje ribosomálním proteinům cestovat do jaderné nukleoplazmy, kde interagují s fosforylovanou centrální oblastí Mdm2, což vede ke stabilizaci a aktivaci p53 jehož hladina se zvyšuje a vyvolává tak apoptózu buňky (Lindstrom *et. al.*, 2007). Jednotlivé děje jsou znázorněny na Obrázku 7.

**A****B**

**Obrázek 7:** Buňka za normálních podmínek (A) a během ribosomálního stresu (B). (Převzato a upraveno podle Zhang, Lu, 2009).

Každý z ribosomálních proteinů má odlišné místo pro vazbu na protein Mdm2 (Obrázek 8). Geny kódující RP jsou rozptýleny na různých chromosomech (Tabulka 1) a je přísně regulováno, aby bylo vytvářeno správné množství těchto RP v poměru k rRNA. V případě nerovnováhy těchto poměrů dochází k selhávání při sestavě funkčních ribosomů, což má za následek ribosomální stres.



**Obrázek 8:** Mdm2 protein a jeho funkční domény se znázorněnými regiony, na které jsou vázány ribosomální proteiny (převzato a upraveno od Kim *et. al.*, 2014)

**Tabulka 1:** Rozpis vazebných míst jednotlivých RP s Mdm2 proteinem (Kim *et. al.*, 2014)

Ribosomální proteiny	Interagující části na Mdm2	Lokace na chromosomu
Velká podjednotka		
RPL5	153-294, 216-374	1p22.3-p22.1
RPL11	284-374	1p36.1-p35
RPL23	150-300, 384-425	17q11.2-q12
RPL26	204-345	17p13
RPL37	273-339	5p13.3-p13.1
Malá podjednotka		
RPS3	243-257	11q13.3-q13.5
RPS7	273-339	2p25.3-p25.1
RPS14	152-301	5q33.1-q33.3
RPS15	1-220, 273-339, 437-482	19p13.3
RPS20	1-220, 273-339, 437-482	8q11.2-q13
RPS25	180-298	11q23.3
RPS26	200-299	12q13
RPS27	151-293	1q21.1-21.3
RPS27L	151-293	15q22.1

Z ribosomálních proteinů jsou nejvíce studovány RPL5 a RPL11, které pravděpodobně hrají nejvýznamnější roli v regulaci p53. Bylo zjištěno, že tyto RP jsou speciálně chráněny při ribosomálním stresu proti degradaci v proteazomu na rozdíl od jiných RP, jako například RPL23, RPL25 a RPS7 (Bursac *et. al.*, 2012). Tyto RP se vážou na centrální kyselou oblast Mdm2 velmi podobným způsobem (Dai *et. al.*, 2004) a pro správnou vazbu obsahují specifické domény. Je pravděpodobné, že vazba pouze jednoho RP na Mdm2 není dostatečná k jeho potlačení a je potřeba určité množství těchto RP v komplexu, kde spolu RP přímo komunikují a regulují pak Mdm2. I když se RPL5 a RPL11 mohou vázat na Mdm2 jednotlivě, studie naznačují, že ochranný účinek stability p53 je mnohem větší v případě, že se vážou v komplexu (Horn a Vousden, 2008, Nicolas *et. al.*, 2016).

Konkrétně u proteinů RPL5 a RPL11 dochází při poruše ribosomální biogeneze k jejich navázání na Mdm2 protein, což vede ke snížené degradaci a aktivaci p53 proteinu (Teng *et. al.*, 2013). RPS7 protein je také považován za pozitivní regulátor p53, a to prostřednictvím modulace aktivity proteinu Mdm2. Při vazbě RPS7-Mdm2-p53 dochází k inhibici E3 ligasové aktivity Mdm2 proteinu a nedochází k ubikvitinaci p53 (Chen *et. al.*, 2007). RPL26 protein se při ribosomálním stresu váže na tzv. 5' UTR (untranslated region) oblast a nadměrná exprese tohoto proteinu indukuje zástavu G1 fáze buněčného cyklu a spouští tak apoptózu (Takagi *et. al.*, 2005). Obecně tedy blokáce Mdm2 ubikvitin ligasové aktivity vede ke zvýšené aktivitě p53 v buňce (Lindstrom *et. al.*, 2007). Při nedostatku RPS6, RPS7 nebo RPS23 dochází k aktivaci p53 bez zjevného narušení jadérka. Dochází k produkování nadbytečného množství RPL11, které pak blokuje Mdm2 a aktivuje p53 protein (James *et. al.*, 2014).

Při překonávání stresu dochází k zastavení buněčného cyklu v pozdní G1 fázi (Song *et. al.*, 2013), což je důležitým krokem, který poskytne dostatek času k reparaci. Je-li poškození správně opraveno, p53 aktivuje protein Mdm2, který reguluje p53 dvěma způsoby (Zhang a Lu, 2009): Přímou vazbou na p53, kdy maskuje transaktivační doménu p53 nebo nepřímo, jako E3 ubikvitin ligasa pro p53 (Oline *et. al.*, 1993), která zajišťuje kunjugaci ubikvitinu s p53 a jeho následnou degradaci v proteazomu (Micel *et. al.*, 2013).

### 2.2.2 Ribosomální stres nezávislý na p53

Druhá možnost, ribosomální stres nezávislý na p53, neovlivňuje p53 protein a vede tedy k zástavě buněčného cyklu bez něj (Donati *et. al.*, 2012).

První možný mechanismus probíhá na základě inhibice syntézy rRNA způsobující snížení exprese E2F-1 transkripčního faktoru. Za normálních okolností je E2F-1 chráněn před degradací v proteazomu prostřednictvím interakce s Mdm2, která zabraňuje vazbě s E3 ligasou zodpovědnou za E2F-1 ubikvitinaci (Zhang *et. al.*, 2005). Inhibice syntézy rRNA uvolní ribosomální protein L11 (RPL11), jež vazbou na Mdm2 blokuje jeho stabilizační funkce na E2F-1 proteinu (Donati *et. al.*, 2011). E2F-1 faktor je důležitý pro přechod buňky z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu a je-li tento faktor bez ochrany, dochází k jeho degradaci v proteazomu a buněčný cyklus je zastaven.

Dále bylo prokázáno, že RPL11 protein může negativně regulovat transkripční faktor c-MYC nezávisle na Mdm2-p53 dráze (Dai a Lu, 2008). c-MYC je gen řídící syntézu DNA a buněčný cyklus a je zodpovědný za správnou biogenezi ribosomů usnadňováním exprese genů, které zajišťují správný chod buněčného cyklu. Při interakci c-MYC s RPL11 dochází ke snižování aktivity c-MYC, což vede ke snižování buněčné proliferace (van Riggelen, 2010). Je také známo, že RPL11 protein spolupracuje s RPL5 proteinem a prostřednictvím mRNA degradace potlačují aktivitu c-MYC (Liao *et. al.*, 2014).

Další mechanismus nezávislý na p53 je spojován s PIM1 (serotonin/theronin-protein kinasa) regulující buněčný cyklus, přežití a proliferaci, a to zejména v hematopoetických buňkách (Iadevaia *et. al.*, 2010). PIM1 kináza je regulována cytokiny, růstovými faktory a hormony, které snižují aktivitu p27Kip1 CDK inhibitoru a zvyšují jeho degradaci (Morishita *et. al.*, 2008). Tato kinasa je stabilizována interakcí s RPS19 proteinem a vazbou na zralé ribosomy. Při nedostatku zralých ribosomů se zvyšuje degradace PIM1 kinázy v proteazomu, tím se snižuje hladina PIM1 a dochází ke stabilizaci a aktivaci CDK inhibitoru p27Kip1, což způsobuje blok v G1 fázi buněčného cyklu (Iadevaia *et. al.*, 2010). PIM1 také navíc zvyšuje aktivitu c-MYC jeho fosforylací. Snížením hladiny PIM1 se tedy sníží také aktivita c-MYC a sníží se proliferace buněk.

### 3 Ribosomopatie

V průběhu let bylo popsáno několik onemocnění a syndromů způsobené poruchou biogeneze a funkce ribosomů (Narla a Ebert, 2010). Tyto poruchy byly zařazeny do sbírky tzv. ribosomopatie typické specifickým klinickým fenotypem, jako jsou např. poruchy kostní dřeně, které se vyznačují sníženým počtem červených krvinek (anémie), malformace kostry a vyšší predispozice ke vzniku rakoviny. Prekurzorové červené krvinky potřebují velké množství ribosomů na syntézu hemoglobinu a musí si je vytvořit ještě před ztrátou jádra.

Diamondova-Blackfanova anémie je definována jako vrozená, autozomálně dominantní hypoplastická makrocytární anémie. Toto onemocnění je zapříčiněno vrozenou mutací v některém z genů, které kódují ribosomální proteiny, a způsobuje selhání funkce kostní dřeně, což vede ke snížení produkce krevních elementů. Podrobněji bude probrána v následující kapitole (viz kap. 3.1).

5q-syndrom je způsoben somaticky získanou delecí krátkého ramene chromozómu 5, na kterém leží ribosomální protein RPS14 (Ebert *et. al.*, 2008). Ztráta tohoto ramene vede k RPS14 haploinsufficienci a fenotypu erytrocytů velmi podobné jako u Blackfanovy-Diamondovy anémie.

Treacher Collinsův syndrom je vyvolán mutací v TCOF1 genu, vedoucí k haploinsufficienci treacle proteinu a snížené úrovni produkce rRNA. TCOF1 gen kóduje protein melasu, jež je základním proteinem pro transkripci rRNA genů a je lokalizována spolu s vazebnými faktory a polymerázou I v jadérku (Valdez *et. al.*, 2004).

Dyskeratosis congenita je soubor multisystémových fenotypově heterogenních onemocnění (Heiss *et. al.*, 1998). I když jsou jednotlivé defekty způsobeny mutacemi v různých genech, tyto geny mají společné, že každý z nich kóduje protein ovlivňující aktivitu telomerázy či stabilitu telomerázového komplexu a toto rychlé zkracování telomer není pro buňky výhodné. Extrémní forma tohoto onemocnění je způsobena mutací v proteinu zvaném dyskleretin. Ten působí jako nukleolární protein a je spojen se snoRNAs zapojenými do rRNA processingu.

Syndrom hypoplastických chrupavek a vlasů je typický pro Amíše a finské populace s charakteristickými končetinami krátkého vzrůstu vyplývající z kosterní displazie a je spojen s mutací v genu RMPR (Welting *et. al.*, 2004). RMPR kóduje



snoRNA, které jsou součástí mitochondriálního RNA processing komplexu, který je primárně lokalizován v jadérku, kde zpracovává pre-5S rRNA.

Shwachmanův-Diamondův syndrom (SDS) je porucha s širokou škálou příznaků (Ganapathi *et. al.*, 2007). Jako příčina tohoto syndromu, byly identifikovány mutace v SBDS genu. Po přemístění 60S ribosomální podjednotky do cytoplasmy, eIF6 z jeho povrchu musí být propuštěn k vytvoření kompletní 80S ribosomu, což má provádět právě SBDS protein. Pokud je SBDS poškozen, odštěpení eIF6 není možné a následně tedy ani tvorba zralých ribosomu.

### 3.1 Diamondova-Blackfanova anémie

Diamondova-Blackfanova anémie (DBA, MIM# 205900) je jednou z vzácných geneticky podmíněných poruch kostní dřeně, která byla poprvé zaznamenána v roce 1936 (Josephs, 1936) a úplněji pak popsána Diamondem a Blackfanem v roce 1938 (Diamond a Blackfan, 1938). Tato nemoc postihuje z pravidla 7 jedinců z 1 miliónu narozených. Prvotní projevy jsou patrné již při porodu a během prvních měsíců jeho života, kdy je novorozenec velice slabý a anemický. Tento stav je způsoben snížením hormonu erytropoetinu, který je zodpovědný za produkci erytrocytů (Vlachos *et. al.*, 2001). Malé množství erytrocytů má obvykle novorozenec z důvodu reakce na zvýšený parciální tlak kyslíku spolu se zvýšeným hemoglobinem. Dochází k posunu afinity hemoglobinu k nižším hodnotám, což umožňuje větší dodávku kyslíku do tkání a tyto změny vedou k vytvoření přechodné anémie. Následně má být stav červených krvinek ustálen (Lipton a Ellis, 2009), což se u pacientů s DBA bohužel nepodaří. Obvykle se příznaky objeví jako vrozená aplazie erytropoézy s mírnou makrocytózou, retikulocytopenií a téměř nepřítomnými erytroidními prekurzory v jinak normální kostní dřeni (Vlachos *et. al.*, 2010). Zároveň se u těchto jedinců vyskytuje zvýšená hladina fetálního hemoglobinu (HbF) (Vlachos *et. al.*, 2008) z důvodu poruchy erytropoézy a enzymu adenosindeaminasy (eADA) v postižených erytrocytech a oproti klasické anémii, 25 – 40 % pacientů s DBA trpí přídruženými anomáliemi s vyšší pravděpodobností ke vzniku maligních chorob (Tabulka 2).

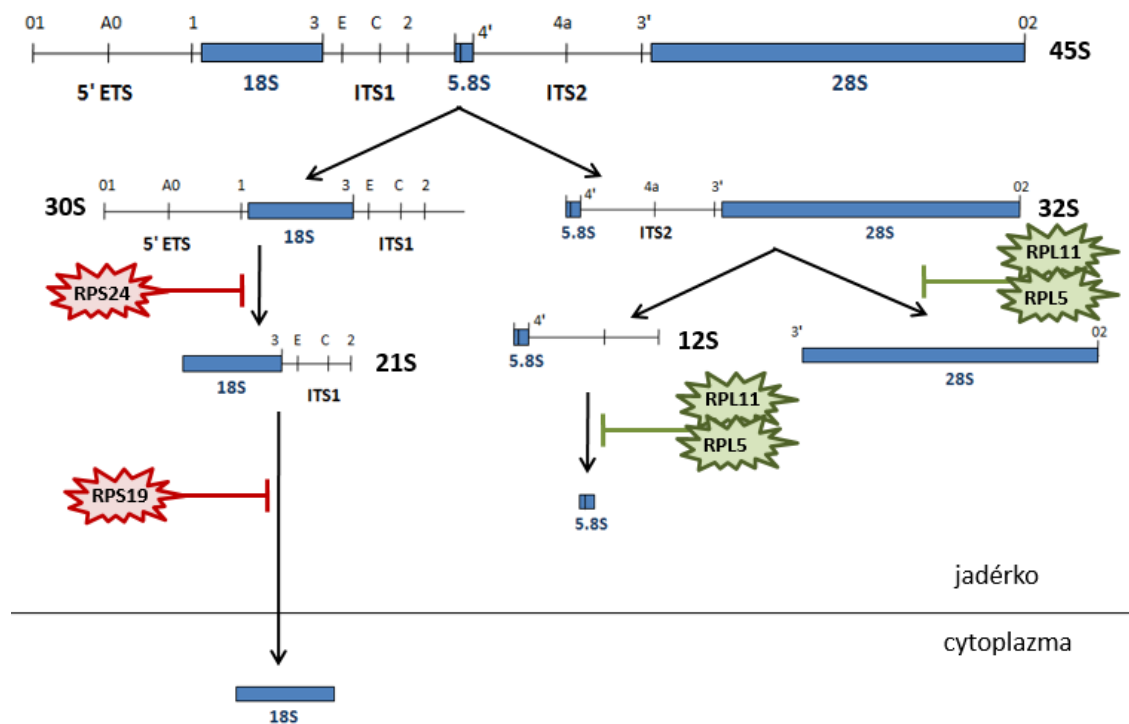
**Tabulka 2:** Seznam přidružených anomálií u DBA onemocnění (převzato z Willig, 1999)

Anomálie	Frekvence výskytu
Kraniofaciální dysmorfie	31 %
Anomálie palce	14,6 %
Anomálie skeletu	8,8 %
Anomálie ledvin	8 %
Anomálie srdce	5 %
Další	22,8 %

DBA onemocnění bylo detekováno u pacientů s mutacemi ve 13 odlišných genech. Prvních dvanáct genů kóduje RP a patří zde zástupci pro velkou podjednotku: RPL5 a RPL11 (Gazda *et. al.*, 2008), RPL15 (Landowski *et. al.*, 2013), RPL26 (Gazda *et. al.*, 2012), RPL31 (Farrar *et. al.*, 2014), RPL35A (Farrar *et. al.*, 2008) i malou podjednotku ribosomu: RPS7 (Watkins-Chow *et. al.*, 2013), RPS17 (Cmejla *et. al.*, 2007), RPS19 (Willig *et. al.*, 1999), RPS24 (Gazda *et. al.*, 2006), RPS26 a RPS10 (Doherty *et. al.*, 2010). Třináctý gen kóduje protein GATA1 (Sankaran *et. al.*, 2012), což je transkripční faktor podílející se na vývoji erytrocytů. Ve většině případů, DBA vzniká spontánně ztrátou funkce mutací v jedné ze dvou kopií genu ribosomálního proteinu a je obvykle přenášena autosomálně dominantním způsobem. Asi 90 % pacientů je postiženo mutací v genu RPS19, RPL5, RPS26, RPL11, RPL35A nebo RPS24. Zbýlých 10 % má mutaci v jiném genu. Mutace v RPS19 a RPS24 byly jako první 2 mutace identifikované u DBA pacientů (Choismel *et. al.*, 2008; Flygare *et. al.*, 2007).

Mutace v genech pro RP ovlivňují buňku a procesy v ní mnoha způsoby, mezi které patří defekt v ribosomální biogenezi aktivující p53 dependentní dráhu hromaděním volných RP (Lindstrom *et. al.*, 2007) nebo zastavení buněčného cyklu v pozdní G1 fázi (Song *et. al.*, 2013) pro následnou reparaci. Charakteristická je také tvorba nefunkčního ribosomálního proteinu či přerušení translace (inzercí, delecí, posunem čtecího rámce aj.). Ribosomální proteiny jsou součástí prekurzorů ribosomů a pomáhají zrání pre-rRNA, jejich deplece tedy vede k blokadě v různých krocích RNA processingu a k ovlivnění zpracování prekurzorů ribosomu (Henras, *et. al.* 2015). Obecně platí, že nedostatek některého z RPS proteinů vede k poruchám v pre-18S-rRNA processingu a akumulaci prekurzorů 21S rRNA (Obrázek 9 značeno červeně). Následkem toho můžeme pozorovat pokles množství volných 40S podjednotek, který vede ke zvýšení hladiny volných 60S podjednotek a významnému snížení množství

zralých 80S ribosomů. Naopak při nedostatku RPL proteinů dochází k akumulaci 5.8S a 28S rRNA (Obrázek 9 značeno zeleně) a ke snížení hladiny volných 60S podjednotek (Robledo *et. al.*, 2008). Celkově je tedy zřejmé, že mutace v genech kódujících RP vedou u DBA pacientů ke snížení počtu zralých ribosomů.



**Obrázek 9:** Zjednodušené schéma rRNA processingu v lidských buňkách s vyznačenými mutacemi v genech pro RPL a RPS (RPS19, RPS24, RPL5 a RPL11) (převzato a upraveno podle Dianzani a Lorenzi, 2008).

U pacientů s DBA můžeme také pozorovat markantní změnu jader. To je díky absenci membrány velmi dynamickou strukturou, jež je schopna okamžitě reagovat na změny (virová infekce, DNA poškození, stres aj.) morfologickou či kompoziční alterací, jako je reorganizace jednotlivých oblastí jádra (FC, DFC, GC), nukleolární segregace a vytváření tzv. jadérových čepiček („nucleolar caps“) (Nicolas *et. al.*, 2016).

Průměrná doba přežití nemocných s DBA onemocněním je 46 let a u těžkých neléčených forem pouze okolo 15 let. Medián přežití činí u DBA 31-42 let, u neléčených těžkých forem 13 let. K léčbě této nemoci se užívají kortikoidy, transfúze krve s podáním chelátoru železa, transplantace kmenových buněk a další.

## **PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Ze vzorků krve pacientů s DBA onemocněním, které byly získány za pomoci Prof. MUDr. Dagmar Pospíšilové, Ph.D (FN Olomouc), byly v laboratoři tkáňových kultur ve sterilním prostředí kultivovány lymfoblastoidní linie (LCL) vytvořené Mgr. Zuzanou Macečkovou transfekcí lymfocytů virem Epstein-Barrové (EBV). Transfekce byla provedena u čtyř pacientů s DBA onemocněním a jednoho kontrolního vzorku zdravého jedince. Pacienti měli heterozygotní mutaci v odlišných RP (Tabulka 3). LCL linie byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (RNBF1543, Sigma-Aldrich, USA) s přídatkem 10% fetálního bovinního séra (P110704, PAN-Biotech, Německo) a antibiotika penicilin-streptomycin (10 mg/ml, 115M4795V, Sigma-Aldrich, USA). Kultivace buněk byla prováděna v plastových kultivačních lahvích T75 (TPP Trasadigen, Švýcarsko) za pomoci inkubátoru nastaveného na 37°C, 95% vlhkost a 5% CO<sub>2</sub> atmosféry.

**Tabulka 3:** Genotyp LCL buněčných linií, všechny mutace jsou heterozygotní

Číslo pacienta	Gen	Mutace	Místo mutace
K	Kontrola	Kontrola	Kontrola
01	RPS26	c.4-1G>A, p.Met1	Intron 1
02	RPS26	c.6_9delAAAG, p.Lys4GlufsX40	Exon 2
03	RPL5	c.169_172delAACA, p.Asn57GlufsX12	Exon 3
04	RPS19	c.173C>T, p.Ala58Val	Exon 4

### 4.2 Izolace RNA

#### 4.2.1 Chemikálie

Trizol, chloroform, isopropanol, 75% ethanol, DEPC (dietyl pyrokarbonát), voda.

#### 4.2.2 Postup

Pelety s buňkami byly rozsuspendovány v 1 ml trizolu, směs byla ponechána 5 minut stát a poté bylo přidáno 200 µl chloroformu. Pomocí vortexu byly obsahy zkumavek promíchány a následně ponechány při laboratorní teplotě, dokud se nevytvořila vrchní čirá vrstva. Centrifugací 15 min na 12 000 g při 4°C došlo k oddělení jednotlivých vrstev. 500 µl vrchní čiré vrstvy obsahující RNA bylo odebráno do nové zkumavky.

K objemu bylo přidáno 500  $\mu$ l isopropanolu za účelem precipitace RNA. Následovala centrifugace (10 min při 12 000 g, 4°C), a vzniklá peleta s RNA byla promyta v 1,5 ml 75% ethanolu, centrifugována za stejných podmínek, sušena ve floxboxu a poté rozpuštěna v DEPC vodě. Vzorky byly inkubovány v termobloku při 60°C 10 min a poté schlazeny. Koncentrace a čistota RNA byla zjištěna pomocí NanoDrop spektrofotometru dle pokynů výrobce.

### **4.3 Analýza buněčného cyklu**

#### **4.3.1 Chemikálie**

PBS, 70% ethanol, PI roztok (70 mM roztok v PBS), roztok ribonukleázy A (0,7 M, 060M7000V, Sigma-Aldrich, USA), citrátový pufr (0,5 M roztok citrátu trisodného monohydrátu v H<sub>2</sub>O).

#### **4.3.2 Postup**

1 milion buněk (změřeno pomocí Vi-Cell XR (Beckman Coulter)) bylo napipetováno do cytometrických zkumavek, stočeno (5 min, 500 g), promyto v PBS, fixováno v 70% ethanolu při 4°C a uchováno přes noc při - 20°C. Druhý den byly buňky centrifugovány 5 min (500 g), promyty v PBS a rozsuspendovány ve 4 ml citrátového pufru. Po následné centrifugaci za stejných podmínek bylo přidáno 500  $\mu$ l roztoku PI, následovalo zvortexování a inkubace 15 min ve tmě ve vodní lázni vytemperované na 37°C. Poté bylo přidáno 200  $\mu$ l roztoku ribonukleázy A a následovala inkubace 15 minut ve tmě ve vodní lázni při 37°C. Vzorky byly uchovány 1 hodinu při 4°C a poté analyzovány pomocí průtokového cytometru FACS Calibur s argonovým laserem (excitace při 488 nm) a pomocí softwaru CellQuest. Měření bylo vyhodnocováno v programu ModFit verze 2 (Verity Software House) a zpracováno v programu Excel (Microsoft Office 2010).

## **4.4 Detekce fosforylace histonu H3**

### **4.4.1 Chemikálie**

PBS, 70% ethanol, 1% FBS, 0,25% roztok Tritonu X-100 v PBS, PBS + 1% FBS, primární protilátky Anti-phospho-Histone H3 (Anti-H3pSer10-FITC, 06-570, Merck Millipore, Canada) v PBS + 1% FBS, sekundární protilátka Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1705868, Life Technologies) v PBS + 1% FBS, 14 mM roztok PI v PBS.

### **4.4.2 Postup**

1 milion buněk (změřeno pomocí přístroje Vi-Cell XR (Beckman Coulter)) bylo napipetováno do cytometrických zkumavek, stočeno (5 min, 500 g, 4°C), promyto v PBS, fixováno v 70% ethanolu při 4°C a uchováno přes noc při - 20°C. Druhý den byly buňky centrifugovány 5 min (500 g), promyty v PBS + 1% FBS, opět centrifugovány za stejných podmínek a poté inkubovány 15 minut na ledě s 1 ml vychlazeného 0,25% roztoku Tritonu X-100 v PBS. Po přidání 10 ml PBS + 1% FBS a stočení buněk bylo na 1 hodinu přidáno 100 µl primární protilátky (ředění 1:200), následovalo promytí v PBS a 1 % FBS a inkubace 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě se 100 µl sekundární protilátky (ředění 1:5000). Po promytí ve 2 ml PBS s 1 % FBS byla provedena inkubace 30 minut s 500 µl roztoku PI a RNAsy ve tmě při 37°C. Tyto vzorky byly poté analyzovány pomocí průtokového cytometru FACS Calibur s argonovým laserem (excitace při 488 nm) a pomocí softwaru CellQuest. Měření bylo vyhodnocováno programem ModFit verze 2 (Verity Software House) a zpracováno v programu Excel (Microsoft Office 2010).

## **4.5 Analýza apoptózy**

Pro měření programované buněčné smrti byly vzorky zpracovány stejným způsobem jako u detekce fosforylace histonů. Analýza byla prováděna pomocí průtokového cytometru FACS Calibur s argonovým laserem (excitace při 488 nm) a pomocí softwaru CellQuest. Měření bylo vyhodnocováno v programu ModFit verze 2 (Verity Software House) a zpracováno v programu Excel (Microsoft Office 2010).

## 4.6 Imunofluorescence

### 4.6.1 Chemikálie

PBS, 4% formaldehyd v PBS, blokovací pufr (5% FCSi, 0,3% Triton X), 0,1% Tween v PBS, 5% FBS v PBS, destilovaná voda.

### 4.6.2 Postup

150 000 buněk bylo pomocí cytocentrifugy Cyto-Tek (SAGURA) nastřeleno na podložní sklo. Následovala fixace 15 min ve 4% formaldehydu v PBS, inkubace 1 hodinu v blokovacím pufru a poté s primární protilátkou (seznam použitých protilátek viz. Tabulka 5) v 5% FBS v PBS přes noc při 4°C.

**Tabulka 5:** Seznam použitých protilátek

Protilátka	Výrobce	Kód	ředění	sekundární protilátka
Nukleolin	abcam	ab22758	1:500	anti-rabbit
Nukleofosmin	abcam	ab10530	1:500	anti-mouse

Po inkubaci probíhalo promytí 5 min v 0,1% Tweenu v PBS, 5 min v PBS, 5 min v 0,1% Tweenu v PBS a poté inkubace 1 hod se sekundární protilátkou v 5% FBS v PBS (ředění 1:1000). Následně byly skla promývána 5 min v 0,1% Tweenu v PBS, 2 × v destilované vodě a označeny pomocí Hoechst 33342. Skla byla zakápnuta montážním médiem a pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu. Obrázky byly upravovány pomocí programu ZEN.

## 4.7 Double RNA FISH

### 4.7.1 Chemikálie

4% formaldehyd v PBS, PBS, 70% ethanol, RNA WASH pufr (2xSSC, 10% formamid), směs se sondou (10% formamid, 2xSSC, 0,005 tRNA, 10% dextran, 250 ng/μl BSA, 10 mM vanidyl, 1 μl próby – viz Tabulka 6), montážní médium.

**Tabulka 6:** Sekvence sond na double RNA FISH detekci

Detekční sonda	Sekvence
ITS1 (Cy5)	5'-CCTCGCCCTCCGGGCTCCGTTAATGATC-3'
ITS2 (Cy3)	5'-GCGATTGATCGGCAAGCGACGCTC-3'



## 4.7.2 Postup

Objem s 200 000 buňkami byl pomocí cytocentrifugy Cyto-Tek (SAGURA) nastřelen na sklo. Nastřelené buňky byly fixovány ve 4% formaldehydu v PBS, opláchnuty v PBS a ponechány 24 hod v 70% ethanolu při teplotě - 20°C. Druhý den byla skla dvakrát promyta v RNA WASH pufru a inkubována 4 hodiny při 37°C se sondou. Poté byla skla opláchnuta v nahřátém RNA WASHi, ponechána uschnout ve tmě a naznačena pomocí DAPI (Hoechst). Skla byla zakápnuta montážním médiem a pozorována pomocí fluorescenčního mikroskopu. Obrázky byly upravovány pomocí programu ZEN.

## 4.8 Northern blot

### 4.8.1 Chemikálie

10× MOPS pufr (200mM MOPS, 50mM sodium acetate, 20mM EDTA), 20× SSC pH 7,5 (3M NaCl, 300mM sodium citrate), loading buffer (200 µl 100% formamidu, 83 µl 37% formaldehydu, 50 µl 10× MOPS pufru, 10 µl 2,5% bromfenolové modři, 50 µl glycerolu, 57 µl RNA vody), LSB (10% SDS v 50 ml 2 × SSC), HSB (10% SDS v 50 ml 0,5 × SSC),

DIG Northern Starter Kit (Cat. No. 12 039 672 910), CDP-Star®, ready-to-use (12041677001, Roche).

### 4.8.2 Namíchání detekčních sond

Próby byly připraveny za pomoci optimalizovaného protokolu (Terminal transferase protocol – NEB – M0315S) smícháním 8 µl Terminal Transferase Reaction Bufferu, 8 µl CoCl<sub>2</sub>, 4 µl 10 mM dNTP, 4 µl Terminal transferasy, 12 µl DEPC vody a 40 µl oligo a následnou inkubací 30 minut při 37°C a poté 10 min při 70°C.

Sekvence sondy ITS1: 5'ITS1 (5'-CCTCGCCCTCCGGGCTCCGTTAATGATC-3')

Sekvence sondy ITS2: ITS2b (5'-CTGCGAGGAACCCCCAGCCGCGCA-3')

ITS2d/e (5'-GCGCGACGGCGGACGACACCGCGGCGTC-3')

Dalším krokem pak bylo otestování próby na membráně Hybond-N+ (GE Healthcare, Orsay, France) podle schématu, které je znázorněno v Tabulce 7.

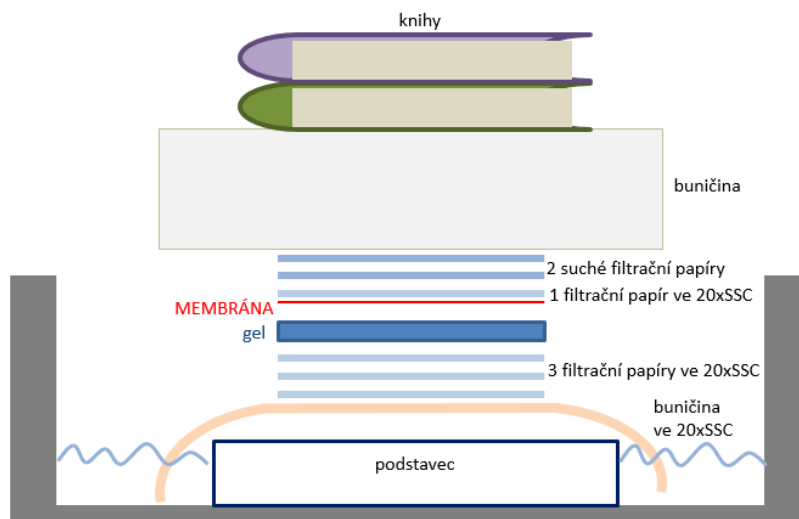
**Tabulka 7:** Schéma testování připravených prób

jamka stripu	množství oligo v $\mu\text{l}$	z jamky	voda v $\mu\text{l}$	finální koncentrace (fmol/ $\mu\text{l}$ )	ředění
A (1)	1	Originální	24	100	1:25
B (2)	3	1	7	30	1:3,3
C (3)	2	1	18	10	1:10
D (4)	2	2	18	3	1:10
E (5)	2	3	18	1	1:10
F (6)	--	--	20	0	--

Z výsledných zkumavek s odlišnými koncentracemi prób byl odebrán multikanálovou pipetou 1  $\mu\text{l}$ , který byl nanesen na membránu, a ta byla ponechána uschnout. Poté byla membrána vložena na 5 minut pod UV, 1 hodinu promývána v 1 $\times$  DIG Easy Hyb a 30 minut v blokovacím roztoku. Následovala inkubace s protilátkou Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (11093274910 Roche) v blokovacím roztoku 1 hodinu, promytí 2 $\times$  15 minut v 1 $\times$  DIG High Wash roztoku a poté byla provedena detekce pomocí roztoku CDP-Star®, membrána byla ponechána s roztokem 5 minut ve tmě. Membrány byly vyfoceny a signály vyhodnoceny pomocí přístroje LI-COR (ODYSSEY).

#### 4.8.3 Postup Northern blot metody

Aparatura byla před použitím sterilizována vysvícením pod UV a poté byl připraven 1% agarosový gel (1 $\times$  MOPS pufr, 37% formaldehyd). Během tuhnutí gelu v digestoři byly nachystány vzorky tak, že z naměřené koncentrace (v ng/ $\mu\text{l}$ ) bylo vypočítáno množství na 10  $\mu\text{g}$ , k vypočítanému množství byl přidán stejný objem loading bufferu a tato směs byla vložena na 10 min do 65°C, aby došlo k denaturaci a vytvoření jednovláknových molekul. Každý vzorek byl zastoupen dvakrát, pro následnou detekci pomocí sondy ITS1 a ITS2. Vzorky byly schlazeny a napipetovány do jamek agarosového gelu v pořadí: K, 01, 02, 03, 04 mezera K, 01, 02, 03, 04 pro následné rozstřížení membrány na 2 odlišné detekce (ITS1 a ITS2 sondou). Elektroforéza jela v 1 $\times$  MOPS pufru v chladicí místnosti 1 hodinu při 100 V a poté 20 hodin při 25 V. Gel byl po elektroforetickém rozdělení promýván společně s nylonovou membránou Hybond N+ (GE Healthcare, Orsay, France) 2  $\times$  15 min ve 20  $\times$  SSC. Po promytí následovalo blotování na membránu (viz. Obrázek 10).



**Obrázek 10:** Schéma sestavení při blotování na membránu.

Do jamky okolo aparatury byl nalit roztok 20× SSC a blotování probíhalo po dobu 4 hod v chladicí místnosti. Poté byla membrána vyjmuta z aparatury, rozstřížena na 2 stejné části a promyta 5 min ve 2× SSC, čímž došlo k odstranění zbytků agarosu a uvolnění nadbytečných solí. Poté byl proveden crosling membrány pomocí UV 5 min a membrána byla ponechána uschnout v digestoři, aby byla připravena pro následné značení připravenými sondami. Po uschnutí byla membrána 1 hodinu promývána v 1× DIG Easy Hyb roztoku při 45°C a poté ponechána inkubovat s ITS1 a ITS2 sondami přes noc při 45°C. Druhý den byly membrány promyty v LSB při pokojové teplotě a v HSB při 45°C. Následovalo promytí v 1× DIG High Wash, inkubace 30 minut v blokovacím roztoku, inkubace 1 hodinu s protilátkou Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (11093274910 Roche, ředění 1:10 000) v blokovacím roztoku, promytí 2× 15 minut v 1× DIG High Wash roztoku a poté byla provedena detekce pomocí CDP-Star®. Membrány byly vyfoceny a signály vyhodnoceny pomocí přístroje LI-COR (ODYSSEY).

## 4.9 Western blot

### 4.9.1 Chemikálie

RIPA pufr (50mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS), Pre diluted protein assay standards: Bovin serum albumin (BSA) set (Thermo Scientific), Bicinchonon Acid Solution, Cooper (II) sulfat solution,

5× SDS loading buffer pH 6,8 (250 mM Tris-HCl, 10% SDS, 30% glycerol, 0,5M DTT, 0,02% bromfenolová modř), Ladder (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder), 1× TGS (Tris-Glycine-SDS), AN I (0,3M Tris, 10% methanol, pH 10,4), AN II (25 mM Tris, 10% methanol, pH 10,4), CAT (25 mM Tris, 40 mM e-amino-n-caproic acid, 20% methanol, pH 9,4), 1× TBS (pH 7,5, 6,05 g Tris –Cl a 9,76 g 150 mM NaCl), TBS-T (1× TBS obsahující 0,05% Tweenu 20), 5% BSA v TBS-T, Ponceau S, 5% sušené mléko v TBS-T, substrát pro křenovou peroxidasu (Luminata™ Forte Western HRP Substrate)

#### 4.9.2 Izolace proteinů

Pelety sklizených buněčných linií byly rozpuštěny v RIPA pufru, ponechány na ledu po dobu 30 minut a poté byla provedena sonikace 30 sekund (10% amplituda). Následovala centrifugace (1400 rpm, 5 min) a supernatant s proteiny byl odebrán do nové eppendorfky.

#### 4.9.3 Změření a výpočet koncentrace

Do 96 jamkové destičky bylo napipetováno 20 µl jednotlivých vzorků, přičemž do první jamky (A) byl vždy nanesen blank (voda) do prvního sloupce standardy 1-7 viz Tabulka 8.

**Tabulka 8:** Schéma nanesení vzorků na 96 jamkovou destičku

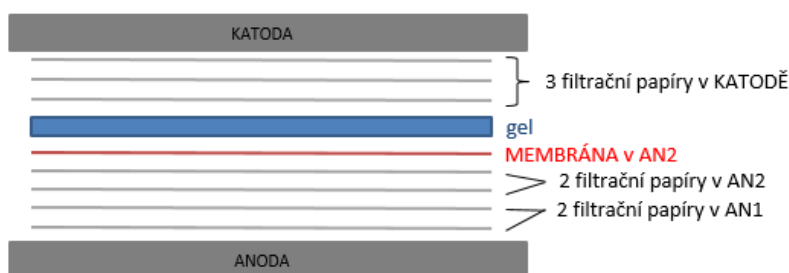
	1	2
A	Blank	blank
B	S1 (125 µg/ml)	vzorek
C	S2 (250 µg/ml)	vzorek
D	S3 (500 µg/ml)	vzorek
E	S4 (750 µg/ml)	...
F	S5 (1000 µg/ml)	
G	S6 (1500 µg/ml)	
H	S7 (2000 µg/ml)	

V Petriho misce bylo smícháno 8 ml Bicinchinon Acid Solution se 160 µl Cooper (II) sulfát solution a multikanálovou pipetou bylo 160 µl této směsi přidáno do každé jamky. Následovala inkubace 15 min při 60°C a poté byla koncentrace změřena destičkového spektrofotometru Multimode plate reader EnSpire (Perkin Elmer)

a naměřené hodnoty byly zpracovány v programu Excel (Microsoft Office 2010), kdy z hodnot standardů byl vytvořen bodový graf závislosti koncentrace na naměřených hodnotách, který byl proložen lineární spojnicí trendu a pomocí rovnice přímky byly dopočítány hodnoty koncentrace našich vzorků (v  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### 4.9.4 Postup Western blot metody

Pro analýzu vzorků metodou WB byly nachystány gely k separaci proteinů. Nejprve byl namíchán separační gel (na jeden gel: 1,65 ml vody, 2 ml 30% akrylamidu, 1,25 ml 1,5M Tris (pH 8,8), 50  $\mu\text{l}$  10% SDS, 50  $\mu\text{l}$  10% amonium persulfátu, 2  $\mu\text{l}$  TEMEDu), který byl převrstven 200  $\mu\text{l}$  butanolu a po ztuhnutí gelu byl namíchán zaostřovací gel (na jeden gel: 1,75 ml vody, 412,5  $\mu\text{l}$  30% akrylamidu, 312,5  $\mu\text{l}$  1M Tris (pH 6,8), 25  $\mu\text{l}$  10% SDS, 25  $\mu\text{l}$  10% amonium persulfátu, 5  $\mu\text{l}$  TEMEDu), který byl navrstven na gel separační. Vzorky byly mezi tím smíchány s 5 $\times$  SDS loading bufferem, poté byly inkubovány 10 min při 95°C a rychle schlazeny na ledu. Po stočení na mikrofuze byly vzorky nanесeny do jamek gelu, přičemž do první jamky byly nanесeny 3  $\mu\text{l}$  Ladderu a elektroforéza byla spuštěna v aparatuře zalité 1 $\times$  TGS pufrem na 15-20 min při 60 V a poté zhruba na 1 hodinu při 150 V. Po separaci proteinů pomocí elektroforézy bylo provedeno blotování na membránu (Trans-Blot Transfer Medium Supported Nitrocellulose Membrane, 0,2  $\mu\text{m}$ , BIO-RAD) vytvořením „sandwiche“ z filtračních papírů namočených v roztocích AN I., AN II. a CAT (obrázek 11).



**Obrázek 11:** Schéma při blotování na membránu.

Pomocí přístroje Trans-Blot Turbo (Transfer System, BIO-RAD) bylo provedeno blotování za podmínek 25 V, 1 A po dobu 30 minut. Po přeblotování vzorků na membránu byl přenos zkontrolován za pomoci barviva Ponceau S, které bylo odmyto TBST roztokem a následně byla membrána inkubována 1 hod v mléku, opláchnuta

v TBS-T a ponechána přes noc s primární protilátkou (Tabulka 9) v 5% BSA v TBS-T v chladicí místnosti.

**Tabulka 9:** Seznam použitých protilátek

<b>Protilátka</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Kód</b>	<b>Ředění</b>	<b>Sekundární protilátka</b>	<b>Velikost</b>
p53	Santa Cruz Biotechnology	Sc-6243	1 : 250	Rabbit	53 kDa
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	Sc-32233	1 : 1000	Mouse	45 kDa
RPL11	Cell Signaling Technology	18163S	1 : 1000	Rabbit	20 kDa
RPS26	Abcam	ab104050	1 : 250	Rabbit	17 kDa
RPL5	Cell Signaling Technology	14568S	1 : 500	Rabbit	34 kDa
RPS19	Santa Cruz Biotechnology	Sc-100836	1 : 1000	Mouse	16 kDa

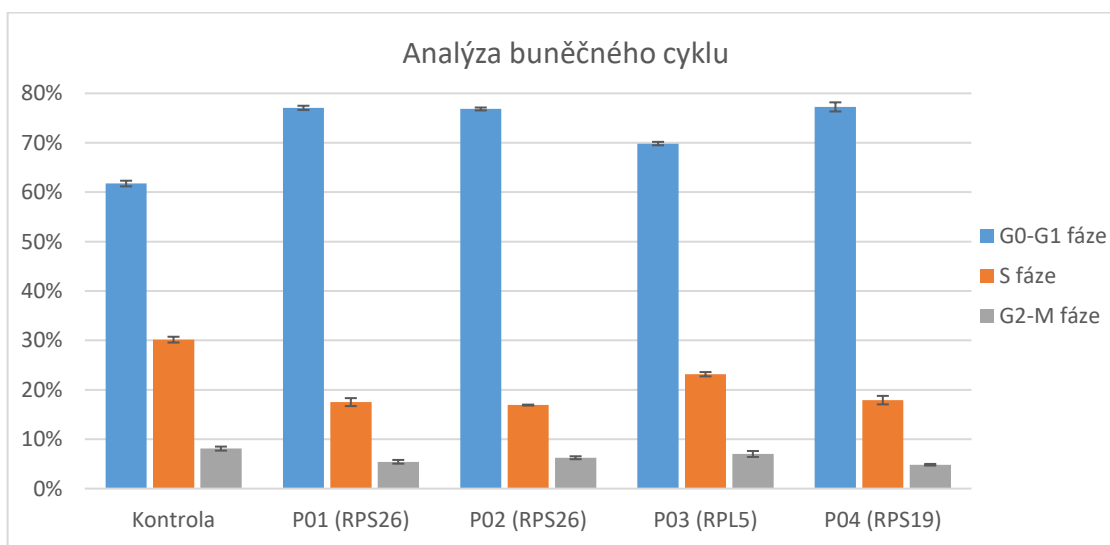
Druhý den byla membrána promyta 2× 5 minut v TBS-T a poté inkubována se sekundární protilátkou o ředění 1:10 000. Po inkubaci bylo provedeno rychlé promytí 3× v TBS-T a poté byla membrána pokapána substrátem pro křenovou peroxidasu a ponechána 5 minut působit ve tmě. Membrány byly vyfoceny a signály vyhodnoceny pomocí přístroje pro kvantifikaci proteinů LI-COR (ODYSSEY).

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Analýza buněčného cyklu

Pro detekci jednotlivých fází buněčného cyklu bylo použito barvení fluorescenčním barvivem propidium jodidem (PI), které díky své schopnosti vmezeřit se mezi vlákna DNA umožňuje semikvantitativně stanovit celkové množství DNA a také rozložení buněčné populace ve fázích buněčného cyklu. Buněčný cyklus byl analyzován ve třech nezávislých opakováních za pomoci průtokového cytometru. Bylo zjištěno, že vzorky pacientů s DBA onemocněním vykazovaly oproti kontrole zvýšené množství buněk v G0-G1 fázi buněčného cyklu. Z Grafu 1 je nárůst buněk oproti kontrole (61,75 %) v G0-G1 fázi patrný, a to u vzorku P01 a P02 a P04 velmi podobný, zhruba o 15 %, a u vzorku P03 byl nárůst nejnižší, a to o 8 %.

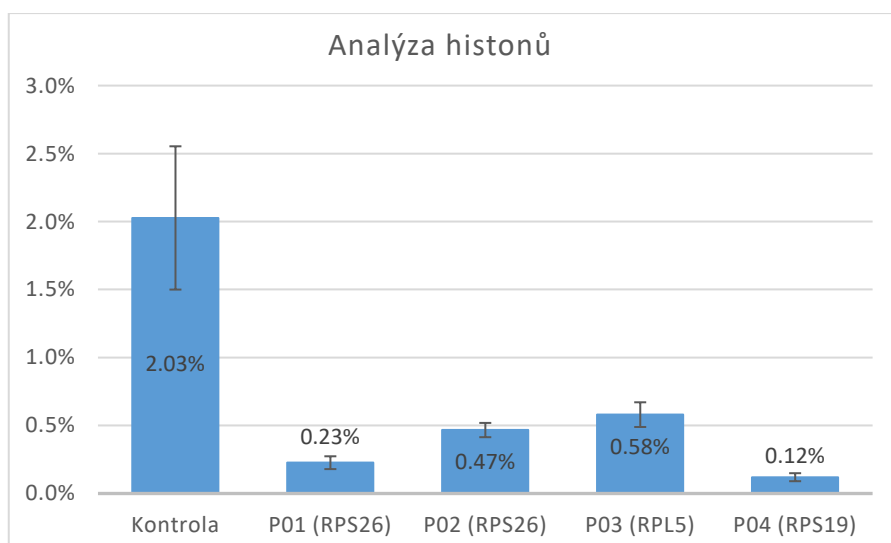
Počet buněk v S fázi a G2-M fázi buněčného cyklu byl u patientských vzorků nižší oproti vzorku kontrolnímu. U vzorku P01, P02 a P04 kleslo množství buněk v S fázi oproti kontrole (30,15 %) o 13 %, u vzorku P03 o 7 %. G2-M fáze je u vzorků P01-P04 nižší oproti kontrole (8,10 %) o 2,7 %, 1,9 %, 1,09 % a 3,3 %, v tomto pořadí.



**Graf 1:** Graf znázorňující množství buněk v procentech u kontrolního vzorku a vzorků pacientů s DBA onemocněním (s odlišnými mutacemi v ribosomálních proteinech) v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Buňky byly zafixovány, označeny pomocí propidium iodidu a podrobeny analýze za pomoci průtokového cytometru.

## 5.2 Detekce fosforylace histonu H3

Histony jsou proteiny, které obsahují velké množství kladně nabitých aminokyselin (arginin a lysin), díky kterým vážou záporně nabitou cukr-fosfátovou kostru DNA. Ta se omotává okolo histonů, zmenšuje tak svoji délku. Histony tak zodpovídají za uspořádání DNA v chromosomech. Nejvíce je chromatin kondenzován během metafáze mitózy (Slabý et al., 2015). Změřením fosforylace histonu H3 na Ser10 (HpSer10) jsme schopni detekovat mitotické buňky a odlišit je tak od buněk v G2/M fázi. Z výsledků znázorněných v Grafu 2 je patrné, že pacienti s DBA mají mnohem nižší hladinu mitotických buněk než kontrolní vzorek zdravého jedince (2,03 %). Nejnižší hladina byla naměřena u pacienta s mutací v RPS19 ribosomálním proteinu (P04), a to o 1,91 % nižší než u kontrolního vzorku. Druhá nejnižší hladina (o 1,8 %) byla naměřena u P01 s mutací v RPS26. O něco vyšší hodnoty, ale stále nižší ve srovnání s kontrolou, byly naměřeny u vzorků P02 (RPS26 mutace) a P03 (RPL5 mutace), a to o 1,56 % a o 1,45 % nižší, v tomto pořadí.

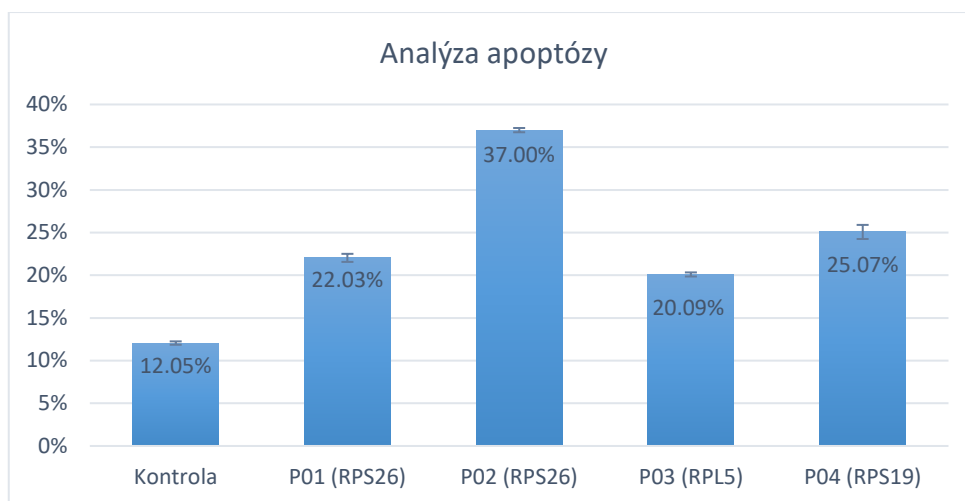


**Graf 2:** Graf znázorňující množství histonů u kontrolního vzorku a vzorků pacientů s DBA onemocněním (s odlišnými mutacemi v ribosomálních proteinech) v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Buňky byly zafixovány, označeny pomocí sekundární protilátky Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG vázající se na primární protilátku Anti-phospho-Histone H3 a podrobeny analýze za pomoci průtokového cytometru.



### 5.3 Analýza apoptózy

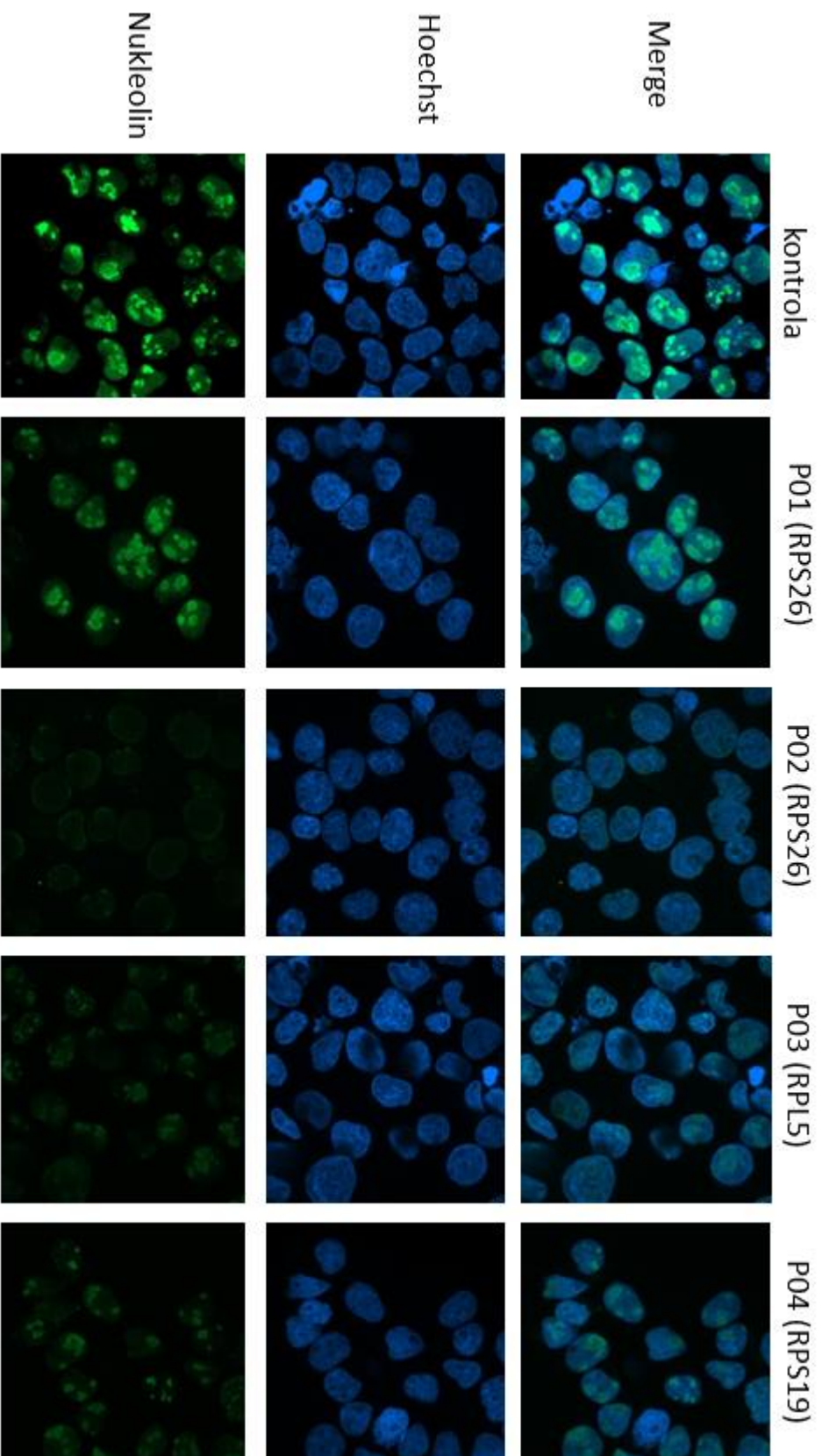
Za pomoci průtokového cytometru byl u všech vzorků zjištěn také počet apoptotických buněk. Naměřené hodnoty byly zaznamenány do Grafu 3. U všech patientských vzorků je možné pozorovat nárůst apoptotických buněk oproti kontrole (12,05 %), a to konkrétně u P01 o 9,98 %, u P02 o 24,95 %, u P03 o 8,04 % a u vzorku P04 o 13,02 %.



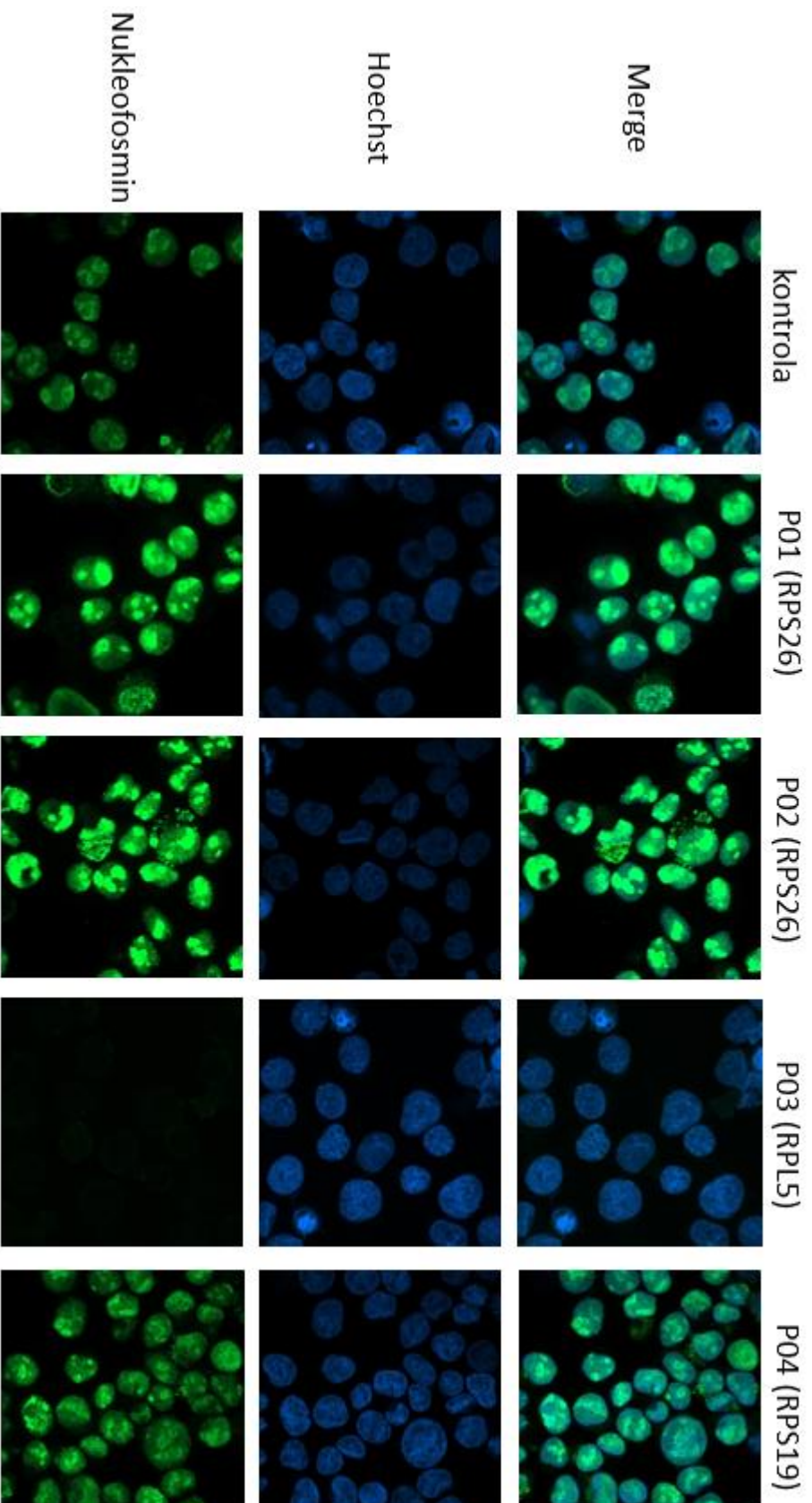
**Graf 3:** Graf znázorňující množství buněk v apoptóze u kontrolního vzorku a vzorků pacientů s DBA onemocněním (s odlišnými mutacemi v ribosomálních proteinech) v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Buňky byly zafixovány, označeny pomocí sekundární protilátky Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG vázající se na primární protilátku Anti-phospho-Histone H3 a podrobeny analýze za pomoci průtokového cytometru.

### 5.4 Imunofluorescence

Za pomoci konfokálního mikroskopu byla pozorována imunofluorescence proteinu nukleolinu (Obrázek 12) a nukleofosminu (Obrázek 13), které se podílejí na výsledném tvaru a velikosti jadérek v buňce. Z Obrázku č. 10 je patrné, že množství nukleolinu je u patientských vzorků nižší než u vzorku kontrolního. Na Obrázku 11, znázorňujícího detekci proteinu nukleofosminu, je možné vidět naopak zvýšení hladin u všech patientských vzorků, kromě vzorku P03 s mutací v ribosomálním proteinu RPL5, kde je naopak množství nukleofosminu nižší. Z Obrázku 11 je také viditelná změna velikosti jadérek u P01 a P02 vzorku s mutacemi v RPS26. Jadérka jsou v porovnání s kontrolou mnohem větší a jejich počet na jednu buňku je nižší. U pacienta s mutací v RPS19 (P04) můžeme pozorovat mírnou nukleolární segregaci.



**Obrázek 12:** Snímky LCL linií kontrolního vzorku a pacientů s DBA s imuno fluorescenčně naznačeným proteinem nukleolinem (zeleně). Hoechst 33342 – obarvená buněčná jádra, Merge – spojení všech fluorescenčních kanálů dohromady.



**Obrázek 13:** Snímky LCL linií kontrolního vzorku a pacientů s DBA s imunofluorescenčně naznačeným proteinem nukleofosminem (zeleně). Hoechst 33342 – obarvená buněčná jádra, Merge – spojení všech fluorescenčních kanálů dohromady.

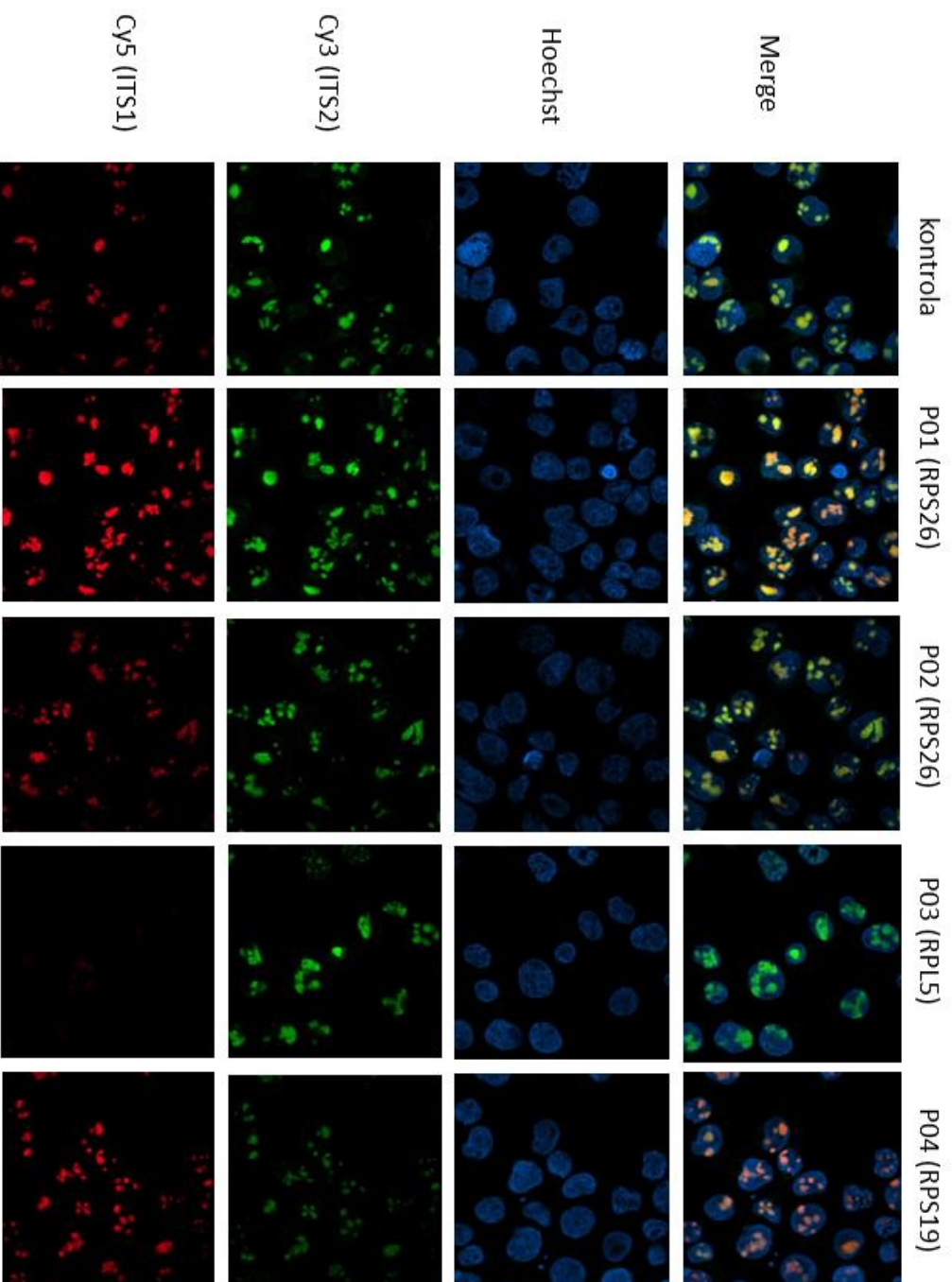
## 5.5 Double RNA FISH

Za pomoci konfokálního mikroskopu byly u jednotlivých vzorků pořízeny snímky z dvojité RNA fluorescenční *in situ* hybridizace se sondami ITS1 a ITS2, díky kterým jsme schopni detekovat hladiny rRNA prekurzorů pro 40S a 60S: 18S a 5.8S. ITS1 sonda se váže na 18S konec rRNA a začátek ITS1 oblasti. ITS2 sonda se váže na konec 5,8S rRNA a začátek oblasti ITS2 pre-rRNA, viz Obrázek 14.



**Obrázek 14:** Schéma vazby fluorescenčních sond ITS1 a ITS2 na rRNA řetězec.

Z vytvořených snímků (Obrázek 15) je patrné, že u kontrolního jedince je poměr ITS1 a ITS2, tedy prekurzorové a rozštěpené rRNA v jadérku zhruba stejný, vzniká tedy shodný počet 40S a 60S podjednotek pro tvorbu 80S ribosomů. U pacientů s DBA onemocněním jsou okem viditelné změny. U P01 pacienta je výrazně zvýšená hladina ITS1 sondy, u P03 je pak hladina ITS1 naopak téměř nulová. P04 má oproti ostatním sníženou hladinu ITS2 sondy.

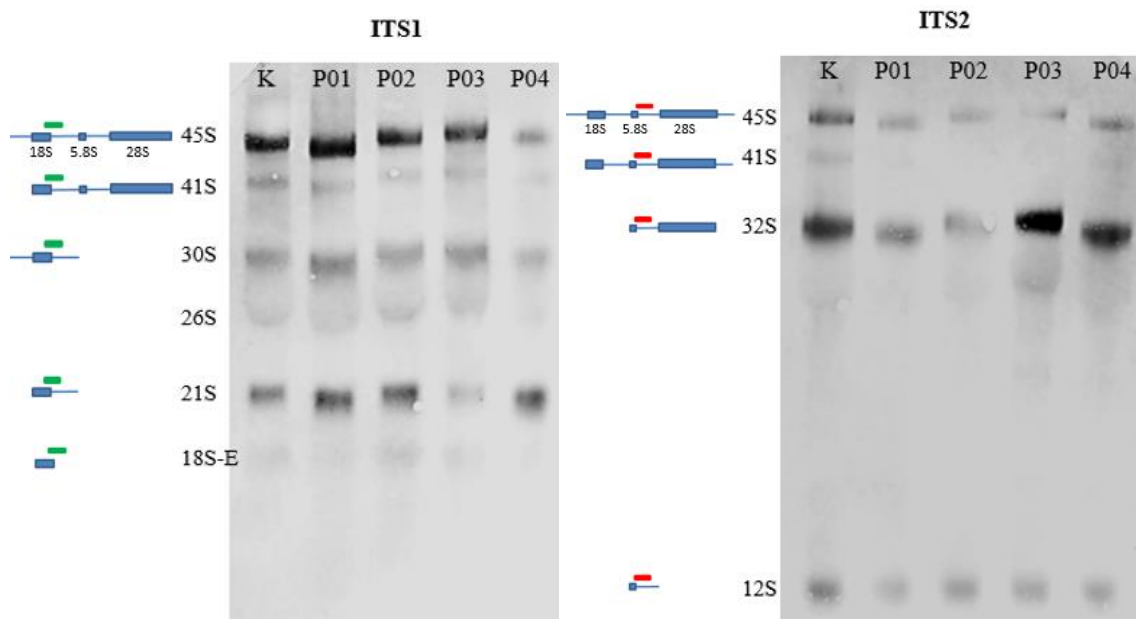


**Obrázek 15:** Snímky LCL linií kontrolního vzorku a pacientů s DBA onemocněním značené pomocí dvojité RNA fluorescenční *in situ* hybridizace za použití fluorescenčních sond ITS1 (zelená) a ITS2 (červená). Hoechst 33342 – obarvená buněčná jádra, Cy3 - ITS1 sonda, která se navázala na konec 18S rRNA a začátek vnitřní transkribovaného spaceru, Cy5 - ITS2 sonda, která se navázala na konec 5,8S rRNA a začátek vnitřní transkribovaného spaceru 2, Merge – spojení všech fluorescenčních kanálů dohromady



## 5.6 Northern blot

Za pomoci specifické sondy ITS1 a ITS2, které se vážou na rRNA, byla provedena detekce protilátkou vázající se na digoxigenin sond (Obrázek 16). Z vytvořených snímků je vidět variabilita mezi jednotlivými pacienty. U pacientů 1, 2 a 4 (s mutací v RPS) je po označení sondou ITS1 patrná akumulace 21S prekurzoru, což značí zvýšenou hladinu 40S podjednotky a nedostatek 60S pro tvorbu ribosomu. U pacienta P03 (mutace v RPL5) je hladina 21S nízká a můžeme pozorovat ohromné zvýšení hladiny 32S prekurzoru rRNA po značení sondou ITS2.



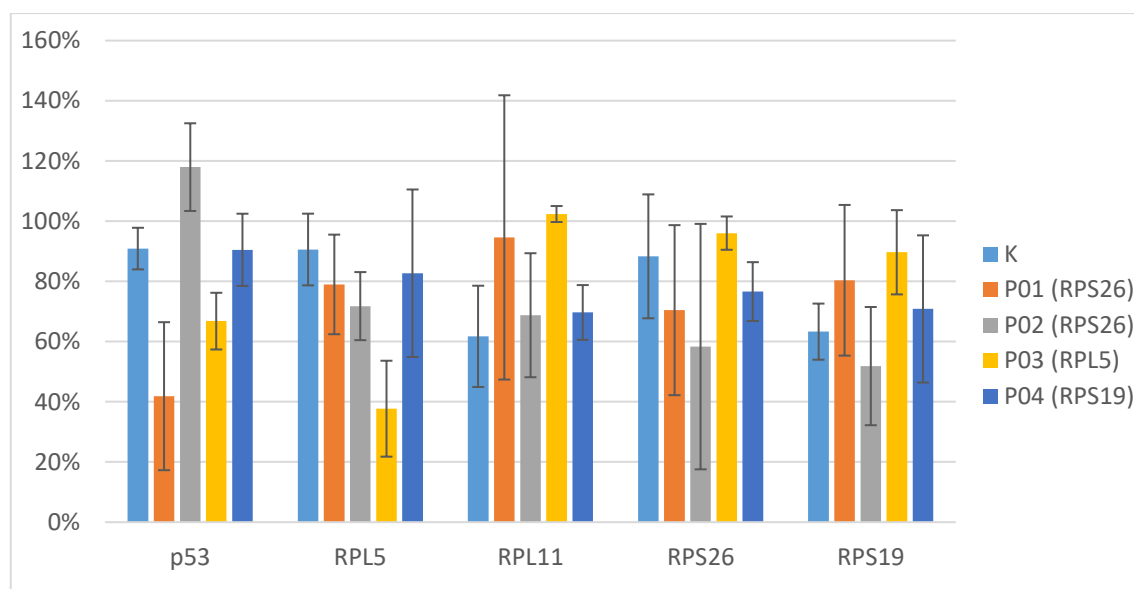
**Obrázek 16:** Northern blot analýza LCL linií za použití 2 detekčních sond (ITS1 a ITS2) vázajících se do odlišného místa rRNA (vznačeno zeleně a červeně)

## 5.7 Western blot

Western blot analýza proteinů byla prováděna v triplikátech pro každý protein a naměřené hladiny signálu jednotlivých proteinů byly dány do poměru s proteinem GAPDH, který je u všech jedinců zastoupen ve stejném množství.

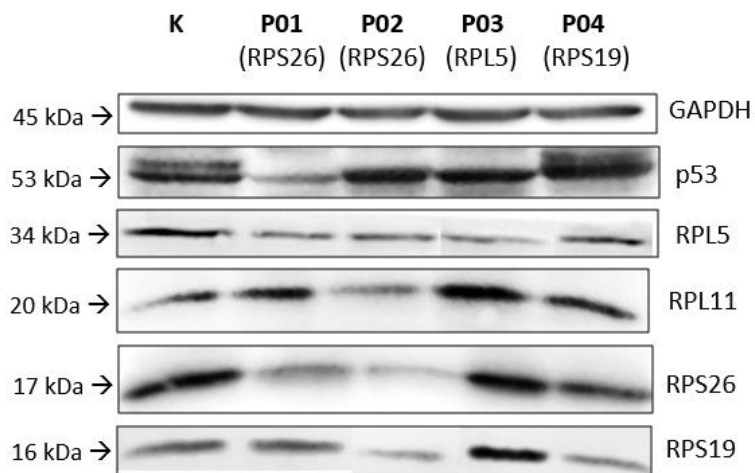
Dle naměřených výsledků znázorněných v Grafu 5 je hladina p53 proteinu u P01 a P03 pacienta oproti vzorku kontrolnímu (90,90 %) nižší, a to u P01 o 49 % a u pacienta P03 o 24 %. Pacient P04 nevykazuje v porovnání s kontrolou téměř žádný posun hladiny p53 proteinu a u pacienta P02 byla detekována hladina vyšší než

u kontroly. Hladina RPL5 proteinu byla u všech pacientů vzhledem ke kontrole zhruba stejná, vyjma pacienta P03 s mutací právě v proteinu RPL5, kde hladina RPL5 klesla oproti kontrole (90,59 %) o 53 %. Tento pacient také vykazuje zvýšenou hladinu RPL11 proteinu oproti kontrole (61,74 %) o 53 %. Z Grafu 4 je patrné, že u pacientů P01 a P02 s mutací v RPS26 proteinu bylo množství tohoto proteinu oproti kontrole nižší. Konkrétně je snížení oproti kontrole (88,33 %) u P01 o necelých 10 % a u P02 o 30 %. Zvýšené množství RPS19 proteinu má dle grafu pacient P01, P03 a P04. Sníženou hladinu má naopak pacient P02.



**Graf 4:** Western blot analýza LCL linií kontrolního vzorku a DBA pacientů. Pro kvantifikaci množství proteinů bylo provedeno srovnání s GAPDH proteinem. Analýza byla provedena ve třech opakováních.

Vybrané snímky z western blott analýz jednotlivých pacientů a kontrolního vzorku byly použity k vytvoření Obrázku 17, kde je také patrné srovnání exprese jednotlivých proteinů.



**Obrázek 17:** Srovnání exprese proteinů p53, RPL5, RPL11, RPS26 a RPS19 u LCL buněčných linií pacientů DBA a kontrolního jedince pomocí western blot analýzy. Pro kvantifikaci množství proteinů bylo provedeno srovnání s GAPDH proteinem. Analýza byla provedena ve třech opakováních.



## 6 DISKUZE

Jadérko je velice specializovanou a nepostradatelnou strukturou v buňce a má mnohá využití. Mezi jeho hlavní funkce patří tvorba ribosomů (ribosomální biogeneze), regulace mitózy, buněčného cyklu, sestřihu mRNA, proliferace, senescence aj. (Brown a Dawid, 1968, Boisvert *et. al.*, 2007). Ribosomy jsou důležitými molekulami buňky pro jejich důležitost v procesu proteosyntézy. Jejich tvorba je pro buňku velice náročný proces a narušení některého z kroků syntézy může mít markantní následky.

Diamond-Blackfanova anémie je genetická porucha projevující se špatnou sestavou ribosomů, což vede ke zpožděné translaci prekurzorů červených krvine (globinu) a přebytku hemu. Volný hem je pro buňky toxický, a dochází tak k buněčné smrti (Yang *et. al.*, 2016). Dominantní teorií je, že je v buňkách přebytek určitých ribosomálních proteinů, aktivuje se p53 protein a dochází k buněčné apoptóze (Dott *et. al.*, 2011). Nicméně, proč je erytropoéza ovlivněna zatímco jiné linie jako granulocyty, lymfocyty a nehematopoetické buňky fungují správně, stále není vysvětleno.

Přibližně 50 % pacientů má mutaci v jednom z genů kódujících ribosomální proteiny. Ve zbylých případech je příčina vzniku tohoto onemocnění prozatím neznámá.

Mutace v ribosomálních genech obvykle vedou v buňce k ohromným změnám, jako je narušení ribosomální biogeneze, zastavení buněčného cyklu za asistence p53 i bez tohoto proteinu s pomocí jiných proteinů (E2F-1, c-MYC, PIM1). Pro téměř polovinu jedinců s tímto onemocněním je typický vznik vývojových malformací a zvýšené riziko vzniku rakoviny (Willig, 1999).

Ribosomální stres vede k narušení struktury jadérka a vlivem toho pak RP mohou přijít do kontaktu s Mdm2 proteinem, který má za fyziologických podmínek inhibovat funkci p53, což v této situaci není schopen a hladina p53 proteinu se tak zvyšuje (Lindstrom *et. al.*, 2007). Z výsledků analýzy buněčného cyklu, apoptózy a mitózy je patrné, že pacienti s DBA onemocněním mají zvýšenou aktivitu p53 dependentní či independentní dráhy, což zvyšuje množství buněk, které jsou v G1 fázi buněčného cyklu. Vyšší obsah apoptotických buněk u pacientů s DBA také koreluje s výsledky z analýzy buněčného cyklu, většinu oprav buňky pravděpodobně nezvládaly včas a byly nuceny využít k vyřešení situace programovanou buněčnou smrt.

Nukleolin (NCL) je protein označovaný jako „RNA binding protein“, což znamená, že je v přímém kontaktu s touto nukleovou kyselinou. Za stresových

podmínek dochází v buňce ke snížení rDNA transkripce, které můžeme pozorovat jako snížení hladiny NCL v buňce. Nízká hladina NCL vede k zástavě buněčného cyklu, apoptóze aj (Ugrinova *et. al.*, 2007). Námi naměřené výsledky potvrzují tento fakt, jelikož hladina NCL je u pacientů s DBA mnohem nižší než u kontroly a z analýzy BC a apoptózy jak již bylo zmíněno, je hladina buněk v G1 fázi vyšší a také je zvýšené množství apoptotických buněk u patientských vzorků.

Nukleofosmin (NPM1) je nukleolární protein potřebný jako endoribonukleáza štěpící ITS2 oblast při pre-rRNA processingu a funguje jako klíčový regulátor při nukleární regulaci buněčné homeostázy (Savkur a Olson, 1998). NPM1 je molekulární chaperon, který se v buňce účastní opravy poškození dvouřetězcových DNA, podílí se na duplikaci centrosomy při profázi a tvorbě mitotického vřeténka v metafázi (Yip *et. al.*, 2011). Jeho snížená hladina nutí buňku k použití programované buněčné smrti a tak se buňka snaží jeho hladinu zvyšovat a tím buňku před apoptózou chránit, což je také viditelné v našich snímků jednotlivých pacientů vyjma pacienta P03. U tohoto pacienta s mutací v RPL5 proteinu byla hladina NPM1 téměř nulová podle Yu *et. al.*, 2006 je vlivem inhibice či snížené hladiny NPM1 zablokován jaderný export RPL5 proteinu a 5S rRNA vedoucí opět k apoptóze. Můžeme se tak domnívat, že NPM1 přímo interaguje s RPL5 proteinem. Je zde ale také možnost chyby ve značení při přípravě vzorku, a proto by měl být experiment zopakován.

Pro pacienty s DBA onemocněním je u RPS mutací typické hromadění 21S prekurzoru projevující se nedostatkem velké podjednotky 40S nezbytné pro tvorbu ribosomu. Hladinu 21S prekurzoru je možné detekovat za pomoci ITS1 specifické sondy, která byla použita v našich analýzách. U pacientů s RPL mutací se naopak akumuluje 32S prekurzor a nedostatek je prekurzorů malé podjednotky 30S, což můžeme zviditelnit díky ITS2 sondy (Robledo *et. al.*, 2008, Dianzani a Lorenzi, 2008). Tato fakta byla dvojnásobně potvrzena, a to za použití dvojité RNA fluorescenční *in situ* hybridizace pomocí vytvořených specifických ITS1 a ITS2 fluorescenčních sond a pomocí Northern blot analýzy s využitím detekčních ITS1 a ITS2 digoxigeninových sond.

Výsledek Western blot analýzy p53 proteinu je překvapující. Předpokládalo se, že podle článku Aspesi *et.al.*, 2017 budou hladiny p53 proteinu u patientských LCL linií vyšší než u vzorku kontrolního. Podle Takagi *et al.*, 2005 je navíc známo, že vysoká hladina nukleolinu má za následek jeho vazbu na 5' UTR oblast p53 a brání tak

translaci tohoto proteinu. Nízká hladina naopak vede ke zvýšení exprese p53. Z výsledků detekce imunofluorescenční sondy pro NCL bylo snížení hladiny NCL patrné a proto jsme předpokládali při western blot analýze u pacientů s DBA vysoké hladiny p53 proteinu. Zvýšení hladiny je ale možné pozorovat pouze u jednoho ze 4 pacientů. Domníváme se, že nízká hladina u ostatních pacientů může být způsobena tím, že tyto linie využívají v reakci na stres p53-independentní dráhy. Pro potvrzení této domněnky je za potřebí změřit hladiny E2F-1, c-MYC a PIM1 proteinů.

## 7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši týkající se jadérka buňky, reakce buňky na ribosomální stres se zaměřením na ribosomopatii známou jako Diamond-Blackfanova anémie. V praktické části byly pomocí několika laboratorních metod zmapovány LCL buněčné linie vytvořené z lymfocytů zdravého jedince a pacientů s DBA onemocnění s mutací v RP RPS26, RPL5 a RPS19. LCL linie byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie, Northern blot analýzy, Western blot analýzy a konfokálního mikroskopu (dvojitá RNA-FISH analýza a imunofluorescence se značeným nukleolinem a nukleofosminem). Naměřené výsledky potvrdily informace týkající se tohoto onemocnění zmíněné ve vědeckých publikacích, vyjma analýzy p53 proteinu metodou western blot. Vytvořené lymfoblastoidní linie (LCL) považujeme za vhodný modelový systém k analýze ribosomálního stresu.

## ABECEDNÍ SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

4D	tetramerizační doména
CTD	C-terminální doména
DBA	Diamondova-Blackfanova anémie
DBD	DNA-binding domain (DNA vazebná doména)
DEPC voda	dietyl pyrokarbonát voda
DFC	hustá fibrilární složka
eADA	enzym adenosindeaminasa
ETS	external transcribed spacers
FC	fibrilární centrum
GC	granulární centrum
HbF	fetální hemoglobin
ITS	internal transcribed spacers
LCL	lymfoblastoidní buněčné linie
Mdm2	Murine Double Minute protein
mRNA	mediátorová RNA
NES	nuclear export sequence (signál pro export z jádra)
NLS	nuclear localization signal (signál pro jadernou lokalizaci)
NOR	nucleolus organizer regions
PIM1	serotonin/theronin-protein kinasa
Pol I-III	polymeráza I-III
PRD	proline-rich domain (doména bohatá na prolin)
Pre-rRNA	polycistronická pre-ribosomální RNA
rRNA	ribosomální RNA
snRNA	malé nukleolární RNA
snRNP	malé ribonukleoproteiny
RP	ribosomální protein
rRNA	ribosomální RNA
SDS	Shwachmanův-Diamondův syndrom
TAD	transaktivační doména
tRNA	transferová RNA
TS	transcribed spacers
UTR	untranslated region

## POUŽITÁ LITERATURA

- Berenbom M, Chang P. I., Betz H. E., Stowell R. E. (1955) **Chemical and enzymatic changes associated with mouse liver necrosis in vitro.** *Cancer Research*, vol. 15, no. 1, pp. 1–5.
- Boisvert F.M., van Koningsbruggen S., Navascues J., Lamond A.I. (2007) **The multifunctional nucleolus.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; 8:574–585
- Boulon S., Westman B.J., Hutten S., Boisvert F.M., Lamond A.I. (2010) **The nucleolus under stress.** *Mol Cell.* 22;40(2):216-27
- Brady S.N., Yu Y., Maggi L.B. Jr, Weber J.D. (2004) **ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway.** *Mol Cell Biol.* 24(21):9327-38.
- Brown D.D., Dawid I.G. (1968) **Specific gene amplification in oocytes. Oocyte nuclei contain extrachromosomal replicas of the genes for ribosomal RNA.** *Science* 160: 272–280.
- Bursac S., Brdovcak M.C., Pfannkuchen M., Orsolich I., Golomb L., Zhu Y., Katz C., Daftuar L., Grabusic K., Vukelic I., Filic V., Oren M., Prives C., Volarevic S. (2012) **Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress.** *Proc Natl Acad Sci U S A.*;109(50):20467–20472.
- Cmejla R., Cmejlova J., Handrkova H., Petrak J., Pospisilova D. (2007) **Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia.** *Hum Mutat.* 28: 1178-82.
- Cui D., Li L., Lou H., , Sun H., Ngai S.M., Shao G., Tang J. (2014) **The ribosomal protein S26 regulates p53 activity in response to DNA damage.** *Oncogene.* 33: 2225-35.
- Daftuar L, Zhu Y, Prives C. (2010) **Ribosomal protein L37 and the p53 network.** *Cell Cycle.*; 9(21):4259.
- Daftuar L, Zhu Y, Jacq X, Prives C. (2013) **Ribosomal Proteins RPL37, RPS15 and RPS20 Regulate the Mdm2-p53-MdmX Network.** *PLoS One.*;8(7):e68667.
- Dai M.S., Lu H. (2004) **Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5.** *J Biol Chem.* 279:44475–44482.
- Dai M.S., Zeng S.X., Jin Y., Sun X.X., David L., Lu H. (2004) **Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition.** *Mol Cell Biol.* 24:7654–7668.
- Dai M.S., Lu H. (2008) **Crosstalk between c-Myc and ribosome in ribosomal biogenesis and cancer.** *J Cell Biochem.* 105(3):670-7.
- Diamond L.K, Blackfan K.D. (1938) **Hypoplastic Anemia.** *American Journal of Diseases of Children*; 56:464–467.
- Dianzani I., Loreni F. (2008) **Diamond-Blackfan anemia: a ribosomal puzzle.** *Haematologica*; 93(11):1601-4.

Doherty L., Sheen M.R., Vlachos A., Choesmel V., O'Donohue M.F., Clinton C., Schneider H.E., Sieff C.A., Newburger P.E., Ball S.E., Niewiadomska E., Matysiak M., Glader B., Arceci R.J., Farrar J.E., Atsidaftos E., Lipton J.M., Gleizes P.E., Gazda H.T. **Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia.** *Am J Hum Genet.* 2010; 86: 222-8.

Donati G, Brighenti E, Vici M, Mazzini G, Trere D, Montanaro L, Derenzini M. (2011) **Selective inhibition of rRNA transcription downregulates E2F-1: a new p53-independent mechanism linking cell growth to cell proliferation.** *J Cell Sci.* 124:3017–28.

Donati G., Montanaro L., Derenzini M. (2012) **Ribosome Biogenesis and Control of Cell Proliferation: p53 Is Not Alone.** *Cancer Res.* 72(7):1602-7.

Dutt S., Narla A., Lin K., Mullally A., Abayasekara N., Megerdichian C., Wilson F.H., Currie T., Khanna-Gupta A., Berliner N., Kutok J.L., Ebert B.L. (2011) **Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells.** *Blood;*117(9):2567-76.

Ebert B.L., Pretz J., Bosco J., Chang C.Y., Tamayo P., Galili N., Raza A., Root D.E., Attar E., Ellis S.R., Golub T.R.. (2008) **Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen.** *Nature.* 451: 335-339.

Farrar J.E., Nater M., Caywood E., McDevitt M.A., Kowalski J., Takemoto C.M., Talbot C.C. Jr, Meltzer P., Esposito D., Beggs A.H., Schneider H.E., Grabowska A., Ball S.E., Niewiadomska E., Sieff C.A., Vlachos A., Atsidaftos E., Ellis S.R., Lipton J.M., Gazda H.T., Arceci R.J. (2008) **Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia.** *Blood;* 112: 1582-92.

Farrar J.E., Quarello P., Fisher R., O'Brien K.A., Aspesi A., Parrella S., Henson A.L., Seidel N.E., Atsidaftos E., Prakash S., Bari S., Garelli E., Arceci R.J., Dianzani I., Ramenghi U., Vlachos A., Lipton J.M., Bodine D.M., Ellis S.R. (2014) **Exploiting pre-rRNA processing in Diamond Blackfan anemia gene discovery and diagnosis.** *Am J Hematol.;*89:985–91

Floutsakou, I., Agrawal, S., Nguyen, T. T., Seoighe, C., Ganley, A. R., and McStay, B. (2013) **The shared genomic architecture of human nucleolar organizer regions.** *Genome Res,* 23(12):2003-12

Flygare J, Aspesi A, Bailey JC, et al. (2007) **Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits.** *Blood.* ;109(3):980–986.

French, S. L., Osheim, Y. N., Cioci, F., Nomura, M., and Beyer, A. L. (2003) **In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes.** *Mol Cell Biol* 23, 1558-1568

Frum R., Busby S.A., Ramamoorthy M., Deb S., Shabanowitz J., Hunt D.F., Deb S.P. (2007) **HDM2-binding partners: interaction with translation elongation factor EF1alpha.** *Journal of proteome research.;* 6(4):1410–1417.

Ganapathi K.A., Austin K.M., Lee C.S., Dias A., Malsch M.M., Reed R., Shimamura A.. (2007) **The human Schwachman-Diamond syndrome protein, SBDS, associates with ribosomal RNA.** Blood. 110: 1458-1465.

Gazda H.T., Grabowska A., Merida-Long L.B., Latawiec E., Schneider H.E., Lipton J.M., Vlachos A., Atsidaftos E., Ball S.E., Orfali K.A., Niewiadomska E., Da Costa L., Tchernia G., Niemeyer C., Meerpohl J.J., Stahl J., Schratt G., Glader B., Backer K., Wong C., Nathan D.G., Beggs A.H., Sieff C.A. (2006) **Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia.** Am J Hum Genet. 2006; 79: 1110-8

Gazda H.T., Preti M., Sheen M.R., O'Donohue M.F., Vlachos A., Davies S.M., Kattamis A., Doherty L., Landowski M., Buros C., Ghazvinian R., Sieff C.A., Newburger P.E., Niewiadomska E., Matysiak M., Glader B., Atsidaftos E., Lipton J.M., Gleizes P.E., Beggs A.H. (2012) **Frameshift mutation in p53 regulator RPL26 is associated with multiple physical abnormalities and a specific pre-ribosomal RNA processing defect in diamond-blackfan anemia.** Hum Mutat; 33: 1037-44

Gazda H.T., Sheen M.R., Vlachos A., Choessel V., O'Donohue M.F., Schneider H., Darras N., Hasman C., Sieff C.A., Newburger P.E., Ball S.E., Niewiadomska E., Matysiak M., Zaucha J.M., Glader B., Niemeyer C., Meerpohl J.J., Atsidaftos E., Lipton J.M., Gleizes P.E., Beggs A.H. (2008) **Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients.** Am J Hum Genet; 83: 769-80.

Heiss N.S., Knight S.W., Vulliamy T.J., Vulliamy T.J., Klauck S.M., Wiemann S., Mason P.J., Poustka A., Dokal I. (1998) **X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions.** Nat Genet. 19: 32-38.

Henras A.K., Plisson-Chastang C., O'Donohue M.F., Chakraborty A., Gleizes P.E. (2015) **An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes.** Wiley Interdiscip Rev RNA. 2015 Mar-Apr;6(2):225-42.

Hernandez-Verdun, D. (2011) **Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle.** Nucleus 2, 189-194

Horn H.F., Vousden K.H. (2008) **Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway.** Oncogene. 27(44):5774-84.

Hupp T.R., Meek D.W., Midglet C.A. and Lane D.P. (1992) **Regulation of the specific DNA binding function of p53.** Cell; 71(5):875-86.

Chen D., Zhang Z., Li M., Wang W., Li Y., Rayburn E.R., Hill D.L., Wang H., Zhang R. (2007) **Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function.** Oncogene;26(35):5029-37.

Cheek C.F., Verma C.S., Baselga J., Lane D.P. (2011) **Translating p53 into the clinic.** Nat Rev Clin Oncol.;8(1):25-37.



- Choemmel V, Fribourg S, Aguisa-Touré AH, et al. (2008) **Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder.** Hum Mol Genet. ;17(9):1253–1263.
- Iadevaia V, Caldarola S, Biondini L, Gismondi A, Karlsson S, Dianzani I, et al. (2010) **PIM1 kinase is destabilized by ribosomal stress causing inhibition of cell cycle progression.** Oncogene; 29:5490–9.
- James A., Wang Y., Raje H., Rosby R., DiMario P. (2014) **Nucleolar stress with and without p53.** Nucleus.;5(5):402-26.
- Jeffrey P.D.; Gorina, S., Pavletich N.P. (1995) **Crystal Structure of the Tetramerization Domain of the p53 Tumor Suppressor at 1.7 Angstroms.** Science; 267(5203):1498-502.
- Jin A., Itahana K., O’Keefe K., Zhang Y. (2004) **Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23.** Mol Cell Biol. 24:7669–7680.
- Josephs H. (1936) **Anemia of infancy and early childhood.** Medicine; 15:307–451.
- Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972) **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics,** British Journal of Cancer, vol. 26, no. 4, pp. 239–257.
- Kim T.H., Leslie P., Zhang Y. (2014) **Ribosomal proteins as unrevealed caretakers for cellular stress and genomic instability.** Oncotarget.; 28;5(4):860-71.
- Kreiner G., Bierhoff H., Armentano M., Rodriguez-Parkitna J., Sowodniok K., Naranjo J.R., Bonfanti L., Liss B., Schütz G., Grummt I., Parlato R. (2013) **A neuroprotective phase precedes striatal degeneration upon nucleolar stress.** Cell Death Differ. 20: 1455-64.
- Kruse J.P., Gu W. (2009) **Modes of p53 regulation.** Cell. 137: 609-22.
- Lafontaine D.L., (2015) **Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function.** NatStruct Mol Biol. 22(1):11-9.
- Landowski M., O’Donohue M.F., Buros C., Ghazvinian R., Montel-Lehry N., Vlachos A., Sieff C.A., Newburger P.E., Niewiadomska E., Matysiak M., Glader B., Atsidaftos E., Lipton J.M., Beggs A.H., Gleizes P.E., Gazda H.T. (2013) **Novel deletion of RPL15 identified by arraycomparativ genomic hybridization in Diamond-Blackfan anemia.** Hum Genet; 132: 1265-74.
- Liao J.M., Zhou X., Gatignol A., Lu H. (2014) **Ribosomal proteins L5 and L11 cooperatively inactivate c-Myc via RNA-induced silencing complex.** Oncogene. 33(41):4916-23.
- Lindstrom M.S., Deisenroth C., Zhang Y. (2007) **Putting a finger on growth surveillance: insight into MDM2 zinc finger-ribosomal protein interactions.** Cell Cycle. 6:434–437.

- Lipkowitz S., Weissman A.M. (2011) **RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis.** *Nat Rev Cancer.*; 11(9):629-43.
- Lipton J.M., Ellis S.R. (2009) **Diamond-Blackfan anemia: diagnosis, treatment, and molecular pathogenesis,** *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 23, 261–282.
- Lohrum M.A., Ludwig R.L., Kubbutat M.H., Hanlon M., Vousden K.H. (2003) **Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11.** *Cancer Cell.* 3:577–587.
- Maden (1990) **The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA.** *ProgNucleic Acid Res Mol Biol.* 39:241-303.
- Maggi L.B. Jr, Kuchenruether M., Dadey D.Y., Schwoppe R.M., Grisendi S., Townsend R.R., Pandolfi P.P., Weber J.D. (2008) **Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome.** *Mol Cell Biol.* 28(23):7050-65
- Marechal V., Elenbaas B., Piette J., Nicolas J.C., Levine A.J. (1994) **The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes.** *Mol Cell Biol.*;14(11):7414–7420.
- Marine J.C., Lozano G. (2010) **Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond.** *Cell Death Differ.* 17: 93-102.
- Micel L.N., Tentler J.J., Smith P.G., Eckhardt G.S. (2013) **Role of ubiquitin ligases and the proteasome in oncogenesis: novel targets for anticancer therapies.** *J Clin Oncol.* 31: 1231-8.
- Moll U. M., Petrenko O. (2003): **The MDM2-p53 interaction.** *Molecular Cancer Research,* 1:1001-1008.
- Morishita D., Katayama R., Sekimizu K., Tsuruo T., Fujita N. (2008) **Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels.** *Cancer Res.* 68:5076-85.
- Narla A., Ebert B.L. (2010) **Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction.** *Blood.* 115(16):3196-3205.
- Nicolas E., Parisot P., Pinto-Monteiro C., de Walque R., De Vleeschouwer C., Lafontaine D.L. (2016) **Involvement of human ribosomal proteins in nucleolar structure and p53-dependent nucleolar stress.** *Nat Commun.* 2016 Jun 6;7:11390.
- Ofir-Rosenfeld Y., Boggs K., Michael D., Kastan M.B., Oren M. (2008) **Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26.** *Mol Cell.* 32: 180-9.
- Robledo S., Idol R.A., Crimmins D.L., Ladenson J.H., Mason P.J., Bessler M. (2008) **The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production.** *RNA.*;14(9):1918–1929.

- Roth J., Dobbstein M., Freedman D.A., Shenk T., and Levine A.J. (1998) **Nucleocytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein.** *EMBO J.*, 17(2):554-64.
- Sankaran V.G., Ghazvinian R., Do R., Thiru P., Vergilio J.A., Beggs A.H., Sieff C.A., Orkin S.H., Nathan D.G., Lander E.S., Gazda H.T. (2012) **Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia.** *J Clin Invest.*; 122: 2439-43.
- Savkur R.S., Olson M.O.J. (1998) **Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease.** *Nucleic Acids Res.* 1998;26:4508-15
- Sharp D.A., Kratowicz S.A., Sank M.J., George D.L. (1999) **Stabilization of the Mdm2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein.** *J Biol Chem*; 274(53):38189-96.
- Shav-Tal Y., Blechman J., Darzacq X., Montagna C., Dye B. T., Patton J. G., Singer R. H., and Zipori D. (2005) **Dynamic Sorting of Nuclear Components into Distinct Nucleolar Caps during Transcriptional Inhibition.** *Mol Biol Cell* 16, 2395-2413
- Shvarts A., Steegenga W. T., Riteco N., van Laar T., Dekker P., Bazuine M., van Ham R. C., van der Houven van Oordt W., Hateboer G., van der Eb A. J., Jochemsen, A. G. (1996) **MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of Mdm2.** *EMBO J.*, 15(19):5349-57.
- Schäfer T., Maco B., Petfalski E., Tollervey D., Böttcher B., Aebi U., Hurt E. (2006) **Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit.** *Nature.* 441: 651-655.
- Sirri, V., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. (2000) **The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle.** *Micron* 31, 121-126
- Slabý O., Michalová E., Šmarda J. (2015) **Molekulární Medicína.** Galén, 598 p. ISBN 978-807-4921-216.
- Song F.Q., Liu Y., Kong X.S., Chang W., Song G. (2013) **Progress on understanding the anticancer mechanisms of medicinal mushroom: inonotus obliquus.** *Asian Pac J Cancer Prev.* 14(3):1571-8.
- Takagi M., Absalon M.J., McLure K.G., Kastan M.B. (2005) **Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin.** *Cell.*;123(1):49-63.
- Tanimura S., Ohtsuka S., Mitsui K., Shirouzu K., Yoshimura A., Ohtsubo M. (1999) **Mdm2 interacts with MDMX through their RING finger domains.** *FEBS Lett.*; 447(1):5-9.
- Teng T., Mercer C.A., Hexley P., Thomas G., Fumagalli S. (2013) **Loss of tumor suppressor RPL5/RPL11 does not induce cell cycle arrest but impedes proliferation due to reduced ribosome content and translation capacity.** *Mol Cell Biol.* ;33(23):4660-71.

- Tschochner H., Hurt E. (2003) **Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm.** Trends Cell Biol. 13(5):255-63.
- Thomson E., Ferreira-Cerca S., Hurt E. (2013) **Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance.** J Cell Sci. 126(Pt 21):4815-21.
- Toledo F., Krummel K.A., Lee C.J., Liu C.W., Rodewald L.W., Tang M., Wahl G.M. (2006) **A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network.** Cancer Cell. 9. 273-285.
- Ugrinova I., Monier K., Ivaldi C., Thiry M., Storck S., Mongelard F., Bouvet P. (2007) **Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication.** BMC Mol Biol 8: 66.
- Valdez B.C., Henning D., So R.B., Dixon J, Dixon MJ. (2004) **The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in ribosomal DNA gene transcription by interacting with upstream binding factor.** Proc Natl Acad Sci USA. 101: 10709-10714.
- Valentin G. (1836). **Repertorium für Anatomie und Physiologie 1:** 1–293. Verlag von Veit und Comp. Berlin.
- van Riggelen, J., Yetil, A. and Felsher, D.W. (2010) **MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis.** Nat. Rev. Cancer, 10(4):301-9.
- Vlachos A, Klein GW, Lipton JM. (2001) **The Diamond Blackfan Anemia Registry: tool for investigating the epidemiology and biology of Diamond-Blackfan anemia.** J Pediatr Hematol Oncol.; 23: 377-382.
- Vlachos A., Ball S., Dahl N., Alter B.P., Sheth S., Ramenghi U., Meerpohl J., Karlsson S., Liu J.M., Leblanc T., Paley C., Kang E.M., Leder E.J., Atsidaftos E., Shimamura A., Bessler M., Glader B., Lipton J.M. (2008) **Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference.** Br J Haematol.; 142: 859-76
- Vlachos A, Muir E. (2010) **How I treat Diamond-Blackfan anemia.** Blood.; 116: 3715–3723.
- Wagner R. (1835) **Einige Bemerkungen und Fragen über das Keimbläschen (vesicular germinativa).** Müller's Archiv Anat Physiol Wissenschaft Med 373–377
- Walker K., Levine A. (1996) **Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression.** Proc. Natl. Acad. Sci.; 93(26):15335-40.
- Watkins-Chow D.E., Cooke J., Pidsley R., Edwards A., Slotkin R., Leeds K.E., Mullen R., Baxter L.L., Campbell T.G., Salzer M.C., Biondini L., Gibney G., Phan Dinh Tuy F., Chelly J., Morris H.D., Riegler J., Lythgoe M.F., Arkell R.M., Loreni F., Flint J., Pavan W.J., Keays D.A. (2013) **Mutation of the diamond-blackfan anemia gene Rps7 in mouse results in morphological and neuroanatomical phenotypes.** PloS Genet.; 9: e1003094.
- Weinberg R.L., Freund S.M., Veprintsev D.B., Bycroft M., Fersht A.R. (2004) **Regulation of DNA Binding of p53 by its C-terminal Domain.** J Mol Biol.; 342 (3). 801-11.

- Welting T.J., van Venrooij W.J., Pruijn G.J. (2004) **Mutual interactions between subunits of the human RNase MRP ribonucleoprotein complex.** *Nucleic Acids Res.* 32: 2138-2146.
- Willig T.N., Draptchinskaia N., Dianzani I., Ball S., Niemeyer C., Ramenghi U., Orfali K., Gustavsson P., Garelli E., Brusco A., Tiemann C., Pérignon J.L., Bouchier C., Cicchiello L., Dahl N., Mohandas N., Tchernia G. (1999) **Mutations in ribosomal protein S19 gene and diamond blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression.** *Blood*; 94: 4294-306.
- Xiong X., Zhao Y., He H., Sun Y. (2011) **Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator.** *Oncogene.*;30(15):1798–1811.
- Yadavilli S., Mayo L.D., Higgins M., Lain S., Hegde V., Deutsch W.A. (2009) **Ribosomal protein S3: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain.** *DNA Repair (Amst).* 8: 1215-24.
- Yang Z., Keel S.B., Shimamura A., Liu L., Gerds A.T., Li H.Y., Wood B.L., Scott B.L., Abkowitz J.L. (2016) **Delayed globin synthesis leads to excess heme and the macrocytic anemia of Diamond Blackfan anemia and del(5q) myelodysplastic syndrome.** *Sci Transl Med.* 8(338):338ra67
- Yip S.P., Siu P.M., Leung P.H.M., Zhao Y., Yung B.Y.M. (2011) **The multifunctional nucleolar protein nucleophosmin/NPM/B23 and the nucleoplasmin family of proteins.** In: Olson MOJ, ed. *The Nucleolus, Protein Reviews.* New York, NY: Springer:213-252.
- Yu Y. T., Scharl E. C., Smith C. M. and Steitz J. A. (1999) **The growing world of small nuclear ribonucleoproteins.** In *The RNA World* (ed. Gesteland, R. F., Cech, T. R. and Atkins, J. F.), pp. 487-524. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Zhang Y., Wolf G.W., Bhat K., Jin A., Allio T., Burkhardt W.A., Xiong Y. (2003) **Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway.** *Mol Cell Biol.* 23:8902–8912.
- Zhang Z, Wang H, Li M, Rayburn ER, Agrawal S, Zhang R. (2005) **Stabilization of E2F1 protein by MDM2 through the E2F1 ubiquitination pathway.** *Oncogene.* 24:7238–47.
- Zhang J., Harnpicharnchai P., Jakovljevic J., Tang L., Guo Y., Oeffinger M., Rout M.P., Hiley S.L., Hughes T., Woolford J.L. Jr. (2007) **Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes.** *GenesDev.* 21: 2580-92.
- Zhang Y., Lu H. (2009) **Signaling to p53: ribosomal proteins find their way.** *Cancer Cell.* 16: 369-77.
- Zhang Y., Wang J., Yuan Y., Zhang W., Guan W., Wu Z., Jin C., Chen H., Zhang L., Yang X., He F. (2010) **Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26.** *Nucleic Acids Res.*;38(19):6544–6554
- Zhang X., Wang W., Wang H., Wang M.H., Xu W., Zhang R. (2013) **Identification of ribosomal protein S25 (RPS25)-MDM2-p53 regulatory feedback loop.** *Oncogene.*;32(22):2782–2791.

Zhou X., Hao Q., Liao J., Zhang Q., Lu H. (2013) **Ribosomal protein S14 unties the MDM2-p53 loop upon ribosomal stress.** *Oncogene* 32: 388-96.

Zhu Y., Poyurovsky M.V., Li Y., Biderman L., Stahl J., Jacq X., Prives C. (2009) **Ribosomal protein S7 is both a regulator and a substrate of MDM2.** *Mol Cell.* 35: 316-26.

Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., Wang X. (1997) **Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3.** *Cell.* 90(3):405-13.