



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Ribozomální stres a aktivace p53

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autorka:	Bc. Barbora Haroková
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Pavel Moudrý, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Barbora Haroková
Název práce	Ribozomální stres a aktivace p53
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř integrity genomu, Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Ing. Pavel Moudrý, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zabývá ribozomálním stresem a aktivací p53. Pozornost je zaměřena zejména na protein DDX56, který je pravděpodobně zapojen do procesu sestavování 60S ribozomální podjednotky. Byla zkoumána souvislost proteinu DDX56 s ribozomálním stresem a aktivací p53, která nebyla do této doby detailně objasněna. Teoretická část obsahuje literární rešerši na téma ribozomální biogeneze, ribozomální stres a aktivace p53, dále je zde rozebrána problematika degradace ribozomálních proteinů a v neposlední řadě také RNA helikázy s důrazem na DEAD-box helikázy DDX56 a DDX51. V experimentální části bylo studováno chování proteinu DDX56 po navození ribozomálního stresu pomocí actinomycinu D o různých koncentracích (1 nM, 5 nM a 10 nM) a různé délce časového ovlivnění (3, 6 a 24 hodin) u buněčné linie U2OS a dále u linií HeLa, BJ a MRC-5. Byl testován účinek bortezomibu a UV záření na hladinu DDX56. Pomocí inhibitorů proteasomu, bortezomibu a MLN7243, byl zjišťován mechanismus destabilizace DDX56. Byly použity metody western blotting, imunofluorescenční analýza a siRNA transfekce. Výsledky vedou k závěru, že je protein DDX56 degradován po navození ribozomálního stresu pomocí actinomycinu D, a to pravděpodobně v proteasomu. Pomocí transfekce siDDX56 došlo k down-regulaci proteinu DDX56 a ke zvýšení hladiny p53. Předpokládáme, že nedostatek proteinu DDX56 může způsobit ribozomální stres a aktivaci proteinu p53, která je závislá na RPL11.

Klíčová slova	Ribozomální stres, p53, DDX56, actinomycin D, U2OS
Počet stran	74
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Barbora Haroková
Title of thesis	Ribosomal stress and activation of p53
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Genome Integrity, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc
Supervisor	Ing. Pavel Moudrý, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

This diploma thesis deals with ribosomal stress and activation of p53. Attention is especially directed to DDX56 protein, which is probably involved in the assembly of the 60S ribosomal subunit. The relationship of DDX56 protein with ribosomal stress and p53 activation, which has not yet been elucidated in detail, has been investigated. The theoretical part includes a literature review on the topic of ribosomal biogenesis, ribosomal stress and p53 activation, degradation of ribosomal proteins and RNA helicases emphasizing the DEAD-box helicases DDX56 and DDX51. In the experimental part, behavior of DDX56 protein after induction of ribosomal stress with actinomycin D at various concentrations (1 nM, 5 nM and 10 nM) and different duration of time (3, 6 and 24 hours) in the U2OS cell line and HeLa, BJ and MRC-5 lines was studied. The effect of bortezomib and UV radiation on the DDX56 level was tested. Using proteasome inhibitors, bortezomib and MLN7243, the DDX56 destabilization mechanism was investigated. Western blotting, immunofluorescence analysis and siRNA transfection were used. The results lead to the conclusion that DDX56 protein is degraded following the induction of ribosomal stress by actinomycin D, presumably via the proteasome pathway. After siDDX56 transfection DDX56 protein was silenced and p53 level was increased. We assume that lack of DDX56 protein can cause ribosomal stress and activation of p53 protein, which is dependent on RPL11.

Keywords	ribosomal stress, p53, DDX56, actinomycin D, U2OS
Number of pages	74
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Pavla Moudrého, Ph.D. s použitím citované literatury.“

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala především Ing. Pavlu Moudrému, Ph.D., za jeho odborné vedení, cenné rady a čas, který mi při řešení práce věnoval. Velké díky patří také všem pracovníkům laboratoře, zejména pak Markétě Šenkyříkové, kteří mi byli vždy ochotni poradit.

OBSAH	
SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	11
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	12
2.1 Ribozomální biogeneze	12
2.2 Ribozomální stres a aktivace p53	14
2.2.1 Actinomycin D	14
2.2.2 Protein p53	15
2.2.2.1 Aktivace p53	17
2.2.2.2 Dráha RP-MDM2-p53	19
2.2.3 Degradace ribozomálních proteinů	21
2.3 RNA helikázy	24
2.3.1 DEAD-box helikázy	25
2.3.1.1 DDX56	27
2.3.1.2 DDX51	29
3 MATERIÁL A METODY	30
3.1 Přístrojové a laboratorní vybavení	30
3.2 Použité chemikálie	30
3.3 Použité roztoky	32
3.4 Použité protilátky	32
3.5 Použité buněčné linie	33
3.6 Pasážování buněk	34
3.7 Ovlivnění buněčných linií	34
3.7.1 Ovlivnění pomocí chemických činidel	35
3.7.2 Ovlivnění pomocí UV záření	35
3.7.3 siRNA transfekce	35
3.8 Tvorba lyzátů	36
3.9 SDS-PAGE, Western blotting, imunodetekce	36

3.10	Imunofluorescenční barvení buněk, focení, analýza	37
4	VÝSLEDKY	39
4.1	Chování proteinu DDX56 v podmínkách ribozomálního stresu.....	39
4.1.1	Různé časové ovlivnění actinomycinem D.....	40
4.1.2	Různé koncentrace actinomycinu D	42
4.1.3	Testování buněčných linií	44
4.2	Chování proteinu DDX56 po navození proteotoxického a genotoxického stresu	48
4.3	Mechanismus destabilizace proteinu DDX56.....	49
4.4	Down-regulace proteinu DDX56	53
5	DISKUZE	59
5.1	Vliv ribozomálního stresu na protein DDX56 a aktivaci p53	59
5.2	Navození proteotoxického a genotoxického stresu.....	60
5.3	Mechanismus destabilizace DDX56	61
5.4	Umlčení proteinu DDX56	61
6	ZÁVĚR	64
7	POUŽITÁ LITERATURA	65

SEZNAM ZKRATEK

ABD	Advanced beer-spoiler detection
Acl4	Assembly chaperone of RPL4
ActD	Actinomycin D
APS	Ammonium persulfate
ARF	ADP ribosylation factor
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosine triphosphate
Bak	Bcl-2 antagonist killer 1
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
Bop1	Block of proliferation 1
BPB	Bromophenol blue
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
BTG2	BTG anti-proliferation factor 2
CBP	CREB-binding protein
CD95	Protein CD95 - Cluster of differentiation 95
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
c-myc	Cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus
DBA	Diamond-Blackfan anemia
DBD	DNA-binding domain
DDX	DEAD-box
DHX	DEAH-box
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DREAM	Dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulval class B complex
DTT	Dithiothreitol

E2F	E2F transcription factor
E6-AP	E6 associated protein
FANCI	Fanconi anemia group J protein
FBS	Fetal bovine serum
GADD45	Growth arrest and DNA damage
HECT	Homologous to E6AP C terminus
HDM2	Human double minute 2
HPV	Human papilloma virus
Chk1	Checkpoint kinase-1
Chk2	Checkpoint kinase-2
IPO7	Importin 7
LSB	Laemmli Sample Buffer
MDM2	Murine double minute 2
MPA	Mycophenolic acid
mRNA	Messenger RNA
NCL	Nucleolin
NOG1	Nucleolar GTP-binding protein 1
NPM	Nucleophosmin
NS	Nucleostemin
PBS	Phosphate buffered saline
Pes1	Pescadillo homolog 1
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
Pol I	Polymerase I
pre-rRNA	Preribosomal RNA
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RACK1	Receptor of activated protein C kinase 1
RAS	Resistance to audiogenic seizures
Rb	Retinoblastoma protein
RNA	Ribonucleic acid
RP	Ribosomal protein
rRNA	Ribosomal RNA
SDS	Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SF	Super family
siRNA	Small interfering RNA
SKIV2L2	Superkiller viralicidic aktivity 2-like 2
snoRNA	Small nucleolar RNA
SUPV3L1	Suppressor of var1 3-like protein 1
SV40	Simian virus 40
TAD	Trans-activating domain
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TIF-IA	Transcription initiation factor IA
TRAIL-R2	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
UAE	Ubiquitin-activating enzyme
UBF	Upstream binding factor
UBE2D3	Ubiquitin-conjugatin enzyme E2 D3
UPS	Ubiquitin proteasome system
U5.snRNP	U5 small nuclear ribonucleoprotein
WDR12	WD repeat-containing protein 12
WDR36	WD repeat-containing protein 36
WNV	West Nile virus
ZNF598	Zinc Finger Protein 598

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Buněčný růst je řízen syntézou bílkovin, procesem, který vyžaduje výrobu ribozomů v jadérku (Deisenroth a Zhang, 2010). Tento děj je známý pod pojmem ribozomální biogeneze a je to jeden z nejrozšířenějších a energeticky nejnáročnějších procesů v biologii. Hyperaktivace biogeneze ribozomů hraje roli při iniciaci a progresi rakoviny (Pelletier a kol., 2018) a porucha jakéhokoliv kroku v procesu ribozomální biogeneze může vést k ribozomálnímu stresu a k aktivaci p53 (Zhou a kol., 2012). Protein p53 má významnou roli při udržení buněčné homeostázy. Prostřednictvím regulace exprese velkého počtu cílových genů může vyvolat zastavení buněčného cyklu, apoptózu, senescenci nebo opravu DNA (Horn a Vousden, 2007).

Na biogenezi ribozomů se podílejí také trans-působící faktory. Tyto faktory zahrnují nukleázy, enzymy modifikující RNA, ATPázy, GTPázy, kinázy a RNA helikázy (Rodríguez-Galán a kol., 2013). RNA helikázy jsou vysoce konzervované enzymy, které používají adenosintrifosfát (ATP) k vázání nebo remodelaci RNA nebo ribonukleoproteinových komplexů. Jelikož se RNA helikázy podílejí na širokém spektru buněčných aktivit, mohou být také terčem protirakovinových léků nebo profylaktických činidel (Tanner a Linder, 2001). Protein DDX56 je členem rodiny proteinů DEAD-box, což představuje podskupinu ATP-dependentních RNA helikáz (Zirwes a kol., 2000). DDX56 se pravděpodobně podílí na biogenezi 60S podjednotky (Wild a kol., 2010), ale jasná molekulární role či spojení s ribozomálním stresem nebyly doposud detailně objasněny.

Byly vytyčeny následující cíle práce:

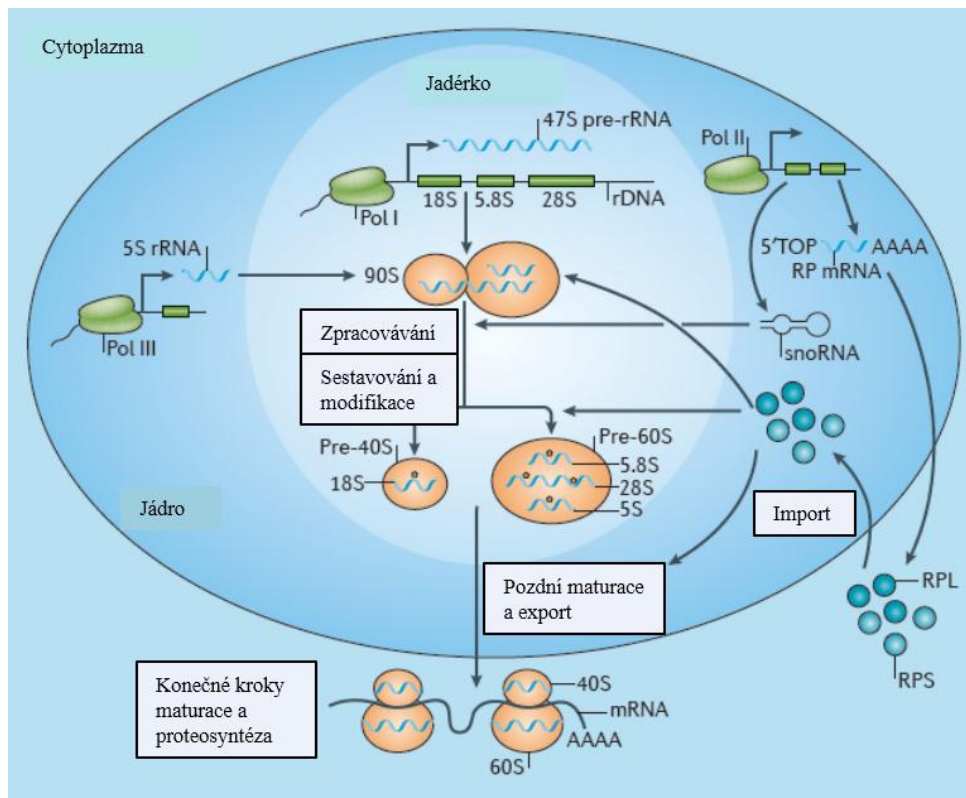
1. Shromáždění a studium literárních údajů k zadané problematice.
2. Zdokumentování chování proteinu DDX56 v podmínkách ribozomálního stresu.
3. Zjištění mechanismu destabilizace proteinu DDX56.
4. Popsání buněčné odpovědi na down-regulaci proteinu DDX56.
5. Průběžné zpracování získaných výsledků.
6. Sepsání diplomové práce.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Ribozomální biogeneze

Ribozomální biogeneze je složitý a komplexní proces zahrnující transkripci, modifikaci a zpracování ribozomálních RNA, produkci ribozomálních proteinů a pomocných faktorů, a koordinované sestavování částic ribonukleoproteinu za vzniku zralých ribozomů (Deisenroth a Zhang, 2010).

Ribozomy jsou ribonukleoproteiny podílející se na konverzi genetické informace zakódované v informační (messenger) RNA (mRNA) do proteinů. Lidský ribozom obsahuje čtyři ribozomální RNA (rRNA) a 80 ribozomálních proteinů (r-proteinů) uspořádaných ve dvou podjednotkách. Malá podjednotka (40S) se skládá z 18S rRNA a 33 r-proteinů a velká podjednotka (60S) obsahuje tři rRNA: 5S, 5.8S a 28S a 47 r-proteinů (Nicolas a kol., 2016). Schématické zobrazení průběhu ribozomální biogeneze můžeme vidět na Obr. 1. Většina kroků při biogenezi ribozomů probíhá v jadérku, kde RNA polymeráza I (Pol I) transkribuje 47S prekurzorové rRNA (47S pre-rRNA) z genů ribozomální DNA, které obsahují sekvence 18S, 5.8S a 28S rRNA. Dále je 47S pre-rRNA kotranskripčně sestavena do 90S podjednotky společně s 5S rRNA a ribozomálními proteiny. Transkripce 5S rRNA je zajištěna RNA polymerázou III a probíhá v jádře, mRNA pro r-proteiny je transkribována polymerázou II rovněž v jádře a následně je exportována do cytoplazmy pro translaci r-proteinů. Po proběhlé translaci jsou ribozomální proteiny dopraveny do jadérka. Zpracovávání a modifikace 90S na pre-40S a pre-60S ribozomální podjednotky je zajištěna pomocí zhruba 200 malých RNA (snoRNA). Kompletní proces biogeneze ribozomů zahrnuje několik stovek pomocných faktorů, které vedou ke vzniku zralého 80S ribozomu (Pelletier a kol., 2018).



Obr. 1: Ribozomální biogeneze

Převzato a upraveno z: Pelletier J., Thomas G., Volarević S. (2018) Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nature Reviews Cancer* 18: 51-63

Mutace v ribozomálních proteinech jsou často spojovány s vývojovými poruchami a lidskými nemocemi (Nicolas a kol., 2016). Ribozomopatie označujeme jako sbírku poruch, u kterých genetické abnormality způsobují narušení biogeneze a funkce ribozomů a vedou ke vzniku specifických klinických fenotypů (Narla a Ebert, 2010). Jako modelové onemocnění pro ribozomopatie se často uvádí Diamondova-Blackfanova anémie (DBA). Jde o vzácné onemocnění s výskytem pěti případů na milion živě narozených (Danilova a Gazda, 2015). Byly pozorovány mutace v genech kódujících ribozomální proteiny 40S podjednotky: RPS7, RPS10, RPS17, RPS19, RPS24 nebo RPS26 a dále v genech kódujících 60S podjednotku ribozomálních proteinů: RPL5, RPL11, RPL26 a RPL35A. Onemocnění DBA je charakterizováno anémií, makrocytózou, retikulocytopenií a snížením, nebo nepřítomností erythroidních prekurzorů v kostní dřeni (Narla a Ebert, 2010). Jedinci s DBA mají zvýšené riziko rakoviny (Danilova a Gazda, 2015). K dalším ribozomopatiím můžeme kromě DBA zařadit také 5q- syndrom, Treacherův-Collinsův syndrom, kongenitální dyskeratózu, syndrom hypoplastických chrupavek a vlasů nebo Shwachmanův-Diamondův syndrom (James a kol., 2014).

2.2 Ribozomální stres a aktivace p53

Narušení jakéhokoliv kroku v procesu biogeneze ribozomů může vést k ribozomálnímu stresu a následné aktivaci p53 (Zhou a kol., 2012). Podněty, způsobující ribozomální stres, rozdělili Zhou a kol. (2015) do tří skupin. První skupina zahrnuje chemická činidla nebo záření, které narušují produkci rRNA nebo zprostředkovávají degradaci ribozomálních proteinů (Zhou a kol., 2015). Zde můžeme zařadit interkalující látky jako jsou mitomycin C, mitoxantron a doxorubicin, které vedou k poškození jádérka a narušují transkripci. Do této skupiny patří také actinomycin D, cisplatina a oxaliplatina, které blokuje transkripci RNA polymerázy I (James a kol., 2014). U cisplatiny a UV záření bylo zjištěno, že mohou vést k proteasomální degradaci r-proteinů, a to konkrétně u RPL37 (Llanos a Serrano, 2010). Do druhé skupiny můžeme zařadit nedostatek živin včetně hladovění a hypoxie. Třetí skupina pak představuje genové deregulace, např. poruchy genů nezbytných pro biogenezi ribozomů (Zhou a kol., 2015).

2.2.1 Actinomycin D

Jako příklad chemických činidel indukujících ribozomální stres můžeme uvést actinomycin D (ActD), což je antineoplastické (působící proti nádorům a neoplaziím) antibiotikum izolované ze *Streptomyces* sp. (Kleeff a kol., 2000). Actinomycin D je používán v klinické praxi již od roku 1954 jako protinádorové léčivo pro léčbu širokého spektra nádorů, také je užitečným nástrojem v biochemii a molekulární biologii (Koba a Konopa, 2005).

Jedná se o blokátor transkripce, potlačuje syntézu RNA vazbou na guaninové zbytky (Choong a kol., 2009). Nejvíce citlivá na působení ActD je především RNA polymeráza I, protože rRNA geny, které jsou touto polymerázou transkribovány, jsou bohaté na GC oblasti.

Nízké dávky ActD způsobují preferenční inhibici syntézy ribozomální RNA a vedou k indukci apoptózy (Kleeff a kol., 2000). Při nízkých cytostatických koncentracích může actinomycin D způsobit ribozomální stres vedoucí ke snížení aktivity MDM2 a tím ke stabilizaci a aktivaci p53 (Chen a kol., 2014). Borsos a kol. (2017) uvádí, že ActD při koncentraci 5 nM napodobuje účinek inhibitoru MDM2, nutlinu-3, zrušením produkce rRNA, která je zprostředkována RNA polymerázou I. Tento stav vede k akumulaci volných ribozomálních proteinů, jako je L11 a L5, které interagují a inhibují MDM2.

Základ této myšlenky položil ve své práci již Choong a kol. (2009), který aplikoval actinomycin D v koncentraci 1, 10 a 100 nM a dospěl k závěru, že nízká dávka ActD indukuje aktivitu p53.

Vysoké dávky ActD blokují transkripci všech druhů RNA (Kleeff a kol., 2000). Actinomycin D při vysoké koncentraci (200 nM) indukuje dvouřetězcové zlomy DNA (Borsos a kol., 2017), a to díky inhibici topoizomerasy II (Avendaño a Menéndez, 2008).

Kombinovaná léčba actinomycinu D s jinými chemoterapeutickými léky může být vhodná k léčbě rakoviny. Hietanen a kol. (2000) ukázal, že kombinace nízkých dávek ActD s leptomycinem B způsobí akumulaci transkripčně aktivního p53 v jádrech buněk cervikálního karcinomu pozitivního na lidský papilomavir, což následně vede k apoptóze buněk. Dále bylo zjištěno, že actinomycin D synergicky zvyšuje cytotoxicitu cisplatinu u buněčné linie KB (Wang a kol., 2017) a také, že ActD a RG7787 působí synergicky k zabíjení mnoha nádorových buněčných linií pozitivních na mezotelin (Liu a kol., 2016b). Tzaridis a kol. (2016) uvádí, že nízké dávky actinomycinu D mohou představovat léčebnou možnost pro pacienty s ependyomem, jejichž nádory často vykazují inaktivaci p53. Bylo rovněž prokázáno, že ActD inhibuje proliferaci a podporuje apoptózu buněk lidského osteosarkomu MG63. Biochemické výsledky této studie ukázaly, že štěpená kaspáza-3 se zvyšuje s rostoucími koncentracemi ActD (Lu a kol., 2015).

2.2.2 Protein p53

Tumor supresor p53 je multifunkční, vysoce regulovaný transkripční faktor, který je citlivý na poškození DNA a signalizaci buněčného stresu. Někdy je známý také pod pojmem „strážce genomu“ a představuje kritický uzel pro určení buněčného osudu tím, že aktivuje zastavení růstu, buněčnou senescenci nebo apoptózu. Rovněž má rozhodující úlohu při ochraně buněk před nekontrolovatelným růstem, čímž zabraňuje vzniku nádorů (Brooks a Gu, 2010).

Protein byl objeven již v roce 1979, kdy bylo zjištěno, že interaguje s velkým T-antigenem viru SV40 (Linzer a Levine, 1979; Lane a Crawford, 1979). Spolu s transkripčními faktory p63 a p73, patří do rodiny proteinů p53 (Belyi a kol., 2010). Gen kódující protein p53 je umístěn na chromozomu 17p13.1 (Hawes a kol., 2009). Protein se skládá z 393 aminokyselin a obsahuje několik funkčních domén: N-koncovou transkripční doménu 1 a 2 (TAD1, TAD2), následuje oblast bohatá na prolin, centrální doména vázající DNA (DBD), oblast jaderného lokalizačního signálu, tetramerizační

doména a C-koncová oligomerizační doména (Qian a Chen, 2013). Doména DBD je zodpovědná za vazbu p53 na cílové geny. V této oblasti se vyskytuje velké množství mutací p53. Doména TAD je vazebným místem pro pozitivní nebo negativní regulátory transkripce genu p53. C-koncová oligomerizační doména podléhá alternativnímu sestřihu a postranlační modifikaci, bylo prokázáno, že ovlivňuje vazbu a transkripční aktivitu členů rodiny p53 (Pflaum a kol., 2014).

Typicky se p53 váže na cílové geny jako tetramer (Fischer, 2017). Apoptotická aktivita p53 je rozhodující pro eliminaci defektních a potenciálně karcinogenních buněk. Protein p53 je zapojený v regulaci vnitřních i vnějších signálních cestách apoptózy, a to iniciováním transkripce funkčních proteinů jako jsou PUMA, Bax, Bid, CD95 nebo TRAIL-R2. Nicméně byly popsány i funkce nezávislé na transkripci. V cytosolu indukuje p53 buněčnou smrt vytvářením inhibičních komplexů s Bcl-XL a Bcl-2, což vede k permeabilizaci mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c. Navíc může p53 aktivovat pro-apoptotické proteiny jako jsou Bax a Bak pomocí přímých protein-proteinových interakcí (Pflaum a kol., 2014).

Aktivace p53 může vést k zastavení růstu v G1 i G2 fázi buněčného cyklu. Zastavení v G1 zabraňuje replikaci poškozené DNA, zatímco zastavení v G2 zabraňuje nesprávné segregaci chromozomů. Protein p53 může také zastavit replikaci DNA v S fázi, toto je však obvykle maskováno předchozím zastavením v G1. Schopnost zastavit buňky ve více kontrolních bodech je rozhodující pro potlačení genetických změn, které by mohly vést k rakovině (Sionov a kol., 2001). Mezi prvními cílovými geny p53 k zastavení buněčného cyklu byl CDKN1A (též známý jako WAF1 a CIP1). Protein p21, který je kódován genem CDKN1A, inhibuje několik cyklin-dependentních kináz (CDK), včetně cyklinD-CDK4/6, cyklinE-CDK2 a cyklinA-CDK2 (Liebermann a kol., 2007). Navíc p21 zastavuje buněčný cyklus blokováním PCNA, které je nutné pro replikaci DNA. Inhibice CDK vede ke stabilizaci a aktivaci retinoblastomového proteinu (Rb) a komplexu DREAM souvisejícího s Rb. Další cílové geny proteinu p53 jsou BTG2 a GADD45A, které rovněž mohou indukovat zástavu G1/S a G2/M fází buněčného cyklu (Fischer, 2017).

Avšak položme si otázku, jak může p53 regulovat zastavení růstu oproti apoptóze? Zdá se, že při výběru mezi zastavením buněčného cyklu a apoptózou hraje roli několik faktorů, včetně typu buňky, přítomnosti či nepřítomnosti faktorů nutných k přežití ve vnějším prostředí, rozsah poškození DNA, hladiny p53 a posttranslační modifikace (Liebermann a kol., 2007). Spolupráce mezi cestami p53 a retinoblastomovým proteinem

se jeví jako zásadní při určování biologické odezvy na poškození DNA. Inaktivace Rb vede ke ztrátě zástavy buněčného cyklu v bodě G1 a indukci apoptózy po poškození DNA. Tento stav může být vysvětlen uvolněním transkripčního faktoru E2F, který může při nadměrné expresi indukovat apoptózu. Modulace Rb a E2F prostřednictvím signalizace p53 jako odpověď na poškození DNA může hrát ústřední roli při rozhodování o volbě mezi apoptózou a zástavou buněčného cyklu.

2.2.2.1 Aktivace p53

V nestresovaných buňkách jsou hladiny p53 typicky velmi nízké, a to díky působení MDM2 (Michael a Oren, 2003). Enzym MDM2 negativně reguluje p53 přímou vazbou nebo působením jako E3 ubiquitin ligáza (Deisenroth a Zhang, 2011). Ligáza MDM2 se může vázat na N-konec p53 a blokovat tak jeho transkripční aktivitu, nebo může tvořit s p53 negativní zpětnovazebnou smyčku, ve které p53 pozitivně reguluje transkripci genu MDM2, zatímco MDM2 ubiquitínuje p53 a podporuje tak proteasomem zprostředkovanou degradaci (Golomb a kol., 2014).

Existuje velké množství regulačních faktorů, které působí na MDM2. Jde například o lokus INK4a/ARF, který kóduje tumor supresor ARF (alternative reading frame), který je klíčovým aktivátorem p53. V reakci na onkogenní stres (například nadměrná exprese RAS nebo c-myc) stabilizuje a stimuluje aktivitu p53 neutralizací inhibičních účinků MDM2. Nadměrně exprimovaný ARF interaguje přímo s MDM2 a blokuje tak ubiquitinaci zprostředkovanou MDM2, jaderný export a degradaci p53 proteasomem (Ozenne a kol., 2010).

Některé formy genotoxického stresu způsobené ionizujícím a ultrafialovým zářením nebo různými chemickými látkami mohou aktivovat kaskády ATM-Chk1 (Ataxia-telangiectasia mutated/Checkpoint kinase-1) nebo ATM-Chk2 (Ataxia-telangiectasia mutated/Checkpoint kinase-2) k podpoře fosforylace jak MDM2, tak i p53, což brání jejich vzájemné interakci (Deisenroth a Zhang, 2011). Také je popsána řada posttranslačních modifikací jako je ubiquitinace, fosforylace, acetylace či sumoylace jak MDM2 nebo p53 ovlivňující vzájemné interakce a stabilizaci p53 (Mekk a Knippschild, 2003; Brooks a Gu, 2003).

Protein p53 může být aktivován také v důsledku ribozomálního stresu. Ten může být vyvolán poruchou syntézy rRNA. Produkci rRNA ovlivňují různá chemická činidla. Jde například o actinomycin D, jehož mechanismus je popsán výše. Dále můžeme zmínit

5-fluorouracil, analog uracilu s atomem fluoru v pozici C5, který díky začlenění do vznikající RNA způsobí blokaci syntézy rRNA (Longley a kol., 2003). Mykofenolová kyselina (MPA) inhibuje enzym inosinmonofosfát dehydrogenázu, což vede k vyčerpání guaninových nukleotidů. Ovlivnění pomocí MPA způsobí inhibici syntézy pre-rRNA a narušení jádérka. Dojde k aktivaci p53 a indukci zastavení buněčného cyklu a apoptóze (Sun a kol., 2008). Regulace syntézy rRNA je zprostředkována také transkripčním iniciačním faktorem pro RNA polymerázu I nazývaným TIF-IA. Ablace TIF-IA vede k zeslabení transkripce rRNA, ztrátě nukleolární integrity, zvýšení p53 a aktivaci apoptózy (Yuan a kol., 2005). Byla odhalena také funkce nádorového supresoru PTEN při regulaci transkripce závislé na Pol I. Bylo zjištěno, že PTEN potlačuje transkripci RNA Pol I díky schopnosti regulovat dráhu PI3 kináza/Akt/mTOR/S6K (Zhang a kol., 2005).

Rovněž narušení zpracování rRNA může vést k aktivaci p53. Ribozomální RNA je nejprve transkribována jako 47S pre-rRNA a poté musí být zpracována na 18S, 5.8S a 28S rRNA, které jsou následně začleněny do ribozomálních podjednotek. Poruchy ve zpracování rRNA mohou vést k akumulaci nezpracovaných meziproductů, které mohou zpomalit sestavení podjednotek a spustit tak stresové události (Deisenroth a Zhang, 2011). Bylo zjištěno, že exprese dominantní negativní formy Bop1 (Bop1 Δ) vede k inhibici 28S a 5.8S rRNA a k nedostatečnosti nově syntetizovaných 60S ribozomálních podjednotek (Strezoska a kol., 2000). Exprese Bop1 Δ způsobí zástavu buněčného cyklu v G1 fázi a bylo ukázáno, že toto zastavení je závislé na proteinu p53 (Pestov a kol., 2001). Dále bylo zjištěno, že protein WDR12 tvoří komplex s Bop1 a Pes1 a je rozhodující pro zpracování 32S pre-rRNA. Exprimovaný dominantní negativní mutant WDR12 blokuje zpracování rRNA, spouští akumulaci p53 a indukuje zastavení buněčného cyklu (Hölzel a kol., 2005). Roli při zpracování rRNA má i protein WDR36. Ztráta WDR36 narušuje zpracování 18S rRNA a rovněž vede k aktivaci p53 (Skarie a Link, 2008).

Ribozomální biogeneze není regulována jen ve stádiích syntézy a zpracování rRNA (Golomb a kol., 2012). Ribozomální proteiny jsou syntetizovány v cytoplazmě, dovezeny do jádra a poté exportovány zpět do cytoplazmy jako zralé ribozomální podjednotky. Porušení jaderného importu nebo exportu může vyvolat ribozomální stres. Vytvoření nerovnováhy v jaderném importu ribozomálních proteinů prostřednictvím narušení importního faktoru Importinu 7 (IPO7) spouští aktivaci p53 a zastavení růstu.

2.2.2.2 Dráha RP-MDM2-p53

Před více než 20 lety bylo zjištěno, že 5.8S rRNA je kovalentně spojena s p53 (Fontoura a kol., 1992; Samad a Carroll, 1991). Na toto zjištění navázal Marechal a kol. (1994), který publikoval jednu z prvních myšlenek, a to, že ribozomální proteiny mohou hrát roli při aktivaci p53. Jeho tým zjistil, že RPL5 tvoří komplex s MDM2, p53, 5S rRNA a případně s 5.8S rRNA. Bylo ukázáno, že komplexy MDM2-L5 a MDM2-L5-p53 váží 5S rRNA specificky, pravděpodobně přes známou specifitu L5 proteinu pro 5S rRNA. Tuto myšlenku potvrdil Dai a Lu (2004), kteří zjistili, že protein L5 zesiluje transkripční aktivitu p53, indukuje zastavení buněčného cyklu závislého na p53 a také výrazně inhibuje MDM2-zprostředkovanou ubiquitinaci p53.

Dále bylo zjištěno, že ribozomální protein L11 se váže na centrální doménu HDM2 (lidský MDM2), může tvořit kvarterní komplex s HDM2, p53 a ARF. Protein L11 také redukuje ubiquitinaci p53, která je zprostředkována HDM2 a stabilizuje p53. Je zajímavé, že L11 reguluje HDM2 a p53 způsobem podobným regulaci pomocí ARF. Oba proteiny, L11 i ARF, jsou za běžných podmínek lokalizovány v jadérku, k interakci s HDM2 jsou ale přemístěny do nukleoplazmy. Rovněž se mohou vázat přímo na HDM2 a formovat komplexy s p53, inhibují ubiquitinaci p53 podporovanou HDM2 a obnovují transkripční aktivitu p53. Existuje však jeden významný rozdíl mezi mechanismy regulace HDM2 zprostředkovanými L11 a ARF. Protein ARF inhibuje jaderný export HDM2, zatímco L11 nikoliv (Zhang a kol., 2003).

Vzájemné působení HDM2 s ribozomálním proteinem bylo také prokázáno u proteinu L23, kdy tato interakce zahrnovala centrální kyselou doménu HDM2 a N-koncovou doménu L23. Bylo dokázáno, že L23 a L11 mohou současně interagovat s HDM2 a tvořit tak ternární komplex. Protein L23 rovněž inhibuje polyubiquitinaci a degradaci p53 indukovanou HDM2 a způsobuje zastavení buněčného cyklu závislé na p53 (Jin a kol., 2004).

U výše uvedených proteinů byl navozen ribozomální stres pomocí nízké koncentrace actinomycinu D. Byla zjištěna zvýšená interakce mezi L11 a HDM2 s následnou stabilizací p53 (Zhang a kol., 2003) a také mezi L5 a HDM2 (Dai a Lu, 2004). Byl však pozorován rozdíl v odpovědi na působení actinomycinu D u proteinu L11 a L23. Buňky po ošetření actinomycinem D vykazovaly pokles L23, který byl v korelaci s nárůstem p53, avšak hladina L11 zůstala beze změny. Toto zjištění naznačuje, že

proteiny L11 a L23 používají odlišný mechanismus odpovědi na poruchu ribozomální biogeneze (Jin a kol., 2004).

Dosud bylo zjištěno, že až 16 ribozomálních proteinů se může vázat na MDM2, zejména na centrální kyselou doménu, a regulovat hladinu p53. Proteiny RPL5 a RPL11 působí jako senzory ribozomálního stresu, zatímco jiné r-proteiny zahrnující RPL6, RPL23, RPL26, RPL37, RPS3, RPS7, RPS14, RPS15, RPS20, RPS25, RPS26 RPS27/RPS27L a RPS27a nesou efektorovou funkci (Liu a kol., 2016a). Seznam ribozomálních proteinů, jejichž deregulace může podporovat aktivaci p53 se stále rozrůstá, avšak zdá se, že RPL5 a RPL11 mají v regulaci p53 jedinečnou úlohu (Golomb a kol., 2014). Bursac a kol. (2012) ošetřili buňky lidského plicního karcinomu (A549) actinomycinem D v koncentraci 5 nM a použili metodu siRNA transfekce proti konkrétním r-proteinům. Bylo zjištěno, že vyčerpání (down-regulace) r-proteinu L5 nebo L11 inhibovala řízenou indukci proteinu p53 a jeho cílů p21^{WAF1} a MDM2. Na rozdíl od L5 a L11, vyčerpání proteinu S7, L23 nebo L26 akumulaci p53 nezmenšilo. Bylo ukázáno, že L5 a L11 jsou unikátní mezi ostatními r-proteiny. Zatímco jiné nově syntetizované RP byly degradovány proteasomem po ošetření actinomycinem D, L5 a L11 se akumulovaly v neribozomální frakci, kdy bylo ukázáno, že tato akumulace je způsobena vzájemnou ochranou L5 a L11 proti proteasomální degradaci. Nesestavené ribozomální proteiny L5 a L11, které se nahromadily v nukleoplazmě jsou schopné dále interagovat s MDM2. Předložené výsledky vedou k závěru, že L5 a L11 jsou kritickými mediátory aktivace p53. Tyto výsledky dále doplňuje Fumagalli a kol. (2012), kteří ve své studii rovněž dospěli k názoru, že vyčerpání S7, L23 a jiných ribozomálních proteinů, s výjimkou L11 a L5 vyvolává odpověď p53. Potvrdili, že RPL5 a RPL11 jsou potřebné k indukci p53.

Základní otázkou však je, jak signály ribozomálního stresu komunikují s MDM2, aby regulovaly p53. Intenzivní studie o ribozomálním stresu ukázaly, že nerovnováha ribozomálních složek je klíčovým zdrojem volných ribozomálních proteinů. Bylo ukázáno, že nedostatek několika RP má za následek indukci p53-závislých stresových odpovědí. Tvrdí se, že nerovnováha ribozomálních složek je tedy hlavním důvodem ribozomálního stresu a následné aktivace p53 (Liu a kol., 2016a). Studie provedené na RPL11 naznačují dva možné modely, které by mohly vysvětlit fyzickou interakci ribozomálních proteinů s MDM2. První model předpokládá, že narušení jadérka a porucha ribozomální biogeneze vyvolává difúzi řady ribozomálních proteinů, včetně L11, z jadérka do nukleoplazmy, kde se mohou vázat na MDM2 a stabilizovat p53 (Bhat a kol., 2004; Zhang a Lu, 2009). Tento

model je podpořen zjištěním, že přemístění ribozomálního proteinu L6 z jadérka do nukleoplazmy, při ribozomálním stresu indukovaném actinomycinem D, předchází interakci s MDM2 (Bai a kol., 2014). Druhý model hovoří o tom, že přestože některé poruchy ribozomální biogeneze nezpůsobují zjevné poškození jadérka, stále může dojít k aktivaci p53 způsobem závislým na RPL11/MDM2. Například vyřazení RPS6 naruší biogenezi malé ribozomální podjednotky 40S a aktivuje p53, avšak bez zjevného narušení nukleolární integrity. V tomto případě se přednostně překládají mRNA s polypyrimidinovou oblastí v jejich 5'-transkripčním počátečním místě (5'-TOP mRNA), včetně RPL11 a případně dalších RP, což vede k akumulaci nesestavených volných L11, které jsou k dispozici pro vazbu na MDM2 (Fumagalli a kol., 2009). Společně tyto data podporují regulační mechanismus dráhy ribozomální protein-MDM2-p53, který reaguje na porušení ribozomální biogeneze.

Předpokládá se, že za normálních podmínek existuje dynamická rovnováha mezi nesestavenými ribozomálními proteiny a r-proteiny, které jsou integrované do ribosomů. V reakci na ribozomální stres se některé ribozomální proteiny uvolňují z jadérka a vstupují do nukleoplazmy, kde se váží na MDM2 a stabilizují p53. Pokud je buňka vystavena onkogenní stimulaci dojde k hyperaktivaci exprese RP a syntézy rRNA. Zvýšená de novo syntéza RP jednak usnadňuje biogenezi ribosomů v jádře, současně však zvyšuje koncentraci volných RP, které se akumulují v nukleoplazmě a iniciují dráhu RP-MDM2-p53. Tato signální cesta tedy působí jako citlivá monitorovací síť, zaznamenávající poškození nebo nadměrnou aktivaci ribozomální biogeneze (Liu a kol., 2016a).

2.2.3 Degradace ribozomálních proteinů

Kontrola kvality proteinů je rozhodující pro udržení proteinové homeostázy v eukaryotických buňkách. U eukaryot se vyvinuly dvě hlavní cesty k eliminaci proteinů, které vykazují odchylky a to: ubiquitin proteasomový systém (UPS) a autofagie (Wang a kol., 2015). Chemické a genetické studie naznačují, že nadměrně exprimované ribozomální proteiny jsou degradovány pomocí UPS a nikoliv autofagií (Sung a kol., 2016b). Substráty UPS jsou označeny ubiquitinem a následně doručeny k 26S proteasomu k degradaci. Konjugace ubiquitinu se substrátem vyžaduje tři typy enzymů: enzymy aktivující ubiquitin (E1), enzymy konjugující ubiquitin (E2) a ubiquitin ligázy (E3) (Wang a kol., 2015).

Bylo zjištěno, že nadprodukované ribozomální proteiny se většinou nesestavují do ribozomů, ale jsou rychle ubiquitinovány a degradovány v jádře, a to způsobem závislým na proteasomu (Sung a kol., 2016b). Dále bylo prokázáno, že po navození ribozomálního stresu jsou RPL5 a RPL11 před proteasomální degradací chráněny, zatímco jiné ribozomální proteiny ne (Bursač a kol., 2012). Otázkou však zůstává, jaké ubiquitin ligázy se podílejí na degradaci ribozomálních proteinů. Shcherbik a Pestov (2010) ve své práci uvádí, že identita ubiquitin ligáz zapojených do cílení ribozomálních proteinů k proteasomální degradaci je nejasná. Od zveřejnění této studie však už uběhl nějaký čas a postupně byly prováděny další výzkumy týkající se této oblasti. Sung a kol. (2016b) se zaměřili na ubiquitinaci r-proteinu L6. Potvrdili, že r-protein L6, který je produkován v přebytku, se do značné míry nesestaví do ribozomů, ale je ubiquitinován a poté degradován v proteasomu. Také testovali, zda je degradace RPL6 závislá na ubiquitin ligáze San1, nicméně nadprodukovaný RPL6 se nehromadil v *san1Δ* buňkách, což naznačuje, že se kontroly kvantity proteinu bude účastnit jiná ubiquitin ligáza. Později bylo zjištěno, že jde o ligázu TOM1, která je popsána níže (Sung a kol., 2016a).

E3 ubiquitin ligáza TOM1 patří do rodiny HECT a spolupracuje s enzymy E2 Ubc4 a Ubc5, aby zprostředkovala degradaci nesestavených ribozomálních proteinů u kvasinek. Bylo zjištěno, že TOM1 přímo ubiquitínuje nesestavené ribozomální proteiny (Sung a kol., 2016a). Bylo objeveno, že u RPL4 rozpoznává ligáza TOM1 K56 spolu s K310 a K340 u *Chaetomium thermophilum* a ubiquitínuje je v nepřítomnosti chaperonu Acl4 a jaderného transportního faktoru Kap104 (Huber a Hoelz, 2017). Sung a kol. (2016a) provedli měření pro tři ubiquitinační místa na RPL4: K55, K308 a K338 u *Saccharomyces cerevisiae*. Zkoumáním krystalové struktury bylo zjištěno, že K55 a K308, jejichž ubiquitinace vykazovala nejsilnější závislost na TOM1, nejsou přístupné pro modifikace ve zralém ribozomu. Dále bylo ukázáno, že Acl4 zakrývá K55 a Kap104, zakotvený na RPL4-Acl4, chrání K308 a K338. Tyto informace podporují zjištění Hubera a Hoelze (2017), kteří ukázali, že pouze nechráněný r-protein L4 je cílen pro proteasomální degradaci. Společně tato data ukazují, že ligáza TOM1 selektivně rozpoznává a ubiquitínuje ribozomální proteiny prostřednictvím zbytků, které jsou přístupné pouze v nesmontovaném stavu a vedou k závěru, že TOM1 se váže na lysinové zbytky, které jsou za normálních podmínek ve struktuře zralého ribozomu nepřístupné. V neposlední řadě je potřeba zmínit, že byl objeven lidský ekvivalent TOM1 známý jako HUWE1 a zjištěné informace

naznačují, že HUWE1 působí podobným způsobem jako ligáza TOM1 (Sung a kol., 2016a).

Jako další ligázu, která je zodpovědná za ubiquitinaci ribozomálních proteinů můžeme uvést Zinc Finger Protein 598 (ZNF598). Lidský ZNF598 se skládá z 904 aminokyselin a obsahuje jednu N-koncovou RING doménu, charakteristickou pro E3 ubiquitin ligázy, čtyři N-koncové a jeden C-koncový C2H2 motiv zinkového prstu (Garzia a kol., 2017). Bylo zjištěno, že ZNF598 ubiquitínuje r-protein S10 a to na místě K138 a K139. Ubiquitinace pomocí ZNF598 byla prokázána i pro r-protein S20, který je modifikovaný na K4 a K8 a také pro r-protein S3, modifikovaný na K214 (Juszkiewicz a Hedge, 2017). Bylo zjištěno, že ZNF598 interaguje s enzymem UBE2D3, který patří do skupiny enzymů E2. (Garzia a kol., 2017). Dále byl identifikován pomocný protein RACK1, který usnadňuje ubiquitinaci r-proteinů S2, S3 a S20. Experimenty ukázaly, že vyřazení (knock-down) RACK1 vedlo ke zrušení ubiquitinace RPS2 a ke snížení ubiquitinace RPS3 a RPS20 stimulované pomocí harringtoninu a dithiothreitolu. Avšak na rozdíl od ZNF598, ztráta RACK1 neměla vliv na ubiquitinaci RPS10. Tyto výsledky vedou k závěru, že RACK1 a ZNF598 regulují odlišnou, ale částečně se překrývající podmonožinu r-proteinů a jsou klíčovými faktory regulující funkci kontroly kvality, pomocí zprostředkování regulace ubiquitinace 40S ribozomálních proteinů (Sundaramoorthy a kol., 2017).

Dále byla identifikována E3 ubiquitin ligáza HEL2. Jedná se o kvasinkový homolog savčí E3 ubiquitin ligázy ZNF598. Jako cíle HEL2 byly označeny r-proteiny S3 a S20, přičemž bylo zjištěno, že RPS3 je ubiquitinován na K212 a RPS20 na K6 a K8 (Matsuo a kol., 2017). Bylo zjištěno, že ligáza HEL2 interaguje s E2 konjugujícím enzymem Ubc4p (Singh a kol., 2012). Ribozomálním proteinem S3 se zabývá i studie, kterou provedli Jung a kol. (2017). Ukázali, že cykloheximid, emetin, blasticidin S, anisomycin ale i vysoké dávky ozařování ultrafialovým zářením (200 J/m^2) mohou indukovat mono-ubiquitinaci RPS3. Rovněž ovlivnění rapamycinem či vyčerpání aminokyselin (např. deplece tryptofanu, histidinu) může vést k mono-ubiquitinaci kvasinkového RPS3. Bylo zjištěno, že mono-ubiquitinace RPS3 na K212 může být zvýšena inhibicí Tor kinázy, nebo inhibicí elongace translace. U lidského RPS3 byla mono-ubiquitinace indukována rovněž působením různých inhibitorů elongace translace a také UV zářením. Bylo potvrzeno, že kvasinkový RPS3 ubiquitínuje ligáza HEL2, zatímco lidský RPS3 ligáza ZNF598.

Ubiquitinací ribozomálních proteinů se ve své práci zabývají i Higgins a kol. (2015). Bylo ukázáno, že cykloheximid, anisomycin, harringtonin a dithiothreitol (DTT) jsou silnými induktory ubiquitinace RP. Po ovlivnění pomocí DTT byl detekován až 16násobný nárůst ubiquitinace oproti neovlivněným buňkám. Byla zaznamenána ubiquitinace RPS2 na K58 a K275, RPS3 na K214 a K230 a RPS20 na K8. Také ovlivnění UV zářením mělo za následek zvýšení ubiquitinace u RPS2, RPS3 a RPS20 (Higgins a kol., 2015). Dále bylo zjištěno, že doxorubicin, který indukuje poškození DNA, může také způsobit ubiquitinaci ribozomálních proteinů. Zvýšení ubiquitinace bylo pozorováno již 2 hodiny po poškození DNA, a to pro velkou skupinu RP. Jednalo se o RPL6, RPL7A, RPL10, RPL15, RPL17, RPL18, RPL23, RPL28, RPL36, RPL27A, RPS2, RPS3, RPS11, RPS16 a RPS20. Ubiquitinační místa pro jednotlivé ribozomální proteiny však nebyly v této studii charakterizovány (Halim a kol., 2018).

2.3 RNA helikázy

V této práci byla předmětem zájmu jedna z RNA helikáz – protein DDX56 – a její vztah k aktivaci p53. RNA helikázy jsou vysoce konzervované enzymy, které používají adenosintrifosfát (ATP) k vázání nebo remodelaci RNA nebo ribonukleoproteinových komplexů. Prakticky se účastní všech procesů týkajících se molekul RNA, zahrnujících transkripci, editaci, sestřih, biogenezi ribozomů, export RNA, translaci nebo degradaci RNA (Tanner a Linder, 2001). Existují příklady dysregulace exprese lidských RNA helikáz, které mohou vést k iniciaci, podpoře nebo progresi u různých typů rakovin. Bylo zjištěno, že DDX1 je nadměrně exprimovaný v neuroblastomu a retinoblastomu. V kolorektálním karcinomu byla zvýšená hladina DDX5 a DDX6. Dále byl nalezen DDX2 nadměrně exprimovaný v melanomu a hepatocelulárním karcinomu. U DHX9 byla detekována interakce s BRCA1 a CBP, zvýšení bylo zaznamenáno u rakoviny plic. Zvýšená regulace byla zjištěna i u DDX48 u rakoviny žaludku, naopak snížení bylo detekované u DHX32 v případě akutní lymfoblastické leukémie (Abdelhaleem, 2004).

RNA helikázy můžeme klasifikovat jako členy šesti superrodin proteinů (SF1 až SF6) na základě výskytu a charakteristik konzervovaných motivů ve své primární sekvenci (Rodríguez-Galán a kol., 2013). Většina RNA helikáz patří do superrodiny SF2, která se dále dělí na několik rodin včetně DEAD-box (běžně označované také jako DExD/H-box), DExH-box a Ski2 rodiny (Singleton a kol., 2007). Umate a kol. (2011) provedli celkovou genomovou analýzu lidských helikáz a identifikovali 64 RNA helikáz, 16 DExH (DXH)

helikáz, z čehož 14 z 16 detekovaných členů vykazovalo přítomnost osmi konzervovaných helikázových motivů. Dále identifikovali 42 členů rodiny DExD (DDX), kdy na základě konzervativního helikázového motivu bylo validováno 37 členů DDX. Nezávislá kategorie helikáz pak zahrnovala helikázy, které nepatří k DHX ani k DDX, obsahovala 6 členů a zařazena zde byla U5.snRNP 200 kDa helikáza, transkripční regulátor ATR-X, dále helikáza SUPV3L1, SKIV2L2, SKI2W a helikáza FANCI.

Několik lidských helikáz je spojováno s transkripcí ribozomálních složek. Tyto helikázy můžeme rozdělit do dvou kategorií: první kategorie – RNA helikázy, které ovlivňují transkripci pre-rRNA a druhá – helikázy, které působí jako koaktivátory transkripčních faktorů, například proteinu p53, souvisejících s biogenezí ribozomů (Rodríguez-Galán a kol., 2013). Co se týče kategorie první, tak použití techniky RNA interference ukázalo, že pro efektivní transkripci ribozomální DNA je požadováno několik lidských RNA helikáz, především pak DHX33 a DHX9. Výzkumy ukazují, že vyřazení DHX33 vede k silnému poklesu hladin 47S pre-rRNA a také, že DHX33 interaguje s UBF, což je specifický transkripční faktor RNA polymerázy I (Zhang a kol., 2011). Do druhé kategorie můžeme zahrnout proteiny DDX5 a DDX17, které fungují jako koaktivátory aktivity p53 (Bates a kol., 2005; Shin a Janknecht, 2007) a jako trans-působící faktory pro biogenezi 60S podjednotky (Rodríguez-Galán a kol., 2013). Bylo zjištěno, že jak DDX5, tak i DDX17 jsou nadměrně exprimovány u karcinomu prsu, prostaty a tlustého střeva (Janknecht, 2010). Dále bylo zjištěno, že protein DDX31 reguluje dráhu p53-HDM2 a transkripci genů ribozomální RNA prostřednictvím interakce s nukleofosminem (NPM1) v karcinomu renálních buněk (Fukawa a kol., 2012).

2.3.1 DEAD-box helikázy

DEAD-box helikázy jsou největší rodinou, pojmenovanou dle motivu II (též motiv Walker B), který má aminokyselinovou sekvenci Asp-Glu-Ala-Asp neboli D-E-A-D. Tento motiv, společně s motivem I (neboli motiv Walker A), Q-motivem a motivem VI, je vyžadován pro vazbu a hydrolýzu ATP (Linder, 2006).

Jak už bylo zmíněno výše, patří DEAD-box helikázy do superrodiny SF2 (Singleton a kol., 2007). Vyznačují se tím, že obsahují 9 konzervovaných sekvenčních motivů – GFxxPxxIQ, AxxGxGKT, PTRELA, TPGR, DExD, SAT, FVxT, RGxD a HRxGRxxR. U pěti členů DEAD-box helikáz některé z výše uvedených sekvenčních motivů zcela chybí, nebo mají změny ve složení aminokyselin. Jde o helikázy DDX1,

DDX11, DDX12, DDX58 a DDX60. Proteiny zařazené do rodiny DEAD-box jsou zobrazeny v tabulce 1 (Umate a kol., 2011).

Tab. 1. RNA helikázy patřící do rodiny DEAD-box

Název proteinu	Synonymum
DDX1	RNA helikáza DDX1, DEAD-box protein retinoblastomu
DDX2A	RNA helikáza eIF4A-1, Eukaryotický iniciační faktor eIF4A-I
DDX2B	RNA helikáza eIF4A-2, Eukaryotický iniciační faktor 4A-II
DDX3X	RNA helikáza DDX3X, HLP2, X-chromozomální
DDX3Y	RNA helikáza DDX3Y, Y-chromozomální
DDX4	RNA helikáza DDX4, Vasa homolog
DDX5	RNA helikáza DDX5, RNA helikáza p68
DDX6	RNA helikáza DDX6, RNA helikáza p54, onkogen RCK
DDX10	RNA helikáza DDX10
DDX11	RNA helikáza DDX11, CHL1-příbuzný protein 1, KRG-2
DDX12	RNA helikáza DDX12, CHL1-příbuzný protein 2
DDX17	RNA helikáza DDX17, RNA-dependentní helikáza p72
DDX18	RNA helikáza DDX18, Myc-regulovaný DEAD-box protein
DDX19A	RNA helikáza DDX19A
DDX19B	RNA helikáza DDX19B, DEAD box RNA helikáza DEAD5
DDX20	RNA helikáza DDX20, DEAD box protein DP 103, Gemin-3
DDX21	Nukleolární RNA helikáza 2, RH II/Gu, Gu-alpha
DDX23	RNA helikáza DDX23, 100 kDa U5 snRNP-specific protein
DDX24	RNA helikáza DDX24
DDX25	RNA helikáza DDX25, Gonadotropin-regulovaná testikulární RNA helikáza
DDX27	RNA helikáza DDX27
DDX28	RNA helikáza DDX28, Mitochondriální DEAD-box protein 28
DDX31	RNA helikáza DDX31
DDX39	RNA helikáza DDX39, Nukleolární RNA helikáza URH49
DDX41	RNA helikáza DDX41
DDX42	RNA helikáza DDX42, SF3b DEAD-box protein, SF3b125
DDX43	RNA helikáza DDX43, DEAD box protein HAGE, CT13

DDX46	RNA helikáza DDX46, PRP5 homolog
DDX47	RNA helikáza DDX47
DDX48	RNA helikáza eIF4A-3, Eukaryotický iniciační faktor 4A-III
DDX49	RNA helikáza DDX49
DDX50	RNA helikáza DDX50, Nukleolární protein Gu2, Gu-beta
DDX51	RNA helikáza DDX51
DDX52	RNA helikáza DDX52, RNA helikáza ROK1-like
DDX53	RNA helikáza DDX53, DEAD box protein CAGE, CT26
DDX54	RNA helikáza DDX54, RNA helikáza DP97
DDX55	RNA helikáza DDX55
DDX56	RNA helikáza DDX56, ATP-dependentní 61 kDa nukleolární RNA helikáza
DDX58	RNA helikáza DDX58, Retinoic acid-inducible gene 1 protein
DDX59	RNA helikáza DDX59, Zinc finger HIT domain-containing protein 5
DDX60	RNA helikáza DDX60
BAT1	Spliceosomová RNA helikáza BAT1, DEAD box protein UAP56

2.3.1.1 DDX56

Protein DDX56 neboli také NOH61 byl charakterizován Zirwesem a kol. (2000). Tento protein má hmotnost 61,5 kDa a hodnotu izoelektrického bodu 9,9. Kontrola primární sekvence ukázala, že protein je členem rodiny DEAD-box a jedná se pravděpodobně o ATP-závislou RNA helikázu. Byla nalezena homologie RNA helikázy Dbp9 ze *Saccharomyces cerevisiae* s DDX56 a je zajímavé, že oba proteiny vykazují vysokou konzervaci sekvence v karboxylové terminální oblasti. Co se týče intracelulárního umístění, bylo pomocí imunocytochemie zjištěno, že protein DDX56 se nachází primárně v jadéřkách, u některých buněk pak navíc v nukleoplazmě. Lokalizace byla potvrzena na buněčných kulturách různých druhů obratlovců, konkrétně se jednalo o lidské cervikální adenokarcinomové buňky linie HeLa, buňky skotu (linie BMGE1H), buňky odvozené od hladkého svalstva cév potkana (linie RV) a epitelální buňky ledvin drápatky (linie A6) (Zirwes a kol., 2000).

Protože protein DDX56 patří do rodiny předpokládaných ATP-závislých RNA helikáz, byla dále analyzována jeho intracelulární distribuce po ovlivnění

deoxyribonukleázou (DNáza), ribonukleázou (RNáza) a actinomycinem D (Zirwes a kol., 2000). Bylo zjištěno, že po inkubaci kultivovaných buněk s DNázou zůstává protein DDX56 v jadéřkách, ačkoliv barvení bylo trochu slabší ve srovnání s neošetřenými buňkami. Distribuce proteinu DDX56 byla ovlivněna působením RNázy, kdy toto působení vedlo k úplnému uvolnění z nukleolárních struktur, což naznačuje, že protein DDX56 se váže na RNA transkripty a pravděpodobně je součástí větších ribonukleoproteinových částic. Po ovlivnění actinomycinem D (koncentrace 5 µg/ml, působení 4 hodiny) byl protein DDX56 uvolněn z jadérek a částečně translokován do nukleoplazmy a také do cytoplazmy.

Specifická intracelulární lokalizace a sekvenční homologie s jinými RNA helikázami vede k hypotéze, že protein DDX56 by mohl být zapojen do syntézy ribozomů, pravděpodobně do procesu sestavování velké (60S) ribozomální podjednotky (Zirwes a kol., 2000). Tuto hypotézu potvrzuje i systematická analýza lidské ribozomální biogeneze pomocí RNA interference provedená Wildem a kol. (2010), která rovněž naznačuje, že se DDX56 pravděpodobně podílí na biogenezi 60S podjednotky.

Další výzkumy týkající se proteinu DDX56 se ubírají především směrem k virologii. Xu a kol. (2011) ve své práci popisují interakci mezi kapsidem West Nile viru (WNV) a RNA helikázou DDX56. Zjistili, že protein DDX56 je důležitý pro infekčnost WNV. Publikovaná data dále napovídají, že infekce WNV způsobuje transport DDX56 z jadérka do cytoplazmy s následnou degradací DDX56 v proteasomu. Rovněž je ukázáno, že protein DDX56 je potřebný pro sestavení infekčních částic WNV, což potvrzuje Xu a Hobman (2012) ve své další studii. Na tyto výsledky navazuje Reid a Hobman (2017), kteří ukazují, že WNV infekce vede k přemístění DDX56 z jadérek na místa shromáždění viru v oblasti endoplazmatického retikula.

Souvislost proteinu DDX56 s ribozomálním stresem a aktivací p53 nebyla doposud detailně objasněna, i proto byl tento protein hlavním objektem zájmu v předkládané diplomové práci. Co se týče dalších oblastí výzkumu u proteinu DDX56 můžeme zmínit výzkum v oblasti kolorektálního karcinomu (Kouyama a kol., 2017). Gen DDX56 byl identifikován na chromozomu 7p. Bylo zjištěno, že exprese DDX56 byla významně vyšší u tkání kolorektálního karcinomu, než u normálních tkání tlustého střeva. Navíc byla exprese pozitivně spojena s lymfatickou invazí a metastázemi a byla špatným nezávislým prognostickým faktorem. Kromě toho může být DDX56 zapojen do progresu nádoru

prostřednictvím stimulace buněčného cyklu a mohl by být terapeutickým cílem, ale i prognostickým biomarkerem u kolorektálního karcinomu.

2.3.1.2 DDX51

Protein DDX51 je ATP-závislá RNA helikáza o délce 666 aminokyselin a molekulovou hmotností 72,457 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q8N8A6>). Byl identifikován jako interagující partner savčího kofaktoru NOG1 a metodou fluorescenční mikroskopie byla prokázána jeho jadéřková lokalizace. Dále bylo zjištěno, že DDX51 hraje roli při dozrání ribozomů v savčích buňkách a působí při zpracování pre-rRNA. Váže se na komplexy pre-60S podjednotky, je potřebný pro zpracování 3' konce 28S rRNA a ovlivňuje asociaci U8 snoRNA s preribozomy (pre-60S) (Srivastava a kol., 2010). Byla nalezena homologie s kvasinkovou RNA helikázou Dbp6 (Rodríguez-Galán a kol., 2013), avšak je zajímavé, že cílem DDX51 je U8 snoRNA, která byla nalezena u vyšších eukaryot, ale chybí u *Saccharomyces cerevisiae* (Srivastava a kol., 2010). Tento fakt naznačuje, že DDX51 i přes vysoký stupeň homologie nejspíše není funkčním ekvivalentem Dbp6 (Rodríguez-Galán a kol., 2013).

Sun a kol. (2017) zkoumali funkci DDX51 v rakovině prsu na buňkách MCF-7. V tkáních a buněčných liniích byla zjištěna zvýšená exprese DDX51 a získaná data naznačují, že DDX51 je onkogenem a reguluje signalizaci Wnt/ β -catenin. Tato studie poskytuje novou naději na léčbu pacientů s rakovinou prsu.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Přístrojové a laboratorní vybavení

V experimentální části byly použity tyto přístroje:

Aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad, USA)

Automatický počítač buněk Vi-Cell XR (Beckman Coulter, USA)

Blotovací aparatura Panther Owl-HEP1 (Thermo Scientific, USA)

Centrifuga Combi-Spin FVL-2400N (Biosan, Lotyšsko)

CO₂ inkubátor (Thermo Scientific, USA)

Chemiluminiscenční kamera ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad, USA)

Magnetická míchačka Instelli-Stirrer MSH-300i (Biosan, Lotyšsko)

Míchačka Thermo Mixer C (Eppendorf, Německo)

Mikroskop Olympus CKX41 (Olympus, Japonsko)

Mikroskop Olympus IX81 (Olympus, Japonsko)

Mikroskop Zeiss Axio Imager A2 (Carl Zeiss AG, Německo)

Laboratorní digestoř (MERCİ, Česká republika)

Laminární box s vertikálním prouděním HeraSafe (Thermo Scientific, USA)

Předvážky BPS 51 (Boeco Germany, Německo)

Třepačka MR-1 (Biosan, Lotyšsko)

Ultraviolet Crosslinker CL-1000 (UVP, USA)

Vodní lázeň Memmert WNB (Memmert, Německo)

Zdroj napětí Consort EV202 (Sigma-Aldrich, USA)

3.2 Použité chemikálie

30% akrylamid/bis-akrylamid (29:1)	Bio-Rad
Actinomycin D	Sigma-Aldrich
Azid sodný	Sigma-Aldrich
Bortezomib	Calbiochem
Bromfenolová modř (BPB)	Sigma-Aldrich
Butanol	Penta
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	Penta
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GbmH
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma-Aldrich

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biosera
Ethanol 70% a 96%	Fagron
Fetální bovinní sérum (FBS)	Thermo Scientific
Formaldehyd	Sigma-Aldrich
Glycerol	Penta
Glycin	Sigma-Aldrich
Hoechst 33342	Molecular Probes
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	Penta
Chemiluminiscenční činidlo SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific
Chemiluminiscenční činidlo SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific
Chlorid draselný (KCl)	Sigma-Aldrich
Chlorid sodný (NaCl)	Sigma-Aldrich
Kyselina octová	Penta
Methylalkohol	Penta
MLN7243	Chemietek
Opti-MEM™ Reduced Serum Medium	Thermo Scientific
Penicilin	Sigma-Aldrich
Peroxodisíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Proteinový marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad
siCON – Ambion® <i>Silencer</i> ® Negative Control #1 siRNA	Thermo Scientific
siDDX56	Thermo Scientific
siRPL11	Thermo Scientific
Streptomycin	Sigma-Aldrich
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Transfekční činidlo	Thermo Scientific
Tris (hydroxymethyl) aminomethan (TRIS)	Serva
Triton X-100	Carl Roth GbmH
Trypsin	Thermo Scientific
Tween 20	MP Biomedicals

Výrobce (stát): AppliChem GbmH (Německo), Biosera (Francie), Bio-Rad (USA), Calbiochem (USA), Carl Roth GbmH (Německo), Fagron (Česká republika), Chemietek (USA), Molecular Probes (USA), MP Biomedicals (USA), Penta (Česká republika), Serva (Německo), Sigma-Aldrich (USA), Thermo Fisher Scientific (USA), Vector Laboratories (USA)

3.3 Použité roztoky

10x TBS: 24,2 g TRIS; 80 g NaCl v 1 l destilované vody; (pH = 7,6)

10x Transfer: 30,3 g TRIS; 144 g Glycin v 1 l destilované vody

10x Running: 30,3 g TRIS; 144 g Glycin; 10 g SDS v 1 l destilované vody

10x PBS: 80 g NaCl; 2g KCl; 2g KH₂PO₄; 32,1 g Na₂HPO₄ * 12H₂O v 1 l destilované vody; (pH = 7,4 – 7,5)

4x LSB (Laemmli Sample Buffer): 8 ml 1 M TRIS (pH = 6,8); 2,7 g DTT; 3,2 g SDS; 16 ml glycerol; 700 µl BPB; 40 ml ddH₂O

1x TBS: 100ml 10x TBS; 900 ml destilované vody; 1 ml Tween

1x Transfer: 100 ml 10x Transfer; 100 ml methylalkohol; 800 ml destilované vody

1x Running: 100 ml 10x Running; 900 ml destilované vody

1x PBS: 100 ml 10x PBS; 900 ml destilované vody

2x LSB: 1,5 ml 4x LSB; 1,5 ml ddH₂O

5% blokovací roztok: 2,5 g sušeného odtučněného mléka v 50 ml TBS s 0,1% Tween 20

10% APS: 1g APS / 10 ml H₂O

10% SDS: 10g SDS / 100 ml H₂O

10% DMEM: 10% FBS, penicilin (100 U/ml), streptomycin (0,1 mg/ml)

ABD médium: DMEM, 10% FBS, 0,02% azid sodný

PBS – Triton X-100: 50 µl Triton X-100; 50 ml PBS

Ponceau: 0,2% v 1% kyselině octové

3.4 Použité protilátky

Pro metodu Western blotting:

Primární protilátky

anti-ddx51, rabbit, ředění 1:1000 (Abcam, UK)

anti-ddx56, rabbit, ředění 1:500 (Abcam, UK)

anti-p21, rabbit, ředění 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

anti-p53, rabbit, ředění 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

anti-rad51, rabbit, ředění 1:1000 (Abcam, UK)

anti-MCM7, mouse, ředění 1: 100 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

Sekundární protilátky

ECL anti-mouse IgG, Horseradish peroxidase linked whole antibody (from sheep) ředění 1:1000 (GE Healthcare, USA)

ECL anti-rabbit IgG, Horseradish peroxidase linked whole antibody (from donkey), ředění 1:1000 (GE Healthcare, USA)

Pro metodu imunofluorescenčního barvení buněk na sklíčku:

Primární protilátky

anti-Nucleolar Helicase, mouse, ředění 1:250 (Progen Biotechnik, Německo)

anti-ddx56, rabbit, ředění 1:500 (Abcam, UK)

anti-p53, rabbit, ředění 1:250 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

anti-p53, mouse, ředění 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

anti-NCL, rabbit, ředění 1:500 (Abcam, UK)

anti-NPM, mouse, ředění 1:1000 (Abcam, UK)

anti-NS, rabbit, ředění 1:500 (Abcam, UK)

Sekundární protilátky

anti-mouse, goat, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, USA)

anti-mouse, goat, Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific, USA)

anti-rabbit, goat, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, USA)

anti-rabbit, goat, Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.5 Použité buněčné linie

Experimenty byly prováděny na adherentní nádorové buněčné linii odvozené z lidského osteosarkomu – U2OS a na buněčné linii HeLa odvozené od rakoviny děložního čípku. Dále na adherentních nenádorových buněčných liniích BJ (lidské kožní fibroblasty) a MRC-5 (lidské plicní fibroblasty).

Buněčné linie byly kultivovány na sterilních plastových Petriho miskách (Techno Plastic Products AG, Švýcarsko) nebo ve sterilních kultivačních láhvích (Techno Plastic

Products AG, Švýcarsko) v kultivačním médiu DMEM s přidavkem 10% fetálního bovinního séra, streptomycinu (0,1 mg/ml) a penicilinu (100 U/ml). V inkubátoru při teplotě 37 °C a v atmosféře s obsahem 5% oxidu uhličitého.

3.6 Pasážování buněk

Buněčné linie byly uchovávány v plastových lahvích (25 cm²). Buňky byly kontrolovány pod mikroskopem a pasážovány dle potřeby v závislosti na rychlosti růstu, aby nedošlo ke 100% konfluenci a k odumírání buněk. Linie U2OS a HeLa byly pasážovány každý druhý den, jelikož jsou rychleji rostoucí než BJ a MRC-5, které byly pasážovány v průměru 1 - 2x týdně.

Pasážování probíhalo ve sterilním prostředí flowboxu. Nejprve bylo odsáto staré médium, následně bylo přidáno 1–2 ml trypsinu, kultivační láhev byla opatrně nakláněna k dosažení rovnoměrného rozprostření trypsinu po celé ploše láhve a poté byla vložena do inkubátoru nastaveného na teplotu 37 °C na dobu 5 min. Po uplynutí kultivační doby byla láhev zkontrolována, aby bylo zjištěno, zda došlo k uvolnění buněk z podkladu. Trypsin byl inaktivován přidáním čerstvého média DMEM, obsah láhve byl několikrát promíchán pomocí pipety a poté byl přepipetován do 15 ml zkumavky. Následně bylo odebráno 500 µl suspenze pro potřeby počítání buněk pomocí automatického počítače buněk Vi-Cell XR nebo pro počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky a optického mikroskopu. Do čistých sterilních kultivačních lahví bylo napipetováno definované množství kultivačního média, bylo přidáno vypočítané množství buněčné suspenze, obsah láhve byl několikrát promíchán a láhev byla vložena do inkubátoru do doby dalšího pasážování. Pro potřebu nasazení buněk na určité experimenty bylo vypočítané množství buněčné suspenze přepipetováno do Petriho misek, následně bylo přidáno odpovídající množství média, celkový obsah byl pomocí pipety promíchán a Petriho misky připravené k ovlivnění byly vloženy do inkubátoru.

3.7 Ovlivnění buněčných linií

Do Petriho misek (60 mm) bylo nasazeno určité množství buněk v závislosti na délce časového ovlivnění. Celkový objem buněčné suspenze činil 5 ml.

3.7.1 Ovlivnění pomocí chemických činidel

Ve sterilních podmínkách flowboxu bylo k buňkám pomocí pipety přidáno definované množství actinomycinu D tak, aby výsledná koncentrace ActD byla 1 nM, 5 nM a 10 nM. Obsah Petriho misek byl jemným kýváním ze strany na stranu promíchán a misky byly vráceny zpět do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). Po uplynutí délky ovlivnění, která byla 3, 6 nebo 24 hod byly buňky zlyzovány postupem popsáním níže.

Stejný postup se opakoval i u ovlivnění pomocí MLN7243, výsledná koncentrace činila 5 mM, délka ovlivnění 6 hod a u bortezomibu, kdy výsledná koncentrace byla 2,6 mM a časové ovlivnění 6 hod.

3.7.2 Ovlivnění pomocí UV záření

Při ovlivnění buněk pomocí UV bylo z Petriho misek odsáto médium do 15 ml zkumavky. Petriho miska bez horního víčka byla vložena do přístroje UV Crosslinker CL-1000 a došlo k ovlivnění, bylo použito UV záření o dávce 50 J/m². Poté byla miska vyjmuta z přístroje, předem odebrané médium bylo přepipetováno zpět a Petriho miska byla vrácena do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). Po uplynutí 6 hod. byly buňky zlyzovány.

3.7.3 siRNA transfekce

Pro každou Petriho misku (60 mm) byly připraveny dvě mikrozkušavky. Do první mikrozkušavky bylo napipetováno 500 µl Opti-MEM™ a 10 µl transfekčního činidla. Druhá mikrozkušavka obsahovala 500 µl Opti-MEM™ a 2 µl siRNA pro příslušný protein. Obsah jednotlivých mikrozkušavek byl protřepán a krátce stočen na centrifuze. Následně byl obsah obou mikrozkušavek smíchán a inkubován 15 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby bylo z Petriho misky odebráno 3 ml média a do misky byl nakapán připravený transfekční roztok. Misky byly vloženy do inkubátoru nastaveného na teplotu 37 °C s atmosférou 5% CO₂. Po 6 až 8 hodinách bylo veškeré médium z misky odebráno a bylo přidáno 5 ml čerstvého média DMEM. Po uplynutí 24 hodin od provedené transfekce byly buňky pasážovány a následně 72 hodin po transfekci byly zlyzovány pro analýzu metodou Western blotting, nebo byly fixovány pro imunofluorescenční barvení.

3.8 Tvorba lyzátů

Z ovlivněných i kontrolních buněk v Petriho miskách bylo odsáto médium. Misky byly 3x opatrně promyty pomocí PBS. Následně bylo přidáno 250–350 μ l 2x LSB. Krouživými pohyby špičky po dně Petriho misky byl vytvořen lyzát, který byl následně přenesen do označené eppendorfové zkumavky. Zkumavky byly vloženy na míchačku Thermo Mixer C a zahřívány při teplotě 96 °C a 1600 rpm po dobu 5 min. Poté byly uskladněny v mrazáku při teplotě -20 °C.

3.9 SDS-PAGE, Western blotting, imunodetekce

Elektroforetická skla byla nejprve očištěna 70% ethanolem z důvodu odmaštění a poté byla složena do aparatury pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell. Byl nanesen dělicí gel připravený dle návodu v tabulce 2, který byl následně zalit butanolem a ponechán polymerizovat po dobu zhruba 25 minut. Jakmile gel zpolymerizoval, butanol byl odsán, prostor mezi elektroforetickými skly byl opláchnut 3x destilovanou vodou a osušen filtračními papíry. Na dělicí gel byl nanesen zaostřovací gel (příprava viz Tab. 3), do kterého byl zapuštěn desetijamkový hřebínek. Po zpolymerizování byl gel zalit elektroforetickým pufrem (1x Running) a hřebínek byl vyjmut. Do krajní jamky bylo napipetováno 10 μ l proteinového markeru a do zbylých jamek 15 μ l vzorku. Aparatura byla připojena ke zdroji, byl nastaven proud 40 mA / 2 gely nebo 20 mA / 1 gel. Elektroforetické dělení probíhalo zhruba 90 min, dokud marker nedoputoval na konec dělicího gelu. Po skončení SDS-PAGE byl gel vyjmut z aparatury, zaostřovací gel byl oddělen a vyhozen a dělicí gel, který obsahoval separované proteiny, byl přenesen na nitrocelulosovou membránu.

Blotovací aparatura Panther Owl-HEP1 obsahovala nitrocelulosovou membránu a filtrační papíry namočené v Transfer puffru. Přenos probíhal při proudu 300 mA / 2 gely nebo 150 mA / 1 gel po dobu 120 minut. Po skončení blotování byla membrána omyta 3 x destilovanou vodou, obarvena v roztoku Ponceau po dobu 2 min, opět omyta destilovanou vodou a usušena na filtračním papíře. Membrána byla nařezána dle velikosti sledovaných proteinů a následně odbarvena v roztoku TBS + 0,1% Tween 20 (2 min). K zablokování nespecifických vazeb byly nařezané membrány vloženy do 5% blokovacího roztoku na dobu 1 hodiny a byly ponechány na kývačce při laboratorní teplotě. Po zablokování byly membrány promyty TBS + 0,1% Tween 20 3x po dobu 10 minut.

Na membrány byly nanесeny primární protilátky naředěné dle potřeby v 5% blokovacím roztoku. Inkubace membrán s primárními protilátkami probíhala přes noc při teplotě 4 °C. Následující den byly membrány promyty 3x po dobu 10 minut v roztoku TBS + 0,1% Tween 20. Posléze byly nanесeny sekundární protilátky, které byly naředěny v 5% blokovacím roztoku. Inkubace trvala 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byly membrány opět 3x promyty po dobu 10 minut v TBS + 0,1% Tween 20. Detekce proteinů byly provedena pomocí chemiluminiscence. Chemiluminiscenční činidlo SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate a SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate bylo smícháno v poměru 3:1 a nanесeno na membrány. Signál byl zaznamenán pomocí CCD kamery a pořízené snímky byly následně analyzovány v programu Image Lab™ Software.

Tab. 2: Složení dělicího gelu

	8% (ml)	10% (ml)	12% (ml)
H ₂ O	7,0	5,9	5,0
30% Acrylamid mix	4,0	5,0	6,0
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,8	3,8	3,8
10% SDS	0,15	0,15	0,15
10% APS	0,15	0,15	0,15
TEMED	0,009	0,006	0,006

Tab. 3: Složení zaostřovacího gelu

	5% (ml)
H ₂ O	3,4
30% Acrylamid mix	0,83
0,5 M Tris (pH 8,8)	0,63
10% SDS	0,05
10% APS	0,05
TEMED	0,005

3.10 Imunofluorescenční barvení buněk, focení, analýza

Buňky narostlé na krycím sklíčku byly 2x opláchnuty roztokem 1x PBS a poté fixovány 4% formaldehydem při teplotě 4 °C po dobu 15 minut. Po uplynutí doby byly buňky opět

2x opláchnuty roztokem 1x PBS, následně došlo k permeabilizaci 0,2% roztokem Tritonu X-100 v PBS po dobu 5 minut. Dále byla sklíčka 3x opláchnuta roztokem PBS. Primární protilátka naředěná v ABD médiu byla inkubována s buňkami po dobu jedné hodiny při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubační doby byly vzorky 4x promyty 1x PBS a byla nanesena sekundární protilátka rovněž naředěná dle potřeby v ABD médiu. Inkubace probíhala ve tmě 1 hodinu při laboratorní teplotě. Následně byly buňky 4x promyty pomocí 1x PBS. Byl nanesen roztok Hoechst 33342 (zásobní koncentrace 1 mg/1 μ l, ředění 1000x v PBS) a inkubován 10 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Sklíčka byla následně omyta v destilované vodě a usušena na filtračním papíře. Na podložní mikroskopické sklo byl kápnut Vectashield, následně bylo přiklopeno krycí sklíčko a to tak, aby strana sklíčka obsahující buňky byla v kontaktu s roztokem Vectashield. Takto připravený preparát byl po stranách fixován průhledným lakem na nehty. Po zaschnutí laku byly preparáty pozorovány pod mikroskopem Zeiss Axio Imager A2, následně foceny na mikroskopu Olympus IX81 a analyzovány pomocí programu Olympus ScanR software.

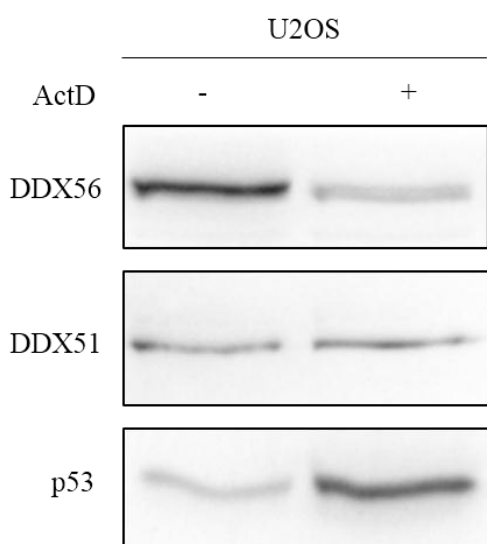
4 VÝSLEDKY

Experimenty probíhaly v Laboratoři integrity genomu na Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období od října 2016 do prosince 2017. Experimenty byly provedeny minimálně ve dvou opakováních.

4.1 Chování proteinu DDX56 v podmínkách ribozomálního stresu

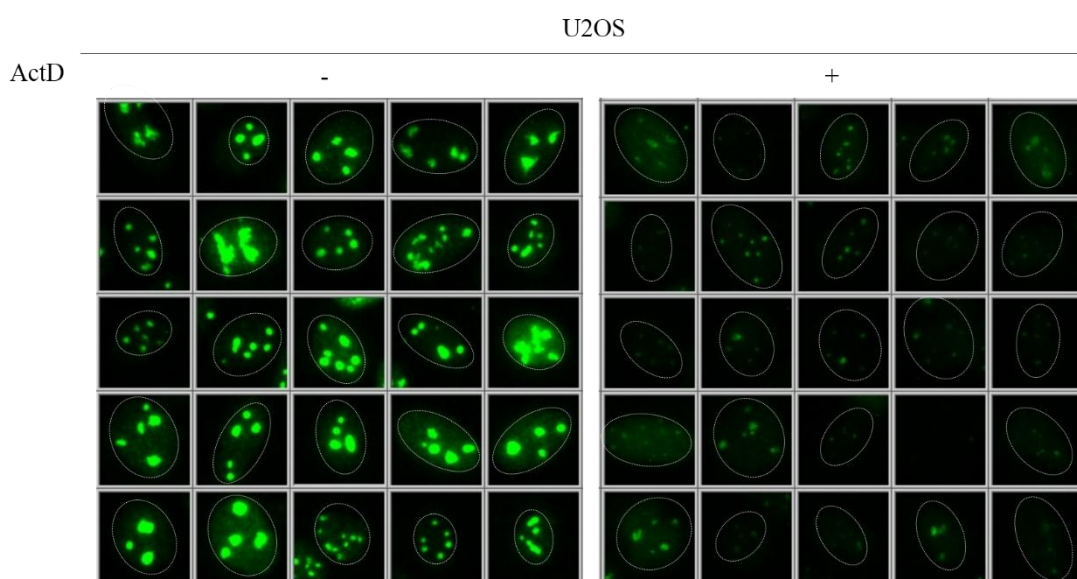
K navození ribozomálního stresu byl použit actinomycin D o různých koncentracích (1 nM, 5 nM a 10 nM) a různé délce časového ovlivnění (3, 6 a 24 hod). Většina experimentů byla provedena na buněčné linii U2OS, při testování různých buněčných linií byly navíc použity linie HeLa, BJ a MRC-5. Analýza proteinů byla provedena pomocí metody western blotting, k objasnění lokalizace proteinů byla použita metoda imunofluorescenčního barvení buněk.

Nejprve byl testován actinomycin D o koncentraci 5 nM a časovém působení 24 hodin. Po navození ribozomálního stresu pomocí ActD vykazoval protein DDX56 pokles hladiny, zatímco u p53 byl detekován nárůst oproti kontrolním neovlivněným buňkám, což můžeme vidět na Obr. 2. Rovněž byla sledována hladina proteinu DDX51, který stejně jako DDX56 patří mezi DEAD-box helikázy. Hladina proteinu DDX51 zůstala beze změny a DDX51 byl v této práci použit jako kontrolní protein.



Obr. 2: Detekce proteinů DDX56, DDX51 (kontrola) a p53 u buněčné linie U2OS bez ovlivnění a po ovlivnění actinomycinem D (5 nM), délka působení 24 hodin.

Pomocí imunofluorescenčního barvení byl protein DDX56 detekován v jádru (na Obr. 3 můžeme vidět jádřka svítící jasně zeleně, což představuje signál proteinu DDX56). Kontrolní buňky U2OS vykazovaly silnou fluorescenci proteinu DDX56 v jádřkách, zatímco u ovlivněných buněk byla pozorována ztráta intenzity fluorescence. Po aplikaci actinomycinu D došlo ke snížení signálu proteinu DDX56. U některých ovlivněných buněk byl ještě zaznamenán jádřkový signál, avšak o mnohem slabší intenzitě než v buňkách kontrolních. Výsledky naznačují, že je protein DDX56 degradován po navození ribozomálního stresu.



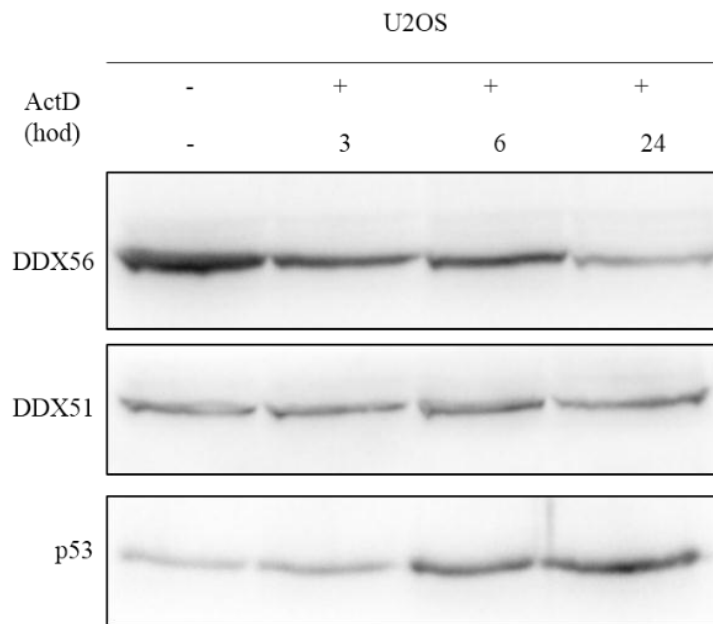
Obr. 3: Detekce proteinu DDX56 u buněk U2OS ovlivněných actinomycinem D (5 nM) po dobu 24 hodin. Oblast jádra ohraničena bílou přerušovanou čarou.

4.1.1 Různé časové ovlivnění actinomycinem D

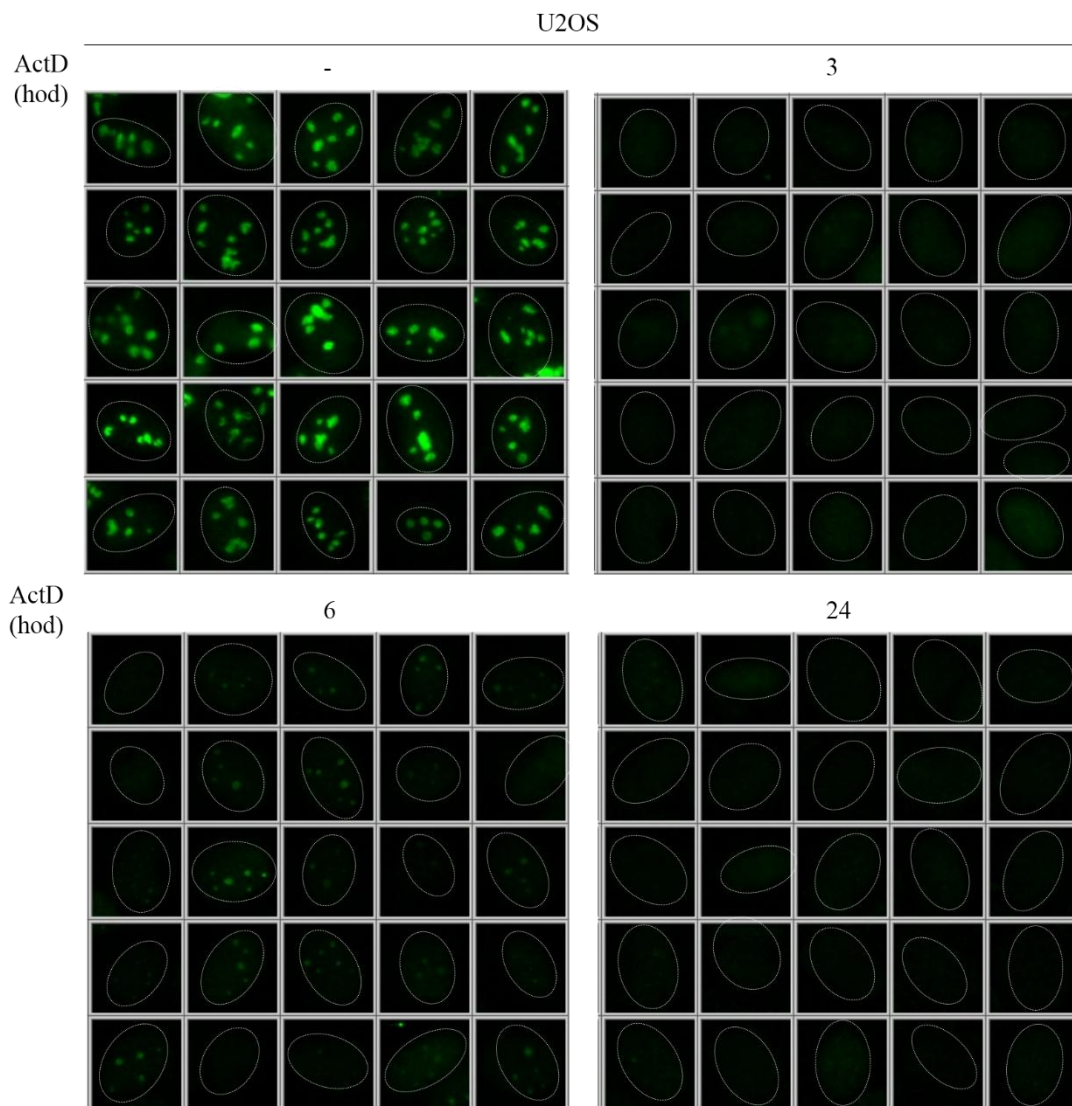
K objasnění, zda má délka ovlivnění actinomycinem D nějaký vliv na hladinu exprese proteinu DDX56 byly buňky ovlivněné po dobu 3, 6 a 24 hodin. Jak je patrné z Obr. 4, oproti kontrolním buňkám byl u ovlivněných buněk zaznamenán pokles hladiny DDX56. Expze DDX56 byla snížena již po 3 hodinách a největší pokles byl detekován po 24 hodinách. Pomocí imunofluorescenčního barvení byl zjištěn pokles intenzity fluorescence DDX56 u všech testovaných časů. Bylo pozorováno výrazné snížení jádřkového signálu proteinu DDX56, což svědčilo o degradaci DDX56, a to již po 3 hodinách od ovlivnění actinomycinem D. U buněk ovlivněných v délce 6 hodin byl ještě detekován slabý signál proteinu DDX56 v jádřkách (Obr. 5). Na základě zjištěných informací můžeme usoudit,

že actinomycin D má vliv na hladinu DDX56 již při testované délce ovlivnění 3 hod., ale hladina p53 byla výrazně zvednuta až při 6 hodinovém působení ActD.

Co se týče proteinu p53 bylo potvrzeno, že se vzrůstajícím působením ActD se zvyšovala hladina p53 (Obr. 4). Z výsledku můžeme potvrdit, že exprese proteinu p53 je závislá na časovém ovlivnění actinomycinem D.



Obr. 4: Detekce proteinů DDX56, DDX51 (kontrola) a p53 u buněčné linie U2OS s různým časovým ovlivněním (3, 6 a 24 hod.) actinomycinu D o koncentraci 5 nM.

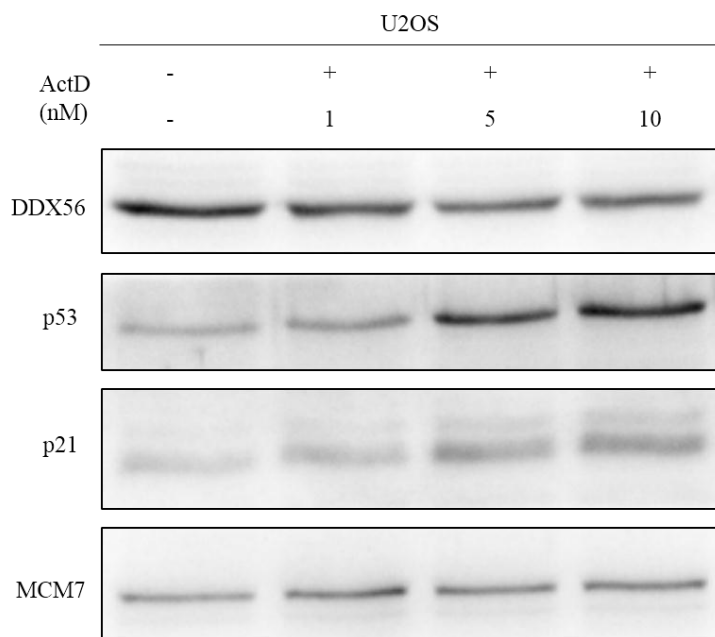


Obr. 5: Různé časové ovlivnění (3, 6 a 24 hod.) actinomycinem D (5 nM) s následnou detekcí proteinu DDX56 u buněk U2OS.

4.1.2 Různé koncentrace actinomycinu D

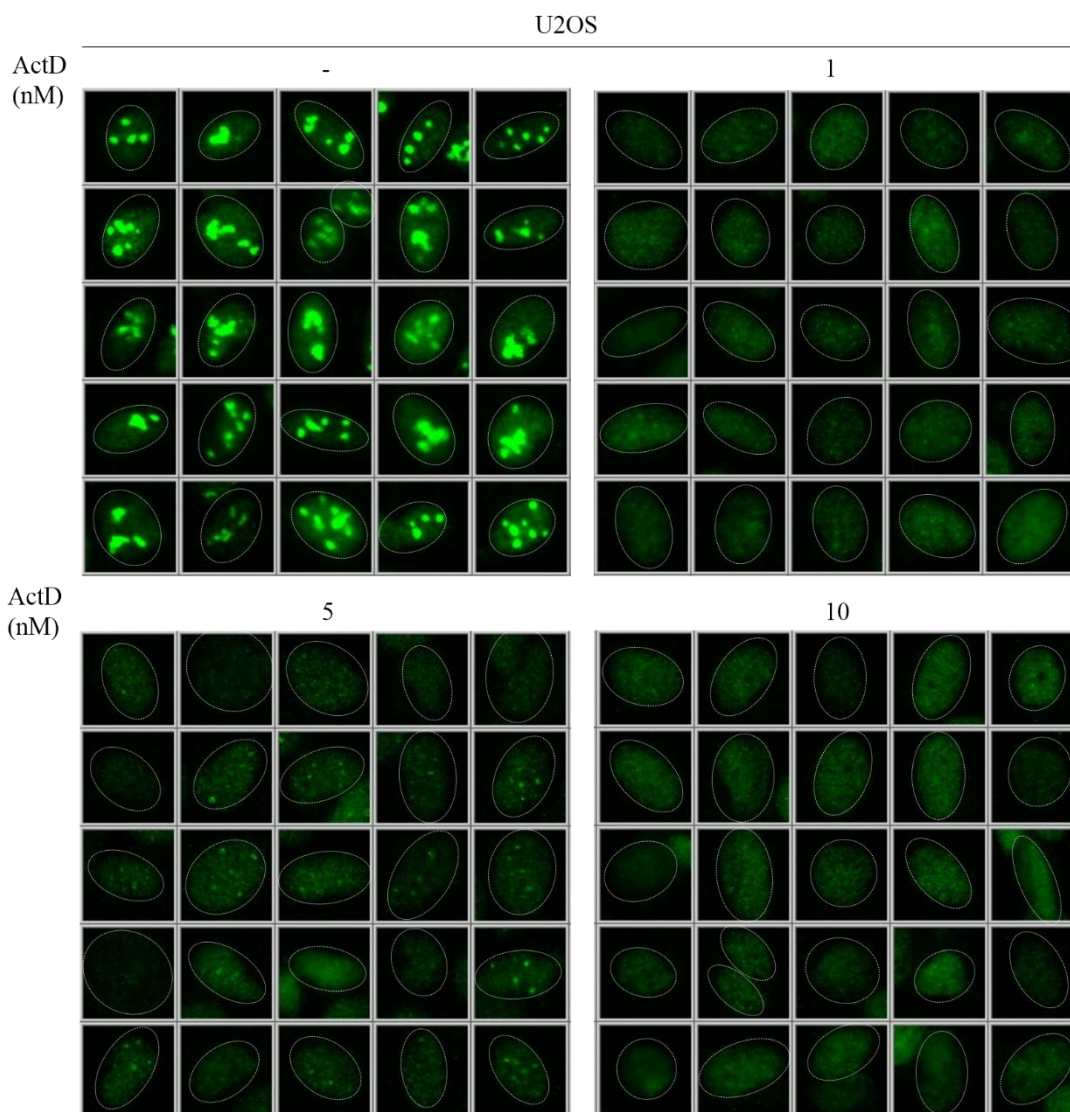
Rovněž byl zkoumán vliv různých koncentrací (1, 5 a 10 nM) actinomycinu D při stejné délce ovlivnění (6 hod.) na hladinu DDX56. Na základě analýzy proteinů pomocí metody western blotting (Obr. 6) bylo pozorováno snížení hladiny proteinu DDX56 v závislosti na ovlivnění pomocí ActD. Bylo zjištěno, že ActD způsobuje degradaci proteinu DDX56 již při testované koncentraci 1 nM.

S rostoucí koncentrací ActD byla zároveň detekována i zvyšující se hladina p53 a p21 v porovnání s proteinem MCM7, který sloužil jako kontrola. Bylo potvrzeno, že exprese proteinu p53 vykazuje závislost na použité koncentraci ActD.



Obr. 6: Detekce proteinů DDX56, p53, p21 a MCM7 (kontrola) u buněk U2OS s různou koncentrací (1, 5 a 10 nM) actinomycinu D, délka působení 6 hodin.

Metodou imunofluorescenčního barvení bylo potvrzeno, že nejmenší testovaná koncentrace 1 nM ActD měla vliv na lokalizaci proteinu DDX56 (Obr. 7). Již při této koncentraci bylo viditelné, že došlo k vylití proteinu DDX56 z jadérek do jádra. Pokles intenzity fluorescence naznačoval degradaci DDX56. Byl pozorován slabý jadérkový signál proteinu DDX56 při koncentraci 5 nM ActD a délce ovlivnění 6 hod., tento signál byl viditelný i při jiném experimentu se stejnou koncentrací a časem ovlivnění (viz Obr. 5). Při koncentraci 10 nM ActD jadérkový signál zaznamenán nebyl, buňky vykazovaly pokles intenzity fluorescence oproti neovlivněným buňkám.

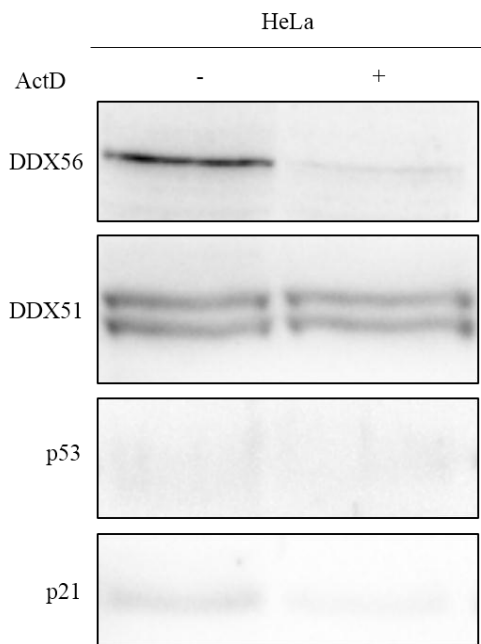


Obr. 7: Různá koncentrace (1, 5 a 10 nM) actinomycinu D s následnou detekcí proteinu DDX56 u buněk U2OS, délka působení ActD 6 hodin.

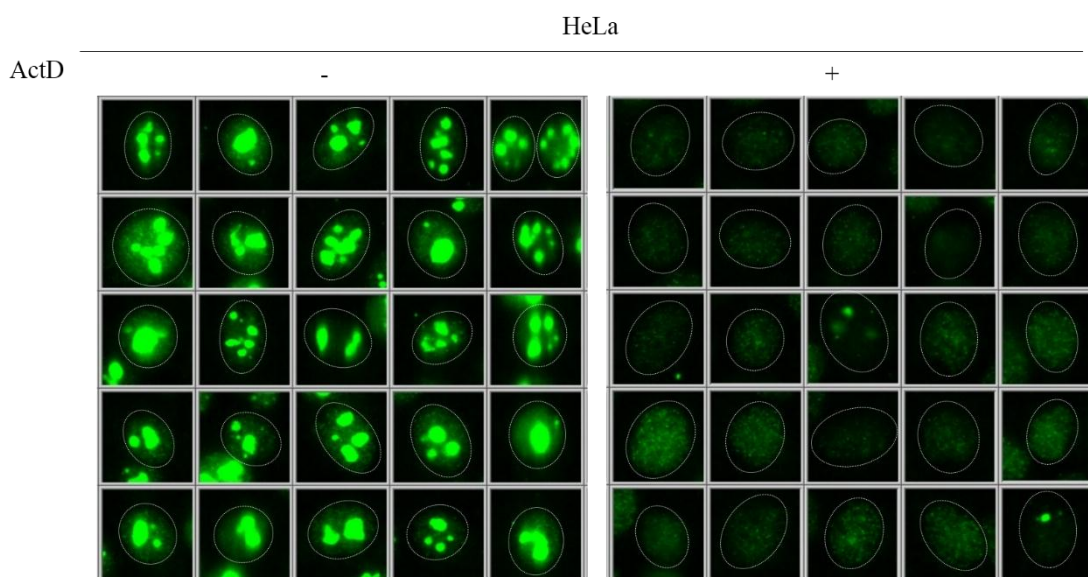
4.1.3 Testování buněčných linií

Ke zjištění, jaké je chování proteinu DDX56 u jiných buněčných linií byly použity linie HeLa, BJ a MRC-5 a buňky byly ovlivněny actinomycinem D o koncentraci 5 nM a délce ovlivnění 24 hodin. Byl zaznamenán pokles hladiny DDX56 u všech testovaných buněčných linií po ovlivnění ActD (Obr. 8, 10 a 12). Pomocí imunofluorescenčního barvení byla u ovlivněných buněk pozorována postupná degradace proteinu DDX56 rovněž u všech testovaných linií (Obr. 9, 11 a 13).

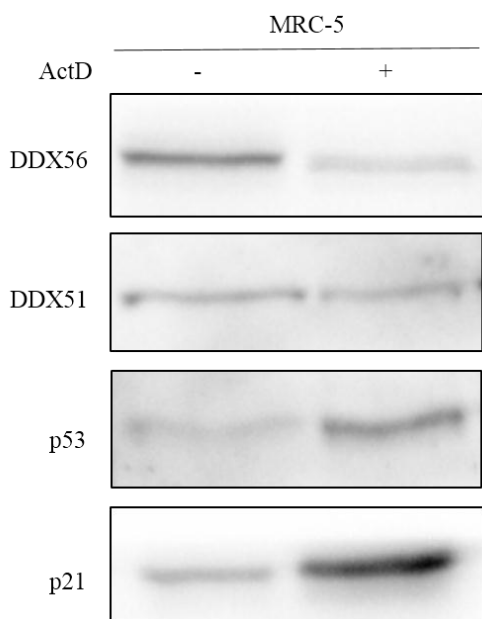
Hladina proteinu p53 a p21 po ovlivnění ActD byla zvýšena u linií BJ a MRC-5, u linie HeLa nebyl protein p53 ani p21 po použití actinomycinu D detekován.



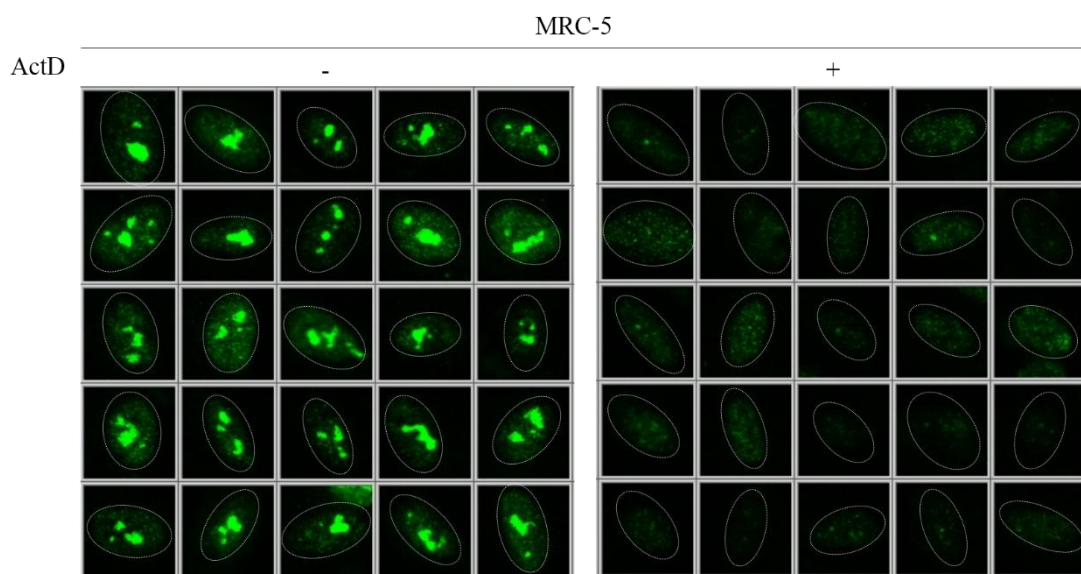
Obr. 8: Detekce proteinů DDX56, DDX51 (kontrola), p53, p21 u buněčné linie HeLa bez ovlivnění a po ovlivnění actinomycinem D o koncentraci 5 nM a délce působení 24 hodin.



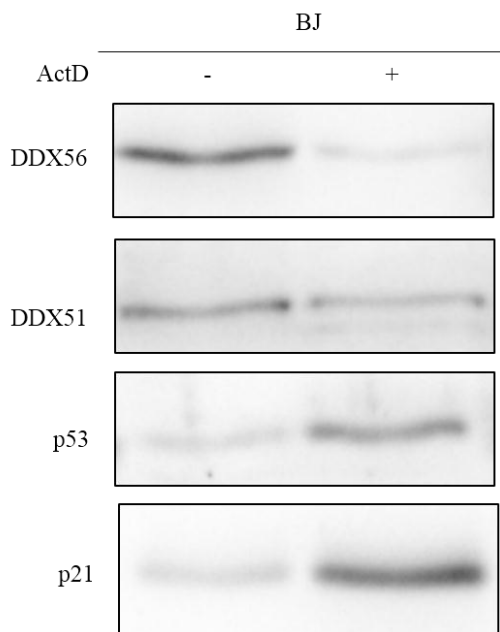
Obr. 9: Detekce proteinu DDX56 u buněk HeLa bez ovlivnění a ovlivněných actinomycinem D (5 nM), délka působení 24 hodin.



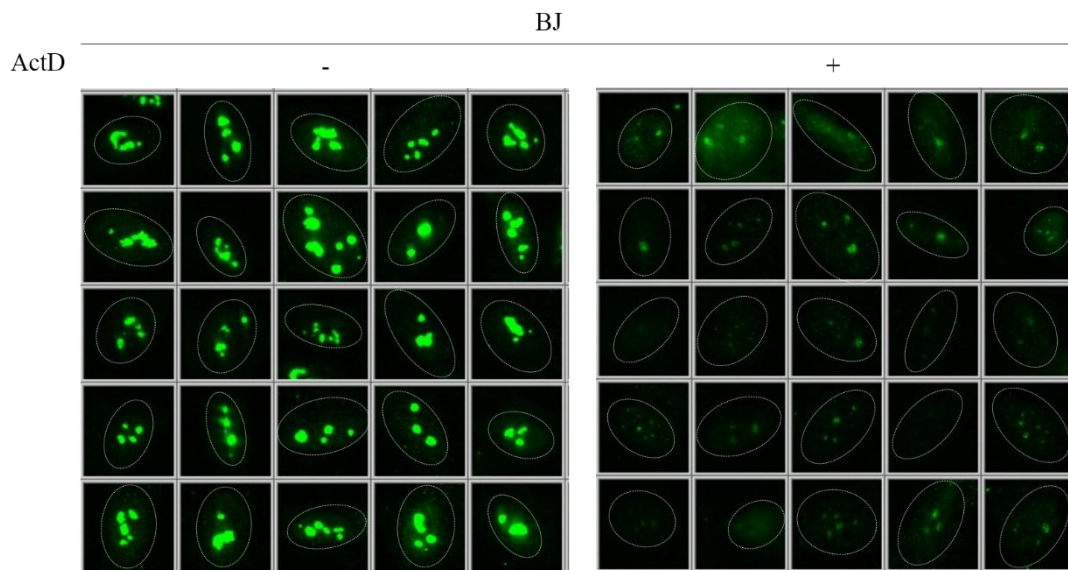
Obr. 10: Detekce proteinů DDX56, DDX51 (kontrola), p53 a p21 u buněčné linie MRC-5 bez ovlivnění a po ovlivnění actinomycinem D o koncentraci 5 nM a délce působení 24 hodin.



Obr. 11: Detekce proteinu DDX56 u buněk MRC-5 bez ovlivnění a po ovlivnění actinomycinem D (5 nM), délka působení 24 hodin.



Obr. 12: Detekce proteinů DDX56, DDX51 (kontrola), p53 a p21 u buněčné linie BJ bez ovlivnění a po ovlivnění actinomycinem D o koncentraci 5 nM a délce působení 24 hodin.



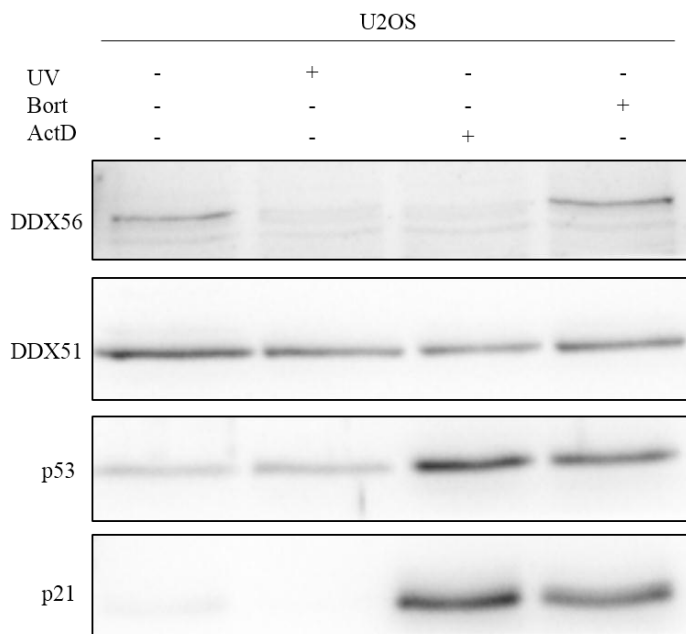
Obr. 13: Detekce proteinu DDX56 u buňek BJ bez ovlivnění a po ovlivnění actinomycinem D (5 nM) (délka působení 24 hod.).

4.2 Chování proteinu DDX56 po navození proteotoxického a genotoxického stresu

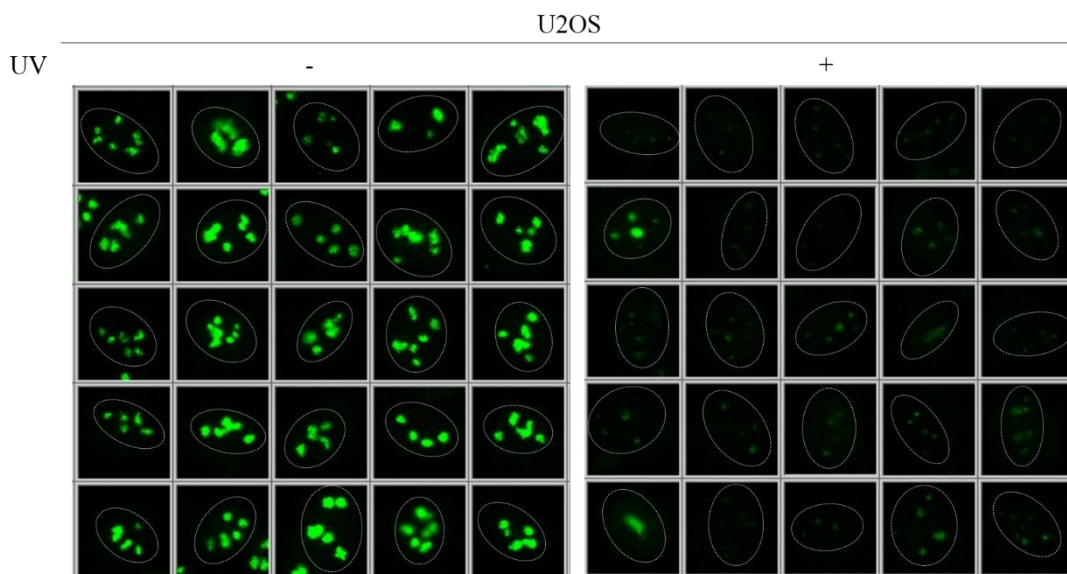
Abychom objasnili chování proteinu DDX56 v různých stresových podmínkách, byly buňky U2OS ovlivněny nejenom actinomycinem D (5 nM), ale také pomocí bortezomibu (2,6 mM), jakožto chemikálie vyvolávající proteotoxický stres. Pro navození silného poškození DNA bylo použito UV záření (50 J/m²). Po ovlivnění pomocí UV bylo detekováno snížení hladiny DDX56, stejně jako v případě ovlivnění actinomycinem D. Toto zjištění naznačuje, že se protein DDX56 degraduje také po aplikaci UV záření. Po ovlivnění bortezomibem, byla exprese DDX56 stejná jako v kontrolních neovlivněných buňkách, hladina DDX56 se neměnila (Obr. 14).

Dále bylo zjištěno zvýšení hladin p53 a p21 po aplikaci ActD i bortezomibu s tím, že po ovlivnění pomocí ActD byla hladina proteinu p53 i p21 zvýšena více než po ovlivnění pomocí bortezomibu. U buněk ovlivněných UV zářením nedošlo k indukci proteinu p21 a exprese p53 byla jen nepatrně zvýšena.

Imunofluorescenční barvení buněk ovlivněných pomocí UV potvrdilo výsledky získané analýzou metodou western blotting. Byl detekován pokles intenzity fluorescence DDX56 svědčící o degradaci proteinu u ovlivněných buněk (Obr. 15).



Obr. 14: Detekce proteinů DDX56, DDX51 (kontrola), p53 a p21 u buněčné linie U2OS bez ovlivnění a po ovlivnění UV (50 J/m²), bortezomibem (2,6 mM), actinomycinem D (5 nM), (délka působení 6 hodin).



Obr. 15: Detekce proteinu DDX56 u buněk U2OS bez ovlivnění a po ovlivnění UV (50 J/m^2), délka působení 6 hodin.

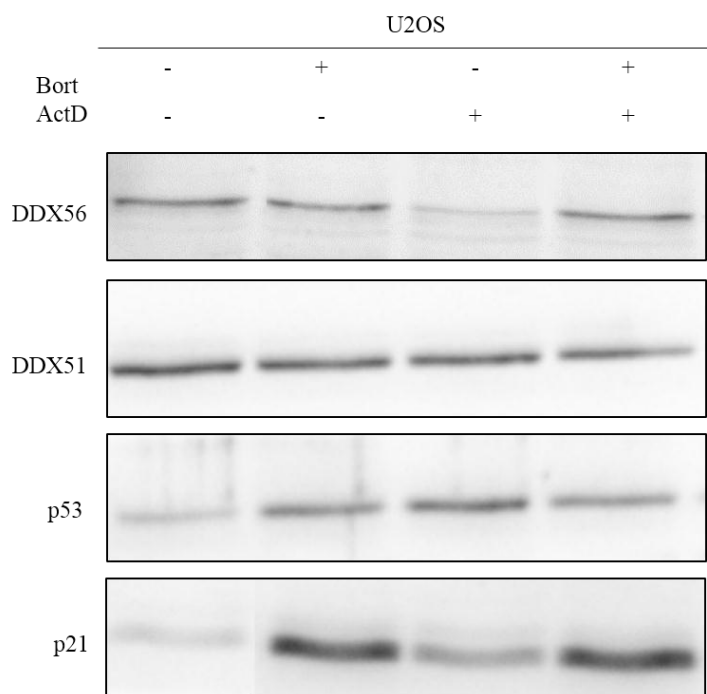
4.3 Mechanismus destabilizace proteinu DDX56

Na základě výsledků, které byly získány po ovlivnění buněk bortezomibem (viz Obr. 14) byla vyslovena hypotéza, že by redukce hladiny proteinu DDX56 mohla být důsledkem degradace v proteasomu. K objasnění této otázky byly na buněčné linii U2OS použity látky zabraňující degradaci v proteasomu, a to inhibitor proteasomu bortezomib a inhibitor ubiquitin E1 enzymu MLN7243.

Nejprve bylo provedeno ovlivnění buněk actinomycinem D (5 nM), bortezomibem (2,6 mM) a ActD současně s bortezomibem (Obr. 16). Pokles hladiny DDX56 se projevil pouze u buněk ovlivněných ActD. Buňky ovlivněné bortezomibem, ale i současně bortezomibem a ActD vykazovaly stejnou hladinu exprese jako buňky kontrolní. Na druhou stranu u všech ovlivněných buněk se projevilo zvýšení hladiny p53 a p21.

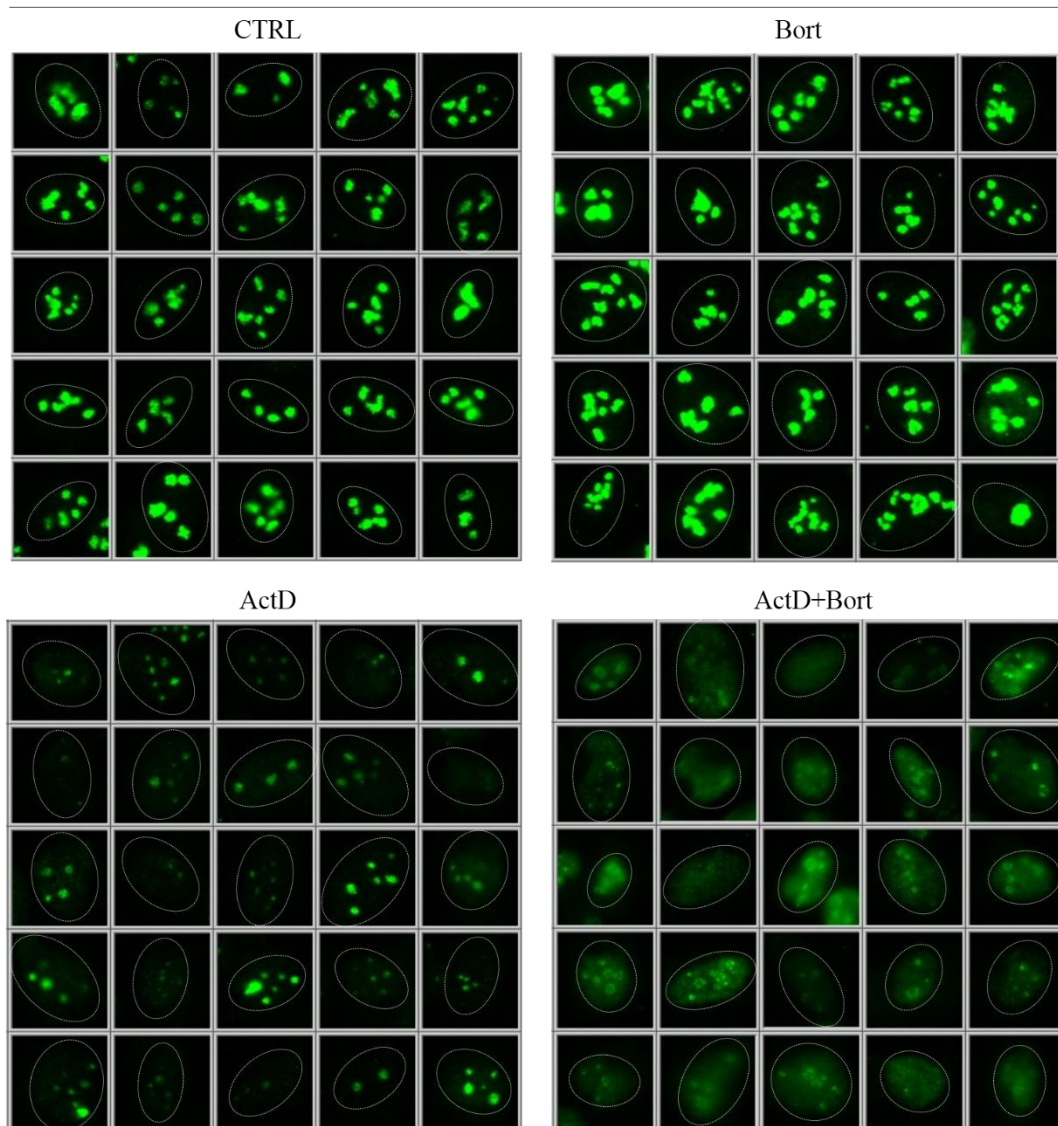
Dále byl proveden experiment, kdy došlo k ovlivnění actinomycinem D (5 nM), MLN7243 (5 mM) a současně ActD a MLN7243 (Obr. 18). Byly získány téměř totožné výsledky jako při experimentu s bortezomibem. Pokles hladiny DDX56 byl pozorován pouze u buněk ovlivněných ActD. U buněk, které byly ovlivněné MLN7243 nebo kombinací MLN7243 a ActD byla pozorována stejná hladina proteinu DDX56 jako u buněk neovlivněných. Hladiny proteinů p53 a p21 byly u ovlivněných buněk zvýšeny.

Získané výsledky naznačují, že protein DDX56 je pravděpodobně degradován cestou přes proteasom. Bylo prokázáno, že kombinace bortezomibu a actinomycinu D nebo kombinace MLN7243 a actinomycinu D zabraňuje proteasomální degradaci.

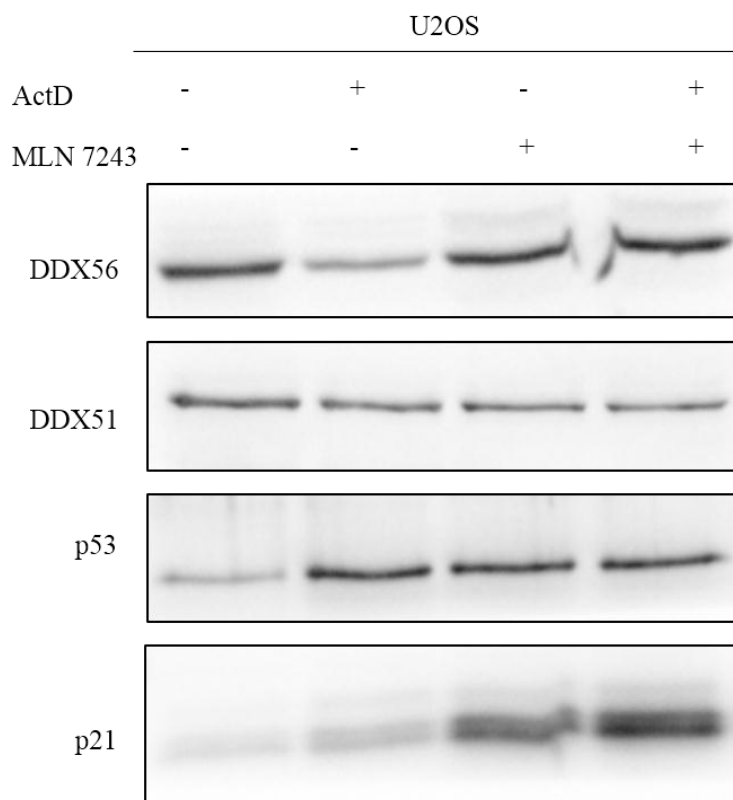


Obr. 16: Detekce proteinů DDX56, DDX51, p53, p21 a MCM7 (kontrola) u buněčné linie U2OS bez ovlivnění a po ovlivnění bortezomibem (2,6 mM), actinomycinem D (5 nM) a actinomycinem D a bortezomibem současně (délka působení 6 hod.).

Co se týče imunofluorescenčního barvení (Obr. 17) vykazovaly buňky ovlivněné bortezomibem silnou intenzitu fluorescence DDX56 v jadérkách. Při ovlivnění pomocí actinomycinu D byl detekován pokles intenzity fluorescence. U některých buněk byl ještě pozorován signál v jadérkách, avšak tento signál byl mnohem menší intenzity než u kontrolních buněk. U buněk, které byly ovlivněny současně ActD a bortezomibem, došlo k částečnému vylití proteinu DDX56 z jadérek do jádra. Jadérkový signál byl menší intenzity vzhledem ke kontrolním buňkám. Také byla zaznamenána akumulace proteinu DDX56 v jádře, jelikož bylo pomocí bortezomibu zabráněno degradaci v proteasomu.



Obr. 17: Detekce proteinu DDX56 u buňek U2OS po ovlivnění borteomibem (2,6 mM), actinomycinem D (5 nM) a borteomibem a actinomycinem D současně v porovnání s kontrolními buňkami (CTRL), (délka působení 6 hod.).

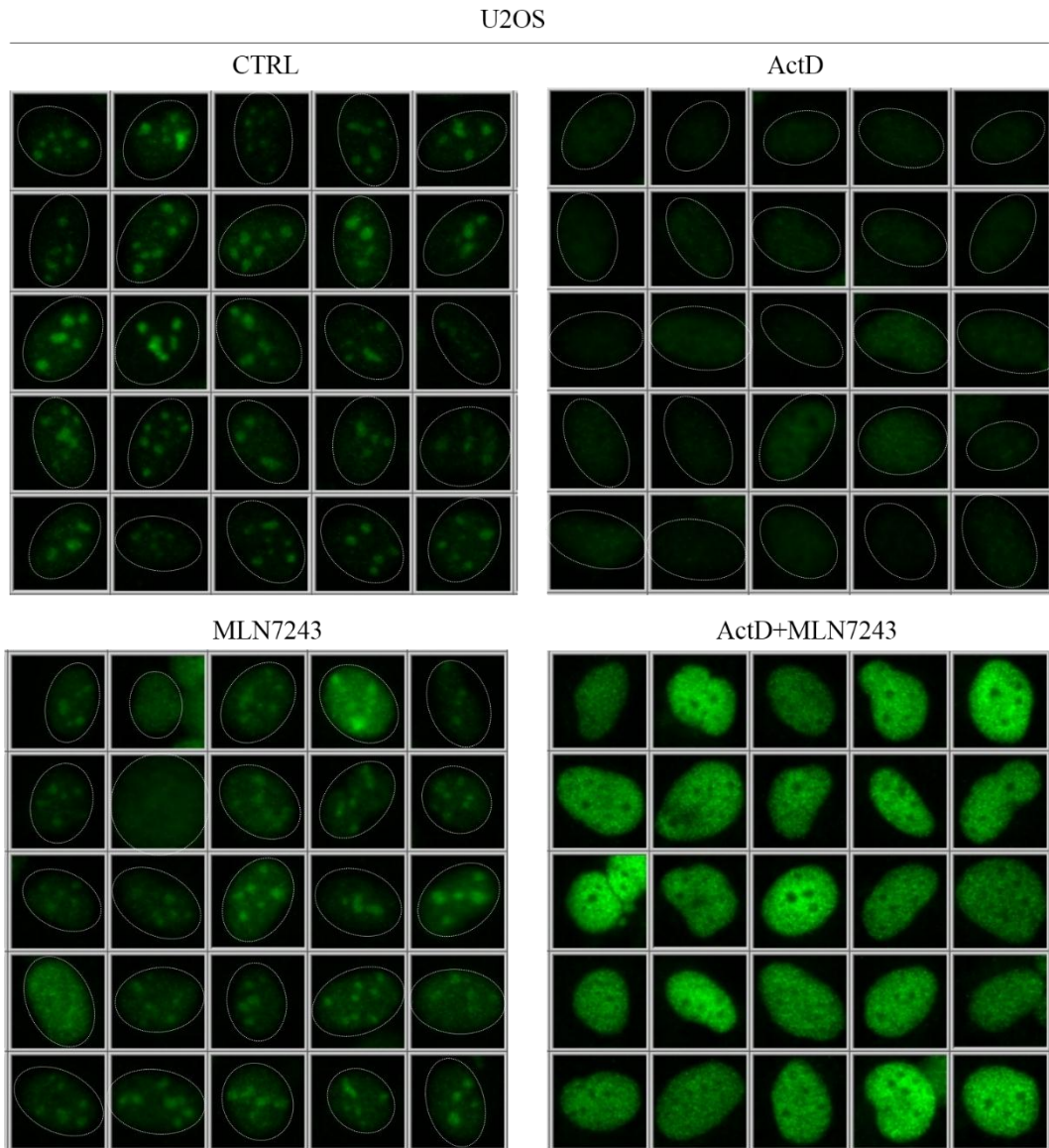


Obr. 18: Detekce proteinu DDX56, DDX51, p53, p21 a RAD51 (kontrola) u buněk U2OS po ovlivnění actinomycinem D (5 nM), MLN7243 (5 mM) a ActD současně s MLN7243, délka působení 6 hod.

U buněk, u kterých byl aplikován MLN7243 došlo k částečnému vylití DDX56 z jadérek do jádra, ale současně byl stále detekován signál v jadéřkách a protein DDX56 nebyl degradován (Obr. 19). Buňky ovlivněné actinomycinem D vykazovaly oproti kontrolním buňkám pokles intenzity fluorescence, jadéřkový signál nebyl přítomen. U buněk ovlivněných zároveň ActD i MLN7243 bylo zaznamenáno vylití DDX56 z jadérek do jádra. Jádra vykazovala silnou intenzitu fluorescence což svědčilo o tom, že byla ubiquitinace DDX56 a potažmo jeho proteasomální degradace inhibována. Na základě zjištěných informací můžeme usoudit, že inhibicí ubiquitinace se zabrání degradaci proteinu DDX56 po navození ribozomálního stresu actinomycinem D.

Na základě imunofluorescenčního barvení byly zaznamenány jisté odlišnosti u buněk ovlivněných pomocí MLN7243 oproti buňkám ovlivněným bortezomibem (srovnání Obr. 17 a 19). Buňky ovlivněné bortezomibem vykazovaly silný jadéřkový signál, kdežto u buněk ovlivněných MLN7243 bylo zaznamenáno kromě jadéřkového signálu také částečné vylití DDX56 z jadérka do jádra. Dále u buněk ovlivněných současně

actinomycinem D a MLN7243 došlo k vylití DDX56 z jadérek do jádra, ale u buněk ovlivněných současně ActD a bortezumibem bylo zaznamenáno pouze částečné vylití DDX56 z jadérek do jádra, stále byl detekován jadérkový signál.

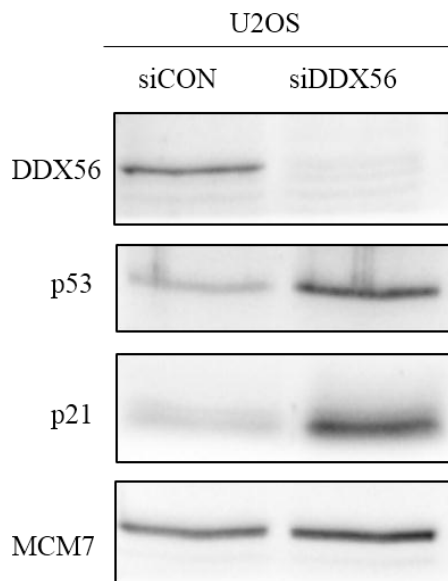


Obr. 19: Detekce proteinu DDX56 u buněk U2OS po ovlivnění actinomycinem D (5 nM), MLN7243 (5 mM) a současně actinomycinem D s MLN7243, délka působení 6 hod.

4.4 Down-regulace proteinu DDX56

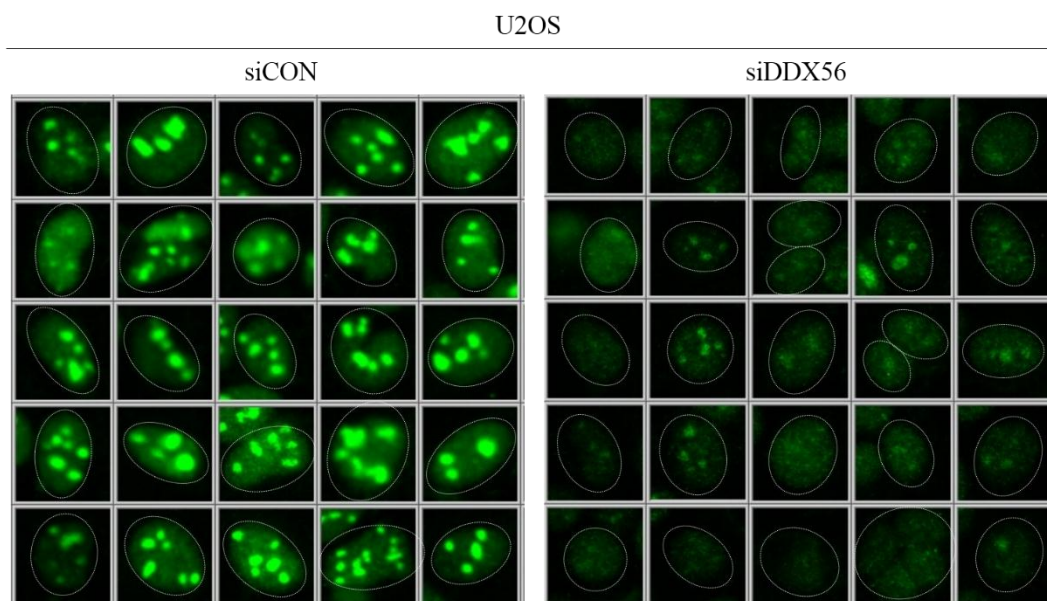
Pro studium efektů utlumení genové exprese DDX56 na biogenezi ribozomů bylo využito metody RNA interference. Po aplikaci siDDX56 došlo k výraznému poklesu hladiny DDX56 oproti kontrolním buňkám. Umlčení proteinu DDX56 tedy bylo úspěšné. U buněk transfekovaných pomocí siDDX56 se projevil vzestup hladiny p53 a p21 (Obr. 20).

Z výsledků předpokládáme, že zvýšení hladiny p53 by mohlo být důsledkem ribozomálního stresu způsobeného umlčením exprese DDX56.

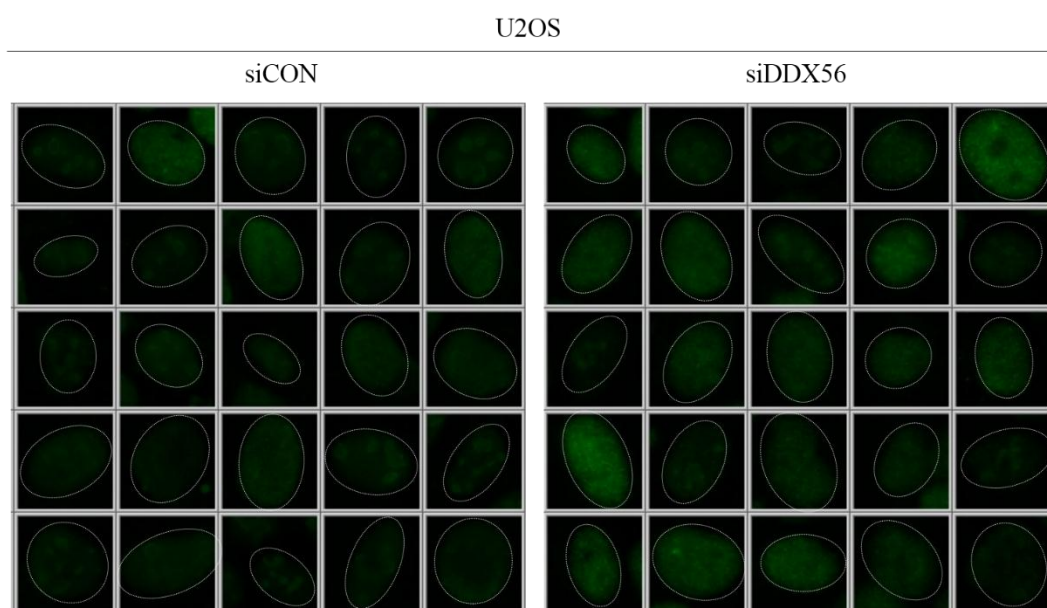


Obr. 20: Detekce proteinů DDX56, p53, p21 a MCM7 (kontrola) u buněčné linie U2OS po siRNA transfekci.

Výsledky získané metodou western blotting byly potvrzeny imunofluorescenčním barvením. Byl detekován pokles intenzity fluorescence proteinu DDX56 u buněk transfekovaných siDDX56, což svědčilo o utlumení exprese DDX56 (Obr. 21). Dále byl potvrzen vliv transfekce siDDX56 na hladinu p53. Byl zaznamenán nárůst intenzity fluorescence p53 u buněk, které byly ovlivněny siDDX56 (Obr. 22).

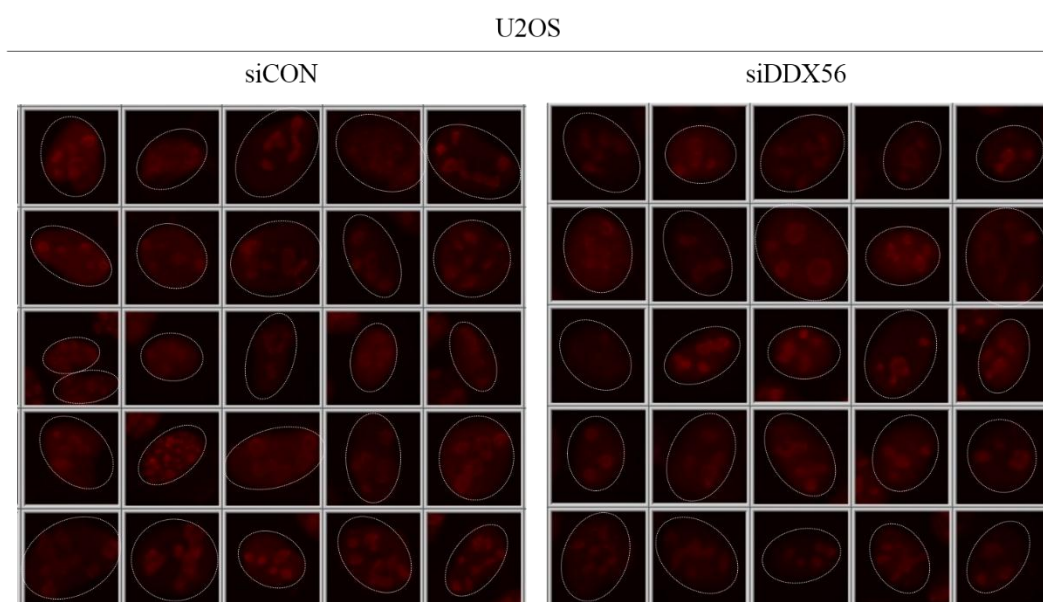


Obr. 21: Detekce proteinu DDX56 u buňek U2OS po siRNA transfekci.

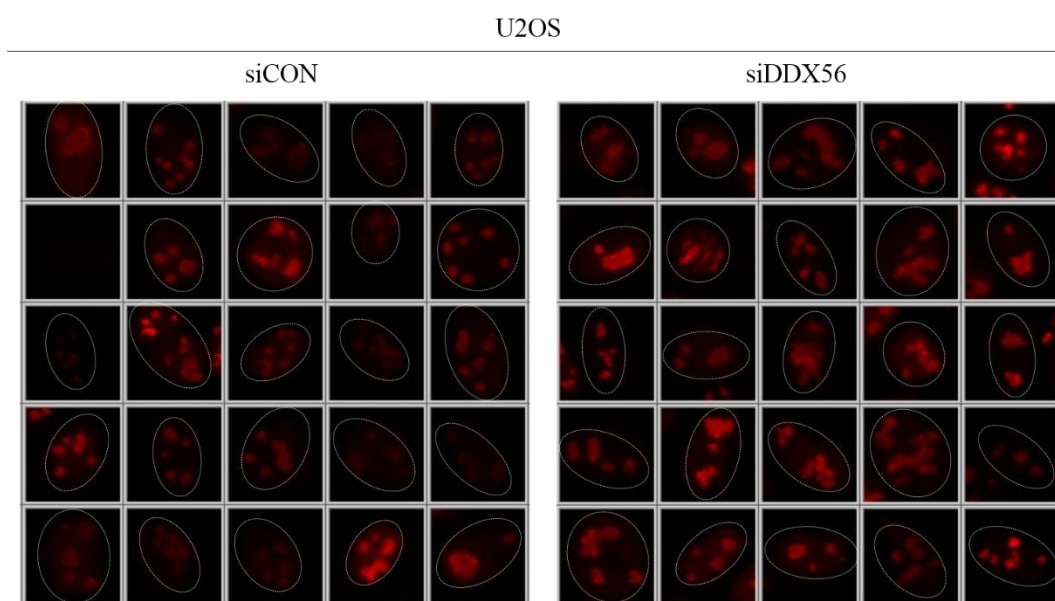


Obr. 22: Detekce proteinu p53 u buňek U2OS po siRNA transfekci.

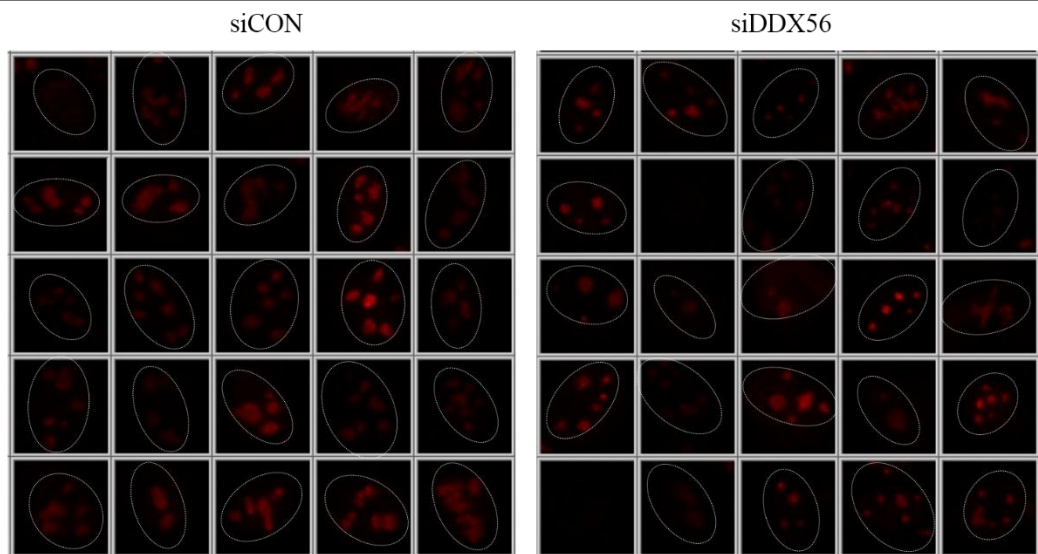
Dále byly detekovány proteiny nucleophosmin (NPM), nucleolin (NCL) a nucleostemin (NS) u kontrolních buněk a buněk transfekovaných siDDX56 (Obr. 21, 22 a 23). Vylití těchto proteinů z jader do cytoplazmy se považuje za markery ribozomálního stresu. Pomocí imunofluorescenčního barvení byly proteiny NCL a NS detekovány v jadrách. Signál proteinu NPM byl zaznamenán nejenom v jadrách, částečně byl NPM detekován také v jádře. Porovnáním buněk siCON a siDDX56 nebyly pozorovány rozdíly v lokalizaci ani v hladinách exprese proteinů.



Obr. 23: Detekce proteinu NPM u buněčné linie U2OS po siRNA transfekci.

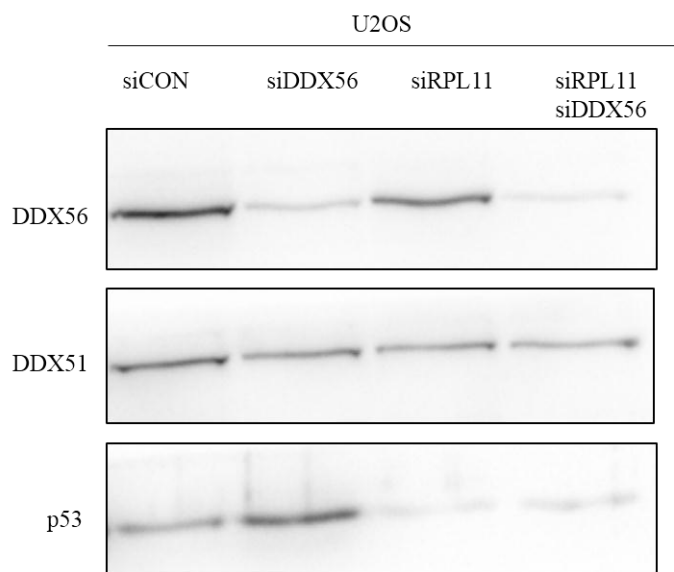


Obr. 24: Detekce proteinu NCL u buněk U2OS po siRNA transfekci.



Obr. 25: Detekce proteinu NS u buněčné linie U2OS po siRNA transfekci.

Abychom objasnili, zda je zvýšení exprese proteinu p53 po siDDX56 aktivováno drahou závislou na RPL11, bylo provedeno ovlivnění nejenom pomocí siDDX56, ale také pomocí siRPL11. U buněk transfekovaných DDX56 siRNA bylo zaznamenáno zvýšení hladiny proteinu p53. Po ovlivnění pomocí siRPL11 došlo k poklesu p53 a v buňkách transfekovaných kombinací siRPL11 a siDDX56 došlo také k výraznému poklesu hladiny p53 (Obr. 26). Můžeme tedy usoudit, že ribozomální protein L11 je nezbytný k akumulaci p53 po siDDX56. Také bylo zjištěno, že na hladinu proteinu DDX56 má vliv i transfekce siRPL11 (Obr. 26). Domníváme se, že knock-down RPL11 způsobí ribozomální stres s následnou destabilizací DDX56.



Obr. 26: Detekce proteinů DDX56, DDX51 (kontrola) a p53 u buněčné linie U2OS po siRNA transfekci.

5 DISKUZE

5.1 Vliv ribozomálního stresu na protein DDX56 a aktivaci p53

O proteinu DDX56 bylo celkově zjištěno relativně málo informací a co se týče vztahu DDX56 k ribozomálnímu stresu jeví se tato oblast jako neprobádaná. Zirwes a kol. (2000) lokalizovali protein DDX56 na základě imunofluorescence v jadérku, a to u buněčných linií HeLa, BMGE1H, RV a A6. Na základě námi provedených experimentů v rámci této diplomové práce byl protein DDX56 rovněž lokalizován v jadérku u neovlivněných buněk. Jednalo se o buněčné linie HeLa, U2OS, BJ a MRC-5.

Po ovlivnění buněk pomocí actinomycinu D (5 nM, 24 hod.) došlo k poklesu intenzity fluorescence proteinu DDX56 oproti kontrolním buňkám. Na základě výsledků z analýzy pomocí western blotu a z imunofluorescenční analýzy bylo naznačeno, že by protein DDX56 mohl být degradován po navození ribozomálního stresu.

Při testování různého časového ovlivnění bylo zjištěno, že aplikovaná doba ovlivnění 3 hod. při koncentraci actinomycinu D 5 nM byla dostatečná k navození stresových podmínek a k poklesu hladiny DDX56. Zároveň se ukázalo, že ActD způsobuje degradaci proteinu DDX56 již při testované koncentraci 1 nM a délce ovlivnění 6 hodin. Při plánování dalších experimentů by bylo vhodné vzít tyto výsledky v úvahu a objasnit odpověď proteinu DDX56 na ribozomální stres při délce ovlivnění 3 hod. a současně při koncentraci 1 nM ActD.

Dále bylo při testování různých koncentrací ActD zjištěno, že již testovaná koncentrace 1 nM ActD (působení 6 hod.) měla vliv na lokalizaci proteinu DDX56. Bylo viditelné, že došlo k vylití proteinu DDX56 z jadérek do jádra. Podobný experiment byl proveden Zirwesem a kol. (2000). Byl použit ActD o koncentraci 5 µg/ml, doba působení činila 4 hodiny. U buněčné linie A6 bylo detekováno uvolnění proteinu DDX56 z jadérek do nukleoplazmy, což je v souladu s námi zjištěnými výsledky.

Je známo, že nízké dávky actinomycinu D indukují aktivitu p53 (Choong a kol., 2009). Rovněž bylo ukázáno, že exprese a fosforylace proteinu p53 je závislá na dávce, ale i časovém ovlivnění actinomycinem D. V dávkových studiích bylo dosaženo maximální hodnoty exprese p53 při ošetření ActD o koncentraci 10 nM a délce působení 24 hodin u buněčných linií 293 a 293T. U buněčné linie HepG2 se jednalo o koncentraci ActD 10 nM a ovlivnění 6 hodin (Chen a kol., 2014). Velmi podobných výsledků bylo dosaženo v našich experimentech, kdy byla zaznamenána nejvyšší hladina exprese p53 při použití

10 nM actinomycinu D a délce ovlivnění 6 hod, avšak experimenty byly provedeny na buněčné linii U2OS.

Zvýšení exprese p53 po ovlivnění actinomycinem D bylo detekováno nejenom u linie U2OS, ale také u linie BJ a MRC-5. U buněčné linie HeLa nebyl protein p53 detekován. U HeLa buněk je zaznamenána pouze velmi nízká exprese p53, a to z důvodu vazby vysoce rizikového E6 proteinu lidského papilomaviru (HPV) na E6-asociovaný protein (E6-AP). Díky vazbě HPV E6 na E6-AP, což je buněčná ubiquitin proteinová ligáza, je umožněna ubiquitinace p53, což vede k následné degradaci p53 (Wei, 2005).

5.2 Navození proteotoxického a genotoxického stresu

Navozením stresových podmínek pomocí UV záření byly získány podobné výsledky jako v případě actinomycinu D, byl detekován pokles hladiny proteinu DDX56. Bylo prokázáno, že ultrafialové záření způsobuje genotoxický stres, může však dojít i k indukci ribozomálního stresu (Brumbaugh a kol., 2004; Wurtmann a Wolin, 2009). Po ovlivnění bortezomibem, o kterém je známo, že způsobuje proteotoxický stres (Neznanov a kol., 2011), byla zaznamenána stejná exprese DDX56 jako v kontrolních neovlivněných buňkách. Bortezomib má za následek inhibici proteasomu (Groll a kol., 2006) a jelikož jsme nezaznamenali pokles hladiny DDX56 jako tomu bylo v případě ovlivnění pomocí UV a ActD, vedlo toto zjištění k hypotéze, že protein DDX56 může být degradován cestou závislou na proteasomu.

Po aplikaci actinomycinu D nebo bortezomibu došlo ke zvýšení hladiny p53 a p21, avšak u buněk ovlivněných UV zářením k indukci p21 nedošlo. Naše výsledky jsou v souladu se zjištěním, které publikoval Lee a kol. (2006). Bylo ukázáno, že hladina p21 je redukována v závislosti na dávce UV záření. Bylo naznačeno, že vyšší dávky vedou k účinnější degradaci p21. Dávky vyšší než 80 J/m^2 měly za následek téměř úplnou degradaci proteinu p21 u většiny testovaných buněčných linií. Konkrétně u linie U2OS byl zaznamenán pokles hladiny p21 již při dávce 40 J/m^2 , což odpovídá našim experimentům, kdy při dávce 50 J/m^2 jsme nezaznamenali indukci p21. Zjištění, že protein p21 je degradován po ošetření UV zářením publikoval i Nishitani a kol. (2008). V této studii byla použita dávka 20 J/m^2 , a to na buněčné lini HeLa. Co se týče mechanismu degradace proteinu p21 byla identifikována ubiquitin ligáza CRL4^{CDT2} (CUL4-DDB1-CDT2), která se podílí na UV-indukované degradaci p21. Předpokladem proteolýzy řízené pomocí

CRL4^{CDT2} je interakce p21 s PCNA. Bylo zjištěno, že degradace p21 byla inhibována, pokud došlo k umlčení PCNA nebo CUL4A (Nishitani a kol., 2008).

5.3 Mechanismus destabilizace DDX56

K objasnění mechanismu destabilizace proteinu DDX56 byly použity látky zabraňující degradaci proteinu v proteasomu: bortezomib a MLN7243. Použitím bortezomibu nebo MLN7243 byly pomocí metody western blotting získány téměř totožné výsledky. U buněk ovlivněných bortezomibem, a současně bortezomibem a ActD, nebo MLN7243 a současně pomocí MLN7243 a ActD byla zaznamenána stejná hladina DDX56 jako u buněk kontrolních. Z provedených experimentů bylo prokázáno, že redukce hladiny proteinu DDX56 je důsledkem degradace v proteasomu.

Metodou imunofluorescenčního barvení byly zjištěny rozdíly v intenzitě fluorescence a lokalizaci proteinu DDX56 u buněk ovlivněných současně bortezomibem a ActD nebo MLN7243 a ActD. Domníváme se, že by zjištěné odlišnosti mohly být dány rozdílným mechanismem účinku bortezomibu a MLN7243 při inhibici proteasomální degradace. Látka MLN7243 je malý molekulový inhibitor, u kterého byla prokázána vazba na ubiquitin aktivující enzym (UAE, též známý jako E1). Prostřednictvím tvorby aduktu MLN7243-ubiquitin je dosaženo inhibice UAE, což má za následek zabránění jak ubiquitinace proteinů, tak i následné proteasomální degradace. (Milhollen a kol., 2014). Bortezomib je dipeptid kyseliny borité, který inhibuje aktivaci $\beta 1$ a $\beta 5$ podjednotek jádra 20S proteasomu v proteasomovém komplexu 26S (Ri, 2016).

U všech ovlivněných buněk (po aplikaci bortezomibu, ActD nebo MLN7243) bylo zároveň zaznamenáno zvýšení exprese p53 a p21. Zvýšení hladin p53 a p21 po ovlivnění pomocí MLN7243 bylo zaznamenáno také Zhuangem a kol. (2016), a to na buněčných myelomových liniích MM1.S a MOLP-8. Rovněž byla zjištěna zvýšená hladina p53 po ovlivnění bortezomibem (500 nM) u buněk U2OS a u buněčné linie MCF7 (bortezomib o koncentraci 50 a 100 nM) (Halasi a kol., 2014).

5.4 Umlčení proteinu DDX56

Jadérko je považováno za důležitý stresový sensor. Velké množství vnějších i vnitřních stimulů může vyvolat nukleolární stres narušením jadéřkové struktury, což má za následek translokaci několika proteinů z jadérka do nukleoplazmy, včetně proteinů nucleophosminu (NPM), nucleosteminu (NS) a nucleolinu (NCL) (Katagiri a kol., 2015). Právě translokace

NPM z jáderka do nukleoplazmy je považována za charakteristický znak nukleolárního stresu (Yao a kol., 2010). Bylo zjištěno, že ovlivnění actinomycinem D, který vyvolává ribozomální stres, způsobí disociaci proteinu NPM z jáderka do nukleoplazmy (Chan a kol., 1999). Podobných výsledků bylo dosaženo i u proteinu NCL, kdy po ovlivnění adriamycinem nebo actinomycinem D došlo k translokaci NCL z jáderka do nukleoplazmy (Katagiri a kol., 2015). K objasnění míry stresové zátěže siRNA transfekce byla provedena detekce proteinů NPM, NS a NCL.

Metodou RNA interference pomocí siDDX56 došlo k umlčení proteinu DDX56. Pomocí imunofluorescenčního barvení byl u buněk ovlivněných siDDX56 detekován pokles intenzity fluorescence DDX56, což potvrdilo utlumení exprese DDX56. Jelikož má protein DDX56 převážně jádřkovou lokalizaci (Zirwes a kol., 2000; tato práce – viz Obr. 3), předpokládali jsme, že jeho vyřazení by mohlo způsobit ribozomální stres a translokaci proteinů NPM, NS a NCL z jáderka do nukleoplazmy. Porovnáním buněk transfekovaných siCON a siDDX56 však nebyly pozorovány žádné výraznější rozdíly v lokalizaci zmíněných proteinů. Translokace z jáderka do jádra se neprojevila. Zároveň ale došlo po siDDX56 k vzestupu hladiny proteinů p53 a p21. Na základě předložených výsledků nevylučujeme, že by vyřazení proteinu DDX56 mohlo vyvolat ribozomální stres, ale tento stres pravděpodobně není dostatečný k vyvolání translokace studovaných proteinů NPM, NS a NCL. Naše výsledky jsou v souladu se studií, kterou provedli Llanos a Serrano (2010). Po depleci RPL37 zaznamenali indukci p53 a p21, ale bez nukleolárního narušení. Sledovali protein NPM, kdy bylo zjištěno, že translokace z jáderka do jádra se neprojevila. K podobným závěrům dospěli také Fumagalli a kol. (2009), kteří zjistili, že také deplece RPS6 vedla k indukci proteinů p53 a p21, avšak bez nukleolárního narušení. Po transfekci siRPS6 byl protein NCL detekován pouze v jádřkách, translokace NCL z jáderka do nukleoplazmy nebyla zaznamenána. Fumagalli a kol. (2009) na základě zjištěných výsledků předpověděli, že nukleolární narušení není předpokladem indukce proteinu p53 po inhibici ribozomální biosyntézy.

Dále bylo pomocí transfekce siRPL11 zjištěno snížení hladiny DDX56 oproti kontrolním buňkám. Ze získaných výsledků předpokládáme, že by transfekce siRPL11 mohla způsobit ribozomální stres vedoucí k částečné degradaci proteinu DDX56, podobně jako při ovlivnění actinomycinem D.

Bylo zjištěno, že ribozomální protein L11 hraje v regulaci p53 důležitou úlohu a je nezbytný k akumulaci proteinu p53 (Bursac a kol., 2012). Dále bylo ukázáno, že redukce

RPL11 pomocí siRNA vedla ke snížení hladiny p53 (Sun a kol., 2010; Goudarzi a kol., 2014). Bursac a kol. (2012) uvádí, že down-regulace ribozomálního proteinu L11 inhibovala indukci proteinu p53 při ribozomálním stresu. Naše výsledky, kdy jsme zjistili, že u buněk transfekovaných siRPL11 došlo k umlčení p53, jsou ve shodě s výše uvedenými informacemi. Po transfekci pomocí siDDX56 se projevila zvýšená hladina p53, ale při ovlivnění pomocí siDDX56 a zároveň siRPL11 hladina p53 výrazně poklesla. Tento výsledek naznačuje, že RPL11 je nezbytný k akumulaci proteinu p53 po transfekci pomocí siDDX56. K podobným závěrům dospěli také Fumagalli a kol. (2009), kteří zjistili, že transfekce siRPL6 vede k aktivaci p53, která je zprostředkována přes RPL11.

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá ribozomálním stresem a aktivací p53. Pozornost je zaměřena zejména na protein DDX56. Vytyčené cíle práce byly splněny. Autorka dospěla k následujícím závěrům:

- Byla vypracována literární rešerše na zadanou problematiku.
- Na základě imunofluorescenčního barvení byla potvrzena jadéřková lokalizace proteinu DDX56.
- Bylo zjištěno, že protein DDX56 je degradován po navození ribozomálního stresu pomocí actinomycinu D, a to jak u nádorových buněčných linií U2OS a HeLa, tak i u nenádorových linií BJ a MRC-5.
- Aplikovaná doba ovlivnění 3 hodiny pomocí ActD (5 nM) byla dostatečná k navození stresových podmínek.
- Bylo detekováno, že actinomycin D způsobuje degradaci proteinu DDX56 již při testované koncentraci 1 nM a délce ovlivnění 6 hod u buněčné linie U2OS.
- UV záření způsobilo pokles hladiny DDX56.
- Bylo zjištěno, že protein DDX56 je pravděpodobně degradován cestou přes proteasom.
- Umlčení proteinu DDX56 vyvolává ribozomální stres a akumulaci p53 závislou na ribozomálním proteinu L11.

7 POUŽITÁ LITERATURA

1. Abdelhaleem M. (2004) Do human RNA helicases have a role in cancer? *Biochimica et Biophysica Acta* 1704: 37-46
2. Avendaño C., Menéndez J. C. (2008) Chapter 7 – DNA Intercalators and Topoisomerase Inhibitors. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drug*. Ed. 1: 199-228, Elsevier Science, USA
3. Bai D., Zhang J., Xiao W., Zheng X. (2014) Regulation of the HDM2-p53 pathway by ribosomal protein L6 in response to ribosomal stress. *Nucleic Acids Research* 42: 1799-1811
4. Bates G. J., Nicol S. M., Wilson B. J., Jacobs A.-M. F., Bourdon J.-C., Wardrop J., Gregory D. J., Lane D. P., Perkins N. D., Fuller-Pace F. V. (2005) The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumor suppressor. *The EMBO Journal* 24: 543-553
5. Belyi V. A., Ak P., Markert E., Wang H., Hu W., Puzio-Kuter A., Levine A. J. (2010) The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a001198
6. Bhat K. P., Itahana K., Jin A., Zhang Y. (2004) Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation. *The EMBO Journal* 23: 2402-2412
7. Borsos B. N., Huliák I., Majoros H., Ujfaludi Z., Gyenis Á., Pukler P., Boros I. M., Pankotai T. (2017) Human p53 interacts with the elongating RNAPII complex and is required for the release of actinomycin D induced transcription blockage. *Scientific Reports* 7: 40960
8. Brooks C. L., Gu W. (2003) Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 15: 164-171
9. Brooks C. L., Gu W. (2010) New insights into p53 activation. *Cell Research* 20: 614-621
10. Brumbaugh K. M., Otterness D. M., Geisen C., Oliveira V., Brognard J., Li X., Lejeune F., Tibbetts R. S., Maquat L. E., Abraham R. T. (2004) The mRNA surveillance protein hSMG-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells. *Molecular Cell* 14: 585-598

11. Bursać S., Brdovčak M. C., Pfannkuchen M., Orsolić I., Golomb L., Zhu Y., Katz Ch., Daftuar L., Grabušić K., Vukelić I., Filić V., Oren M., Prives C., Volarević S. (2012) Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 20467-20472
12. Dai M.-S., Lu H. (2004) Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 44475-44482
13. Danilova N., Gazda H. T. (2015) Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *Disease Models & Mechanisms* 8: 1013-1026
14. Deisenroth C., Zhang Y. (2010) Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway. *Oncogene* 29: 4253-4260
15. Deisenroth C., Zhang Y. (2011) The Ribosomal Protein-Mdm2-p53 Pathway and Energy Metabolism: Bridging the Gap between Feast and Famine. *Genes & Cancer* 2: 392-403
16. Fischer M. (2017) Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene* 36: 3943-3956
17. Fontoura B. M., Sorokina E. A., David E., Carroll R. B. (1992) p53 is covalently linked to 5.8S rRNA. *Molecular and Cellular Biology* 12: 5145-5151
18. Fukawa T., Ono M., Matsuo T., Uehara H., Miki T., Nakamura Y., Kanayama H. O., Katagiri T. (2012) DDX31 regulates the p53-HDM2 pathway and rRNA gene transcription through its interaction with NPM1 in renal cell carcinomas. *Cancer Research* 72: 5867-5877
19. Fumagalli S. Di Cara A., Neb-Gulati A., Natt F., Schwemberger S., Hall J., Babcock G. F., Bernardi R., Pandolfi P. P., Thomas G. (2009) Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nature Cell Biology* 11: 501-508
20. Fumagalli S., Ivanenkov V. V., Teng T., Thomas G. (2012) Suprainduction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. *Genes & Development* 26: 1028-1040
21. Garzia A., Jafarnejad S. M., Meyer C., Chapat C., Gogakos T., Morozov P., Amiri M., Shapiro M., Molina H., Tuschl T., Sonenberg N. (2017) The E3 ubiquitin ligase

- and RNA-binding protein ZNF598 orchestrates ribosome quality control of premature polyadenylated mRNAs. *Nature Communications* 8: 16056
22. Golomb L., Bublik D. R., Wilder S., Nevo R., Kiss V., Grabusic K., Volarevic S., Oren M. (2012) Importin 7 and exportin 1 link c-Myc and p53 to regulation of ribosomal biogenesis. *Molecular Cell* 45: 222-232
 23. Golomb L., Volarevic S., Oren M. (2014) p53 and ribosome biogenesis stress: The essentials. *FEBS Letters* 16: 2571-2579
 24. Goudarzi K. M., Nistér M., Lindström M. S. (2014) mTOR inhibitors blunt the p53 response to nucleolar stress by regulating RPL11 and MDM2 levels. *Cancer Biology & Therapy* 15: 1499-1514
 25. Groll M., Berkers C. R., Ploegh H. L., Ovaas H. (2006) Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. *Structure* 14: 451-456
 26. Halasi M., Pandit B., Gartel A. L. (2014) Proteasome inhibitors suppress the protein expression of mutant p53. *Cell Cycle* 13: 3202-3206
 27. Halim V. A., García-Santisteban I., Warmerdam D. O., van den Broek B., Heck A. J. R., Mohammed S., Medema R. H. (2018) Doxorubicin-induced DNA damage causes extensive ubiquitination of ribosomal proteins associated with a decrease in protein translation. *Molecular & Cellular Proteomics* RA118.000652
 28. Hawes D., Shi S.-R., Dabbs D. J., Taylor C. R., Cote R. J. (2009) Chapter 5 – Immunohistochemistry. *Modern Surgical Pathology* Ed. 2: 48-70, Saunders, USA
 29. Hietanen S., Lain S., Krausz E., Blattner C., Lane D. P. (2000) Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 8501-8506
 30. Higgins R., Gendron J. M., Rising L., Mak R., Webb K., Kaiser S. E., Zuzow N., Riviere P., Yang B., Fenech E., Tang X., Lindsay S. A., Christianson J. C., Hampton R. Y., Wasserman S. A., Bennett E. J. (2015) The unfolded protein response triggers site-specific regulatory ubiquitylation of 40S ribosomal proteins. *Molecular Cell* 59: 35-49
 31. Horn H. F., Vousden K. H. (2007) Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 26: 1306-1316
 32. Huber F. M., Hoelz A. (2017) Molecular basis for protection of ribosomal protein L4 from cellular degradation. *Nature Communications* 8: 14354

33. Hölzel M., Rohrmoser M., Schlee M., Grimm T., Harasim T., Malamoussi A., Gruber-Eber A., Kremmer E., Hiddemann W., Bornkamm G. W., Eick D. (2005) Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation. *The Journal of Cell Biology* 170: 367-378
34. Chan P. K., Bloom D. A., Hoang T. T. (1999) The N-terminal half of NPM dissociates from nucleoli of HeLa cells after anticancer drug treatments. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 264: 305-309
35. Chen C.-S., Ho D.-R., Chen F.-Y., Chen C.-R., Ke Y.-D., Su J.-G. (2014) AKT mediates actinomycin D-induced p53 expression. *Oncotarget* 5: 693-703
36. Choong M. L., Yang H., Lee M. A., Lane D. P. (2009) Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D: a new route to p53 based cyclotherapy. *Cell Cycle* 8: 2810-2818
37. James A., Wang Y., Raje H., Rosby R., DiMario P. (2014) Nucleolar stress with and without p53. *Nucleus* 5: 402-426
38. Janknecht R. (2010) Multi-talented DEAD-box proteins and potential tumor promoters: p68 RNA helicase (DDX5) and its paralog, p72 RNA helicase (DDX17). *American Journal of Translational Research* 2: 223-234
39. Jin A., Itahana K., O'Keefe K., Zhang Y. (2004) Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Molecular and Cellular Biology* 24: 7669-7680
40. Jung Y., Kim H. D., Yang H. W., Kim H. J., Jang C.-Y., Kim J. (2017) Modulating cellular balance of Rps3 mono-ubiquitination by both Hel2 E3 ligase and Ubp3 deubiquitinase regulates protein quality control. *Experimental & Molecular Medicine* 49: e390
41. Juszkievicz S., Hedge R. S. (2017) Initiation of Quality Control during Poly(A) Translation Requires Site-Specific Ribosome Ubiquitination. *Molecular Cell* 65: 743-750
42. Katagiri N., Kuroda T., Kishimoto H., Hayashi Y., Kumazawa T., Kimura K. (2015) The nucleolar protein nucleophosmin is essential for autophagy induced by inhibiting Pol I transcription. *Scientific Reports* 5: 8903

43. Kleff J., Kornmann M., Sawhney H., Korc M. (2000) Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. *International Journal of Cancer* 86: 399-407
44. Koba M., Konopa J. (2005) Actinomycin D and its mechanisms of action. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej* 59: 290-298
45. Kouyama Y., Ogawa Y., Masuda T., Yoshikawa Y., Noda M., Wakiyama H., Sato K., Nambara S., Hu Q., Kidogami S., Saito T., Sakimura S., Hayashi N., Kuroda Y., Ito S., Eguchi H., Mimori K. (2017) Abstract 1972: Identification of novel candidate driver genes of colorectal cancer on chromosome 7p. *Cancer Research* 77: 1972-1972
46. Lane D. P., Crawford L. V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263
47. Lee H., Zeng S. X., Lu H. (2006) UV induces p21 rapid turnover independently of ubiquitin and Skp2. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 26876-26883
48. Llanos S., Serrano M. (2010) Depletion of ribosomal protein L37 occurs in response to DNA damage and activates p53 through the L11/MDM2 pathway. *Cell Cycle* 9: 4005-4012
49. Liebermann D. A., Hoffman B., Vesely D. (2007) p53 induced growth arrest versus apoptosis and its modulation by survival cytokines. *Cell Cycle* 6: 166-170
50. Linder P. (2006) DEAD-box proteins: a family affair - active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Research* 34: 4168-4180
51. Linzer D. I., Levine A. J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52
52. Liu Y., Deisenroth C., Zhang Y. (2016a) RP-MDM2-p53 Pathway: Linking Ribosomal Biogenesis and Tumor Surveillance. *Trends in Cancer* 2: 191-204
53. Liu XF, Xiang LM, Zhou Q, Carralot JP, Prunotto M, Niederfellner G, Pastan I (2016b) Actinomycin D enhances killing of cancer cells by immunotoxin RG7787 through activation of the extrinsic pathways of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: 1066-10671
54. Longley D. B., Harkin D. P., Johnston P. G. (2003) 5-Fluorouracil: mechanism of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* 3: 330-338

55. Lu D.-F., Wang Y.-S., Li C., Wei G.-J., Chen R., Dong D.-M., Yao M. (2015) Actinomycin D inhibits cell proliferations and promotes apoptosis in osteosarcoma cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8: 1904-1911
56. 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. *Molecular and Cellular Biology* 14: 7414-7420
57. Matsuo Y., Ikeuchi K., Saeki Y., Iwasaki S., Schmidt C. Udagawa T., Sato F., Tsuchiya H., Becker T., Tanaka K., Ingolia N. T., Beckmann R., Inada T. (2017) Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. *Nature Communications* 8: 159
58. Meek D. W., Knippschild U. (2003) Posttranslational modification of MDM2. *Molecular Cancer Research* 1: 1017-1026
59. Michael D., Oren M. (2003) The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in Cancer Biology* 13: 49-58
60. Milhollen M., Hyer M., Ciavarrri J., Traore T., Sappal D., Huck J., Shi J., Duffy J., Gavin J., Brownell J., Yang Y., Stringer B., Ishii Y., Koenig E., Lublinsky A., Griffin R., Xia C., Powe J., Fleming P., Bence N. (2014) 561 Nonclinical characterization of the first in class investigational ubiquitin activating enzyme inhibitor MLN7243 in cellular and in vivo models of cancer in support of a phase I study. *European Journal of Cancer* 50: 181-182
61. Narla A., Ebert B. L. (2010) Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 115: 3196-3205
62. Neznanov N., Komarov A. P., Neznanova L., Stanhope-Baker P., Gudkov A. V. (2011) Proteotoxic stress targeted therapy (PSTT): induction of protein misfolding enhances the antitumor effect of the proteasome inhibitor bortezomib. *Oncotarget* 2: 209-221
63. 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. *Nature Communications* 7: 11390
64. Nishitani H., Shiomi Y., Iida H., Michishita M., Takami T., Tsurimoto T. (2008) CDK inhibitor p21 is degraded by a proliferating cell nuclear antigen-coupled Cul4-DDB1^{Cdt2} pathway during S phase and after UV irradiation. *Journal of Biological Chemistry* 283: 29045-29052

65. Ozenne P., Eymin B., Brambilla E., Gazzeri S. (2010) The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. *International Journal of Cancer* 127: 2239-2247
66. Pelletier J., Thomas G., Volarević S. (2018) Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nature Reviews Cancer* 18: 51-63
67. Pestov D. G., Strezoska Z., Lau L. F (2001) Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effect of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Molecular and Cellular Biology* 21: 4246-4255
68. Pflaum J., Schlosser S., Müller M. (2014) p53 family and cellular stress responses in cancer. *Frontiers in Oncology* 4: 285
69. Qian Y., Chen X. (2013) Senescence regulation by the p53 protein family. *Methods in Molecular Biology* 965: 37-61
70. Reid C. R., Hobman T. C. (2017) The nucleolar helicase DDX56 redistributes to West Nile virus assembly sites. *Virology* 500: 169-177
71. Ri M. (2016) Mechanism of action of bortezomib in multiple myeloma therapy. *International Journal of Myeloma* 6: 1-6
72. Rodríguez-Galán O., García-Gómez J. J., de la Cruz J. (2013) Yeast and human RNA helicases involved in ribosome biogenesis: Current status and perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta* 8: 775-790
73. Samad A., Carroll R. B. (1991) The tumor suppressor p53 is bound to RNA by a stable covalent linkage. *Molecular and Cellular Biology* 11: 1598-1606
74. Shcherbik N., Pestov D. G. (2010) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in the nucleolus: multitasking tools for a ribosome factory. *Genes & Cancer* 1: 681-689
75. Shin S., Janknecht R. (2007) Concerted activation of the Mdm2 promoter by p72 RNA helicase and the coactivators p300 and P/CAF. *Journal of Cellular Biochemistry* 101: 1252-1265
76. Singh R. K., Gonzalez M., Kabbaj M.-H., Gunjan A. (2012) Novel E3 ubiquitin ligases that regulate histone protein levels in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 7: e36295
77. Singleton M. R., Dillingham M. S, Wigley D. B (2007) Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annual Review of Biochemistry* 76: 23-50

78. Sionov R. V., Hayon I. L., Haupt Y. (2001) The regulation of p53 growth suppression. *Cell Cycle Checkpoints and Cancer*: 106-125, Landes Bioscience, USA
79. Skarie J. M., Link B. A. (2008) The primary open-angle glaucoma gene WDR36 functions in ribosomal RNA processing and interacts with the p53 stress-response pathway. *Human Molecular Genetics* 17: 2474-2485
80. Srivastava L., Lapik Y. R., Wang M., Pestov D. G. (2010) Mammalian DEAD box protein Ddx51 acts in 3' end maturation of 28S rRNA by promoting the release of U8 snoRNA. *Molecular and Cellular Biology* 30: 2947-2956
81. Strezoska Z., Pestov D. G., Lau L. F. (2000) Bop1 is a mouse WD40 repeat nucleolar protein involved in 28S and 5.8S rRNA processing and 60S ribosome biogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 20: 5516-5528
82. Sun W., Cang S., Lv X., Wang P., Lin Q., Zhang Q., Yan Z., Liu Z., Song Y. (2017) DDX51 gene promotes proliferation by activating Wnt/ β -catenin signaling in breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 10: 10892-10900
83. Sun X.-X., Dai M.-S. Lu H. (2008) Mycophenolic acid activation of p53 requires ribosomal proteins L5 and L11. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 12387-12392
84. Sun X.-X., Wang Y.-G., Xirodimas D. P., Dai M.-S. (2010) Perturbation of 60S ribosomal biogenesis results in ribosomal protein L5- and L11-dependent p53 activation. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 25812-25821
85. Sundaramoorthy E., Leonard M., Mak R., Liao J., Fulzele A., Bennett E. J. (2017) ZNF598 and RACK1 regulate mammalian ribosome-associated quality control function by mediating regulatory 40S ribosomal ubiquitylation. *Molecular Cell* 65: 751-760
86. Sung M.-K., Porras-Yakushi T. R., Reitsma J. M., Huber F. M., Sweredoski M. J., Hoelz Á., Hess S., Deshaies R. J. (2016a) A conserved quality-control pathway that mediates degradation of unassembled ribosomal proteins. *Elife* 5: e19105
87. Sung M.-K., Reitsma J. M., Sweredoski M. J., Hess S., Deshaies R. J. (2016b) Ribosomal proteins produced in excess are degraded by the ubiquitin-proteasome system. *Molecular Biology of the Cell* 27: 2642-2652

88. Tanner N. K., Linder P. (2001) DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Molecular Cell* 8: 251-62
89. Tzaridis T., Milde T., Pajtler K. W., Bender S., Jones D. T., Muller S., Wittmann A., Schlotter M., Kulozik A. E., Lichter P., Collins V. P., Witt O., Kool M., Korshunov A., Pfister S. M., Witt H. (2016) Low-dose Actinomycin-D treatment re-establishes the tumour-suppressive function of p53 in RELA-positive ependymoma. *Oncotarget* 7: 61860-61873
90. Umate P., Tuteja N., Tuteja R. (2011) Genome-wide comprehensive analysis of human helicases. *Communicative & Integrative Biology* 4: 118-137
91. Wang F., Canadeo L. A., Huibregtse J. M. (2015) Ubiquitination of newly synthesized proteins at the ribosome. *Biochimie* 114: 127-133
92. Wang L., Pang X.-C., Yu Z.-R., Yanq S.-Q., Liu A.-L., Wang J.-H., Du G.-H. (2017) Actinomycin D synergistically enhances the cytotoxicity of CDDP on KB cells by activating P53 via decreasing P53-MDM2 complex. *Journal of Asian Natural Products Research* 19: 630-643
93. Wei Q. (2005) Pitx2a binds to human papillomavirus type 18 E6 protein and inhibits E6-mediated P53 degradation in HeLa cells. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 37790-37797
94. Wild T., Horvath P., Wyler E., Widmann B., Badertscher L., Zemp I., Kozak K., Csucs G., Lund E., Kutay U. (2010) A protein inventory of human ribosome biogenesis reveals an essential function of exportin 5 in 60S subunit export. *PLoS Biology* 8: e1000522
95. Wurtmann E. J., Wolin S. L. (2009) RNA under attack: Cellular handling of RNA damage. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 44: 34-49
96. Xu Z., Anderson R., Hobman T. C. (2011) The capsid-binding nucleolar helicase DDX56 is important for infectivity of West Nile virus. *Journal of Virology* 85: 5571-5580
97. Xu Z., Hobman T. C. (2012) The helicase activity of DDX56 is required for its role in assembly of infectious West Nile virus particles. *Virology* 433: 226-235
98. Yao Z., Duan S., Hou D., Wang W., Wang G., Liu Y., Wen L., Wu M. (2010) B23 acts as a nucleolar stress sensor and promotes cell survival through its dynamic interaction with hnRNPU and hnRNPA1. *Oncogene* 29: 1821-1834

99. Yuan X., Zhou Y., Casanova E., Chai M., Kiss E., Gröne H. J., Schütz G., Grummt I. (2005) Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis. *Molecular Cell* 19: 77-87
100. Zhang C., Comai L., Johnson D. L. (2005) PTEN represses RNA polymerase I transcription by disrupting the SL1 complex. *Molecular and Cellular Biology* 25: 6899-6911
101. Zhang Y., Forsys J. T., Miceli A. P., Gwinn A. S., Weber J. D. (2011) Identification of DHX33 as a mediator of rRNA synthesis and cell growth. *Molecular and Cellular Biology* 31: 4676-4691
102. Zhang Y., Lu H. (2009) Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell* 16: 369-377
103. Zhang Y., Wolf G. W., Bhat K., Jin A., Allio T., Burkhart W., Xiong Y. (2003) Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Molecular and Cellular Biology* 23: 8902-8912
104. Zhou X., Liao J. M., Liao W. J., Lu H. (2012) Scission of the p53-MDM2 Loop by Ribosomal Proteins. *Genes Cancer* 3: 298-310
105. Zhou X., Liao W. J., Liao J. M., Liao P., Lu H. (2015) Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *Journal of Molecular Cell Biology* 7: 92-104
106. Zhuang J., Lee H., Kuitse I., Wang H., Shirazi F., Berger A., Hyer M., Chattopadhyay N., Syed S., Shi J. Q., Yu J., Shinde V., Kreshock A., Tirell S., Menon S., Jones R. J., Orłowski R. Z. (2016) The anti-tumor effect of the ubiquitin-activating enzyme (UAE) inhibitor TAK-243 on pre-clinical models of multiple myeloma. *Blood* 128: 3296
107. Zirwes R. F., Eilbracht J., Kneissel S., Schidt-Zachmann M. S. (2000) A novel helicase-type protein in the nucleolus: protein NOH61. *Molecular Biology of the Cell* 11: 1153-1167

Internetové zdroje:

1. The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8N8A6>. Poslední modifikace 25. 9. 2017, staženo 10. 2. 2018