

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2016

Ivana Drufbíková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv ribozomálního stresu na markery
po-kození DNA**

Bakalářská práce

Ivana Druflbíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezentace

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Mgr. Natálie Táborská

Prohlá-ení:

Prohla-uji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Natálie Táborské, dále prohla-uji, že veškeré podklady, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v přehledu literatury.

V Olomouci: í í í í í í í

Podpis: í í í í í í í

Podkování:

Chci bych podkovat své vedoucí práce Mgr. Natálii Táborské za odborné a metodické vedení práce, za rady, připomínky, ochotu a čas. Dále bych ráda podkovala Mgr. Zuzanu Macekové a Mgr. Pawlu Znojkoví, Ph.D za odborné rady a pomoc při vypracovávání praktické části.

SOUHRN

Pro život jako takový je nesmírně důležitá stabilita, integrita genomu buněk a ochrana DNA před poškozením. Úinkem exogenních a endogenních faktorů dochází často k chemickým změnám ve struktuře DNA - poškození DNA.

Neopravené poškození DNA se projevuje mutacemi, které mohou souviset se vznikem různých onemocnění. Buňky si během evoluce vytvořily systémy na vlastní ochranu - opravné dráhy, které brání trvalému poškození DNA, buněk a celého organismu. Nereparovaná nebo chybně reparovaná DNA u buněk vede k senescenci nebo apoptóze.

Ribozomální stres je stav nedostatečné i chybné syntézy ribozomů. Mutace v genech kódujících ribozomální proteiny, které se podílí na této syntéze, mohou vést ke vzniku onemocnění, tzv. ribozomopatie. Mutace v genech *RPL5* a *RPL11* byly identifikovány u pacientů s Diamond-Blackfanovou anémií.

V praktické části byly klonovány lidské geny pro vybrané ribozomální proteiny do plazmidu ptdTomato-C1, připravenými vektory byly transfekovány lidské buňky MRC5 a následně na nich byly imunofluorescenční značky i vybrané markery poškození DNA (-H2AX, 53BP1 a MDC1). Pomocí obrazové analýzy a automatické analýzy obrazu byly srovnány pozitivní (IR) a negativní (nonIR) kontroly MRC5 buněk a s nimi byly porovnány transfekované MRC5 buňky plazmidem ptdTomato-C1 s přirozenou nebo mutantní formou expresního genu. Byly analyzovány markery poškození DNA v buňkách pod ribozomálním stresem, avšak vliv ribozomálního stresu na poškození DNA nebyl na základě experimentální části prokázán.

SUMMARY

The protection of genetic information from DNA damage effects is extremely important because the genome stability and integrity is essential for every cell. The DNA damage can be caused by exogenous and endogenous factors which change the DNA chemical structure.

The impaired DNA damage leads to mutations that may be associated with various diseases. During the evolution, cells created repair mechanisms for their own protection of DNA damage repair systems which are pathways protecting DNA, cells and whole organisms from their permanent damage. Defects in DNA repair lead to senescence or apoptosis.

The ribosomal stress is characterized by the impaired or faulty ribosome biogenesis. Mutations in genes encoding ribosomal proteins which are involved in synthesis of ribosomes can lead to the disease called ribosomopathy. Mutations in genes *RPL5* and *RPL11* were identified in Diamond-Blackfan anemia patients.

In the experimental part of this work human genes encoding target ribosomal proteins were cloned into ptdTomato-C1 vector, MRC5 human cells were transfected with this vector and subsequently immunofluorescent labelling of three specific markers for DNA damage (γ-H2AX, 53BP1 and MDC1) was done. Positive (IR) and negative (nonIR) controls were compared using image analysis and automatic image analysis. Then these controls were compared with the results from MRC5 cells carrying ptdTomato-C1 plasmid with the wild type or mutant form of the selected gene. In conclusion, DNA damage markers in cells under the ribosomal stress were analysed but the ribosomal stress effect on DNA damage was not proved.

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 CÍLE PRÁCE	10
3 SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY	11
3.1 Poškození DNA	11
3.1.1 Abazická místa	13
3.1.2 Chybné párování bází	15
3.1.3 Deaminace bází	16
3.1.4 Pyrimidinové dímery	17
3.1.5 Jedno- a dvou-štrukturové zlomy	18
3.1.6 Dvou- a jedno-štrukturové zlomy	18
3.1.7 Interkalární sloučeniny	19
3.1.8 Příčné vazby	20
3.2 Opravy poškození DNA	20
3.2.1 Přímá oprava	21
3.2.2 Bázová excizní oprava	21
3.2.3 Nukleotidová excizní oprava	23
3.2.4 Oprava chybného párování bází	26
3.2.5 Oprava dvou- a jedno-štrukturových zlomů	27
3.2.5.1 Homologní rekombinace	28
3.2.5.2 Nehomologní spojování konců	30
3.3 Ribozomy, ribozomální stres a ribozomopatie	32
4 MATERIÁL A METODY	36
4.1 Biologický materiál	36
4.2 Klonování genů <i>RPL5</i> a <i>RPL11</i>	36
4.2.1 Amplifikace genů <i>RPL5</i> a <i>RPL11</i>	36
4.2.2 Klonování genů do pcDNA TM 3.3-TOPO plazmidu a transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i>	38
4.2.3 Izolace pcDNA TM 3.3-TOPO plazmidu s cílovým genem z bakterií <i>E. coli</i>	40
4.3 Cílená mutageneze vybraných genů	41
4.3.1 Mutageneze	41
4.3.2 Transformace kompetentních bakteriálních buněk XL1-Blue Supercompetent cells	43
4.3.3 Izolace pcDNA TM 3.3-TOPO plazmidu s cílovými geny po mutagenezi z bakterií XL1-Blue Supercompetent cells	43

4.4 P eklonování gen <i>RPL5</i> a <i>RPL11</i> do ptdTomato-C1 vektoru	44
4.4.1 Vnesení restrikčních míst na cílové geny	44
4.4.2 Restrikční typy	45
4.4.3 Izolace ptdTomato-C1 plazmidu z agarózového gelu	46
4.4.4 Ligace cílových genů do ptdTomato-C1 vektorem	47
4.4.5 Izolace ptdTomato-C1 plazmidu s cílovými geny z bakterií <i>E. coli</i>	47
4.5 Transfekce lidských MRC5 buněk	48
4.5.1 Pasážování buněk	48
4.5.2 Elektroporace buněk MRC5	48
4.6 Imunofluorescence	50
4.6.1 Imunofluorescenční značení	50
4.7 Analýza poškození DNA	51
4.8 Použití komerčních kity	52
4.9 Použití chemikálie (katalogové číslo)	52
4.10 Použití roztoky a jejich složení	53
4.11 Použití přístroje	54
5 VÝSLEDKY	56
5.1 Klonování genů <i>RPL5</i> a <i>RPL11</i>	56
5.2 Cílená mutageneze vybraných genů	58
5.3 P eklonování genů <i>RPL5</i> a <i>RPL11</i> do ptdTomato-C1 vektoru	60
5.4 Analýza poškození DNA u kontrolních a transfekovaných MRC5 buněk	62
6 DISKUZE	75
7 ZÁVĚR	79
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	80
9 SEZNAM LITERATURY	83

1 ÚVOD

Jedním z hlavních cílů všech živých organismů je předávat svým potomkům nepoškozený genetický materiál. Neustálé útoky endogenních a exogenních faktorů na buněnou DNA organismu ztěžují dosažení tohoto cíle. Proto si buňky vyvinuly systémy reagující na vznik změn ve struktuře DNA. Opravné dráhy chrání buňky, resp. organismus před trvalým poškozením, u buněk s neopravenou DNA lze sledovat jejich přítomnost v buňce senescentní (Hayflick a kol., 1961), apoptotické (Kerr a kol., 1972), anebo nekontrolovaně se dělící - vznikají buňky nádorové (Doll a kol., 1981).

Každá buňka se snaží udržet vnitřní rovnováhu (homeostázu) a neměnný fyziologický stav. K udržení homeostázy musí buňky nepřetržitě vnímat a reagovat na celou řadu stimulů z vnějšku i vnitřního prostředí. Změnami podmínek ovlivňujícími stabilitu buňky je vyvolán buněčný stres, který aktivuje p53 signální dráhu (Zhang a kol., 2009). Každá signální dráha informuje buňku o změnách a poté se na nové podmínky adaptuje (buněčná odpověď). Protein p53 chrání buňky před tumorogenezí tím, že zastavuje buněčný cyklus a indukuje senescenci nebo apoptózu (Lane, 1992).

Pro viabilitu buněk je esenciální také správná a přesná syntéza ribozomů, což je energeticky velmi náročný proces, který se proto považuje za kritický senzor buněčné homeostázy. Narušením biogeneze ribozomů je vyvolán ribozomální stres, který se projevuje aktivací p53 signální dráhou. Průběh dráhy ovlivňují některé proteiny malé i velké podjednotky ribozomů (RPS i RPL). Při adaptaci na ribozomální stres jsou hlavními regulátory proteiny velké ribozomální podjednotky - RPL5 a RPL11 (Fumagalli a kol., 2012). Vazbou těchto proteinů na regulátor MDM2 (E3 ubikvitin ligáza) je zamezeno jeho navázání na protein p53, který tím pádem není degradován v proteozomu. V případě stresu se tedy p53 v buňce stabilizuje a spouští buněnou odpověď, tzn. aktivuje inhibitory buněného cyklu nebo spouští buněnou smrt (Liu a kol., 2006; Drygin a kol., 2009).

V dnešní době existuje celá řada metod na detekci a případně kvantifikaci buněného stresu a buněnou adaptaci. Poškození DNA lze skenovat například PCR reakcí, u které se poškození DNA detekuje zastavením amplifikace v místě poškození, kometovou analýzou (comet assay) (Olive a kol., 1990), fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH) (Sauter a kol., 1997) a imunocytochemicky prostřednictvím imunofluorescenční značeného markeru poškození DNA (Rogakou a kol., 1998). Citlivým a spolehlivým markerem je například histon H2AX, jeho fosforylovaná forma (γ -H2AX) v místě poškození je imunofluorescenčně vizualizována a zaznamenávána například proužkovým cytometrem (Ikeda a kol., 2010).

2 CÍLE PRÁCE

- ❖ Vypracování literární re-er-e na téma šPrincipy po-kození a oprav DNA s dopln ním kapitoly na téma šRibozomy, ribozomální stres a ribozomopatie.
- ❖ Klonování vybraných gen *RPL5* a *RPL11* pro lidské ribozomální proteiny.
- ❖ Optimalizace imunofluorescen ního zna ení 3 marker (-H2AX, 53BP1 a MDC1) po-kození DNA.
- ❖ Srovnání pozitivních (IR) a negativních (nonIR) kontrol pomocí obrazové analýzy a automatické analýzy obrazu z hlediska po-kození.
- ❖ Transfekce lidské bun né linie MRC5 elektroporací vybranými geny (*RPL5* a *RPL11*) ve vhodném vektoru.
- ❖ Analýza po-kození DNA - srovnání s kontrolami a vypracování bakalá ské práce s výsledným potvrzením nebo vyvrácením teorie o vlivu ribozomálního stresu na po-kození DNA.

3 SOUASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Život každého organismu závisí na schopnosti buněk uchovávat, řídit a opravovat genetickou informaci. Dědičné informace jsou předávány z mateřských buněk do dceřných, konkrétně procesem buněčného dělení, a dále z generace na generaci prostřednictvím reprodukčních buněk. Veškerá genetická informace je uložena v podobě genů a kompletní genetická výbava se nazývá genom. Při buněčném dělení dochází k přenosu informací z celého genomu do dceřných buněk. Esenciální pro tento přenos je proces zvaný mitóza, při kterém dochází k duplikaci genetické informace podle templátového vlákna DNA, potom následuje rozdělení zdvojené informace do dceřných jader.

3.1 Poškození DNA

Jako poškození DNA (deoxyribonukleová kyselina) jsou označovány chemické změny, ke kterým dochází ve struktuře DNA (Krokan a kol., 2004). Buňky jsou neustále vystavovány faktorům, které mohou poškodit DNA a ovlivnit, nebo dokonce ohrozit funkci a přenos genetické informace. DNA je nejvíce biologická molekula, která podléhá velkému množství chemických reakcí, a může se v ní hromadit i velké množství poškození. Nárůst počtu poškození/chyb dochází k poklesu nebo změně buněčných funkcí, k projevům stárnutí i propuknutí onemocnění (Izzotti a kol., 1999). Proto je pro život nezbytné udržovat stabilitu, integritu genomu a chránit DNA před poškozením. Pokud není vzniklé poškození DNA odstraněno opravnými mechanismy, může dojít ke genomické nestabilitě nebo se buňka může dostat do stavu senescence (Hayflick a kol., 1961) i podlehnout apoptóze (Kerr a kol., 1972).

Neopravené chyby v DNA se mohou v genomu ustálit ve formě mutací, které mohou následně vést k různým druhům onemocnění. Například dusíkaté báze ve struktuře DNA snadno podléhají chemickým modifikacím. V důsledku replikačních a opravných chyb se vzniklé poškození bází může transformovat na mutaci. Jedná se o definitivní změnu, která se může projevit i v potomstvu poškozené buňky. Následkem vzniklé mutace může být například snížení funkce nebo poškození tumor supresorových genů, které chrání buňky a celý organismus před vznikem nádorového onemocnění, a aktivace onkogenů, které spouští nekontrolované buněčné dělení (Chang a kol., 1982). Příkladem provázanosti mezi poškozením DNA a lidskými nemocemi může být autozomálně recesivní onemocnění ataxia telangiectasia, které je způsobené mutací genu *ATM*. Tento gen kóduje ATM kinázu, která

společně s ATR kinázou hraje důležitou roli při kontrole buněného cyklu a při opravách poškození DNA (www.genecards.org).

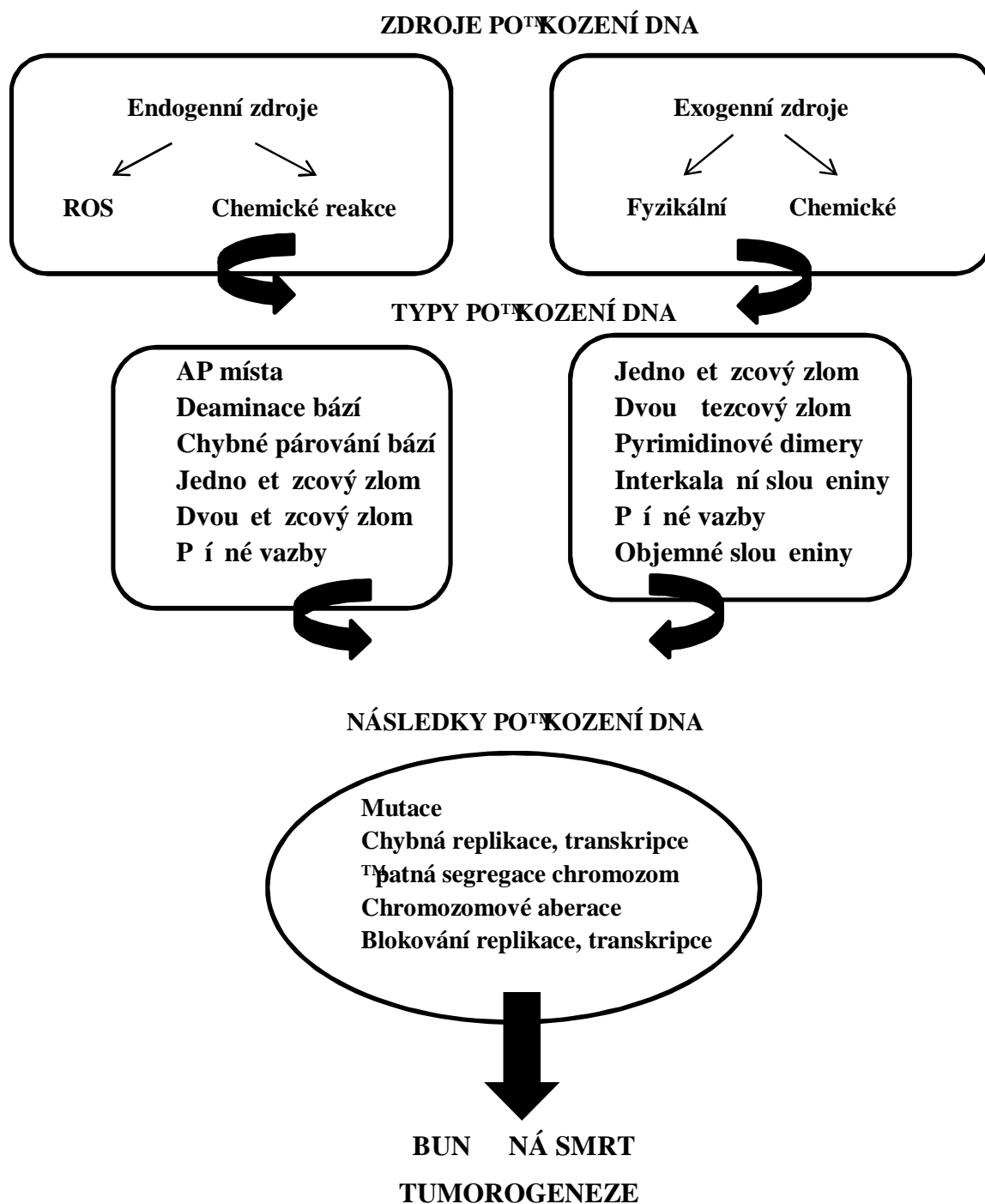
Buňky jsou neustále vystavovány endogenním a exogenním faktorům, které mohou být zdrojem poškození DNA molekul. Podle působení těchto faktorů rozlišujeme základní typy poškození DNA, ke kterým patří vznik abazických míst, deaminace bází, chybné párování bází, formování pyrimidinových dimerů, jednoetřicové a dvouetřicové zlomy v DNA, tvorba píňých vazeb a takyž mnohy působené interkalacími sloučeninami. Zdroje vedoucí k poškození DNA a základní typy poškození jsou shrnuty na Obr. 1.

Endogenní zdroje ohrožují integritu DNA a způsobují velké množství poškození. Sám buněný metabolismus je zodpovědný za tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které generují řádná oxidativní poškození. K poškozením způsobeným reaktivními radikály zařadíme chybné párování bází, jednoetřicové a dvouetřicové zlomy a vznik píňých vazeb v DNA (Cadet a kol., 1997). K dalšímu endogennímu poškození může docházet během fyziologických procesů v molekule DNA. Například může být narušen průběh replikace, transkripce i translace. Nejjednodušší typ endogenního poškození je způsoben kyselou hydrolyzou (Lindahl, 1993). Nejen hydrolyza, ale i další chemické reakce, jako je alkylace a oxidace, vedou k endogennímu poškození DNA. Na které základní typy poškození mohou vznikat jsou závislým působením endogenních i exogenních faktorů. Příkladem toho je geneze chybného párování bází i dvouetřicových zlomů.

DNA není vystavena pouze endogenním vlivům, ale i exogenním, které mohou být fyzikálního nebo chemického původu (Totter, 1980). Fyzikálním zdrojem je například ultrafialové záření, jehož působením se vytvoří pyrimidinové dimery, a ionizující záření indukující především dvouetřicové zlomy (Ward, 1988). Chemickým zdrojem jsou například alkylation a interkalation sloučeniny. Většina těchto chemických látek se využívá pro lékařské účely, konkrétně v boji proti rakovině a jiným onemocněním (Erickson a kol., 1980).

Všechny buňky mají opravný systém, jehož hlavním úkolem je ochrana před trvalým poškozením. To provádí pomocí kontrolních bodů v různých fázích buněného cyklu nebo také pomocí provázaných opravných drah. Jestliže není poškození DNA správně opraveno, dochází například k mutaci, poškození procesu transkripce, replikace DNA, špatné segregaci chromozomů, anebo vzniku chromozomových aberací. Následkem těchto poškození je zvýšené riziko vzniku rakoviny nebo propuknutí buněčné smrti (Hoeijmakers, 2009).

Obr. 1: Zdroje, typy a následky poškození DNA (převzato a upraveno Hoeijmakers, 2009)



DNA ó deoxyribonukleová kyselina, ROS ó reaktivní kyslíkové radikály, AP místa ó apurinová/apyrimidinová místa

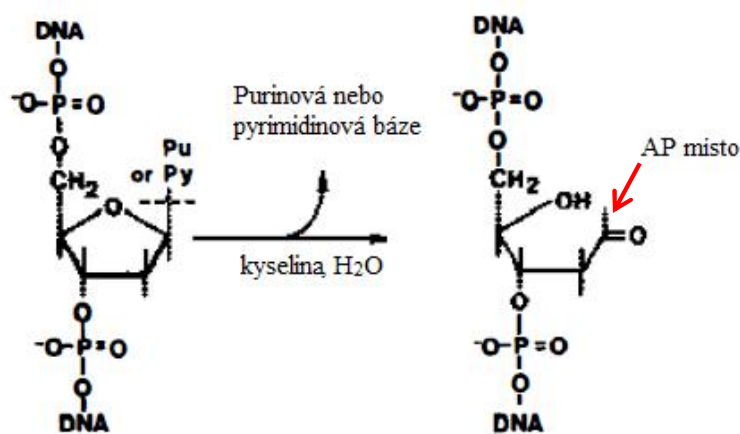
3.1.1 Abazická místa

Prvním příkladem poškození DNA je vznik abazických míst, mezi která patří apurinová a apyrimidinová místa (AP). Jejich název odvozujeme od typu dusíkaté báze

(purinová nebo pyrimidinová), která je z polynukleotidového řetězce DNA odstraněna. K tomuto endogenně vznikajícímu poškození dochází spontánní kyselou hydrolyzou N-glykosidové vazby, která se nachází mezi purinovou/pyrimidinovou bází a 2-deoxyribózou. Nestabilitu této vazby způsobují chemické modifikace nukleosidu, který je složen z dusíkaté báze a 2-deoxyribózy. Výsledkem reakce je odštěpení purinové/pyrimidinové báze a zánik N-glykosidové vazby, avšak fosfodiesterová vazba mezi zbytky nukleotidů zůstává neporušená. Za toto poškození jsou zodpovědné depurinace a depyrimidinace. Depurinací se odstraní purinové báze a depyrimidinací se uvolní pyrimidinové báze z organické molekuly DNA. Podle toho vzniká buď apurinové, nebo apyrimidinové místo (Kochetkov a kol., 1972). V apurinovém místě chybí báze jako adenin, guanin a v případě apyrimidinového místa chybí pyrimidinové báze jako cytosin a thymin. Průběh reakce a struktura AP místa je znázorněna na Obr. 2.

V jedné buňce dochází k tomuto spontánním ztrátám bází přibližně 10 000krát během jednoho dne. Výskyt apurinových míst v řetězci DNA je asi jít než apyrimidinových, protože depurinace probíhá jednodušeji než depyrimidinace. V souvislosti se ztrátou purinové báze může docházet k tzv. transverzi, tedy procesu, při kterém se zamění purinová báze za pyrimidinovou, anebo naopak. Takováto místa v řetězci DNA jsou potenciálním zdrojem spontánních mutací (Lindahl T., 1972). AP místa se přidávají mezi cytotoxická poškození, jelikož vedou k zablokování průběhu replikace DNA (Kamiya a kol., 1993) a narušení transkripce (Sanchez a kol., 1994).

Obr. 2: Chemická reakce vzniku AP místa a jeho struktura na polynukleotidovém řetězci DNA (převzato a upraveno Lawrence a kol., 1986)



Pu – purinová báze, Py – pyrimidinová báze, AP místo – apurinové/apyrimidinové místo

3.1.2 Chybné párování bází

Správné párování bází je důležitým strukturním i funkčním rysem deoxyribonukleové kyseliny. Antiparalelní a zpravidla dvou-roubovice jsou tvořené lineární sekvencí bází: adeninu (A), guaninu (G), cytosinu (C) a thyminu (T). Na základě Watson-Crickova pravidla komplementarity bází se k sobě pomocí dvou vodíkových můstků váže A s T a pomocí tří vodíkových vazeb G s C. Tato struktura zajišťuje bezchybnou duplikaci a stabilitu genetické informace (Watson a Crick, 1953).

Chybné párování bází způsobují endogenní faktory v průběhu replikace DNA (Kornberg a kol., 1992). Jedná se o poškození, které se neřídí pravidlem komplementarity bází, ale vzájemně se párují nekomplementární báze, například: G s T, A s C, A s A, G s G a další (Holliday, 1974). Struktura bází není statická, ale dochází k chemickým modifikacím vodíkových vazeb, což vede ke změnám v párování bází (Watson a Crick, 1953). Jednotlivé typy chybně spárovaných bází ovlivňují různé míry helikální strukturu DNA.

Důsledkem chybného párování bází může vzniknout mutace, která započiná změnu purinového nukleotidu za pyrimidinový a naopak. Jedná se o již zmíněnou transverzi, která nastává v případě ztráty purinové báze. Dalším typem mutace je tranzice, která vyvolává změnu purinového nukleotidu za jiný purinový, anebo pyrimidinového nukleotidu za jiný pyrimidinový. Tab. 1 schematicky zaznamenává 12 možných změn bází, z toho 8 transverzí a 4 tranzice. Chybné párování bází ve struktuře DNA se rychle opravuje pomocí specifických proteinů. V případě výskytu chyb během opravy chybně spárovaných bází může docházet k rychlejší mutacím a u lidí se zvyšuje možnost vzniku rakoviny (Kolodner, 1995).

Tab. 1: 12 možných změn bází o 8 transverzí a 4 tranzice

		purinová báze		pyrimidinová báze	
		adenin	guanin	cytosin	thymin
purinová báze	adenin		tranzice	transverze	transverze
	guanin	tranzice		transverze	transverze
pyrimidinová báze	cytosin	transverze	transverze		tranzice
	thymin	transverze	transverze	tranzice	

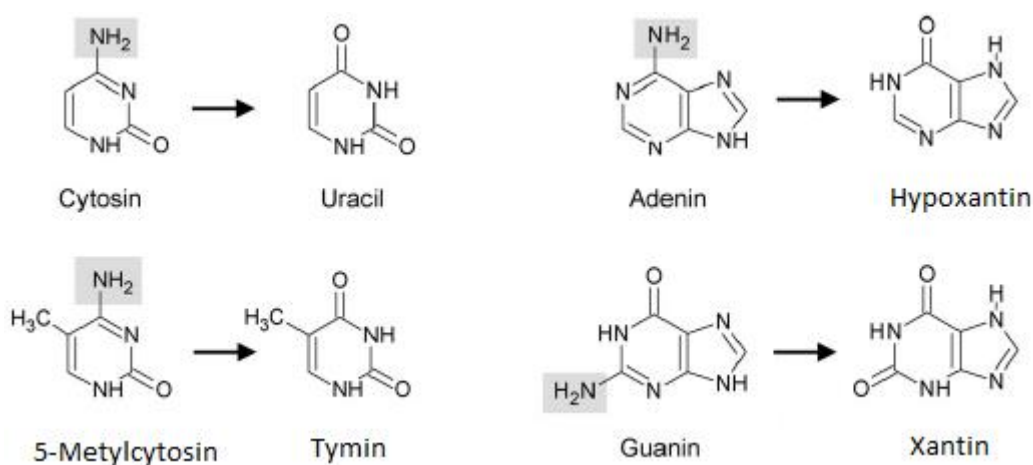
3.1.3 Deaminace bází

Deaminace je chemická reakce, při které se z báze DNA odštěpuje aminoskupina za vzniku ketonické skupiny v důsledku působení endogenních zdrojů. Deaminace tedy může probíhat na guaninu, adeninu a cytosinu, protože mají ve své chemické struktuře primární aminoskupinu (Lutsenko a kol., 1999).

Zmíněné báze DNA podléhají únikům jako hydrolytické deaminace (Singer a kol., 1983), tak i deaminaci způsobené vlivem sloučenin odvozených od oxidu dusíku - oxid dusnatý, oxid dusitý a kyselina dusitá (Wink a kol., 1991). Deaminace podnětené oběma způsobem se řídí mechanismem nukleofilní aromatické substituce (Gould, 1959). Pyrimidinové báze DNA jsou náchylnější ke spontánní deaminaci než purinové (Shapiro a kol., 1966).

Deaminace jednotlivých bází je schematicky znázorněna na Obr. 3. Cytosin se deaminuje na uracil, který se následně páruje s adeninem místo původního párování cytosinu s guaninem. Deaminací adeninu vzniká hypoxantin, který tvoří pár s cytosinem místo s tyminem. Deaminací guaninu vzniká xantin, který se komplementárně spojuje s cytosinem. Za pátý typ báze se považuje 5-metylcytosin, což je metylovaná forma báze cytosinu, a u flivních sekvencí se v těle nachází v palindromické sekvenci CpG (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). 5-metylcytosin se u eukaryot podílí na regulaci genové exprese (Defossez a kol., 2011). Deaminací 5-metylcytosinu vzniká thymin. Sloučeniny oxidu dusíku indukují mutace prostřednictvím deaminace bází v DNA. Silně mutagení jsou deaminace cytosinu a 5-metylcytosinu, protože odpovídají za tranzici (Hill-Perkins a kol., 1986).

Obr. 3: Deaminace bází (převzato a upraveno z Akbari a kol., 2008)



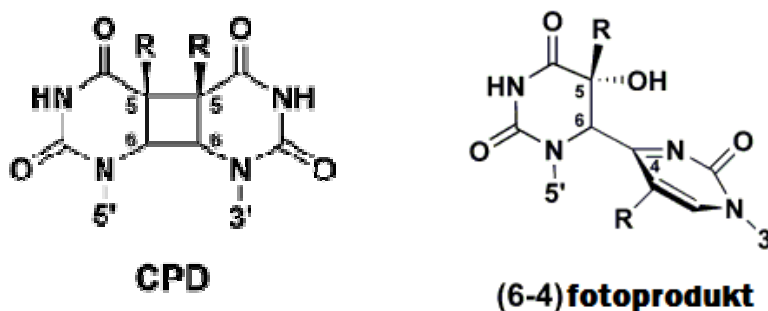
3.1.4 Pyrimidinové dimery

Exogenní faktory způsobují tvorbu pyrimidinových dimerů, které porušují strukturu dvouřetězce DNA. Záření buněk ultrafialovým zářením (UV) dochází ke vzniku mutagenních porušení v DNA. Po absorpci UV záření molekulou DNA můžeme rozlišit dva hlavní produkty, a to (6-4)-fotoprodukty ((6-4) PPs) a cyklobutanové pyrimidinové dimery (CPDs).

Cyklobutanové pyrimidinové dimery - thyminové, cytosin-thyminové a cytosinové dimery (Becker a kol., 1989) patří k zastaralým mutagenním porušením a jejich oprava je pomalá nebo nemohutná (Cadet 1997). Jejich vznik je dán netypickými kovalentními vazbami mezi dvěma sousedními pyrimidinovými bázemi. Mezi oběma sousedními pyrimidiny se vytváří charakteristický cyklobutanový kruh vazbou pátých a šestých uhlíků na benzenovém jádru. Dalšími produkty po absorbování UV záření jsou (6-4)-fotoprodukty, které vznikají spojením tvrdého uhlíku jednoho pyrimidinu s šestým uhlíkem druhého pyrimidinu. Chemické struktury CPDs a (6-4)-fotoproduktů jsou na Obr. 4.

Epidemiologické údaje prokázaly spojitost mezi UV zářením a rakovinou kůže (Ananthaswamy, 1990). Neopravené fotoprodukty před replikací DNA zodpovídají za mutace v prokaryotických genech. Příkladem může být mutace genu *TP53*, který kóduje tumor supresorový protein p53 - strážce genomu (Strachan and Read, 1999). Protein p53 obsahuje dvě domény - vazebnou a oligomerační, a slouží jako transkripční faktor. Protein mimo jiné reguluje expresi genů, které kontrolují průběh buněčného cyklu, apoptózy, senescenci buněk i opravy DNA. Mutace v tomto genu jsou spojeny s velkým množstvím onemocnění, například Li-Fraumeniho syndrom (www.genecards.org).

Obr. 4: Chemická struktura pyrimidinových dimerů CPD a (6-4) PP



CPD - cyklobutanové pyrimidinové dimery

3.1.5 Jedno et zcové zlomy

Ve struktuře DNA ke zlomu jednoho et zce (DNA Single Strand Break, SSBs) dochází dvěma způsoby přímo a nepřímo. Příímé útoky endogenních volných radikál (ROS) poškozují 2-deoxyribózu v et zci DNA a následkem toho pozorujeme přerušení kontinuity DNA, které trvale ohrožuje genomovou integritu. Nepříímým způsobem se reparaují meziprodukty bázevé excizní opravy - jedno et zcové zlomy (Caldecott, 2001). Jedno et zcové zlomy charakterizujeme jako přerušení v deoxyribozofosfátové páte i jednoho vlákna DNA. V průběhu dne se tvoří ať tisíce jedno et zcových zlomů DNA, které, pokud nejsou opraveny, se mohou změnit na vysoce nebezpečné dvou et zcové zlomy (Lindahl, 1993).

Zlomy mohou být indukovány i exogenními zdroji, a to ionizujícím zářením, alkylujícími látkami nebo například topoizomerázovým jedem camptotecinem (Caldecott, 2001, 2003). Jedno et zcové zlomy mají cytotoxický efekt, protože blokují funkci RNA polymerázy II, která je důležitá v procesu transkripce (Scott, 2004).

Přestože existují dvě možné cesty vzniku jedno et zcových zlomů, oprav se účastní stejné typy proteinů bez ohledu na způsob vzniku. Defekty v opravě jedno et zcových zlomů mají vliv na nervový systém a jsou spojovány například se spinocerebelární ataxií (Takashima a kol., 2002). Jedná se o dědičnou chorobu, která se popisuje jako fyziologické stárnutí mozku v důsledku apoptózy neuronů a celkového poklesu výkonnosti mozku (Nospikel a kol., 2002; Taylor, 2001).

3.2.6 Dvou et zcové zlomy

Ze všech možných poškození DNA se právě dvou et zcové zlomy (DNA Double Strand Break, DSBs) považují za nejnebezpečnější a buď nejvíce ohrožující, a proto je jejich oprava naprosto nezbytná (Jackson a kol., 2001). Tyto zlomy způsobují nejen exogenní faktory - záření a chemické sloučeniny, ale i endogenní faktory jako chybná replikace. Nejčastějším faktorem zodpovědným za vznik dvou et zcových zlomů je ionizující záření, jehož působení je jak přirodní jako gama a kosmické záření, tak umělé jako rentgenové záření (Ward, 1988). Přidevším endogenní a exogenní faktory jsou zodpovědné za DSB, ale tvoří se i v (D)J rekombinaci při vývoji T a B lymfocytů (Dai a kol., 2003). U jedno et zcových zlomů se naruší kontinuita pouze jednoho et zce DNA, ale u dvou et zcových zlomů dochází ke zlomu u obou komplementárních et zce DNA na stejném místě souasně. V důsledku toho se v místě zlomu objevují volné konce DNA, které jsou velmi složitě opravovány, a proto poskytují příležitost k nesprávné rekombinaci v genomu.

Spousta lidských dědičných onemocnění a syndromů vzniká mutacemi genů, které kódují produkty důležité pro průběh reparačních procesů. Například ataxia telangiectasia vzniká mutací genu *ATM* (ataxia telangiectasia mutated), jehož produkty ve zdravé formě zastavují buněčný cyklus a aktivují opravu DNA (Lavin a kol., 2007). Podobným syndromem s mírnějším průběhem je ataxia telangiectasia like disorder (ATLD). Mutací genu *ATR* vzniká Seckelův syndrom. *ATR* (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) gen je velmi blízký *ATM* a společně jsou aktivovány poškozením DNA (Majewski a kol., 1982). V roce 1998 byl identifikován gen *NBS1* (Nijmegen breakage syndrome 1), který odpovídá za rozpoznání DNA poškození a následnou signalizaci. Mutací tohoto genu dochází k propuknutí Nijmegenova syndromu.

3.1.7 Interkalantní sloučeniny

Interkalantní sloučeniny jsou chemické látky se schopností zabudovat se i se kovalentně vázat do struktury DNA.

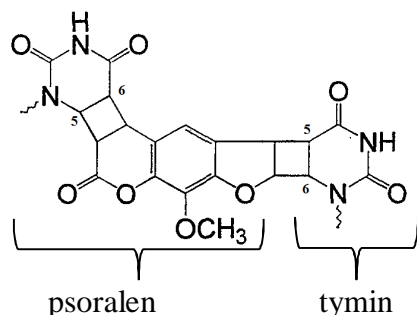
K interkalantním sloučeninám patří benzo-*a*-pyren, který se nachází v některých potravinách, výfukových plynech a v cigaretovém kouři. Benzo-*a*-pyren se řadí mezi polycyklické aromatické uhlovodíky, což jsou jedny z nejsilnějších karcinogenních látek. Schopnost vyvolat nádorové bujení byla prokázána pomocí experimentů se zvířaty (Fazio, 1973). Polycyklické aromatické uhlovodíky lze najít v grilovaném masu, v zelenině a ovoci, u oleje, uzených ryb a v nízké koncentraci i v mnoha plodech (Kazerouni, 2001). U myšičích krmených stravou bohatou na benzo-*a*-pyren došlo ke vzniku leukémie a flukuidního nebo plicního nádoru (Rigdon a kol. 1966, 1969). Další studie na zvířatech prokázaly, že v důsledku příjmu potravy obsahující benzo-*a*-pyren se zvyšuje výskyt nádorů v horní části gastrointestinálního traktu. Do jaké míry ovlivňuje množství této karcinogenní látky lidské zdraví, je stále nejasné (Kazerouni, 2001).

Další sloučeninou je peptidové antibiotikum aktinomycin D, který se váže mezi báze DNA. Používá se k inhibici syntézy DNA i RNA. Podobnou schopností zabudovat se do struktury DNA se vyznačuje psoralen. Na Obr. 5 se psoralen kovalentně váže na pátý a šestý uhlík pyrimidinové báze thymin. Výsledkem jsou chemické struktury podobné cyklobutanovým pyrimidinovým dimerům (Peckler, 1982). K interkalantním sloučeninám náleží i daunorubicin, což je antracyklinové antibiotikum užívané k léčbě leukémie a jiných nádorů (Gary a kol., 1980).

Mimo to existují ještě sloučeniny, které se kovalentně vážou k různým místům báze DNA. Jedná se o objemné sloučeniny obsažené v cigaretovém kouři (Bartsch a kol., 1999),

jeff mají schopnost poru-ít strukturu DNA a zablokovat Watson-Crickovo párování bází (Geacintov a kol., 1997).

Obr. 5: Chemická struktura psoralenu a jeho navázání na tymin v DNA



3.2.8 P í né vazby

Alkyla ní látky a bifunk ní alkyla ní inidla zodpovídají za alkylaci bází, která vede ke vzniku p í ných vazeb ve struktu e DNA. Metansulfonát a metazolamid jsou zástupci alkyla ní ch látek, které modifikací báze zap í iní vznik bodových mutací. K bifunk ní m alkyla ní m pat í dusíkaté yperity, slou eniny platiny a mitomycin C, které vyvolávají chromozomální zm ny související se zlomy DNA (Noll a kol., 2006). Tyto slou eniny ozna ujeme jako klastogeny, protože indukují po-kození DNA na chromozomové úrovni, nej ast ji strukturní chromozomové aberace (Vogel a kol., 1996).

Metazolamid je perorální chemoterapeutický medikament k lé b n kterých typ rakovin mozku (<http://www.nice.org.uk>). Ke klinicky významným zástupc m dusíkatých yperit adíme chlorambucil, mechlorethamin a fosfidový yperit. Dusíkaté yperity reagují s guaninovými zbytky ve struktu e DNA p es meziproduct aziridinu za vzniku derivátu guaninu. Deriváty se ú astní reakce s dal-ími aziridinovými meziprodukty a tvo í se p í né vazby ve struktu e DNA (Ojwang a kol., 1989). Dal-ím zmín ným bifunk ní m alkyla ní m inidlem je mitomycin C, který se poufívá jako úsp -né chemoterapeutikum, ale p í astém ufvání se mohou projevit vedlej-í hematotoxické ú inky (Denny a kol., 1995).

3.2 Opravy po-kození DNA

V-echny flivé organizmy se snaží p edat svou nezmm n nou a neporu-enou genetickou informaci do generace potomk . K tomuto p enosu musí docházet i p es neustálé p sobení potenciáln nebezpe ných endogenních a exogenních faktor . B hem evoluce se v bu kách vytvo ily systémy, pomocí kterých mohou bu ky opravit vzniklé zm ny. Tyto mechanismy slouffí jako odpov na po-kození DNA. Hlavními funkcemi t chto systém je rozpoznávání po-kození DNA, p enos signálu o tomto po-kození a zprost edkování oprav. Bun né

odpovědi jsou velmi důležitě, protože mohou zabránit vzniku mutací a jejich přenosu do dceriných buněk. Tím chrání člověka nebo jakýkoli jiný organismus například před propuknutím nemocí. Ovšem i v případě těchto opravných mechanismů může docházet k chybám a následně k onemocnění. Odpovědi na různé typy poškození jsou odlišné. Saví buňky používají různé základní typy opravných drah, ke kterým se řadí například oprava poškození, básová excizní oprava, nukleotidová excizní oprava, oprava chybného párování bází, homologní rekombinace a nehomologní spojování konců.

3.2.1 Příklad oprava

Ve srovnání s excizními opravami zde nedochází k odstranění poškozené části DNA a následné syntéze chybějící části. Příklad oprava DNA se liší tím, že není složená z velkého množství po sobě jdoucích kroků a nepodílí se na ní mnoho proteinů. Postup opravy spočívá pouze v jednom kroku, kdy se poškozená báze reparuje chemickou reakcí (Sedgwick a kol., 2007). Tímto mechanismem lze opravit pyrimidinové dimery a produkty s navázanou alkylovou skupinou, například O^6 -alkylguanin.

Cyklobutanové pyrimidinové dimery vzniklé po absorpci UV záření jsou odstraňovány procesem fotoreaktivace (Sancar, 1994). V tomto procesu hraje hlavní roli enzym DNA fotolyáza, který rozpoznává dimery ve struktuře DNA, specificky se na ně váže a s využitím viditelného světla roztáhne kovalentní vazby mezi pyrimidiny (Kim, 1994).

O^6 -alkylguanin je substituovaný derivát guaninu, který má na sobě navázanou alkylovou skupinu na šestém uhlíku purinového kruhu přes kyslík navázanou metylovou nebo etylovou skupinu. Tento derivát se v průběhu replikace páruje s thyminem a narušuje tím komplementární párování guaninu s cytosinem (Lawly a kol., 1970). U savců se oprava takovéto změny uskutečňuje prostřednictvím enzymu O^6 -methylguanin-DNA metyltransferázy (MGMT). MGMT přenáší alkylovou skupinu z DNA na aktivní cysteinový zbytek proteinu MGMT. Po připojení alkylové skupiny do katalytického místa enzymu dochází k jeho inaktivaci, čímž se stává cílem ubiquitinace a proteazomové degradace (Xu-Welliver a kol., 2002).

3.2.2 Básová excizní oprava

Básová excizní oprava (BER) umožňuje reparovat DNA, která byla poškozena například hydrolyzou, deaminací, alkylací, působením ROS a dalších látek či reakcí, které jakkoli modifikovaly báze DNA (Lindahl a kol., 1993). Mechanismus této opravy je uskutečňován pomocí většího množství po sobě jdoucích enzymatických reakcí, kterých se účastní různé proteiny. Jedná se o opravnou dráhu, během které je poškozená báze

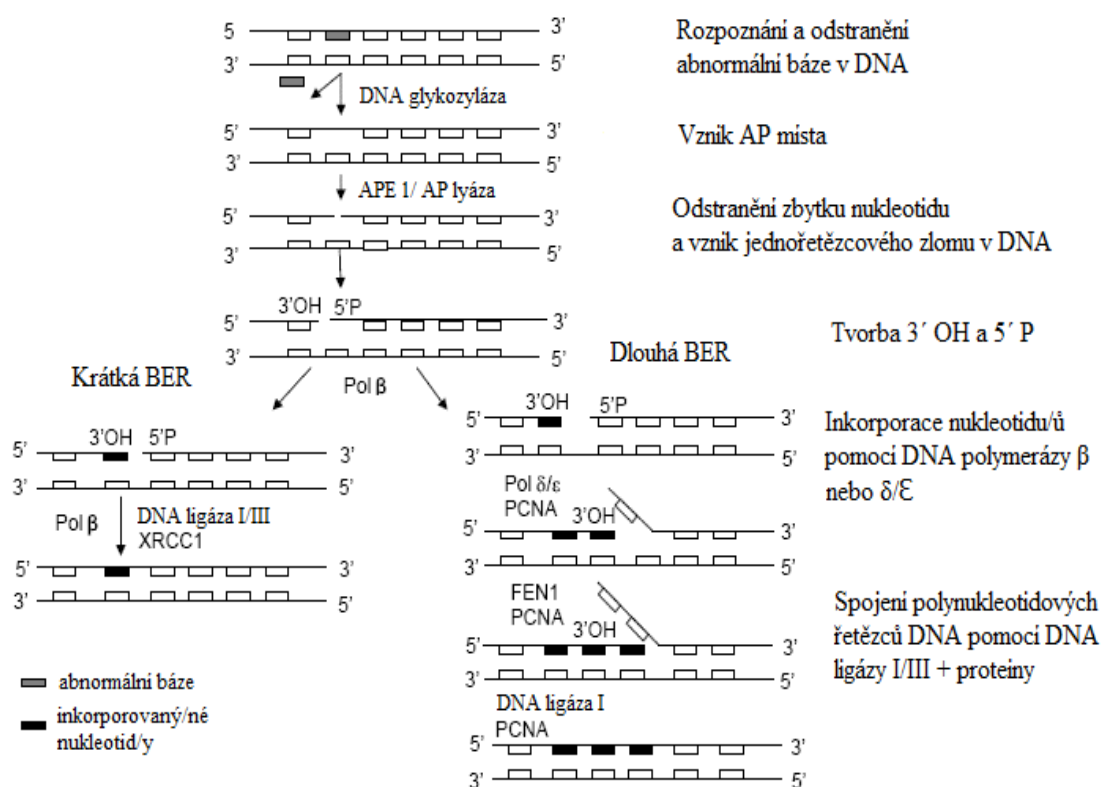
rozpoznána, odstraněna ze struktury DNA a ukončí se uvedením molekuly DNA do původní podoby.

Mechanismus báze excizní opravy se dělí do pěti základních kroků, které jsou znázorněny na Obr. 6. Nejprve je rozpoznána abnormální báze pomocí enzymu DNA glykozylázy. Tomas Lindahl v roce 1974 identifikoval první uracil-DNA-glykozylázu u bakterie *Escherichia coli* a na základě jeho objevu byla zjištěna funkce DNA glykozylázy – štěpení N-glykosidové vazby mezi 2-deoxyribózou a modifikovanou bází DNA. Odstraněním této báze se formuje abazické místo (Lindahl, 1974).

AP místa jsou detekována endonukleázou (APE) nebo lyázou (AP lyáza). Pro prokaryotické buňky je esenciální AP-endonukleáza 1 (APE1), která hydrolyzuje fosfodiesterovou vazbu na 5' konci vzhledem k AP místu. Důsledkem je odstranění 2-deoxyribózy a fosfátového zbytku a vznik jednostranného zlomu v DNA s hydroxylovou skupinou na 3' konci (3'OH) a na 5' konci s 2-deoxyribozofosfátem (5'dRP) (Abbotts a kol., 2010). AP lyáza prostřednictvím chemické reakce (β-eliminace) působí stejně jako APE, ale na 3' konci má 2-deoxyribozofosfát (3'dRP) a na 5' konci fosfát (5' P). Pomocí enzymů jsou tyto abnormální konce upraveny tak, aby na 5' konci byl fosfát a 3' konec nesl hydroxylovou skupinu, protože pouze na tyto konce je umožněno nasednutí DNA polymerázy (O'Connor a kol., 1989). Oprava jednostranných zlomů se uskutečňuje DNA polymerázou, jejímž úkolem je inkorporace nových nukleotidů do DNA. Tento krok závisí na tom, jestli se syntetizuje a inkorporuje do DNA pouze 1 nukleotid nebo 2 až 13 nukleotidů. Na základě toho BER rozdělujeme na dvě dráhy, krátkou a dlouhou (Fortini a kol., 2007).

Krátká opravná dráha probíhá mnohem častěji (80 - 90 % všech BER). V této dráze do zlomu v DNA vnáší nukleotidy dle komplementarity bází DNA polymeráza β. K úspěšné ligaci polynukleotidových konců slouží DNA ligáza I nebo DNA ligáza III. Do oprav poškození způsobených ionizujícím zářením nebo alkylujícími látkami se zapojuje sekundární protein (XRCC1). U dlouhé opravné dráhy jsou nové nukleotidy inkorporovány do DNA pomocí DNA polymerázy β nebo γ a ve zvláštních případech spolu s proteiny PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) a FEN1 (Flap Structure - Specific Endonuclease 1). Ligaci polynukleotidových konců zajišťuje pouze DNA ligáza I (Caldecott, 2003).

Obr. 6: Průběh báze excizní opravy DNA (převzato a upraveno Tudek a kol., 2006)



APE 1 ó AP endonukleáza 1, Pol ó polymeráza, XRCC1 - X-Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cells 1, FEN1 - Flap Structure-Specific Endonuclease 1, PCNA - Proliferating Cell Nuclear Antigen

3.2.3 Nukleotidová excizní oprava

Významnou roli hraje nukleotidová excizní oprava (NER) v případě poškození DNA ultrafialovým zářením, chemickými mutageny nebo sloučeninami, které se kovalentně váží do molekuly DNA (Leibeling a kol., 2006). Podobně jako u BER je mechanismus opravy tvořen více po sobě následujícími kroky. U savců tento systém vyžaduje 30 různých proteinů, u prokaryotických organismů stačí jen tři proteiny (Truglio a kol., 2006). NER mechanismus se rozděluje do pěti základních kroků schematicky znázorněných na Obr. 7.

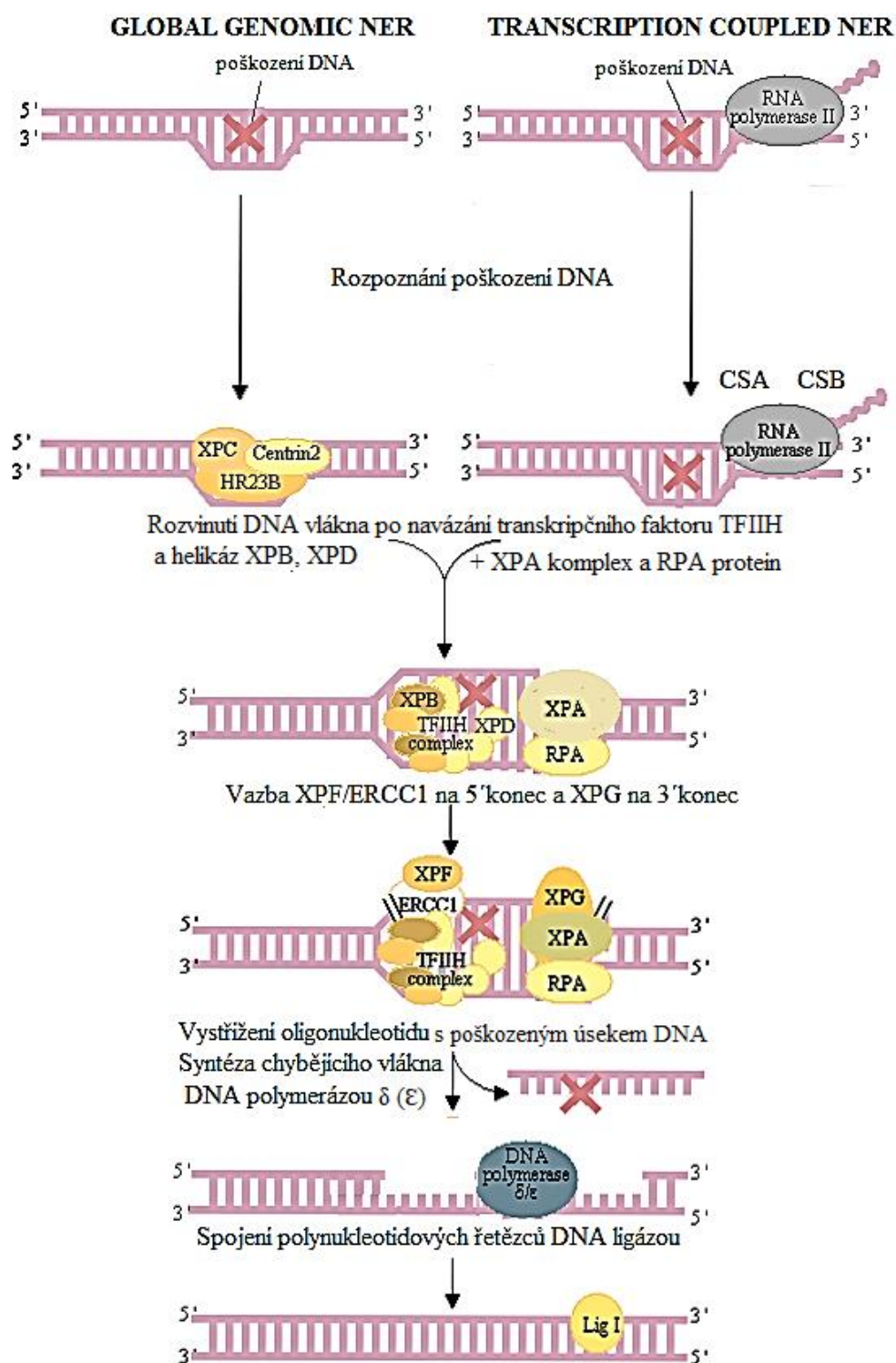
Rozlišíme dvě velmi si podobné opravné dráhy, tzv. genomová NER (Global Genomic NER, GG-NER), která odstraňuje poškození po celé délce genomu, a NER spojená s transkripcí (Transcription Coupled NER, TC-NER), která především opravuje transkribovaná místa DNA na kódujících třetech. Obě dráhy jsou identické s výjimkou odlišného způsobu rozpoznání poškození. V případě GG-NER jsou chyby ve struktuře DNA detekovány proteinovým komplexem XPC (Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group C) (Sugasawa a kol., 1998). HR23B (Rad23 homolog B) a CEN2 (Centrin-2) jsou předatné proteiny, které zvyšují afinitu skupiny proteinů xeroderma pigmentosum (XP)

k místu poškození (Sugasawa, 2008). TC-NER se spouští během epizody DNA do mRNA, v místě poškození se zastaví RNA polymeráza II (Fousteri a kol., 2008), která je specifickými proteiny Cockaynova syndromu A (CSA) nebo B (CSB) odstraněna z DNA (Hanawalt a kol., 2008). Po rozpoznání poškození, následně pomocí XPC nebo CSA (CSB) komplexu, se na poškozené místo váže transkripční faktor TFIIH (Transcription factor II Human). S tímto faktorem asociují helikázy XPB a XPD, jejichž úkolem je rozvinout od sebe vlákna DNA o délce až 30 nukleotidů v místě poškozeného místa. Rozvolněná vlákna DNA umožní vazbu XPA komplexu do poškozeného místa, což představuje další stupeň rozpoznání poškození. Součástí XPA se váže replikační protein A (RPA), který od sebe úplně odvíjí vlákna DNA v místě poškození. V dalším kroku se na 3' konec od místa poškození váže endonukleáza XPG (Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group G) a na 5' konec od poškození endonukleáza XPF (Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group F) s proteinem ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementing Group-1) (Matsunga a kol., 1996). Výsledkem je vystříhání oligonukleotidu dlouhého 24 až 30 nukleotidů obsahujícího poškozený úsek DNA. Nepoškozené vlákno používá DNA polymeráza nebo jako šablónu na syntézu vystříhaného vlákna. Posledním krokem NER je spojení polynukleotidových konců DNA ligázou (Hanawalt, 2000).

Chyby v NER dráze se spojují nejméně s dvěma syndromy - xeroderma pigmentosum, Cockaynov syndrom a trichotiodystrofií (Thoms a kol., 2007). Pacienti s těmito nemocemi jsou vysoce citliví na sluneční záření, a proto se u nich v dětství vyvíjí kožní onemocnění. K dalším symptomům patří imunologické potíže, neurodegenerace a často trpí i stavovou retardací nebo předčasným stárnutím (Vermeulen a kol., 1997).

Xeroderma pigmentosum je nemoc způsobená mutací jednoho ze sedmi genů *XPA* a *XPG* (Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group A - G), které kódují proteiny důležité pro přímou nukleotidovou excizní opravu (Wood, 1999). Buď pacient s mutací v něm, kterým z těchto genů nejsou schopny využívat NER opravnou dráhu a v brzkém věku (cca 10 let) se u nich mohou projevit první symptomy rakoviny kůže (Thoms a kol., 2007). Mutace *CSA* nebo *CSB* genů jsou příčinou Cockaynova syndromu. Pacienti trpí trpasličím vzrůstem, kognitivními poruchami, může se u nich objevit předčasný zákal nebo refrakční vady očí jako krátkozrakost, dalekozrakost, astigmatismus (Thoms a kol., 2007). Trichotiodystrofií není spojena s rakovinou kůže a u dětí vznikla mutací genu *XPB* nebo *XPD*. Pacienti mají křehké vlasy a nehty, jsou malého vzrůstu a citliví na sluneční paprsky (Thoms a kol., 2007).

Obr. 7: Průběh nukleotidové excizní opravy DNA (převzato a upraveno Yano a kol., 2004)



XPC - Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group C, HR23B - UV excision repair protein RAD23 homolog B, CSA (CSB) - Cockayne syndrome A (B), XPA (B, D, F, G) - Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group A (B, D, F, G), RPA - Replication protein A, TFIIH complex - Transcription factor II Human, Lig I - DNA ligáza I

3.2.4 Oprava chybného párování bází

Nesprávně spárované báze jsou opravovány mechanismem DNA mismatch repair (MMR). MMR systém reaguje na vzniklé inserce a delece, které mohou být generovány během replikace repetitivních sekvencí DNA, tzv. sklouznutím DNA (šlippage mechanismus). Takové defekty v DNA se vyznačují mikrosatelitovou nestabilitou a zvýšenou frekvencí mutací (Peltomaki, 2001). MMR je proces rozdělený do tří základních kroků, na kterých se podílí v určitém množství proteinů (Hoeijmakers, 2001), na Obr. 8 jsou jednotlivé kroky znázorněny.

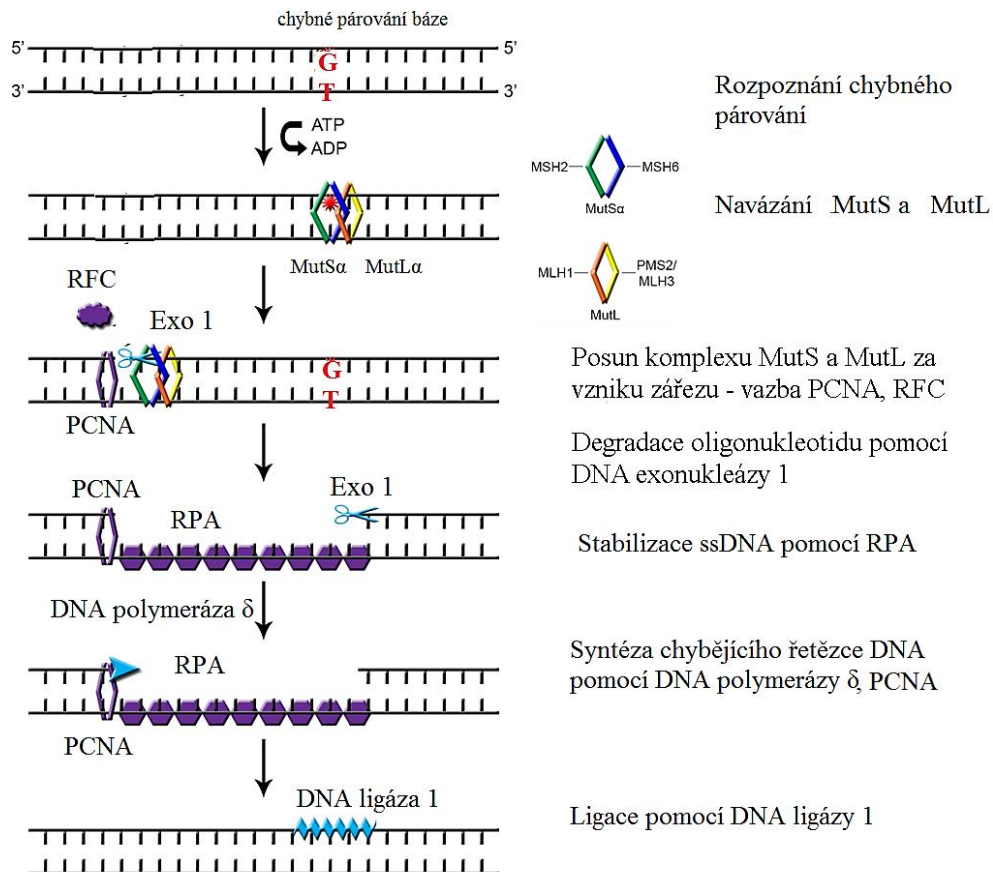
Na základě podrobně prostudované MMR u bakterie *Escherichia coli* je odvozen i princip MMR u eukaryotních organismů. V určitém množství proteinů se této opravě je charakterizována na základě podobnosti s proteiny u MMR *E. coli*.

V lidských buňkách jsou k dispozici na detekování chybně spárovaných bází dva heterodimerní komplexy skládající se ze dvou MutS homologů (MSH) (Modrich, 2006). Heterodimer MutS složený z monomerů MSH2 (MutS Homolog 2) a MSH6 (MutS Homolog 6) rozpoznává substituované báze a inserce/delece u jednoho, maximálně dvou nukleotidů na vláknech DNA (Acharya a kol., 1996). Zatímco heterodimer MutS tvořený monomery MSH2 a MSH3 (MutS Homolog 3) nedetekuje báze substituované, ale pouze inserce/delece u 2 až 10 nukleotidů (Palombo a kol., 1996). S MutS homologem komunikuje heterodimer MutL (mutator L) složený z MLH1 (MutL Homolog 1) a PMS2 (PMS1 Homolog 2), který přivádí do místa poškození reparační proteiny (Kunkel a kol., 2005). MutS-MutL komplex se na DNA posouvá z místa poškození do té doby, až na opačném vlákně udělá zásek. Na vzniklý zásek se váží kofaktory PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) a RFC (Replication factor C), je-li jsou ve spojení s podjednotkami MSH2 a MLH1 (Umar a kol., 1996). Na takto označené místo se naváže DNA exonukleáza 1 (Exo1), která odstraní oligonukleotidy od místa záseku k detekovanému poškození (exonukleázová aktivita 5' → 3') (Galio a kol., 1999). Rozsáhlá mezera vzniklá na opačném vlákně DNA se syntetizuje pomocí templátové DNA stabilizované proteinem RPA (replication protein A), DNA polymerázou a PCNA. Posledním krokem MMR je ligace polynukleotidových konců pomocí DNA ligázy I.

Chyby v MMR opravě jsou spojeny s nestabilitou celého genomu, projevem predispozice k některým typům rakoviny (včetně dědičného nepolypózního kolorektálního karcinomu) a buňky se stávají rezistentní vůči některým chemoterapeutickým látkám. Mutace v genech *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*, které se účastní MMR opravy, mohou vést k propuknutí Lynchova syndromu (HNPCC, hereditary non-polyposis colorectal cancer)

(www.genecards.org). U pacientů s těmito mutacemi poměrně brzy propukne rakovina tlustého střeva (Peltomaki, 2001). S menší četností se vyskytují mutace v genech *PMS1* (*PMS1* Homolog 1, Mismatch Repair System Component), *MLH3* (MutL Homolog 3) a *Exo1* (Vasen a kol., 2007).

Obr. 8: Průběh opravy chybného párování bází (převzato a upraveno Bridge a kol., 2014)



PCNA - Proliferating Cell Nuclear Antigen, RPA - Replication protein A, Exo 1 - DNA exonukleáza 1, G - guanin, T - thymin, ATP - adenosintrifosfát, ADP - adenosindifosfát, RFC - replication factor C, MSH2 - MutS Homolog 2, MSH6 - MutS Homolog 6, MSH3 - MutS Homolog 3

3.2.5 Oprava dvou et zcových zlom

Biologicky nejnebezpečnějším poškozením DNA jsou dvou et zcové zlomy, kdy pouhý jeden neopravený zlom může propuknout v buněčnou smrt nebo apoptózu. Nepřesné opravy zlomů způsobují delece nebo chromozomální aberace, které aktivováním protoonkogenů nebo inaktivací tumor supresorových genů buněk vedou ke vzniku nádorového bujení (karcinogenezi). Pro přežití buněk a udržení integrity genomu se vyžaduje správná a přesná oprava dvou et zcových zlomů (Khanna a kol., 2001).

Rozli-ujeme dva repara ní mechanizmy DSB ó homologní rekombinace (HR) a nehomologní spojování konc (NHEJ). Bakterie, kvasinky a jen 10 % sav ích bun k k oprav dvou et zcových zlom uflívá homologní rekombinaci. Homologní rekombinace je mnohem p esn j-í nefl NHEJ, vyufflívá templátu - sesterská chromatida nebo homologní chromozom, podle kterého jsou opraveny DSB (Li X a kol., 2008). HR probíhá b hem S a G2 fáze bun ného cyklu. Výsledkem homologní rekombinace m fle být genová konverze nebo crossing over. Více nefl 90 % sav ích bun k se zlomy v DNA je reparováno mechanismem nehomologního spojování konc . Na rozdíl od HR je NHEJ náchyln j-í k chybám, m fle prob hnout b hem jakékoli fáze bun ného cyklu a reparuje zlomy p ímou ligací volných konc (Johnson a kol., 2000).

3.2.5.1 Homologní rekombinace

Homologní rekombinace (HR) spo ívá v resyntéze DNA v míst zlomu pomocí templátu - sesterská chromatida nebo homologní chromozom (Kanaar a kol. 1997). V sav ích bu kách HR probíhá mén ásto a rozdluje se do t í základních krok : presynapse, synapse a postsynapse (Obr. 9).

Homologní rekombinace je v presynaptické fázi nastartována navázáním MRN komplexu na oba konce v míst DSB (Stracker a kol., 2011). Komplex je slofen ze t í významných regulátor - Mre11 (Meiotic Recombination 11), NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome 1) a Rad50 (RAD50 Homolog, Double Strand Break Repair Protein) (Jackson a kol., 2002). Nukleázov aktivní podjednotka Mre11 spole n s RBBP8 (Retinoblastoma Binding Protein 8) hydrolyzuje na 5' konci od místa zlomu fosfodiesterovou vazbu a formuje jedno et zcové pesahy (tzv. resekce ve sm ru 5' 3'). Tvorb pesah se v nuje i BLM helikáza (Bloom syndrome, RecQ helicase-like) a Exo1 (Symington a kol., 2011), které potom stabilizuje RPA protein. Na ssDNA pesazích je tento RPA protein nahrazen proteinem Rad51, který zde vytvá í presynaptické nukleoproteinové vlákno (Khanna a kol., 2001). Na intracelulárním transportu a funkci Rad51 se podílí proteiny BRCA1 (Breast Cancer 1) a BRCA2 (Breast Cancer 2) (Connora kol., 1997). Mutace v genech (*BRCA1 a BRCA2*) zvy-ují riziko vzniku rakoviny prsu, vaje ník , prostaty a slinivky (Rahman a kol., 1998).

V pr b hu synapse se vlákno páruje s homologním duplexem a je moflná vým na DNA mezi templátem a nukleoproteinovým vláknem za vzniku D-smy ky (Heyer a kol., 2010).

V postsynaptické fázi se syntetizuje DNA od 3' konce pomocí DNA polymerázy a následuje postupné ligování et zc DNA ligázou I. Druhý konec DSB je zarovnan podle

D-smýky a tvoří se tzv. Hollidayovy spoje (McIlwraith a kol., 2005). Enzym resolváza separuje rekombinantní molekuly DNA tak, aby dojde k výměně genetické informace mezi nesesterskými chromatidami a crossing over (Modesti a kol., 2001) nebo probíhá pouze genová konverze (non-crossing over) (Johnson a kol., 2000).

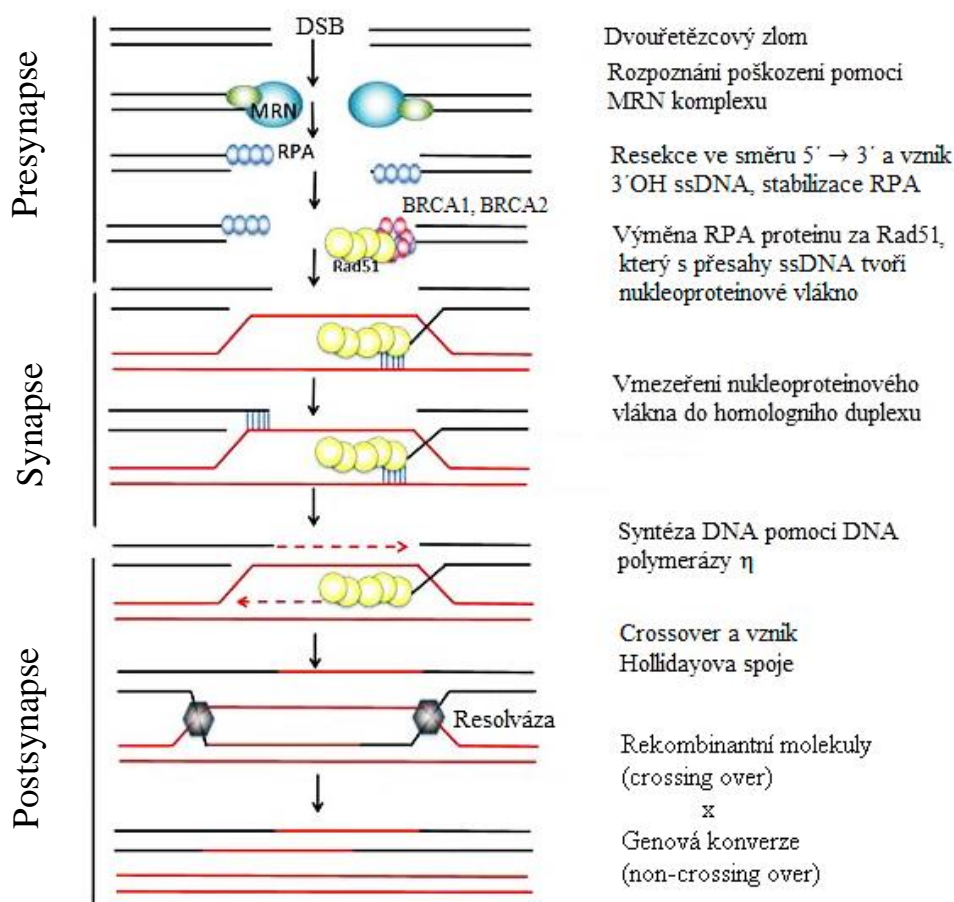
Mutagenese genů kódujících proteiny a podílejících se na opravě DSB vede k celé řadě onemocnění. Se zmíněným MRN komplexem interaguje ATM protein, který se díky této vazbě dostává do místa zlomu a aktivuje se. ATM spouští signální kaskádu, kterou se minimalizují následky poškození. Instrukce pro tvorbu ATM proteinu nese gen *ATM* (ATM Serine/Threonine Kinase), který se za normální situace účastní regulace buněného cyklu. U řady zmíněných mutací genu *ATM* vede k dědičnému onemocnění ataxia telangiectasia (Lavin a kol., 2007). U pacientů se projevuje neschopnost koordinovat pohyby (ataxie) a teleangiektázie se odkazuje na výskyt rozšíření malých cév. Byla prokázána degenerace neuronů, konkrétně ztráta Purkyňových buněk v mozku. U těchto pacientů vznikají zhoubné nádory, včetně lymfoidní leukémie a karcinomu prsu. Léčba je velmi obtížná, protože pacienti trpí velkou citlivostí na chemoterapeutika a ionizující záření (Schalch a kol., 1970; Bar a kol., 1978).

Mutace genu *NBS1* způsobuje Nijmegen v syndrom. Pacienti trpící touto nemocí mají charakteristický vzhled obličeje s postupujícím edémem a dolními edémy, mají velké uši a řídké vlasy, trpí mikrocefalií a pomalým růstem (Carney a kol., 1998). Kromě mutace byl u pacientů zaznamenán i nedostatek proteinu RAD50 (kódovaný genem *RAD50*), který se stejně jako NBS1 rozpoznává zlomy v DNA (Walters a kol., 2009).

ATLD (Ataxia-telangiectasia like disorder) vzniká mutací lidského genu *MRE11* (Meiotic Recombination 11 Homolog A), jehož produkt se účastní opravy DSB mechanismem HR (Taylor a kol., 2004; www.genecards.org). Jedná se o mírnější formu onemocnění ataxia telangiectasia, u které pokračává degenerace neuronů a vysoká citlivost k ionizujícímu záření. Pacienti ve své genetické výbavě nesou predispozice k rakovině nebo ataxii telangiectasii (Stewart a kol., 1999).

ATR (Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein) je gen velmi blízký *ATM* a společně jsou aktivovány poškozením DNA, kódují kinázy s funkcí v odpovědi na poškození DNA (Majewski a kol., 1982). Mutací genu *ATR* vzniká Seckelův syndrom. Roku 1960 byl poprvé popsán jako prvotní forma trpasličtství (Seckel, 1960) a jeho znaky tohoto onemocnění patří mikrocefalie, mentální retardace, citlivost na ultrafialové záření a charakteristické obličejové rysy (O'Driscoll a kol., 2007).

Obr. 9: Průběh homologní rekombinace (převzato a upraveno Rass a kol., 2012)



DSB – Double Strand Break, ssDNA – jednořetězcová DNA, MRN – Mre11-Rad50-Nbs1 complex, RPA – Replication Protein A, BRCA1 (2) – Breast Cancer 1 (2)

3.2.5.2 Nehomologní spojování konc

V tělních buňkách savců je oprava DSB mechanismem nehomologního spojování konc (NHEJ) (Liang a kol., 1998). Na rozdíl od HR systém NHEJ nevyžaduje homologní templát, a proto může probíhat ve všech fázích buněčného cyklu. Obecný mechanismus této opravy se rozděluje do několika základních kroků (Obr. 10).

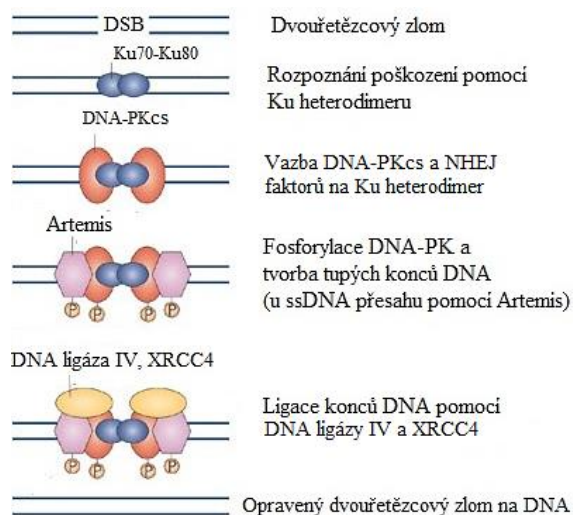
NHEJ proces je zahájen vazbou Ku proteinu na volné konce DNA v místě dvouřetězcového zlomu (Cary a kol., 1997). Ku protein je heterodimer složený ze dvou polypeptidů Ku70 a Ku80. Krystalografické studie prokázaly, že Ku heterodimer vytváří kolem volných konců DNA prstencovitou strukturu, která umožňuje jeho pohyb po vlákně DNA (Walker a kol., 2001). Na DNA-Ku komplex se váže katalytická podjednotka (DNA-PKcs) DNA-dependentní protein kinázy (DNA-PK) (Gottlieb a kol., 1993). DNA-PKcs se fosforyluje a váže nukleázu Artemis, která řezá jednovláknové přesahy ve směru 5' → 3' (Chapell a kol., 2002). Volné konce DNA musí mít formu tupého zakončení, pouze takové se mohou spojit (Bernstein a kol., 2005). Ku heterodimer slouží jako

šmolekulární le-eníõ, na které se váflou dal-í proteiny ú astníci se reparace DSB. Do místa po-kození se takto p ipojují dal-í NHEJ faktory ó XRCC4 (X-ray cross complementing protein 4), DNA ligáza IV, XLF (XRCC4-like factor) a APLF (Aprataxin-and-PNK-like factor) (Mahajan a kol., 1999). Po adí p ipojení NHEJ faktor je flexibilní v závislosti na komplikovanosti po-kození DNA (s výjimkou Ku heterodimeru).

Po úprav konc DNA jsou polynukleotidové et zce DNA ligovány k sob pomocí protein XRCC4 a DNA ligázy IV (Grawunder a kol., 1997). Samotné spojení konc má na starost pouze DNA ligáza IV a protein XRCC4 spoj stabilizuje a reguluje (Critchlow a kol., 1997).

Mutace genu *PRKDC*, který kóduje katalytickou podjednotku DNA-dependentní protein kinázy DNA-PKcs, vede k t flké kombinované imunodeficienci (radiosensitive severe combined immunodeficiency, RS-SCID) (Siple a kol., 1995). Pacienti mají naru-enou p irozenou i adaptivní imunitu a bez lé by brzy umírají (cca do 1 roku) (Burg a kol., 2009). Lidský protein XLF/Cernunnos kódovaný genem *NHEJ1* se zapojuje do ligování et zc DNA a jeho defekty generují nemoci s typickými nervovými poruchami, imundeficiencí a zvý-enou citlivostí na ionizující zá ení (Buck a kol., 2006).

Obr. 10: Mechanismus opravy dvou t zcových zlom ó nehomologní spojování konc NHEJ (p evzato a upraveno Misteli a kol., 2009)



DSB ó Double Strand Break, ssDNA ó jedno et zcová DNA, DNA-PK ó DNA-dependent protein kinase, XRCC4 - X-ray cross complementing protein 4

3.3 Ribozomy, ribozomální stres a ribozomopatie

Ve všech živých buňkách jsou přítomné ribozomy, které jsou zodpovědné za syntézu proteinů. Na jejich povrchu probíhá translace - překlad genetické informace z pořadí nukleotidů mediátorové RNA (mRNA) do pořadí aminokyselin odpovídajícího proteinu. Rozlišíme prokaryotické ribozomy (70S) a v eukaryotické ribozomy (80S), které se skládají ze dvou podjednotek - malá podjednotka (40S) a velká podjednotka (60S). Ribozomy jsou komplexy složené z ribozomální RNA (rRNA) a ribozomálních proteinů (RP). Malá ribozomální podjednotka (40S) obsahuje jednu rRNA (18S), 33 ribozomálních proteinů a velká podjednotka (60S) je složená ze tří rRNA (25S; 5,8S a 5S) a 50 ribozomálních proteinů (Wool, 1979). Ribozomální proteiny tvořící malou ribozomální podjednotku jsou označovány RPS (Ribosomal Protein Small) a k známým zástupcům z hlediska významu u lidských onemocnění patří RPS7, RPS19 a RPS26. Velká ribozomální podjednotka zahrnuje ribozomální proteiny, které se značí RPL (Ribosomal Protein Large) a v rámci ribozomálního stresu se nejčastěji diskutují RPL5, RPL11, RPL23 a RPL26 (Politz a kol., 2005).

Hlavním místem syntézy ribozomů je jadérko, což je jaderný prostor s tandemovými kopiemi genů pro rRNA. V jadérku RNA polymeráza I transkribuje 28S rRNA; 5,8S rRNA a 18S rRNA ve formě prekurzorového transkriptu 47S rRNA. V jádře se pak děje se 5S rRNA pomocí RNA polymerázy III (Leary a kol., 2001). Transkribovaná 5S rRNA interaguje s ribozomálními proteiny RPL5 a RPL11, které umožňují její přenos do jadérka, kde společně s 47S rRNA tvoří prvotní jednotku ribozomu o velikosti 90S (Tschochner a kol., 2003). 90S jednotka se po interakci s ribozomálními proteiny rozděluje na 18S rRNA, která tvoří pre-40S a 5,8S; 28S a 5S za vzniku pre-60S (Vennem a kol., 1999). Prekurzorové ribozomální podjednotky 40S a 60S jsou pomocí exportinů (NMD3 Ribosome Export Adaptor, CRM1 Chromosomal Maintenance 1) transportovány do cytoplazmy, kde dochází k posledním úpravám, aby na nich mohla probíhat translace (Panse a kol., 2010).

Biosyntéza ribozomů je velmi energeticky náročný proces, který je kontrolován tumor supresorovým proteinem p53 (Lane, 1992). Za normálních podmínek se nachází v buňce nízká hladina proteinu p53, kterou udržuje onkoprotein MDM2 (murine and human double minute 2). Vazba MDM2 na p53 vede k jeho degradaci v proteozomu (Itahana a kol., 2007) (viz Obr. 11 A). Funkční domény proteinu MDM2 (E3 ubikvitin ligázy), který je složený ze 491 aminokyselin, regulují proces degradace. Na N-konci MDM2 je p53 vazebná doména, jejími prostřednictvím se MDM2 váže k transaktivní doméně proteinu p53. Na karboxylovém konci (C-konec) je RING finger doména zodpovědná za ubikvitinaci

p ebyte něho proteinu p53. Na procesu degradace p53 se podílí i centrální kyselá a Zn finger doména, která v p ípad vazby ribozomálních protein (RPL5, RPL11) zodpovídá za zvý-ení množství a stabilizaci p53 v bu ce, nikoliv za jeho degradaci (Manfredi a kol., 2010). Naru-ení biogeneze ribozom je hlavní p íinou tzv. ribozomálního stresu bun k. Bun ný stres má za následek p eru-ení transkripce rRNA a strukturní zm ny v jadérku. Bun né stresory jsou chemické slou eniny (aktinomycin D), UV zá ení, tepelný šok, hypoxie a poškození DNA. Indukováním ribozomálního stresu se na MDM2 váflou volné ribozomální proteiny a inhibují jeho ubikvitinázovou aktivitu, čímž se stabilizuje p53 v bu ce a nedochází k jeho degradování (Vogelstein a kol., 2000). Hlavními ribozomálními proteiny regulujícími p53 signální dráhu v pr b hu ribozomálního stresu jsou RPL5 a RPL11. Jejich interakce s centrální doménou MDM2 zp sobuje inhibici ubikvitinace, tím pádem se p53 stabilizuje a aktivuje ochranu bu ky (Fumagalli a kol., 2012) (viz Obr. 11 B). Na základ této signální dráhy se potvrzuje esenciální role jadérka v adaptaci na ribozomální stres. Proteiny RPL5 a RPL11 jsou p í ribozomálním stresu chrán ny p ed degradací v proteazomu, oproti ostatním RP, které se váflou na MDM2, nap . RPL23 a RPL25 (Bursac a kol., 2012). Bun nou odpovídá na ribozomální stres je zmín ná aktivace p53 signální dráhy, která spou-tí transkripci cílových gen (transaktivace). Transaktivované geny sm ují p edevším k zastavení bun něho cyklu, cofl bu ce poskytne dostatek asu na opravu DNA (Lindström a kol., 2009; Vousden a kol., 2007). Pokud ovšem oprava není možná, mohou tyto geny navést bu ky do apoptózy, k diferenciaci (Liu a kol., 2) nebo do senescence (Drygin a kol., 2009). Pro každý organismus je naprosto nezbytná bezchybná biogeneze ribozom , ale i p esto se lze setkat s adou genových mutací, jejichž produkty se podílí na tvorb ribozom . Ne všechny chyby v syntéze ribozom musí být viditelné jen ve struktu e jadérka, ale defekty lze pozorovat i v transportu ribozomálních podjednotek.

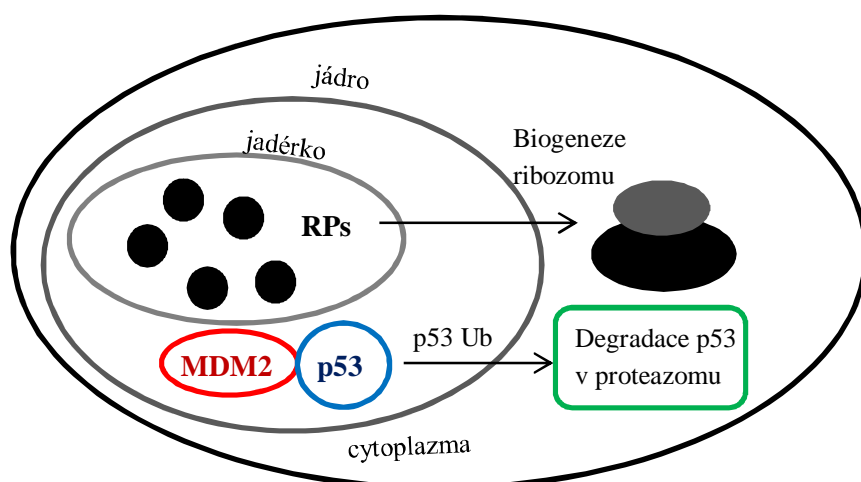
Ribozomopatií se ozna uje skupina patologických stav s defekty v biogenezi ribozom (James a kol., 2014). Mutacemi v RP genech se snižuje počet funk ních ribozomálních protein , čímž se naru-uje zpracování pre-rRNA a následkem je neúsp -né sestavení nových ribozom (Gazda a kol., 2004). Modelovým zástupcem ribozomopatií se stalo vzácné onemocnění, kterým trpí z milionu fliv narozených d tí každé páté ó Diamond-Blackfanova anémie (DBA). V roce 1936 byla popsána jako d tská anémie a pozd ji ji Diamond s Blackfanem definovali jako vrozenou hypoplastickou anémií (Diamond a Blackfan, 1938). DBA je syndrom projevující se anémií a fyzickými vadami (Halperin a kol., 1989; Vlachos a kol., 2012). U pacient s DBA byly objeveny n které mutace i delece gen kódujících ribozomální proteiny (RPS i RPL). Mutace v ribozomálních

genech *RPS17* (Cmejla a kol., 2007), *RPS19* (Da Costa a kol., 2003) a *RPS24* (Gazda a kol., 2006) byly identifikovány p iblifn u jedné t etiny pacient , p i emfl nej ast j-í je mutace genu *RPS19*, který kóduje d leflitý protein malé ribozomální podjednotky eukaryot (40S) (Draptchinskaia a kol., 1999). V roce 2008 Gazda s kol. identifikovali u dal-ích pacient DBA mutace v genech *RPL5* a *RPL11*. Oba proteiny se p i vzniku ribozom váflou na 5S rRNA a transportují jej do jádérka. Fenotypové projevy ribozomopatií jsou odli-né, ale společným znakem je aktivace proteinu p53 (Jones a kol., 2008). DBA se u lidí asto diagnostikuje ufl v pr b hu prvního roku flivota (bledost a letargie). Ke klinickým p íznak m pat í anémie, chudokrevnost, nízký počet retikulocyt , makrocytárních erytrocyt a zvý-ená exprese fetálního hemoglobinu (Fargo a kol., 2013). Postifení jedinci jsou malého vzr stu s astými vadami o í, srdce, vnit ních orgán a kon etin. Pacienti s mutacemi v genu *RPL5* mají roz-t p patra nebo rtu, zatímco u pacient s mutacemi ve zmín ném genu *RPL11* se vyskytují abnormální palce. Tyto deformace v-ak nebyly pozorovány u jedinc nesoucí mutace v *RPS19* (Gazda et al., 2008). Sou asná terapie DBA spo ívá v podávání steroid , transfúzích krve a doposud nejú inn j-í lé bou je transplantace kostní d en (Vlachos a kol., 2001).

K dal-ím ribozomopatiím krom DBA pat í Schwachman-Diamond v syndrom, kongenitální dyskeratóza, syndrom hypoplastických chrupavek a vlas , Treacher-Collins v syndrom a myelodysplastický syndrom s izolovanou delecí 5q.

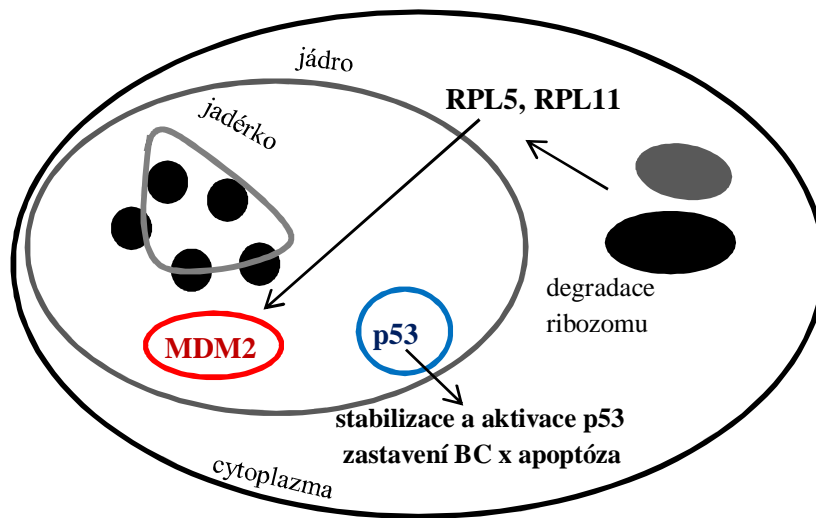
Obr. 11: Regulace p53 signální dráhy (p evzato a upraveno James a kol., 2016)

A) Za normálních podmínek



MDM2 ó murine and human double minute 2, p53 ó protein p53, Ub ó ubikvitinace, RPs ó ribozomální proteiny

B) B hem ribozomálního stresu



MDM2 ó murine and human double minute 2, p53 ó protein p53, RPL5 ó ribosomal protein large 5, RPL11 ó ribosomal protein large 11, BC ó bun ný cyklus

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Bakterie *Escherichia coli*, kmen DH5 (genotyp: *F* - *80lacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk -, mk +) phoA supE44 -thi -1 gyrA96 relA1*) a bakterie XL1-Blue Supercompetent cells (genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ M15 Tn10 (Tetr)]*) byly poskytnuty ze sbírky bakteriálních konzerv Mgr. Natálie Táborské (ÚMTM).

Buňky linie lidských fibroblast MRC5 byly získány z banky buněk kultur Laboratoře tkáňových kultur (ÚMTM). Buňky byly inkubovány při 37 °C a 5% CO₂ v kultivačním médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) + 10% fetálního bovinního sérum + 1x penicilin/streptomycinová směs.

4.2 Klonování genů *RPL5* a *RPL11*

Prvním krokem experimentální části této práce bylo klonování vybraných lidských genů pro ribozomální proteiny (*RPL5* a *RPL11*).

4.2.1 Amplifikace genů *RPL5* a *RPL11*

Amplifikace lidských genů (*RPL5* a *RPL11*) z cDNA byla provedena pomocí polymerázové řetězové reakce za použití primerů uvedených v Tab. 2. Primery pocházely z knihovny Mgr. Natálie Táborské (ÚMTM). Jako templát byla použita cDNA izolovaná z MRC5 lidských buněk, která byla poskytnuta z knihovny Mgr. Hanuše Slávika (ÚMTM). Příprava PCR reakční směsi je uvedena v Tab. 3 a podmínky pro amplifikaci v Tab. 4.

Tab. 2: Sekvence primerů na amplifikaci genů *RPL5* a *RPL11* z cDNA

Název primeru	5' - sekvence 3'
RPL5_WT_cDNA_FP	CGGTCTCTGTTCCGCAGGAT
RPL5_WT_cDNA_RP	AATTGCTGGGTTTAGCTCTCAG
RPL11_WT_cDNA_FP	ATCATGGCGCAGGATCAAGG
RPL11_WT_cDNA_RP	GCTCTTTTGGATAGAAACGGGA

RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, WT ó wild type, cDNA ó komplementární DNA, FP ó forward primer, RP ó reverse primer

Tab. 3: Reakční směs na amplifikaci genů *RPL5* a *RPL11* z cDNA (1 reakce = 20 μl)

Reagencie	Objem (μl)
10x DNA polymerázový reakční pufr	2
10μM RPL5_WT_cDNA_FP/RPL5_WT_cDNA_FP	1
10μM RPL11_WT_cDNA_RP/RPL11_WT_cDNA_RP	1
10mM dNTP	0,4
5 U/μl <i>Taq</i> DNA polymeráza	0,4
MgCl ₂	1,6
H ₂ O	11,6
DMSO	1
templátová cDNA	1

RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, WT ó wild type, FP ó forward primer, RP ó reverse primer, dNTP - směs deoxyribonukleotidů, cDNA - komplementární DNA (c = 100 ng/μl), DMSO - dimethylsulfoxid

Tab. 4: Podmínky amplifikace *RPL5* a *RPL11* genů z cDNA

Teplota (°C)	čas	Opakování
95	5 minut	
95	30 sekund	35x
58	30 sekund	
72	1 minuta	
72	5 minut	
4	Ó	

PCR produkty byly rozdělány elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu (TBE pufr) během 1 hodiny při 120 V stejnosměrného napětí za účelem kontroly přítomnosti a velikosti PCR produktů. Amplikony byly čištěny pomocí PCR Purification Kit, Qiagen (Postup 1). Koncentrace čistých amplikonů byla změněna fluorimetricky.

Postup 1: Čištění PCR produktu (PCR Purification Kit, Qiagen)

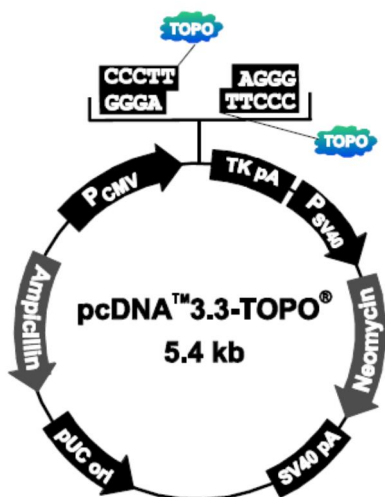
1. K PCR produktu (20 μl) byl přidán 5x objem PBI pufru (100 μl).
2. Směs byla aplikována na kolonu a stožena (1 minuta/12 000 rcf).
3. Stožený obsah byl odstraněn a na kolonu bylo přidáno 750 μl PE pufru. Následovala centrifugace (1 minuta/12 000 rcf).

4. Stořený obsah byl opět odstraněn a kolona byla znovu stořena (vysušení).
5. DNA byla eluována do 20 μ l destilované vody. Minutu se nechala kolona stát a potom byla centrifugována (1 minuta/12 000 rcf).
6. Koncentrace eluované DNA byla změněna pomocí Qubit fluorometru.

4.2.2 Klonování genu do pcDNATM 3.3-TOPO plazmidu a transformace kompetentních buněk *E. coli*

PCR produkty byly klonovány do pcDNATM3.3-TOPO vektoru pomocí pcDNATM3.3-TOPO Cloning Kit (Thermo Fischer Scientific). Schéma vybraného vektoru je na Obr. 12. Pro každý vzorek (gen *RPL5* a *RPL11*) byla připravena klonovací směs do 0,2ml mikrozkušavky smícháním 4 μ l daného PCR produktu, 1 μ l roztoku solí a 1 μ l TOPO vektoru. Klonovací směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě a umístěna na led.

Obr. 12: Schéma pcDNATM 3.3-TOPO vektoru



Rekombinantní plazmid pcDNATM3.3-TOPO byl použit k transformaci kompetentních bakteriálních buněk (*E. coli*, kmen DH5) pomocí metody teplotního šoku (Postup 2).

Postup 2: Transformace bakterií *E. coli* teplotním šokem

1. 50 μ l zásobní suspenze kompetentních bakterií (*E. coli*, kmen DH5) bylo rozmrazeno na ledu.
2. K bakteriím byly přidány 2 μ l klonovací směsi. Reakční směs byla pomocí pipety lehce promíchána a 30 minut inkubována na ledu.

3. Následně byla mikrozkušavka umístěna na 30 sekund do termobloku (42 °C). Poté byla mikrozkušavka přenesena na led (inkubace 2 minuty).
4. Do mikrozkušavky bylo přidáno 250 µl LB média a směs byla inkubována za stálého otáčení v 37 °C 1 hodinu.
5. Během inkubace byly připraveny Petriho misky s 20 ml LB média a s příslušným antibiotikem o 20 µl ampicilinu (100 µg/ml).
6. Po inkubaci byla kultura vyseta na připravené Petriho misky.
7. Misky byly inkubovány dnem vzduchu při 37 °C přes noc.

Druhý den byla u narostlých bakteriálních kolonií provedena kontrolní (colony) PCR ke zjištění úspěšnosti transformace bakterií. Jako templát byl použit odpich z bakteriální kolonie, který byl přenesen pipetou do PCR reakční směsi. Příprava reakční směsi je shrnuta v Tab. 5 a specifické podmínky amplifikace v Tab. 4.

PCR produkty byly následně elektroforeticky rozděleny v 1% agarózovém gelu (TBE pufr) během 50 minut při 120 V stejnosměrného napětí za účelem kontroly velikosti a přítomnosti klonovaného inzertu.

Tab. 5: Reakční směs pro kontrolní PCR (1 reakce = 20 µl)

Reagencie	Objem (µl)
10x DNA polymerázový reakční pufr	2
10µM RPL5_WT_cDNA_FP/RPL11_WT_cDNA_FP	1
10µM RPL11_WT_cDNA_RP/RPL11_WT_cDNA_RP	1
10mM dNTP	0,4
5 U/µl <i>Taq</i> DNA polymeráza	0,4
MgCl ₂	1,6
H ₂ O	13,6

RPL o protein velké ribozomální podjednotky, WT o wild type, cDNA o komplementární DNA, FP o forward primer, RP o reverse primer, dNTP - směs deoxyribonukleotid

Pouze z bakteriálních kolonií, u kterých byla potvrzena přítomnost a správná velikost cílového genu, byly připraveny zásobní suspenze bakteriálních buněk (Postup 3).

Postup 3: Příprava zásobních suspenzí bakteriálních buněk

1. Podle počtu pozitivních bakteriálních kolonií bylo připraveno stejné množství 1,5ml mikrozkušavek.

2. Do každé zkumavky byl napipetován 1 ml LB média a 1 μ l ampicilinu (100 μ g/ml).
3. Pomocí pipety byly jednotlivé bakteriální kolonie přeneseny do média.
4. Skúmavky byly inkubovány přes noc při 37 °C za stálého třepání.
5. Následující den bylo k 800 μ l bakteriální suspenzi přidáno 200 μ l glycerolu.
6. Mikrozkušavky byly zvortexovány.
7. Zásobní suspenze bakteriálních buněk byly uskladněny v -80 °C.

Stejně pozitivní kolonie z Petriho misky byly pipetou přeneseny do 100ml Erlenmeyerovy baňky, ve které bylo 50 ml LB média s 50 μ l ampicilinu (100 μ g/ml). Tato bakteriální suspenze byla inkubována za stálého třepání přes noc při 37 °C.

4.2.3 Izolace pcDNATM 3.3-TOPO plazmidu s cílovým genem z bakterií *E. coli*

Z přesné bakteriální suspenze byl izolován pcDNATM3.3-TOPO plazmid nesoucí cílový gen (*RPL5* a *RPL11*) pomocí komerčně dodávaného kitu QIAfilter Plasmid Purification MIDI 100, Qiagen (Postup 4).

Postup 4: Izolace pcDNATM 3.3 TOPO plazmidu s naklonovanou DNA (QIAfilter Plasmid Purification MIDI 100, Qiagen)

1. Přesná kultura bakterií byla centrifugována 15 minut při 6 000 rcf a 4 °C.
2. Supernatant byl odstraněn, peleta byla suspendována ve 4 ml P1 pufru.
3. Byly přidány 4 ml pufru P2, 4 - 6x promícháno převrácením zkumavky a inkubováno 5 minut v pokojové teplotě.
4. Byly přidány 4 ml pufru P3 a celá suspenze byla promíchána převrácením.
5. Následně byl lyzát přenesen na QIAfilter cartridge a 10 minut inkubován v pokojové teplotě.
6. Během inkubace byla QIAGEN-tip ekvilibrována 4 ml QBT pufru.
7. Z QIAfilter cartridge byl lyzát filtrován do ekvilibrované QIAGEN-tip.
8. Následně byla QIAGEN-tip promyta 20 ml QC pufru.
9. DNA byla eluována do 5 ml QF pufru.
10. K eluované DNA bylo přidáno 3,5 ml izopropanolu.
11. DNA s izopropanolem byla rozdělena po 2 ml do čtyř 2ml mikrozkušavek, vzorky byly centrifugovány 30 minut při 4 °C a 15 000 rcf.
12. Supernatant byl odstraněn, peleta plazmidové DNA byla resuspendována v 500 μ l 70% etanolu (pokojová teplota), vzorky byly centrifugovány 10 minut při 4 °C a 15 000 rcf.

13. Supernatant byl odstraněn, peleta byla vysušena v otevřené zkumavce při pokojové teplotě během 10 minut.
14. Plazmidová DNA byla rozpuštěna ve 20 µl destilované vody.
15. Koncentrace izolovaného plazmidu byla změněna spektrofotometricky.

Izolovaný pcDNATM3.3-TOPO plazmid sloužil jako templát v kontrolní PCR (Tab. 6) Podmínky pro amplifikaci byly shodné s Tab. 4. PCR produkty byly separovány agarózovou elektroforézou (TBE pufr) během 50 minut při 120 V stejnosměrného napětí z důvodu kontroly velikosti a přítomnosti klonovaného genu ve vektoru.

Tab. 6: Reakce směs kontrolní PCR izolovaných pcDNATM3.3-TOPO plazmid s cílovým inzertem (1 reakce = 20 µl)

Reagencie	Objem (µl)
10x DNA polymerázový reakční pufr	2
10µM RPL5_WT_cDNA_FP/RPL11_WT_cDNA_FP	1
10µM RPL5_WT_cDNA_RP/RPL11_WT_cDNA_RP	1
10mM dNTP	0,4
5 U/µl <i>Taq</i> DNA polymeráza	0,4
MgCl ₂	1,6
H ₂ O	12,6
izolovaný pcDNA TM 3.3-TOPO plazmid s cílovým genem	1

RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, WT ó wild type, cDNA ó komplementární DNA, FP ó forward primer, RP ó reverse primer, dNTP - směs deoxyribonukleotid

4.3 Cílená mutageneze vybraných gen

Do cílových genů v pcDNATM 3.3-TOPO plazmidu byla vnesena genová mutace pomocí komerčně dodávaného kitu - QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies).

4.3.1 Mutageneze

Pomocí primerů uvedených v Tab. 7 byla v exonu 6 genu *RPL5* provedena cílená genová mutace. U *RPL5* genu byl substituován 680. nukleotid C za G, tato mutace vede při translaci k zaazení argininu (Arg) místo aminokyseliny izoleucin (Ile). Tato mutace má ní smysl polynukleotidového řetězce, tzv. MISSENSE Ile227Arg. Primery cílového genu *RPL11* uvedené v Tab. 7 způsobily v exonu 2 u *RPL11* genu substituci 59. nukleotidu T za A. Tato genová mutace vede při translaci k zaazení leucinu (Leu) místo histidinu (His) a má ní tak

smysl polypeptidového et zce, tzv. MISSENSE Leu20His. Primery navržené pro mutagenezi cílových gen pocházely z knihovny Mgr. Natálie Táborské (ÚMTM). Izolované pcDNATM 3.3-TOPO plazmidy s cílovými geny byly vhodným templátem pro cílenou mutagenezi (Tab. 8, Tab. 9).

Tab. 7: Sekvence primerů na mutagenezi genů *RPL5* a *RPL11*

Název primeru	5' - sekvence a 3'
RPL5_M_cDNA_FP	GAAAAGTTCTCTCAATACAGAAAGAACAGCGTAACTCCAG
RPL5_M_cDNA_RP	CTGGAGTTACGCTGTTCTTTCTGTATTGAGAGAACTGTTTC
RPL11_M_cDNA_FP	CTTCGCATCCGCAAACACTGTCTCAACATCTG
RPL11_M_cDNA_RP	CAGATGTTGAGACAGTGTGTTGCGGATGCGAAG

RPL a protein velké ribozomální podjednotky, M a mutant, cDNA a komplementární DNA, FP a forward primer, RP a reverse primer

Tab. 8: Reakční směs na mutagenezi pcDNATM 3.3-TOPO plazmidu s cílovými inzerty
(1 reakce = 50 µl)

Reagencie	Objem (µl)
10x <i>Pfu</i> ultra II reakční pufr	5
10µM RPL5_M_cDNA_FP/RPL11_M_cDNA_FP	2,5
10µM RPL5_M_cDNA_RP/RPL11_M_cDNA_RP	2,5
10mM dNTP	1
2,5 U/µl <i>Pfu</i> DNA polymeráza	1
H ₂ O	37,5
80 ng pcDNA TM 3.3-TOPO plazmidu s cílovým inzertem	0,5

RPL a protein velké ribozomální podjednotky, M a mutant, cDNA a komplementární DNA, FP a forward primer, RP a reverse primer, dNTP a směs deoxyribonukleotid

Tab. 9: Podmínky cílené mutagenese vybraných gen

Teplota (°C)	as	Opakování
95	30 minuty	
95	30 sekund	30x
58	1 minuta	
72	5,5 minuty*	
72	3 minuty	
4	Ô	

* 5, 5 minuty/ 5,4 kb vektoru pcDNATM3.3-TOPO

K odstranění p vodních molekul DNA byl do každé reakce na mutagenesi přidán 1 µl restrikčního enzymu DpnI (10 U/µl). Směs v mikrozkuhavce byla propipetována a lehce stožena, poté byly vzorky inkubovány 1 hodinu při 37 °C. Enzym DpnI byl tepelně inaktivován 70 °C během 10 minut. Pro kontrolu úspěšné mutagenese DNA byla provedena elektroforetická separace PCR produktu v agarózovém gelu (50 min/120V) a srovnána migrace p vodních plazmidů s inzertou oproti těm, které prošly mutagenesí, a jsou tedy v lineární formě.

4.3.2 Transformace kompetentních bakteriálních buněk XL1-Blue Supercompetent cells

PcDNATM3.3-TOPO vektory byly použity k transformaci kompetentních bakterií *E. coli* XL1-Blue Supercompetent cells (Postup 2). Na zkontrolování úspěšnosti transformace bakterií byla provedena kontrolní (colony) PCR (Tab. 5). Templátem byly bakteriální kolonie přenesené přímo do PCR reakční směsi. Podmínky amplifikace jsou v Tab. 4. Následně byla provedena separace PCR produktu agarózovou elektroforézou (50 minut/120V).

Pouze z bakteriálních kolonií, u kterých byla potvrzena přítomnost a správná velikost cílového genu, byly připraveny zásobní bakteriální suspenze (Postup 3). Stejně bakteriální kolonie byly přeneseny do 100ml Erlenmeyerovy baňky s 50 ml LB média a 50 µl ampicilinu (100 µg/ml) a inkubovány přes noc.

4.3.3 Izolace pcDNATM 3.3-TOPO plazmidu s cílovými geny po mutagenesi z bakterií

XL1-Blue Supercompetent cells

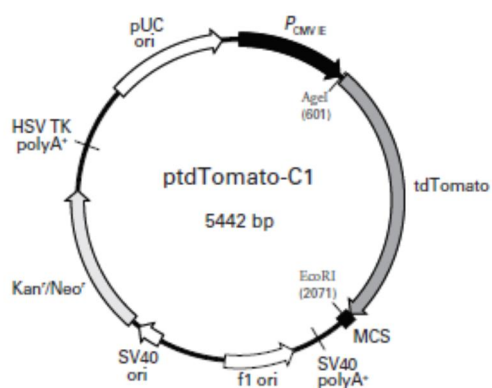
Z přesné bakteriální suspenze byly izolovány mutantní pcDNATM3.3-TOPO plazmidy (Postup 4). Izolovaná DNA sloužila jako templát v kontrolní PCR (Tab. 6) a podmínky amplifikace jsou v Tab. 4. Nakonec byly PCR produkty separovány agarózovou elektroforézou (TBE pufr/50min/120V). Spektrofotometricky byly změřeny koncentrace

izolovaných mutantních pcDNATM 3.3-TOPO plazmidů. Kromě kontroly přítomnosti daného inzertu pomocí elektroforetické separace byla provedena i kontrolní analýza sekvencí pomocí sekvenování, které bylo zajištěno specializovanými pracovníky v SEQme s.r.o.

4.4 Pěklonování genů *RPL5* a *RPL11* do ptdTomato-C1 vektoru

Za účelem následného rozlišení transfekovaných a netransfekovaných lidských MRC5 buněk byly geny *RPL5* a *RPL11* pěklonovány do vektoru ptdTomato-C1. Tento vektor exprimuje červený fluorescenční protein tdTomato, který je odvozen od dsRed proteinu. Schéma vybraného vektoru je na Obr. 13.

Obr. 13: Schéma ptdTomato-C1 vektoru



4.4.1 Vnesení restrikčních míst na cílové geny

Cílové geny zaklonované v plazmidu pcDNATM3.3-TOPO z nichž byly amplifikovány tzv. Tag primery z knihovny Mgr. Natálie Táborské (ÚMTM), viz Tab. 10. Tyto primery byly navrženy tak, aby amplifikovaly dané geny a zároveň vnesly na jejich konce krátké sekvence (restrikční místa), které rozpoznávají vybrané restrikční enzymy EcoRI a KpnI.

Příprava PCR reakce s Tag primery je popsána v Tab. 11 a podmínky amplifikace jsou v Tab. 4. PCR produkty byly následně pomocí agarózové elektroforézy (120V/50 min) separovány na kontrolu přítomnosti a velikosti ampliconů *RPL5* a *RPL11* ohraničených restrikčními místy. Produkty Tag PCR reakce byly přečištěny kolonovým systémem (PCR Purification Kit, Qiagen) (Postup 1), následně byla spektrofotometricky změřena jejich koncentrace.

Tab. 10: Sekvence Tag primer

Název primeru	5' - sekvence ó 3'
RPL5_cDNA_EcoRI_Tag_FP	CCGAGAATTCTGAGGGGTTTGTAAAGTTGT
RPL5_cDNA_KpnI_Tag_RP	CCGAGGTACCAAATTGCTGGGTTTAGCTCTCAG
RPL11_cDNA_EcoRI_Tag_FP	CCGAGAATTCTCATGGCGCAGGATCAAGGTGA
RPL11_cDNA_KpnI_Tag_RP	CCGAGGTACCGAAACGGGAATTTATTTGCCAGG

RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, cDNA ó komplementární DNA, FP ó forward primer, RP ó reverse primer, EcoRI ó *Escherichia coli* R-factor I, KpnI - Klebsiella pneumonie enzym I

Tab. 11: Reak ní sm s na Tag PCR (1 reakce = 20 µl)

Reagencie	Objem (µl)
10x DNA polymerázový reak ní pufr	2
10µM RPL5_cDNA_EcoRI_FP/RPL11_cDNA_EcoRI_FP	1
10µM RPL5_cDNA_KpnI_RP/RPL11_cDNA_KpnI_RP	1
10mM dNTP	0,4
5 U/µl <i>Taq</i> DNA polymeráza	0,4
MgCl ₂	1,6
H ₂ O	12,6
Izolovaný pcDNA TM 3.3-TOPO plazmid s cílovým genem (WT i M)	1

RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, cDNA ó komplementární DNA, FP ó forward primer, RP ó reverse primer, EcoRI ó *Escherichia coli* R-factor I, KpnI - Klebsiella pneumonie enzym I, WT ó wild type, M - mutant, dNTP ó sm s deoxyribonukleotid

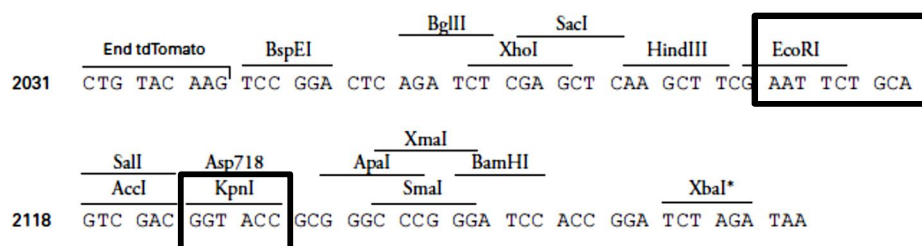
4.4.2 Restrik ní -t pení

Enzym EcoRI -t pí DNA v restrik ním míst - 5'- G AATTC -3' a KpnI v míst - 5'- GGTAC C -3'.

Tag PCR produkty (RPL5 WT, M a RPL11 WT, M) s vnesenými sekvencemi - restrik ními místy pro vý-e uvedené enzymy byly -t peny p es noc (Tab. 12).

Vybraný ptdTomato-C1 vektor byl poskytnut ústavem ÚMTM v Olomouci a byl -t pen v místech uvedených na restrik ní map (Obr. 14) taktéfl endonukleázami EcoRI a KpnI. Reak ní sm s na -t pení je popsána v Tab. 12.

Obr. 14: Mapa restrikčních míst ptdTomato-C1 vektoru



Tab. 12: Reakční směs na restrikční-čepení Tag PCR produktu a ptdTomato-C1 plazmidu (1 reakce = 20 µl)

Reagencie	Objem (µl)
10 U/µl EcoRI	1
10 U/µl KpnI	1
10x M pufr	2
Tag PCR produkt/ptdTomato-C1	16

EcoRI ó *Escherichia coli* R-factor I, KpnI - *Klebsiella pneumoniae* enzym I

Tag PCR produkty a ptdTomato-C1 plazmid byly čepeny přes noc při 37 °C. Poté byly restrikční endonukleázy tepelně inaktivovány v 65 °C po dobu 20 minut. Následující den byly Tag PCR produkty i vektor přečepeny systémem kolon (Postup 1).

PtdTomato-C1 plazmid byl defosforylován 1 µl alkalické fosfatázy (CIP) (10 U/ml) společně s 2 µl 10x CutSmart pufru, aby bylo možné do něj zaligovat Tag PCR produkty. Defosforylace plazmidu ptdTomato-C1 byla provedena v 37 °C po dobu 1 hodiny.

4.4.3 Izolace ptdTomato-C1 plazmidu z agarózového gelu

K získání čistého lineárního plazmidu ptdTomato-C1 byla provedena jeho elektroforetická separace v 1% agarózovém gelu (90min/120V). Na jeho extrakci byl použit DNA Gel Extraction Kit (Millipore) (Postup 5).

Postup 5: Izolace ptdTomato-C1 plazmidu z gelu (DNA Gel Extraction Kit, Millipore)

1. PtdTomato-C1 plazmid byl separován v 1% agarózovém gelu (TAE pufr) během 1 hodiny a 30 minut při stejnosměrném napětí 90 V.
2. Poté byl cílový vektor ptdTomato-C1 vyříznut z gelu v UV transiluminátoru sterilním skalpelem, kostička gelu byla vložená do extrakční kolony.
3. Kolona s gelem byla centrifugována 10 minut při 5 000 rcf.
4. Koncentrace izolovaného ptdTomato-C1 plazmidu byla změněna spektrofotometricky.

4.4.4 Ligace cílových genů do ptdTomato-C1 vektoru

Do izolovaného ptdTomato-C1 plazmidu byly ligovány Tag PCR produkty (*RPL5* WT, M a *RPL11* WT, M) s komplementárními konci pomocí komerčně dodávaného návodu k enzymu T4 DNA ligáza (Ligation Protocol with T4 DNA Ligase, BioLab) (Tab. 13).

Tab. 13: Reakční směs na ligaci cílových genů do ptdTomato-C1 vektoru

(1 reakce = 20 µl)

Reagencie		Objem
10x T4 DNA ligázový pufr		2 µl
ptdTomato-C1 vektor (5 400 bp)*		4,5 µl
cílový gen	<i>RPL5</i> WT/M (924 bp)*	1,73 µl/0,81 µl
	<i>RPL11</i> WT/M (537 bp)*	0,57 µl/0,5 µl
T4 DNA ligáza		1 µl
H ₂ O		do 20 µl

* 50 ng plazmidu ptdTomato-C1; *RPL5* WT, M ó 23 ng, *RPL 11* WT, M ó 16 ng

RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, WT ó wild type, M ó mutant

Ligační směs byla inkubována 18 hodin v 16 °C a T4 DNA ligáza byla poté tepelně inaktivována při 70 °C během 10 minut.

Rekombinantní ptdTomato-C1 plazmid byl použit k transformaci kompetentních bakterií *E. coli*, kmen DH5 (Postup 2). Bakteriální suspenze byla vyseta na Petriho misky s 20 ml LB média a 20 µl kanamycinu (50 µg/ml). Byla provedena kontrolní (colony) PCR, kdy templátem byla bakteriální kolonie (Tab. 5) a podmínky amplifikace jsou uvedeny v Tab. 4. PCR produkty byly separovány agarózovou elektroforézou (120V/40minut). Pouze z bakteriálních kolonií, u kterých byla potvrzena přítomnost a správná velikost cílového genu (*RPL5*, *RPL11*), byly připraveny zásoby bakteriálních suspenzí (Postup 3). Přes noc byly bakterie kultivovány ve 100ml Erlenmeyerovské bačce s 50 ml LB média a 50 µl kanamycinu (50 µg/ml) při 37 °C za stálého třepání.

4.4.5 Izolace ptdTomato-C1 plazmidu s cílovými geny z bakterií *E. coli*

Z tekutých bakteriálních kultur byly izolovány ptdTomato-C1 plazmidy s cílovými geny *RPL5* WT, M a *RPL11* WT, M (Postup 5). U izolované plazmidové DNA byla provedena kontrolní PCR (Tab. 6) za shodných podmínek uvedených v Tab. 4. PCR produkty

byly separovány agarózovou elektroforézou (40min/120V) a spektrofotometricky byla změřena jejich koncentrace.

4.5 Transfekce lidských MRC5 buněk

K transfekci buněk (MRC5) izolovanými plazmidy ptdTomato-C1 s cílovými geny (*RPL5/RPL11* WT, M) byla použita elektroporace.

4.5.1 Pasáfování buněk

Buňky vybrané buněčné linie MRC5 byly nejprve pasáfovány (Postup 6).

Postup 6: Pasáfování MRC5 buněk

1. Z kultivační láhve s MRC5 buňkami bylo vylito médium DMEM.
2. Adherované buňky byly 2x opláchnuty 10 ml 1x PBS.
3. Ke buňkám bylo přidáno 2,5 ml enzymu TrypLE a inkubovaly se 2 minuty v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂.
4. Bylo přidáno 13 ml média DMEM.

4.5.2 Elektroporace buněk MRC5

Transfekce buněk byla provedena pomocí Neon Transfection System, Invitrogen. MRC5 buňky transfekované ptdTomato-C1 plazmidem s cílovým genem *RPL5* WT, M a *RPL11* WT, M byly vysety (každý vzorek) do 9 jamek (50 000 buněk/jamka) na desku ViewPlate-96 Black, Glass Bottom (PerkinElmer) dle Postupu 7.

Jako pozitivní kontrola byly použity buňky MRC5 vystavené 1 minutu ionizujícímu záření (2,3 Gy). Negativní kontrolou byly nestresované buňky MRC5. Nejdříve byla provedena optimalizace metody a skenování, buňky na pozitivní kontrolu byly vysety na 3 skla a na negativní kontrolu také na 3 skla (100 000 buněk/sklo) dle Postupu 8. Následně byly kontrolní buňky (pozitivní i negativní) ke srovnání s transfekovanými buňkami vysazeny do 3 jamek (30 000 buněk/jamka) a do dalších 3 jamek (15 000 buněk/jamka) na desky ViewPlate-96 Black, Glass Bottom (PerkinElmer) dle Postupu 9.

Kontrolní i transfekované buňky byly použity k imunofluorescenčnímu značení markerů poškození a k analýze poškození DNA.

Postup 7: Elektroporace MRC5 buněk (Neon Transfection System, Invitrogen)

1. Na Vi-cell XR analyzátoru bylo naměřeno 810 000 buněk v 1 ml DMEM média.

2. Do 9 jamek bylo třeba 450 000 buněk, a proto bylo odebráno 0,6 ml suspenze buněk v DMEM médiu (pro každý vzorek).
3. Daný objem buněk byl stořen při 530 rcf po dobu 5 minut a v 20 °C.
4. Buňky byly resuspendovány v 1x PBS a centrifugovány za stejných podmínek.
5. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována ve 100 µl R pufru.
6. K MRC5 buňkám bylo přidáno 4,5 µg izolovaného ptdTomato-C1 plazmidu s jedním z cílových genů - *RPL5* WT, M a *RPL11* WT, M.
7. Následovala 1x elektroporace buněk 1700 V během 20 ms.
8. Transfekované buňky byly resuspendovány v 1,8 ml DMEM média bez antibiotik.
9. K buňkám bylo přidáno 1,8 µl geneticinu 418 (selektivní marker).
10. Buňky byly vysazeny v devíti opakováních po 200 µl (každý vzorek) do ViewPlate-96 Black, Glass Bottom (PerkinElmer) a inkubovány 3 dny v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂).

Postup 8: Příprava kontrolních MRC5 buněk na optimalizaci (skla)

1. MRC5 buňky byly pořízeny na Vi-cell analyzátoru XR.
2. Daný počet buněk byl stořen při 530 rcf, 5 minut a v 20 °C.
3. Buňky byly resuspendovány ve 2 ml 1x PBS a centrifugovány za stejných podmínek.
4. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována v DMEM médiu (4,2 ml) s 10% fetálním bovinním sérem a 1x penicilin/streptomycinovou směsí.
5. Buňky byly po 700 µl vysazeny na skla a inkubovány 3 dny v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂).

Postup 9: Příprava kontrolních MRC5 buněk (desky)

1. MRC5 buňky byly pořízeny na Vi-cell analyzátoru XR.
2. Daný počet buněk byl stořen při 530 rcf, 5 minut a v 20 °C.
3. Buňky byly resuspendovány ve 2 ml 1x PBS a centrifugovány za stejných podmínek.
4. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována v DMEM médiu (1,2 ml) s 10% fetálním bovinním sérem a 1x penicilin/streptomycinovou směsí.
5. Buňky byly po 200 µl vysazeny na desky ViewPlate-96 Black, Glass Bottom (PerkinElmer) a inkubovány 3 dny v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂).

4.6 Imunofluorescence

Pomocí metody nepřímé imunofluorescence byly lokalizovány a analyzovány 3 vybrané markery poškození DNA (Tab. 14).

Tab. 14: Markery poškození DNA a jejich protilátky

Marker poškození DNA	Primární protilátka/ p vodní organismus	Sekundární protilátka/ p vodní organismus
-H2AX	anti- -H2AX (Ser139)/myš	anti-myš-alexa fluor 488/osel
53BP1	anti-53BP1/králík	anti-králík alexa fluor 488/osel
MDC1	anti-MDC1/myš	anti-myš-alexa fluor 488/osel

H2AX - gamma histon 2AX, 53BP1 - 53 binding protein 1, MDC1 - mediator of DNA damage checkpoint 1

4.6.1 Imunofluorescenční značení

Vybrané markery poškození DNA byly imunofluorescenční značeny u adheřovaných kontrolních buněk na skle i v jamkách podle Imunofluorescence General Protocol (Cell Signaling Technology) (Postup 11). Od protokolu se postup odklonil v případě značení MDC1 proteinu, kdy byla provedena preextrakce jak v případě kontrolních, tak i u testovaných transfekovaných buněk (Postup 10).

Postup 10: Preextrakce buněk před lokalizací MDC1 markeru

1. DMEM médium z jamek bylo odstraněno, adheřované buňky byly na ledu opláchnuty 1x PBS.
2. 1x PBS byl odsán, buňky 2 minuty inkubovány na ledu v preextrakčním pufru A (200 µl).
3. Pufr byl odsán, buňky byly na ledu 20 minut inkubovány ve 200 µl preextrakčního pufru B.
4. Po odsání pufru byly buňky opláchnuty ve 200 µl studeného 1x PBS.

Postup 11: Imunofluorescenční značení

1. Jamky s adheřovanými buňkami byly fixovány 4% formaldehydem v 1x PBS a inkubovány 15 min při pokojové teplotě.
2. Formaldehyd byl odsán a buňky byly permeabilizovány v 0,25% TRITON X-100 v 1x PBS a inkubovány 15 minut při pokojové teplotě.

3. TRITON X-100 byl odstraněn a buňky byly 3x po dobu 5 minut promývány v 1x PBS.
4. Buňky byly inkubovány ve 200 μ l dilu ního pufru.
5. Primární protilátky anti- γ -H2AX, anti-53BP1 bylyředny 500x dilu nímu pufrém a anti-MDC1 bylaředna 200x dilu nímu pufrém. 10% azid sodný byl přidán (300xředný) ke každé naředné protilátce.
6. Dilu ní pufr byl odsán a do jamky bylo napipetováno 28,6 μ l zředné primární protilátky ó každá ve 3 opakováních.
7. Buňky byly s protilátkami inkubovány přes noc ve tmě ve 4 °C.
8. Další den byly jamky 3x promyty po dobu 5 minut v 1x PBS.
9. Ke buňkám bylo přidáno 10 μ l specifické sekundární protilátky (1000xředné dilu nímu pufrém) a desky byly inkubovány 1 hodinu a 30 minut ve tmě .
10. Jamky byly 3x promyty po dobu 5 minut v 1x PBS.
11. Do každé jamky bylo přidáno 10 μ l Hoechstu 33342 (10 mg/ml) na barvení jader.
12. Jamky byly promyty v 1x PBS a uchovány ve 200 μ l 1x PBS.
13. Připravené preparáty na sklech byly pomocí fluorescen ního mikroskopu IX81 a ScanR Acquisition programu snímány a byla provedena analýza obrazu.
14. Připravené preparáty byly pomocí Yokogawa CV7000s snímány, následně byla provedena analýza obrazu jak pozorováním, tak automaticky. Analyzované bylo poškození DNA pomocí vybraných markerů u WT a M vzorků ve srovnání s kontrolami.

4.7 Analýza poškození DNA

Nejdříve byla provedena analýza poškození DNA v jádrech u kontrolních buněk pouhým pozorováním. Automatická analýza imunofluorescenčně značených MRC5 buněk byla provedena Mgr. Natálií Táborskou pomocí specializovaného systému ColumbusTM Image Data Storage and Analysis. Systém pořídil množství buněkých jader vyskytujících se v jednotlivých jamkách na deskách a poté z celkového počtu vybral jádra dle jejich velikosti a kulatosti. Buněká jádra byla obarvena modrým barvivem Hoechst 33342, a proto byla detekována modrým kanálem při 445/45 nm. Dále byly v jádrech pořídány body skenované zeleným kanálem při 515/30 nm. Tímto systémem byly mimo jiné rozlišovány transfekované buňky od těch netransfekovaných pomocí červeného fluorescenčního proteinu z plazmidu ptdTomato-C1, který byl detekován červeným kanálem při 595/40 nm.

4.8 Poufíté komer ní kity

Imunofluorescence General Protocol	Cell Signaling Technology
Ligation Protocol with T4 DNA Ligase	BioLabs
Neon Transfection System	Invitrogen
pcDNA TM 3.3-TOPOTA Cloning Kit	Invitrogen
QIAquick DNA Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Quifilter Plasmid Purification MIDI 100	Qiagen
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies

4.9 Poufíté chemikálie (katalogové íslo)

10x CutSmart reak ní pufr	BioLabs (B7204S)
10x M pufr	Clontech (SD006)
10x Pfu ultra II reak ní pufr	Agilent (600670-52)
10x Thermo-Start PCR pufr	Thermo Scientific (AB0908B)
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific (R0611)
Agar	Thermo Scientific (LP0028)
Agaróza	Sigma Aldrich (A9539)
Alexa Fluor 488 osel anti-králík	Thermo Scientific (A-21206)
Alexa Fluor 488 osel anti-my-	Thermo Scientific (A-21202)
Alkalická fosfatáza (CIP)	BioLabs (M0290S)
Ampicilin	Sigma Aldrich (A9393)
Anti-53BP1 (králík)	Santa Cruz (sc-22760)
Anti-gamma H2AX Ser139 (my-)	Millipore (05-636)
Anti-MDC1 (my-)	Abcam (ab50003)
Azid sodný	Millipore (822335)
DAPI	Cytocell (S7113)
DMSO	Sigma Aldrich (D9170)
Dulbecco´s Modified Eagles Medium	Sigma Aldrich (D5796)
EcoRI 10 U/ml	Thermo Scientific (ER0271)
Etanol	Fagron (1000800)
FCSi	Sigma Aldrich (12003C)
Fetální bovinní sérum	Sigma Aldrich (A0281)
Formaldehyd	Fagron (100500)

GelRed	Biotium (41003)
GeneRuler 1 kb, DNA ladder	Thermo Scientific (SM0311)
Geneticin 418	Sigma Aldrich (A1720)
Glycerol	Sigma Aldrich (G6279)
Hoechst 33342 trihydrochlorid, trihydrát	Thermo Scientific (H21492)
Izopropanol	Lach-ner (20037-CT0-M1000-1)
Kanamycin	Sigma Aldrich (K1377)
KpnI 10 U/ml	Thermo Scientific (ER0521)
MgCl ₂	Thermo Scientific (AB0908B)
Penicilin-streptomycinová směs	Sigma-Aldrich (P4333)
<i>Pfu</i> DNA polymeráza 2,5 U/μl	Thermo Scientific (EP0502)
Qubit dsDNA HS pufr	Thermo Scientific (Q32854)
Qubit dsDNA HS reagent	Thermo Scientific (Q32854)
Thermo-Start <i>Taq</i> DNA polymeráza 5 U/μl	Thermo Scientific (AB0908B)
TrypLE Select enzym	Thermo Scientific (12563029)

4.10 Poufítě roztoky a jejich složení

Diluční pufr (50 ml)	BSA í í í í í í í í í í í í .. 0,5 g 1xPBS í í í í í í í í í í í í ... 50 ml
1x TAE pufr (1l)	destilovaná voda í í í í í í í í . 900 ml 10x TAE pufr 100 ml
10x TAE pufr (1l)	TRIS í í í í í í í í í í í í í 48,4 g ledová kyselina octová í í í í í 11,4 ml 0,5M EDTA í í í í í í í í í í ..20 ml pH 8 destilovaná voda í í í í í í .. do 1000 ml
1x TBE pufr (1l)	TRIS í í í í í í í í í í í í í 10,8 g kyselina boritá í í í í í í í í í . 5,5 g 0,5M EDTA í í í í í í í í í 4 ml pH 8,3 destilovaná voda í í í í í í .. do 1000 ml

LB médium (200 ml) (tekuté)	destilovaná voda í í í í í í í í . 200 ml LB Base í í í í í í í í í í í í í 5 g
LB médium (50 ml) (tuhé)	destilovaná voda í í í í í í í í . 50 ml LB Base í í í í í í í í í í í . 1,25 g agar í í í í í í í í í í í í 0,75 g
1x PBS (1l)	NaClí í í í í í í í í í í í í í . 8 g KClí í í í í í í í í í í í í í 0,2 g Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ Oí í í í í í í í í . 3,21 g KH ₂ PO ₄ í í í í í í í í í í í í .. 0,2 g pH 7,4
Preextrak ní pufr A (100 ml)	300mM sucrose í í í í í í í í 10,27 g 1,5mM MgCl ₂ í í í í í í í í 0,0305 g 100mM NaCl í í í í í í í í .. 0,5844 g pH 6,8
Preextrak ní pufr B (2 ml)	1mM DTT (1000x)í í í í í í í í ... 2µl 5 µg/ml Leupeptin (500x) í í í í í í 4 µl 2 µg/ml Aprotinin (500x) í í í í í í 4 µl 0,5% Triton X í í í í í í í í í í 51 µl Preextrak ní pufr A í í í í í í í 1939 µl

4.11 Použití přístroje

Analyzátor Vi-cell XR viability	Beckman
Centrifuga 5430	Eppendorf
Centrifuga MiniSpin	Eppendorf
Centrifuga Rotina 420 R	Hettich
Columbus TM Image Data Storage and Analysis system	PerkinElmer
Digitální CCD kamera C10600 (ORCA-R2)	Hamamatsu
Elektroforetická komora HU10 Mini Plus Horizontal	Scie-plas
Flow box TopSafe 1.2	Euroclone
Fluorescenční mikroskop IX81	Olympus

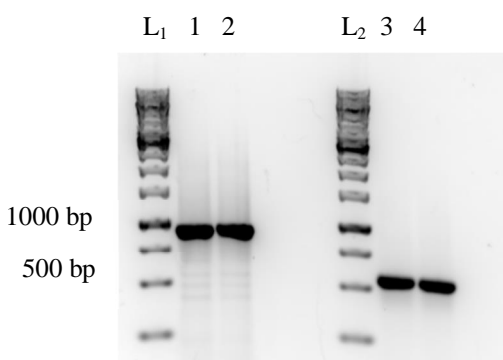
Fluorometr Qubit 2.0	Invitrogen
Inkubátor C 24 Benchtop	New Brunswick Scientific
Inkubátor IR 230	Cole-Parmer
Laboratorní váhy Sartorius Extend ED423S-OCE	Sartalex
Mastercycler nexus	Eppendorf
Nanodrop spektrofotometr ND 1000	Thermo Scientific
Neon Transfection System	Thermo Scientific
ScanR Acquisition	Olympus
Termoblok ThermoStat plus	Eppendorf
Thermal Cycler C1000	Bio-Rad
Transiluminátor 1500 UV Kodak Gel Logic	LabX
Vodní láze SUBAqua 12 plus	Grant
Vortex Mixer VX 6 200	Labnet
Yokogawa CV7000s	PelkmansLab
Zdroj stejnosměrného napětí PowerPack HC	Bio-Rad

5 VÝSLEDKY

5.1 Klonování gen *RPL5* a *RPL11*

Amplifikace lidských gen *RPL5* a *RPL11* byla úspěšná, protože elektroforetická separace (Obr. 15) potvrdila jejich očekávanou velikost *RPL5* (924 bp) a *RPL11* (537 bp). Pro každý gen byly zpracovány 2 vzorky. Fluorimetricky získané koncentrace PCR produktů pomocí systému kolonek (PCR Purification Kit, Qiagen) jsou v Tab. 15.

Obr. 15: PCR produkty *RPL5* a *RPL11* gen



L_{1,2} = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher); 1 = *RPL5*₁ gen, 2 = *RPL5*₂ gen; 3 = *RPL11*₁ gen; 4 = *RPL11*₂ gen; naná-ecí pufr 6x Loading Dye (ThermoFisher), barvivo NK 6 GelRed (Biotium).

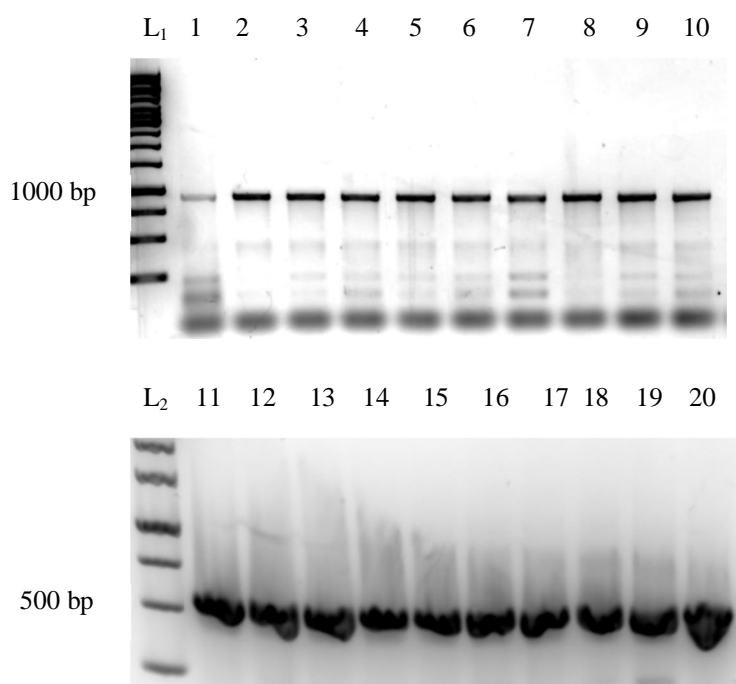
Tab. 15: Koncentrace PCR produkt *RPL5*₁₋₂ a *RPL11*₁₋₂

PCR produkt	Koncentrace (ng/μl)
<i>RPL5</i> ₁	69,6
<i>RPL5</i> ₂	77,4
<i>RPL11</i> ₁	41,2
<i>RPL11</i> ₂	22,4

RPL 6 protein velké ribozomální podjednotky

PCR produkty odpovídajících gen (*RPL5* a *RPL11*) byly klonovány do pcDNATM 3.3-TOPO vektoru (TA klonování) pro transformaci kompetentních bakterií *E. coli* (kmen DH5α). Kontrolní (colony) PCR byla provedena u 10 narostlých kolonií s cílovým *RPL5* genem a u 10 kolonií s cílovým *RPL11* genem. Výsledná elektroforetická separace (Obr. 16) potvrdila očekávanou velikost PCR produktu u 10 kolonií - *RPL5* gen 924 bp a *RPL11* gen 537 bp.

Obr. 16: Kontrolní (colony) PCR genu *RPL5* a *RPL11*



L_{1,2} = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher); 1 ó 10 = bakteriální kolonie s *RPL5* genem; 11 ó 20 = bakteriální kolonie s *RPL11* genem; naná-ecí puřr ó 6x Loading Dye (Thermo Fisher), barvivo NK ó Gel Red (Biotium).

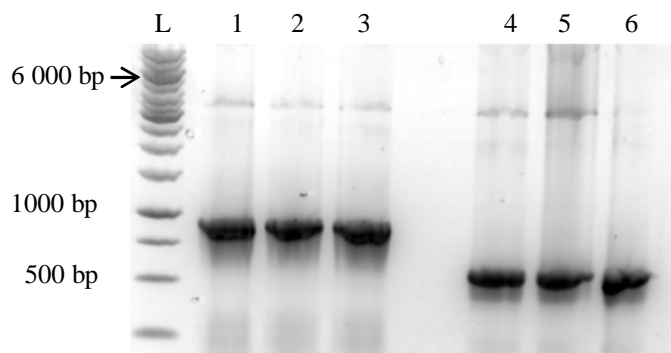
Pomocí Qiafilter plasmid purification MIDI 100 (Qiagen) byly úsp –n izolovány 3 vzorky plazmid pcDNATM 3.3-TOPO s cílovým genem *RPL5* i 3 vzorky s cílovým genem *RPL11*. Plazmidová DNA byla eluována do 20 µl destilované vody a jejich spektrofotometricky nam ená koncentrace je v Tab. 16. Elektroforetická separace izolovaných plazmid po kontrolní PCR potvrdila p ítomnost i správnou velikost cílových gen (*RPL5* gen 924 bp, *RPL11* gen 537 bp), viz Obr. 17.

Tab. 16: Koncentrace izolovaných pcDNATM 3.3-TOPO plazmid s cílovými geny

Izolovaný pcDNA TM 3.3-TOPO plazmid s cílovými geny	Koncentrace (ng/µl)
<i>RPL5</i> ₁	121
<i>RPL5</i> ₂	146
<i>RPL5</i> ₃	131
<i>RPL11</i> ₁	163
<i>RPL11</i> ₂	250
<i>RPL11</i> ₃	188

RPL ó protein velké ribozomální podjednotky

Obr. 17: Kontrolní PCR izolovaných pcDNATM3.3-TOPO plazmidů s cílovými geny *RPL5* a *RPL11*

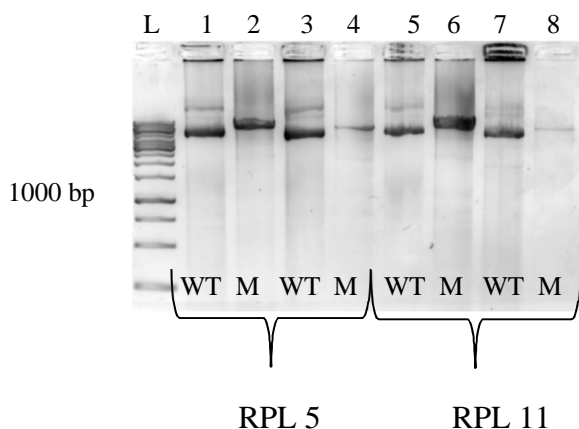


L = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher), 1 a 3 = izolovaný pcDNATM 3.3- TOPO plazmid (5 400 bp) s cílovým *RPL5* genem; 4 a 6 = izolovaný pcDNATM 3.3- TOPO plazmid (5 400 bp) s cílovým *RPL11* genem; naná-ecí pufr a 6x Loading Dye (Thermo Fisher), barvivo NK a Gel Red (Biotium).

5.2 Cílená mutagenéze vybraných genů

Pomocí Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) byla do cílových genů v plazmidu pcDNATM3.3-TOPO úspěšně vnesena genová mutace. Templátem pro cílenou mutagenézi byl izolovaný pcDNATM3.3-TOPO plazmid s cílovým *RPL5* genem o c = 146 ng/μl, 131 ng/μl a s cílovým *RPL11* genem o c = 163 ng/μl, 181 ng/μl. Lineární struktura produktů mutagenéze byla detekována jejich separací agarózovou elektroforézou ve srovnání s kruhovými povodními plazmidy s WT inzerty (Obr. 18).

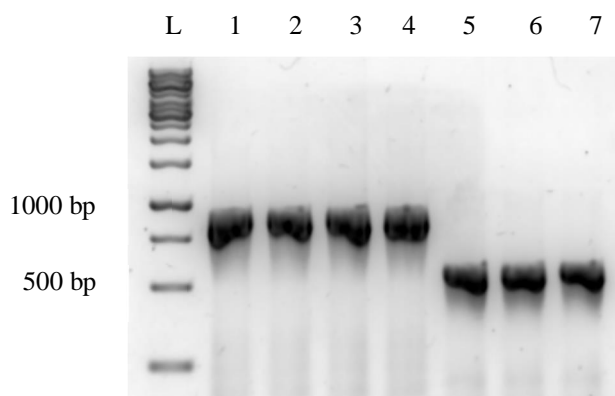
Obr. 18: Kontrolní PCR WT a M pcDNATM3.3-TOPO plazmidů



L = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher). 1, 3, 5, 7 a izolované WT pcDNATM 3.3-TOPO plazmidy s *RPL5* genem o c₁ = 146 ng/μl, c₃ = 131 ng/μl; *RPL11* genem c₅ = 163 ng/μl a c₇ = 181 ng/μl. 2, 4, 6, 8 a M pcDNATM 3.3-TOPO plazmidy s *RPL5* genem o c₂ = 28 ng/μl, c₄ = 120 ng/μl; *RPL11* genem o c₆ = 113 ng/μl, c₈ = 86 ng/μl. Naná-ecí pufr a 6x Loading Dye (Thermo Fisher), barvivo NK a Gel Red (Biotium).

Úspěšná transformace bakteriálních buněk *E. coli* XL1-Blue Supercompetent cells mutantními pcDNATM 3.3-TOPO plazmidy byla zjištěna pomocí kontrolní (colony) PCR u 4 kolonií s *RPL5* genem a u 3 kolonií s *RPL11* genem. Následná elektroforetická separace (Obr. 19) potvrdila přítomnost inzertů o očekávané velikosti *RPL5* gen 924 bp a *RPL11* gen 537 bp.

Obr. 19: Kontrolní (colony) PCR *RPL5* a *RPL11* genu



L = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher). 1- 4 = bakteriální kolonie s *RPL5* M genem, 5 a 7 = bakteriální kolonie s *RPL11* M genem. Nanášeč pufru 6x Loading Dye (Thermo Fisher), barvivo NK a Gel Red (Biotium).

Z bakteriálních suspenzí pomocí Qiafilter plasmid purification MIDI 100 (Qiagen) byly úspěšně izolovány mutantní pcDNATM 3.3-TOPO plazmidy. Koncentrace 4 izolovaných vzorků plazmidové DNA s *RPL5* genem a 3 vzorků plazmidové DNA s *RPL11* genem jsou v Tab. 17. Plazmidová DNA byla eluována do 30 μ l destilované vody a po kontrolní PCR jejich výsledná elektroforetická separace potvrdila přítomnost a správnou velikost inzertů (Obr. 20). Sekvenování potvrdilo očekávanou velikost cílových genů *RPL5* a *RPL11* v plazmidu a u mutantních genů v plazmidu byly identifikovány správně vnesené bodové mutace (MISSENSE Ile227Arg a MISSENSE Leu20His).

Tab. 17: Koncentrace izolovaných pcDNATM 3.3-TOPO plazmidů s mutantní formou cílových genů

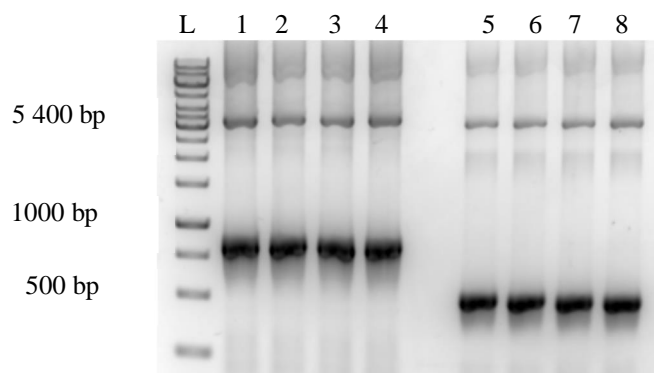
Izolovaný pcDNA TM 3.3-TOPO plazmid s M genem	Koncentrace (ng/ μ l)
<i>RPL5</i> ₁	1584
<i>RPL5</i> ₂	1349
<i>RPL5</i> ₃	2567
<i>RPL5</i> ₄	1151

Tab. 17 pokračování: Koncentrace izolovaných pcDNATM 3.3-TOPO plazmidů s mutantní formou cílových genů

Izolovaný pcDNA TM 3.3-TOPO plazmid s M genem	Koncentrace (ng/μl)
<i>RPL11</i> ₁	658
<i>RPL11</i> ₂	646
<i>RPL11</i> ₃	470
<i>RPL11</i> ₄	2814

RPL = protein velké ribozomální podjednotky, M - mutant

Obr. 20: Kontrolní PCR izolovaných pcDNATM 3.3-TOPO plazmidů s mutantními cílovými geny

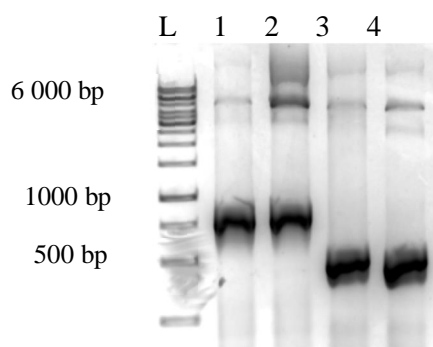


L = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher). 1- 4 = izolovaný pcDNATM 3.3-TOPO plazmid s M *RPL5* genem, 5 a 8 = izolovaný pcDNATM 3.3-TOPO plazmid s M *RPL11* genem. Naná-ecí pufr 6x Loading Dye (Thermo Fisher), barvivo NK a Gel Red (Biotium).

5.3 P eklonování genů *RPL5* a *RPL11* do ptdTomato-C1 vektoru

Pomocí Tag primer byla vytvořena restrikční místa pro PCR amplifikaci. Elektroforetickou separací byla ověřena u Tag PCR produktů správná velikost cílových genů *RPL5* (924 bp) a *RPL11* (537 bp) (Obr. 21). Fluorimetricky změřené koncentrace Tag PCR produktů jsou v Tab. 18. Úspěšná izolace ptdTomato-C1 plazmidu z agarózového gelu pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) byla zkontrolována elektroforetickou separací (Obr. 22). Spektrofotometricky změřená koncentrace izolovaného plazmidu ptdTomato-C1 byla 11 ng/μl DNA.

Obr. 21: Produkty Tag PCR

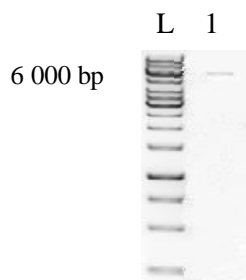


L = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher); 1 - pcDNATM3.3-TOPO plazmid s WT *RPL5* genem a Tag p ív sky, 2 - pcDNATM3.3-TOPO plazmid s M *RPL5* genem a Tag p ív sky, 3 - pcDNATM3.3-TOPO plazmid s WT *RPL11* genem a Tag p ív sky, 4 - pcDNATM 3.3-TOPO plazmid s M *RPL11* genem a Tag p ív sky; naná-ecí pufr ó 6x Loading Dye, barvivo NK ó Gel Red (Biotium).

Tab. 18: Koncentrace Tag PCR produkt

Tag PCR produkt	Koncentrace ng/ μ l
<i>RPL5</i> WT	13,3
<i>RPL5</i> M	28,4
<i>RPL11</i> WT	28,2
<i>RPL11</i> M	35

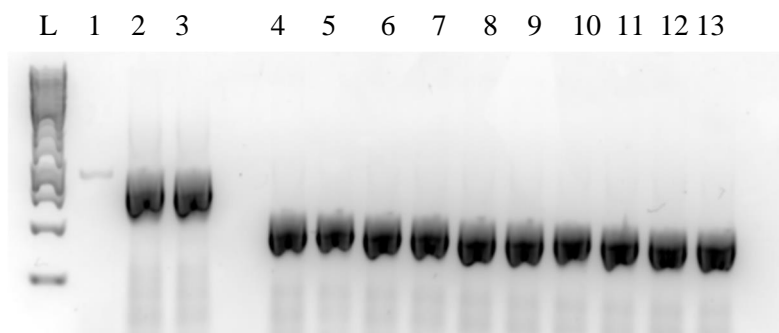
Obr. 22: Izolovaný ptdTomato-C1 plazmid



L = 1 kb DNA Ladder GeneRuler (Thermo Fischer), 1 ó ptdTomato-C1 plazmid

Po restrik ním -t pení byly cílové geny úsp -n zaklonovány do ptdTomato-C1 vektoru podle protokolu Ligation protocol with T4 DNA Ligase (BioLabs) a prob hla transformace bakterií. Úsp -ná ligace byla potvrzena pomocí kontrolní (colony) PCR, kdy následná elektroforetická separace potvrdila p ítomnost a velikost cílových gen ó *RPL5* gen 924 bp a *RPL11* gen 537 bp (Obr. 23). Spektrofotometricky zm ené koncentrace izolovaných plazmid eluovaných do 30 μ l jsou v Tab. 19.

Obr. 23: Kontrolní (colony) PCR bakteriálních kolonií s WT a M formou genu v ptdTomato-C1 plazmidu



L = 1 kb DNA Ladder GeneRuler (Thermo Fischer). 1 - 2 - gen *RPL5* WT, 3 - gen *RPL5* M, 4 ó 8 - gen *RPL11* WT, 9 ó 13 - gen *RPL11* M. Naná-ecí pufr ó 6x Loading Dye, barvivo NK ó Gel Red (Biotium).

Tab. 19: Koncentrace izolovaných ptdTomato-C1 plazmidů s cílovými WT a M geny

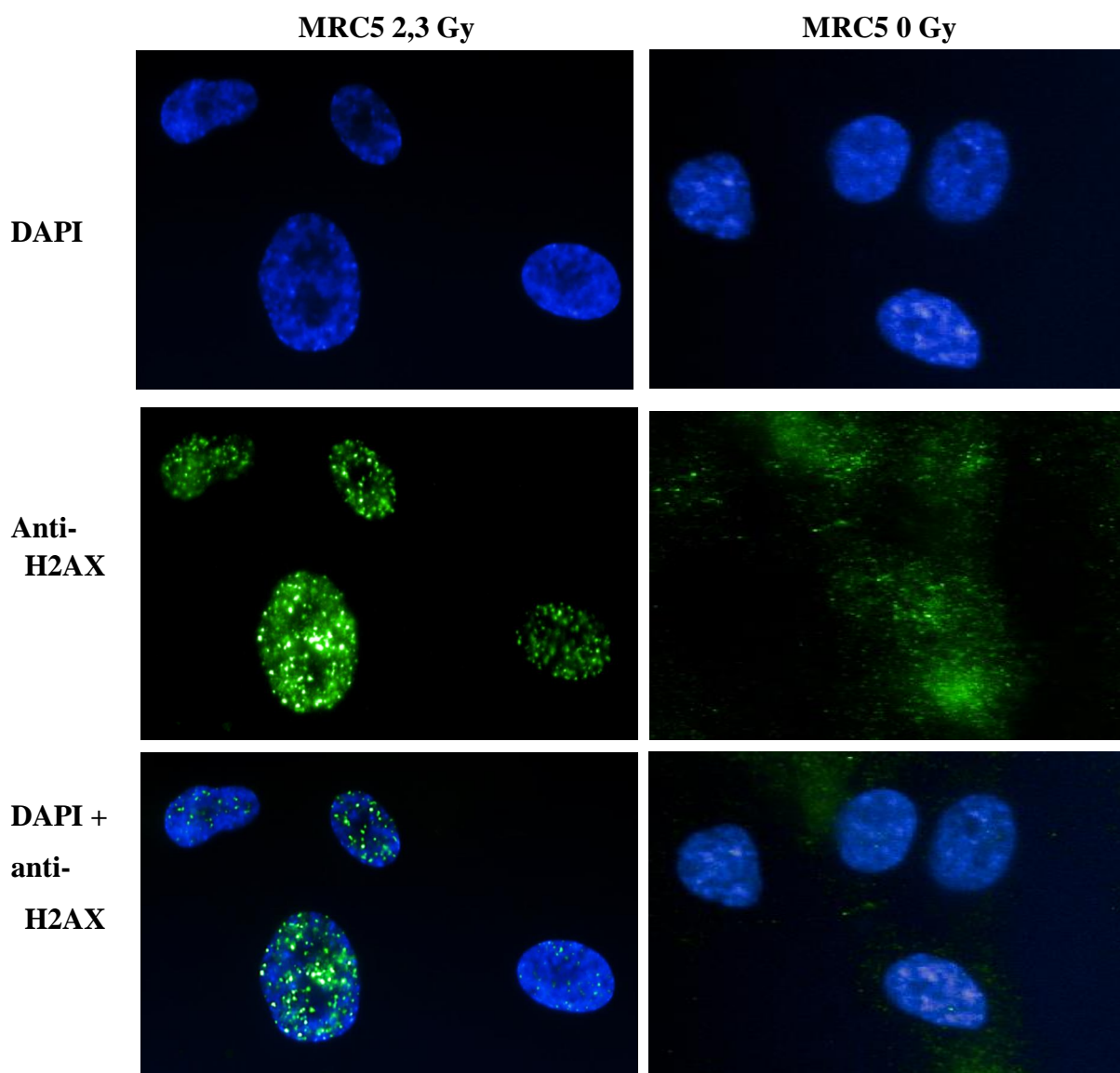
Izolovaný ptdTomato-C1 plazmid s cílovými geny	Koncentrace (ng/μl)
<i>RPL5</i> WT	1 314
	876
	2 225
	950
<i>RPL5</i> M	708
	827
	2 351
	1 183
<i>RPL11</i> WT	569
	723
	406
	1 401
<i>RPL11</i> M	1 354
	1 136
	1 099
	1 297

RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, WT ó wild type, M ó mutant

5.4 Analýza po-kození DNA u kontrolních a transfekovaných MRC5 buněk

U imunofluorescenčních značených MRC5 buněk byly sledovány zelené signály markerů signalizujících po-kození DNA. Na Obr. 24, 25 a 26 jsou ukázky z analýzy obrazu pozitivních a negativních kontrol, po-kození DNA buněk na sklech bylo stanoveno pomocí 3 indikátorů -H2AX, 53BP1 a MDC1. V Tab. 20 je výsledná analýza obrazu kontrol na sklech pouhým pozorováním.

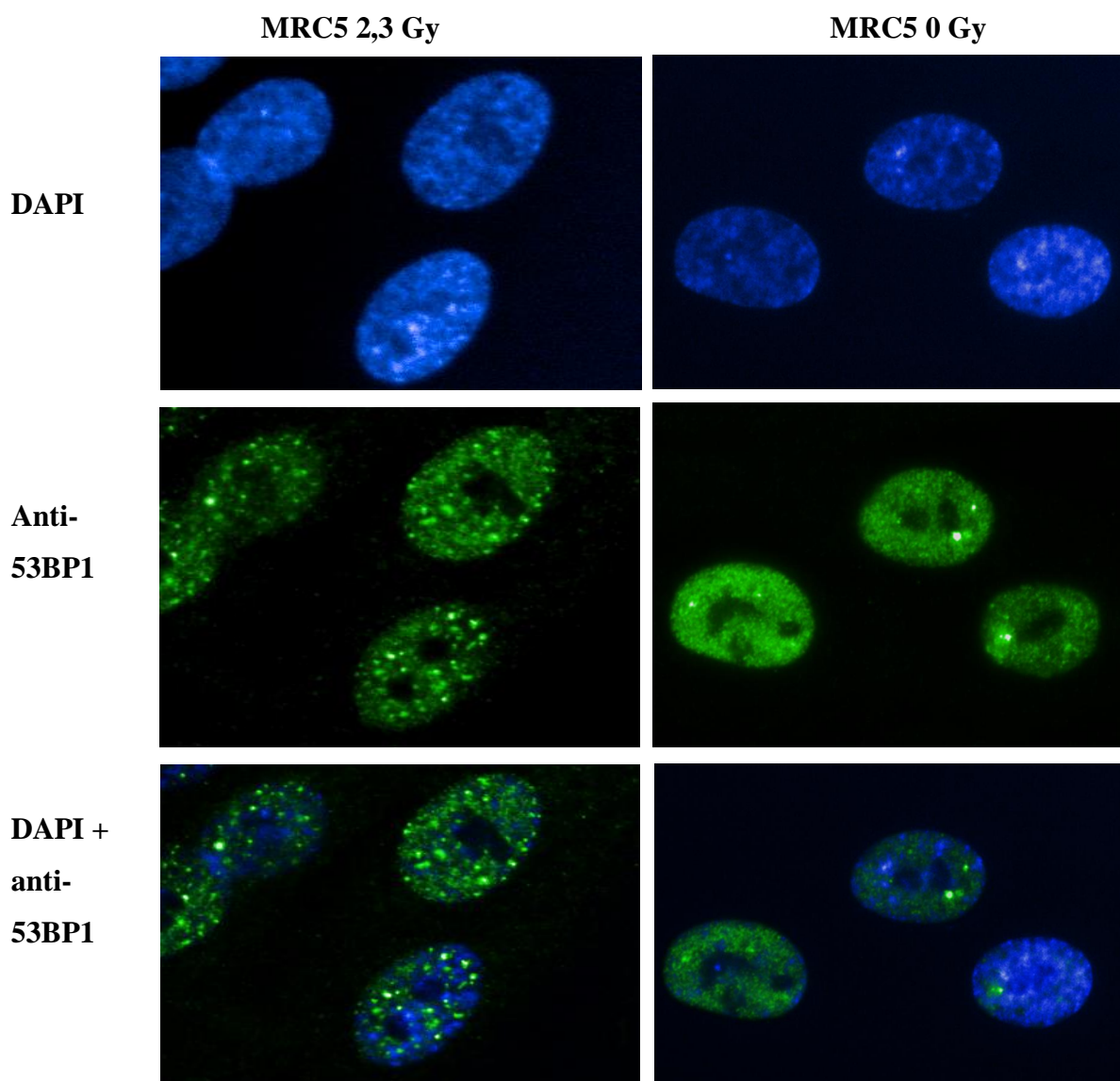
Obr. 24: Pozitivní a negativní kontrola značeného markeru poškození DNA γ -H2AX



zvětění 40x

Buněná linie MRC5, zdroj Laboratoř tkáňových kultur (ÚMTM); 2,3 Gy/1minuta, fixace 30 minut po ozáření; + IR γ pozitivní kontrola, - IR γ negativní kontrola, DAPI - 4',6-diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride = obarvení jader MRC5 buněk, anti- γ -H2AX γ protilátka proti gamma histon 2AX = marker poškození DNA detekovaný zeleným kanálem, DAPI + anti- γ -H2AX = spojení kanálu DAPI a anti- γ -H2AX

Obr. 25: Pozitivní a negativní kontrola značeného markeru poškození DNA pomocí 53BP1

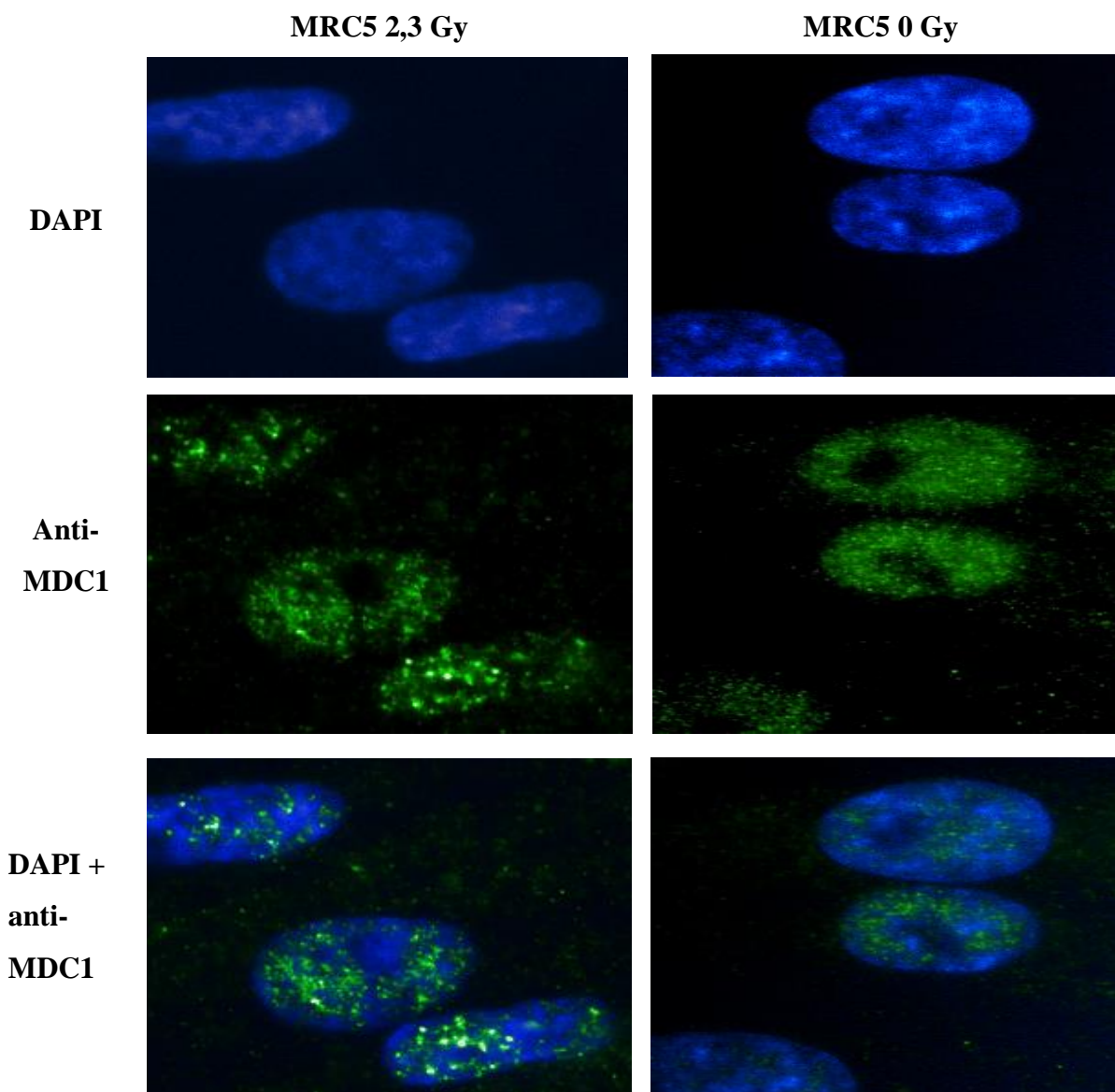


zvětění 40x

Buněčná linie MRC5, zdroj Laboratoř tkáňových kultur (ÚMTM); 2,3 Gy/1minuta, fixace 30 minut po ozáření; + IR je pozitivní kontrola, - IR je negativní kontrola, DAPI - 4',6-diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride = obarvení jader MRC5 buněk, anti-53BP1 je protilátka proti 53 binding protein 1 = marker poškození DNA detekovaný zeleným kanálem, DAPI + anti-53BP1 = spojení kanálu DAPI a anti-53BP1

..

Obr. 26: Pozitivní a negativní kontrola značeného markeru poškození DNA pomocí MDC1



zvětění 40x

Buněná linie MRC5, zdroj Laboratořká ových kultur (ÚMTM); 2,3 Gy/1minuta, fixace 30 minut po ozáření; + IR je pozitivní kontrola, - IR je negativní kontrola, DAPI - 4',6-diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride = obarvení jader MRC5 buněk, anti-MDC1 je protilátka proti mediator of DNA damage checkpoint 1 = marker poškození DNA detekovaný zelenými signály, DAPI + anti-MDC1 = spojení kanálu DAPI a anti-MDC1

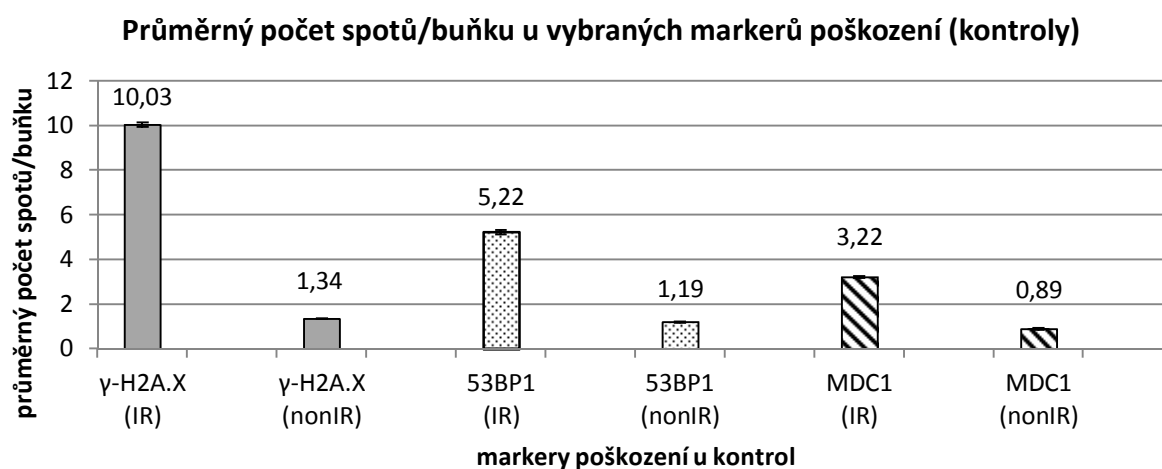
Tab. 20: Analýza marker poškození DNA u kontrolních buněk pozorováním

Marker poškození DNA	Kontrola	Počet buněk	Počet zelených spotů detekovaných pozorováním	Průměrný počet spotů / buňku	Průměrný počet spotů / buňku	
-H2AX	+	100	1 009	10,09	10,03	0,092
-H2AX	+	100	996	9,96		
-H2AX	-	100	135	1,35	1,34	0,014
-H2AX	-	100	133	1,33		
53BP1	+	100	529	5,29	5,22	0,099
53BP1	+	100	515	5,15		
53BP1	-	100	120	1,20	1,19	0,021
53BP1	-	100	117	1,17		
MDC1	+	100	325	3,25	3,22	0,042
MDC1	+	100	319	3,19		
MDC1	-	100	91	0,91	0,89	0,035
MDC1	-	100	86	0,86		

+ pozitivní kontrola, - negativní kontrola, -H2AX ó gamma histon 2AX, 53BP1 ó 53 binding protein 1, MDC1 ó mediator of DNA damage checkpoint 1, ó sm rodatná odchylka

Byl spoítán rozdíl v průměrném počtu zelených spotů na buňku u pozitivních a negativních kontrol každého markeru poškození DNA. U buněk s detekovaným markerem -H2AX byl pozorován u negativních kontrol pokles spotů vzhledem k pozitivní kontrole o 86,6 %, u buněk s markerem 53BP1 o 77,2 % a u markeru MDC1 o 72,4 %. U kontrolních buněk vyšetřovaných na sklech byla kromě analyzování poškození DNA pouhým pozorováním použita i automatická analýza pomocí ScanR Acquisition a Columbus™ Image Data Storage and Analysis system, viz Tab. 21. Pro přehlednost jsou získané výsledky zaneseny v Grafu 1.

Graf 1: Průměrný počet spotů/buňku u markerů poškození DNA (pozorování)



IR ó pozitivní kontrola, nonIR ó negativní kontrola, -H2AX ó gamma histon 2AX, 53BP1 ó 53 binding protein 1, MDC1 ó mediator of DNA damage checkpoint 1

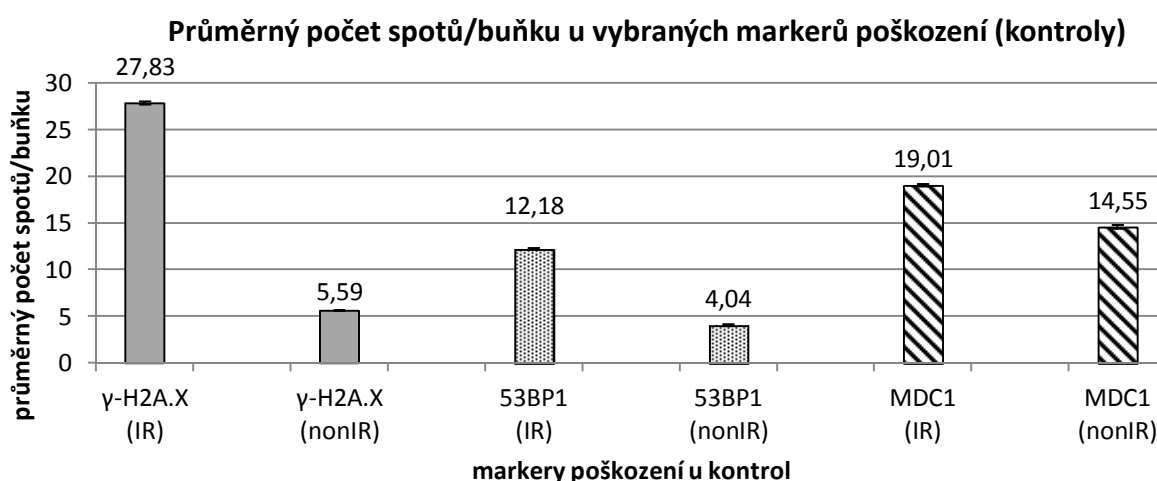
Tab. 21: Automatická analýza markerů poškození DNA u kontrolních buněk na sklech

Marker poškození DNA	Kontrola	Počet buněk	Počet zelených spotů	Průměrný počet spotů/buňku	Průměrný počet spotů/buňku	
-H2AX	+	485	13 432	27,70	27,83	0,184
-H2AX	+	478	13 368	27,96		
-H2AX	-	359	1 998	5,57	5,59	0,028
-H2AX	-	352	1 976	5,61		
53BP1	+	634	7 678	12,11	12,18	0,099
53BP1	+	620	7 593	12,25		
53BP1	-	625	2 568	4,11	4,04	0,092
53BP1	-	631	2 512	3,98		
MDC1	+	558	10 554	18,91	19,01	0,141
MDC1	+	536	10 243	19,11		
MDC1	-	444	6 388	14,39	14,55	0,226
MDC1	-	425	6 253	14,71		

+ pozitivní kontrola, - negativní kontrola, -H2AX ó gamma histon 2AX, 53BP1 ó 53 binding protein 1, MDC1 ó mediator of DNA damage checkpoint 1, ó sm rodatná odchylka

Automatickou analýzou byly spočteny rozdíly v průměrném počtu zelených spotů na buňku u pozitivních a negativních kontrol každého markeru poškození DNA (na skle). U buněk s markerem -H2AX byl zjištěn pokles počtu spotů u negativní kontroly vzhledem k pozitivní kontrole o 79,9 %, u buněk s markerem 53BP1 o 66,8 % a u buněk s markerem MDC1 o 23,5 %. Pro přehlednost jsou získané výsledky zaneseny do Grafu 2.

Graf 2: Průměrný počet spotů/buňku u markerů poškození DNA (analýza obrazu)



IR ó pozitivní kontrola, nonIR ó negativní kontrola, -H2AX ó gamma histon 2AX, 53BP1 ó 53 binding protein 1, MDC1 ó mediator of DNA damage checkpoint 1

U transfekovaných bun k byla zaji-t na automatická analýza obrazu pomocí softwaru Columbus™ Image Data Storage and Analysis system, viz Tab. 23 a 24. Automatická analýza obrazu byla po ízena i pro kontrolní bu ky na deskách (Tab. 22), protofe s nimi byly srovnávány výsledky analýzy transfekovaných bun k (Graf 3 ó 8).

Tab. 22: Automatická analýza marker po-kození DNA kontrolních bun k na deskách

Marker po-kození DNA	Kontrola	Po et bun k	Po et zelených spot	Pr m rný po et spot / bu ku	Pr m rný po et spot / bu ku	
-H2AX	+	1 496	1 642	1,09	1,05	0,092
-H2AX	+	713	682	0,96		
-H2AX	-	2 422	268	0,11	0,11	0,007
-H2AX	-	304	36	0,12		
53BP1	+	2 222	5 757	2,59	2,42	0,247
53BP1	+	2 025	4 536	2,24		
53BP1	-	1 432	1 718	1,20	1,21	0,014
53BP1	-	1 444	1 766	1,22		
MDC1	+	10 768	438	0,041	0,042	0,004
MDC1	+	3 116	142	0,046		
MDC1	-	243	4	0,016	0,014	0,001
MDC1	-	1 108	15	0,014		

+ pozitivní kontrola, - negativní kontrola, -H2AX ó gamma histon 2AX, 53BP1 ó 53 binding protein 1, MDC1 ó mediator of DNA damage checkpoint 1, ó sm rodatná odchylka

Automatickou analýzou byl zji-t n rozdíl v pr m rném po tu zelených spot na bu ku u pozitivní a negativní kontroly markeru po-kození DNA (na deskách). U bun k s markerem -H2AX byl zji-t n pokles spot u negativní kontroly vzhledem k pozitivní o 89,5 %, u bun k s markerem 53BP1 o 50 % a u bun k s markerem MDC1 byl pokles o 66,7 %. Na Obr. 27 jsou ukázkové fotografie transfekovaných MRC5 bun k s detekovaným proteinem -H2AX.

Tab. 23: Automatická analýza obrazu marker po-kození DNA u transfekovaných bun k I

Marker po-kození DNA	Cílový gen (RPL)	Po et jader	Transfekované bu ky	Pr m rná úsp -nost transfekce (%)	Celkem spot v jádrech transfekovaných bun k	Pr m rný po et spot / bu ku
-H2AX	5WT	274	116	43,5	11	0,10
		461	236		26	0,11
		117	19		3	0,16
-H2AX	5M	194	61	38,0	18	0,29
		365	136		45	0,33
		220	99		35	0,35
-H2AX	11WT	239	133	52,1	31	0,23
		220	96		29	0,30
		259	145		29	0,20
-H2AX	11M	984	263	26,0	178	0,67
		359	94		69	0,73
		287	66		31	0,47
53BP1	5WT	183	37	21,8	48	1,29
		147	15		23	1,53
		193	62		74	1,19
53BP1	5M	186	90	44,2	175	1,94
		209	84		134	1,59
		205	91		205	2,25
53BP1	11WT	243	100	44,5	116	1,16
		195	77		67	0,87
		230	120		138	1,15
53BP1	11M	540	201	33,2	368	1,83
		443	144		267	1,85
		362	101		213	2,11
MDC1	5WT	173	29	30,6	1	0,034
		201	86		4	0,046
		179	54		2	0,037
MDC1	5M	243	79	28,5	3	0,037
		211	71		3	0,042
		135	18		2	0,032
MDC1	11WT	194	64	30,9	1	0,016
		263	89		2	0,022
		233	60		2	0,033
MDC1	11M	176	63	41,0	2	0,032
		285	131		5	0,038
		279	109		4	0,037

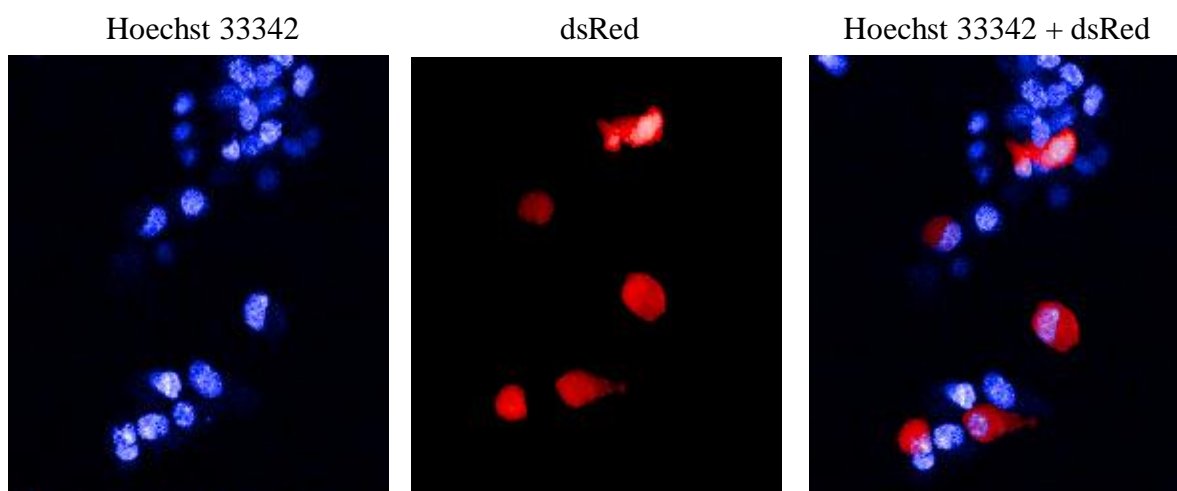
RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, WT ó wild type, M ó mutant, -H2AX - gamma histon 2AX, 53BP1 ó 53 binding protein 1, MDC1 ó mediator of DNA damage checkpoint 1

Tab. 24: Automatická analýza obrazu marker po-kození DNA u transfekovaných bun k II

Marker po-kození DNA	Cílový gen (RPL)	Pr m rný po et spot / bu ku	
-H2AX	5WT	0,11	0,032
-H2AX	5M	0,33	0,031
-H2AX	11WT	0,24	0,051
-H2AX	11M	0,66	0,136
53BP1	5WT	1,27	0,175
53BP1	5M	1,94	0,330
53BP1	11WT	1,08	0,165
53BP1	11M	1,90	0,156
MDC1	5WT	0,04	0,006
MDC1	5M	0,05	0,005
MDC1	11WT	0,02	0,009
MDC1	11M	0,04	0,003

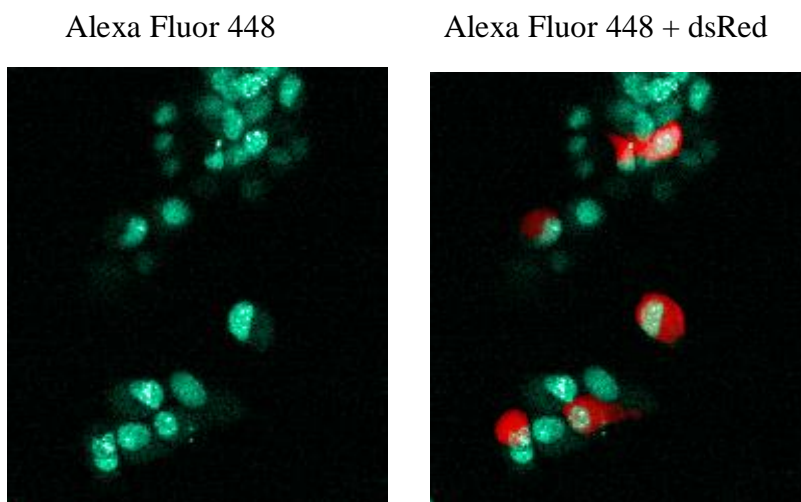
RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, WT ó wild type, M ó mutant, -H2AX - gamma histon 2AX, 53BP1 ó 53 binding protein 1, MDC1 ó mediator of DNA damage checkpoint 1, ó sm rodatná odchylka

Obr. 27: Ukázka transfekovaných MRC5 bun k ptdTomato-C1 plazmidem s mutantním genem *RPL11* (-H2AX)



zv t-ení 20x

Obr. 27 pokračování: Ukázka transfekovaných MRC5 buněk k ptdTomato-C1 plazmidem s mutantním genem *RPL11* (-H2AX)

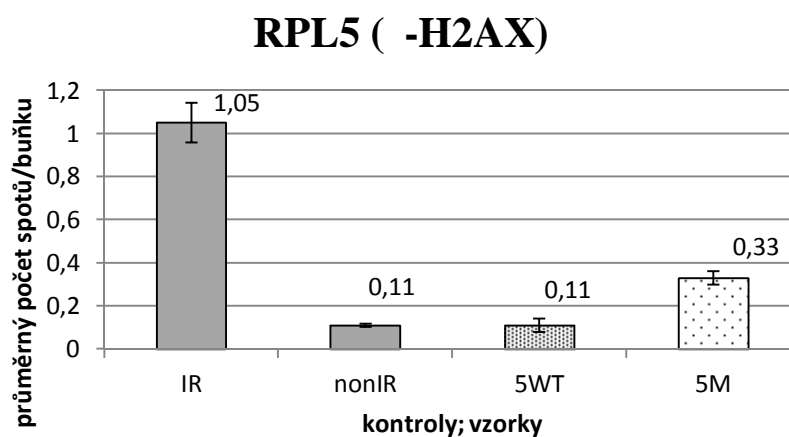


zvětšení 20x

Buněčná linie MRC5, zdroj Laboratořká ových kultur (ÚMTM), fixace 3 dny po elektroporaci, DAPI - 4',6-diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride = obarvení jader MRC5 buněk, Hoechst 33342 ó barvivo jader, dsRed ó protein ptdTomato-C1 plazmidu, Hoechst 33342 + dsRed ó spojení kanálu Hoechst 33342 a dsRed

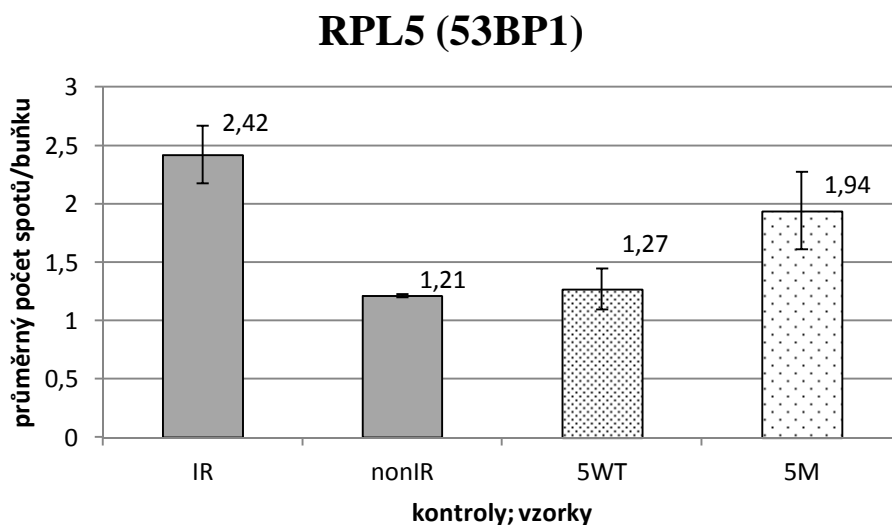
Grafy 3 ó 8 zobrazují a shrnují automatickou analýzu obrazu vybraných markerů poškození DNA (-H2AX, 53BP1 a MDC1) u transfekovaných buněk (Tab. 23, 24) vzhledem k pozitivním a negativním kontrolám (IR, nonIR). V Tab. 25 jsou přehledně shrnuty poklesy průměrných počtů spotů/buňku u všech transfekovaných buněk vzhledem ke specifickým pozitivním kontrolám.

Graf 3: Srovnání průměrného počtu spotů/buňku u kontrolních buněk a buněk transfekovaných vektorem ptdTomato-C1 s cílovým genem *RPL5* WT, M u protilátky anti-H2AX



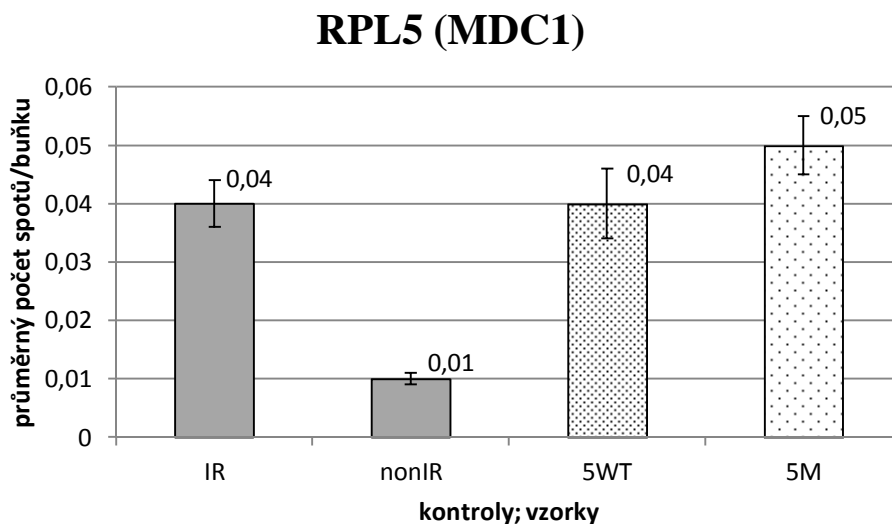
IR ó pozitivní kontrola (ionizující záření), nonIR ó negativní kontrola, RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, WT ó wild type, M ó mutant

Graf 4: Srovnání průměrného počtu spotů/buňku u kontrolních buněk a buněk transfekovaných vektorem ptdTomato-C1 s cílovým genem *RPL5* WT, M u protilátky anti-53BP1



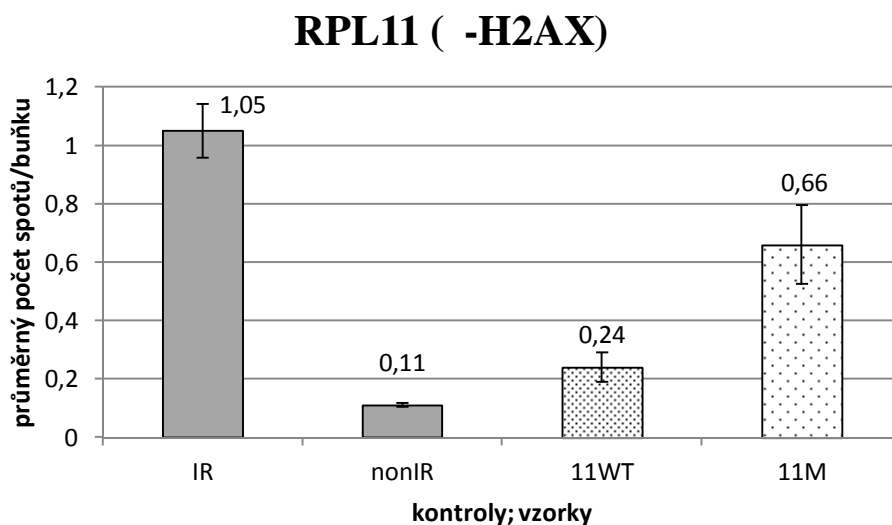
IR ó pozitivní kontrola (ionizující záření), nonIR ó negativní kontrola, RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, WT ó wild type, M ó mutant

Graf 5: Srovnání průměrného počtu spotů/buňku u kontrolních buněk a buněk transfekovaných vektorem ptdTomato-C1 s cílovým genem *RPL5* WT, M u protilátky anti-MDC1



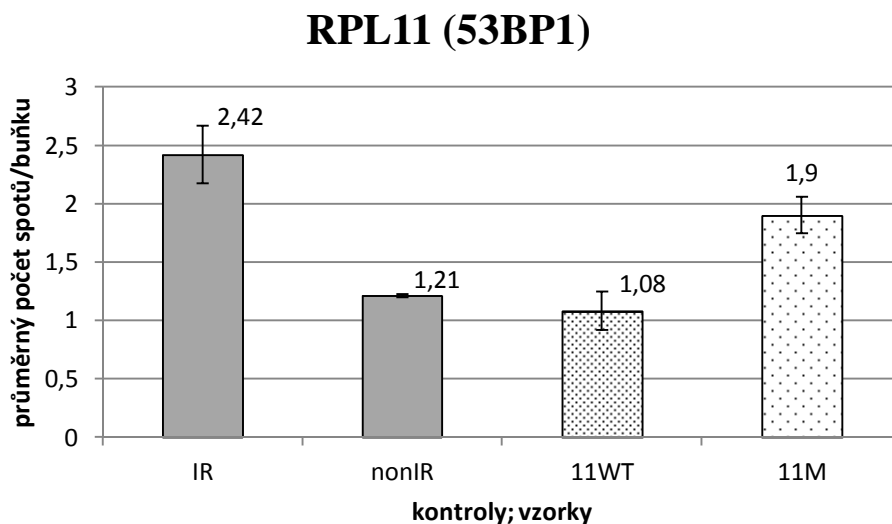
IR ó pozitivní kontrola (ionizující záření), nonIR ó negativní kontrola, RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, WT ó wild type, M ó mutant

Graf 6: Srovnání průměrného počtu spotů/buňku u kontrolních buněk a buněk transfekovaných vektorem ptdTomato-C1 s cílovým genem *RPL11* WT, M u protilátky anti-H2A.X



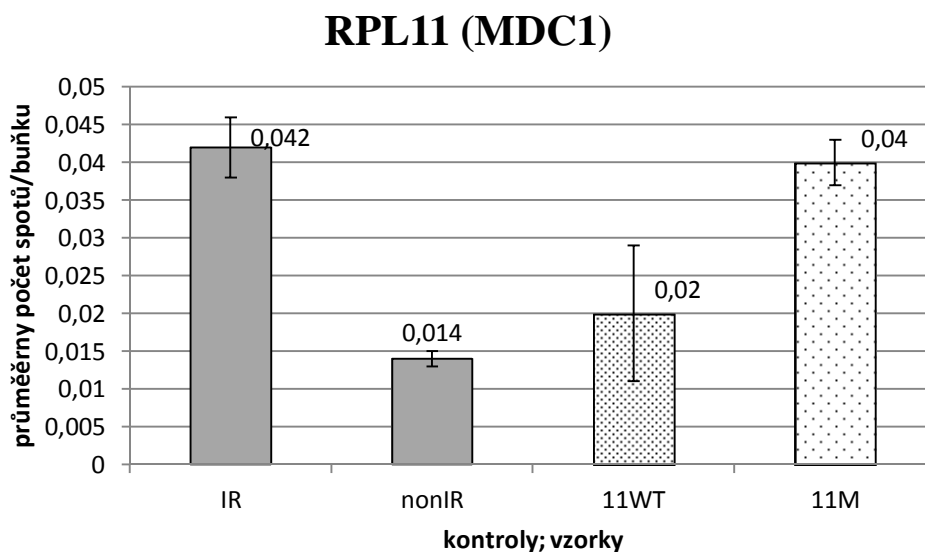
IR ó pozitivní kontrola (ionizující záření), nonIR ó negativní kontrola, RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, WT ó wild type, M ó mutant

Graf 7: Srovnání průměrného počtu spotů/buňku u kontrolních buněk a buněk transfekovaných vektorem ptdTomato-C1 s cílovým genem *RPL11* WT, M u protilátky anti-53BP1



IR ó pozitivní kontrola (ionizující záření), nonIR ó negativní kontrola, RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, WT ó wild type, M ó mutant

Graf 8: Srovnání průměrného počtu spotů/buňku u kontrolních buněk a buněk transfekovaných vektorem ptdTomato-C1 s cílovým genem *RPL11* WT, M u protilátky anti-MDC1



IR ó pozitivní kontrola (ionizující záření), nonIR ó negativní kontrola, RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, WT ó wild type, M ó mutant

Tab. 25: Pokles průměrného počtu spotů/buňku u všech transfekovaných buněk vzhledem k p íslu-né pozitivní kontrole (IR)

Cílový gen	Marker po-kození	WT forma genu (%)	M forma genu (%)
<i>RPL5</i>	-H2AX	89,5	68,6
	53BP1	47,5	19,8
	MDC1	100	125*
<i>RPL11</i>	-H2AX	77,1	37,1
	53BP1	55,4	21,5
	MDC1	52,4	5

* o 25 % zvý-en po et spot /bu ku

RPL ó protein velké ribozomální podjednotky, WT ó wild type, M ó mutant, -H2AX - gamma histon 2AX, 53BP1 ó 53 binding protein 1, MDC1 ó mediator of DNA damage checkpoint 1

6 DISKUZE

DNA bun k je vystavena velkému množství endogenních a exogenních faktorů, které způsobují její poškození. Nejrizikovějším poškozením DNA jsou dvě etablované zlomy, jejichž následkem dochází ke genomické nestabilitě nebo propuká buněčná smrt. Aby se zabránilo apoptóze nebo hromadění genomických poškození, mají buňky vyvinuty systémy oprav. Díky ochranným mechanismům existuje možnost detekovat a lokalizovat proteiny účastnící se těchto drah a vyúflít je jako markery poškození DNA (Cadet a kol., 1997; Jackson a kol., 2001, 2002).

Z recentních studií vyplývá, že by poškození DNA mohlo určitým způsobem iniciovat ribozomální stres, nebo naopak. Tato teorie je však stále předmětem studia. Ribozomálním stresem se označuje narušení nebo poškození biogeneze ribozomu a následkem této události se aktivuje p53 signální dráha (Zhang a kol., 2009). Dráha může být iniciována vyerpáním nebo poškozením některých ribozomálních proteinů, ale zato jiné ribozomální proteiny, konkrétně RPL5 a RPL11 se váží na MDM2. Zastaví se proces proteazomové degradace proteinu p53 a místo toho se v buňkách stabilizuje (Llanos a kol., 2010). Existuje tedy jakési propojení mezi vybranými ribozomálními proteiny a p53 signální dráhou, která je jasným signálem pro stres/poškození v buňce. Proto se geny pro zmíněné proteiny staly předmětem této práce.

Například byl analyzován úbytek proteinu RPL37 na hladinu proteinu p53 a jeho redukce byla prokázána aktivací signální dráhy p53, včetně stabilizace proteinu p53. V buněčných liniích U2OS byl v jádru vizualizován RPL37 pomocí fluorescenčního (GFP) značené protilátky. Po 48 hodinách od transfekce těchto buněk pomocí siRNA, kdy probíhá RNA interference, došlo k výraznému úbytku proteinu RPL37. Tento pokles byl pozorován sníženým počtem detekovaných signálů a po celkovém vyerpání proteinu RPL37 došlo k zastavení buněčného cyklu (Caldarola a kol., 2009; Kruse a kol., 2009). Získané výsledky tedy prokázaly, že v případě úbytku ribozomálního proteinu RPL37 byla aktivována signální dráha p53, ale při nedostatku proteinu RPL5 a RPL11 se signální dráha p53 neaktivovala (Sun a kol., 2010). Byla podpořena teorie, že poškození DNA indukované proteazomovou degradací RPL37 může mít souvislost s iniciací ribozomálního stresu poškozením DNA (Llanos a kol., 2006, 2010).

Narušení biogeneze ribozomu je často propojeno s viditelnými morfologickými změnami jádru. Při vyerpání ribozomálních proteinů RPL23, RPL29 dochází k uvolnění proteinů z jádru do nukleoplazmy (Bhat a kol., 2004; Sun a kol., 2010). V případě vystavení

bun k cytotoxickým látkám je možné pozorovat rozpletení a různé fragmentace jádérka. Příkladem je působení drogy DRB (5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole), která má jádérko na strukturu známou jako šjadérkový náhrdelník, je-li lze pomocí protilátek na jádérkový protein fibrillarin (DFC marker) vizualizovat (Haaf a kol., 1996; Ochs, 1998).

V bakalářské práci byly klonovány geny ribozomálních proteinů *RPL5* a *RPL11* do vektoru pcDNATM3.3 TOPO pomocí TOPO klonování (pcDNATM 3.3-TOPOTA Cloning Kit, Invitrogen), protože jeho klonovací úspěšnost dle výrobce je až 99 % (v závislosti na velikosti PCR produktu). Cílové geny ve wild type a mutantní formě (mutagenese cílových genů - QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies) byly přesto klonovány do ptdTomato-C1 vektoru, protože tento vektor má červený expresní protein tdTomato, pomocí kterého byly rozlišeny transfekované buňky. Firma Invitrogen dodávající kit na elektroporaci (Neon Transfection system) udává 75% úspěšnost v transfekci fibroblastových buněk z plic, ale nám se podařilo přeměnit transfekovat ptdTomato-C1 plazmidem pouze 36,2 % MRC5 buněk. Analýza vybraných markerů poškození DNA (-H2AX, 53BP1 a MDC1) v transfekovaných buňkách byla provedena pomocí jejich nepřímého imunofluorescenčního znebarvení specifickými primárními a sekundárními protilátkami s Alexa Fluor 488.

U buněk se znebarvením markerem -H2AX byl pozorován nárůst po tu spot v i negativní kontrole. Tento aspekt byl oekáván, protože v d sledku elektroporace může docházet ke vzniku nebezpečných dvočetných zlomů. Odpovědí na tyto zlomy je právě fosforylace histonu H2AX, který je běžnou součástí primární struktury chromatinu, tzv. nukleozomu. V místech dvočetných zlomů DNA se na C-konci histonu fosforyluje serin (139. pozice). Tato posttranslační modifikace histonu byla poprvé pozorována po působení záření a z toho důvodu se nazývá fosforylovaný histon -H2AX (Rogakou a kol., 1998 a 1999). Hlavním faktorem způsobujícím jeho fosforylaci je kináza ATM, případně DNA-PK a ATR kináza (Burman a kol., 2001; Durocher a kol., 2001). U buněk s wild type formou genu *RPL5* nebylo detekováno zvýšené množství markeru -H2AX, ale naopak u mutantní formy došlo k více než 60% nárůstu vzhledem k nestresovaným buňkám (negativní kontrola). Tuto skutečnost si vysvětlujeme přítomností mutantního proteinu RPL5 (i RPL11) v buňkách. Přítomnou mutací se narušila syntéza ribozomu a tím pádem zřejmě nedošlo k dostatečnému zásobení místa poškození proteiny opravných drah, takže množství detekovaného markeru poškození DNA zůstalo zvýšené.

Fosforylovaný -H2AX poskytuje vazebné místo pro protein MDC1. Závislost MDC1 proteinu na -H2AX se zřejmě projevila tím, že při zvýšeném výskytu -H2AX narostlo

i množství MDC1. Hlavními vazebnými doménami proteinu MDC1 k fosforylovanému histonu jsou BRCT (BRCA1 C Terminus) oblasti, které slouží i jako místa vazby dalších reparačních proteinů. Lokalizace proteinu MDC1 závisí na přítomnosti fosforylovaného histonu a k jeho citlivému značení byla provedena preextrakce. Na základě těchto informací bylo podobně jako u histonu pozorováno navýšení markeru MDC1 u buněk s mutantními proteiny RPL5 a RPL11.

Dalším proteinem kolokalizujícím a interagujícím s fosforylovaným histonem v místech dvou endogenních zlomů je marker 53BP1. V analyzovaných buňkách byl u markeru 53BP1 pozorován nárůst podobný jako u proteinu MDC1, jelikož je stejně jako MDC1 závislý na přítomnosti fosforylovaného histonu. Esenciální funkcí proteinu 53BP1 je vazba na centrální vazebnou doménu proteinu p53, čímž zprostředkovává jeho aktivaci v buňkách (Iwabuchi a kol., 1994, 1998).

Nejcitlivější metodou na lokalizování endogenních zlomů je imunofluorescenční značení daného markeru, například -H2AX protilátkou. Ke kvantifikaci jednotlivých -H2AX spotů se používá nejčastěji fluorescenční mikroskop, protože právě jednomu spotu -H2AX odpovídá jeden endogenní zlom (Rogakou a kol., 1999). K dalším méně citlivým metodám na kvantifikaci markerů poškození DNA může být použita kometová analýza neboli gelová elektroforéza, která detekuje poškození na úrovni jednotlivých buněk (Singh a kol., 1998), Western blot (Burma a kol., 2001), 2-D elektroforéza (Foster a kol., 2005) anebo proukový cytometr (Kataoka a kol., 2006).

K našemu studiu vlivu ribozomálního stresu na markery poškození DNA by bylo vhodné použít i jiné markery, které by nesignalizovaly tak fatální poškození DNA, jako jsou právě endogenní zlomy. S největší pravděpodobností by v buňkách pod ribozomálním stresem ani nevznikaly. Pokud bychom chtěli analýzu doplnit o další markery signalizující poškození DNA, nabízí se markery oxidativního stresu (zpravidla ROS) jako 8-hydroxyguanosin a 8-oxo-2'-deoxyguanosin (Shigenaga a kol., 1989). Případně se mohou použít i markery reparačních proteinů, které jsou součástí opravných drah poškození DNA, například XPC, Ku70, Rad52 a ATM i ATR.

Na klonování a následnou analýzu markerů lze použít i jiné známé geny kódující další ribozomální proteiny. Především se nabízí geny kódující proteiny RPL23, RPL26, RPL37 a RPS15 a RPS20, které svou vazbou na MDM2 aktivují p53 signální dráhu.

Elektroporace je účinnou metodou na transformaci buněk, ale elektrický proud může velkou část buněk usmrtit nebo (dle výše popsaných výsledků) vést k poškození DNA, a proto by bylo možné srovnat elektroporaci s účinností například lipofekce a jejím účinkem na

bu ky/DNA. Dále by bylo vhodné k testovaným kontrolám a vzorkům přidat skupinu buněk, které by byly transfekovány šnaprázdno, tzn. prošly by elektroporací stejně jako testované bučky, ale bez dodání vektoru. Mohli bychom takto jednoduše odlišit vliv samotné elektroporace.

Skenování spot po imunofluorescenčním značení bylo provedeno při zvětšení objektivu 20x. Použitím většího zvětšení (40x) bychom mohli získat podstatně přesnější výsledky. S ribozomálním stresem souvisí celá řada dalších jevů, jejichž sledováním bychom mohli dojít k dalším výsledkům a k vysvětlení některých trendů. Například měněním hladiny proteinu p53 by mohl být signifikantně potvrzen vliv ribozomálního stresu na tento marker poškození DNA.

7 ZÁVĚR

V rámci zadání bakalářské práce byly z cDNA úspěšně izolovány geny pro ribozomální proteiny *RPL5* a *RPL11*, které se podařilo zaklonovat do vektoru pcDNATM3.3 TOPO. Bakterie *Escherichia coli*, kmen DH5 byly transformovány těmito vektory s wild type a mutantní formou genu, ze kterých byly následně izolovány plazmidy. Za účelem rozlišení transfekovaných buněk byly obě formy cílových genů klonovány do vektoru ptdTomato-C1, který exprimoval protein dsRed. Izolované plazmidy s cílovými geny byly transfekovány (elektroporace) do lidských MRC5 buněk. Následně se podařilo úspěšně imonofluorescenční známit 3 vybrané markery poškození DNA (-H2AX, 53BP1 a MDC1) u kontrolních i transfekovaných buněk. Na závěr bylo analyzované poškození DNA srovnáno s kontrolními buňkami.

Úspěšnost transfekce byla u MRC5 buněk spočítána na 36,2 %. Z automatické analýzy kontrolních buněk vyšetřovaných na sklech i na deskách bylo u pozitivních kontrol průměrně detekováno v určitém množství poškození DNA nejlépe u negativní kontroly. U negativních kontrol na sklech v porovnání s pozitivní kontrolou byl u markeru -H2AX zjištěn pokles poškození o 79,9 %, u markeru 53BP1 o 66,8 % a u markeru MDC1 o 23,8 %. Kontrolní buňky vyšetřované na deskách měly také detekovaný pokles poškození u negativní kontroly, u markeru -H2AX o 89,5 %, u markeru 53BP1 o 50 % a u markeru MDC1 o 66,7 %. U transfekovaných buněk byl ve srovnání s průměrnou pozitivní kontrolou vypočítán pokles markeru poškození DNA. Buňky s wild type formou *RPL5* genu měly vzhledem k pozitivní kontrole u markeru -H2AX pokles o 89,5 %, u markeru 53BP1 o 47,5 % a u MDC1 nebyl žádný pokles (0 %). U buněk s mutantní formou *RPL5* genu byl oproti pozitivní kontrole detekován podstatně menší pokles spotřeby u markeru poškození -H2AX o 68,6 %, u 53BP1 o 19,8 % ačkoliv u MDC1 došlo dokonce k navýšení poškození oproti pozitivní kontrole, a to o 25 %. Buňky s wild type formou *RPL11* genu měly u markeru poškození -H2AX pokles o 77,1 %, u markeru 53BP1 o 55,4 % a u markeru MDC1 o 52,4 % oproti pozitivní kontrole. U buněk s mutantní formou *RPL11* genu došlo k podstatně menšímu poklesu spotřeby ve srovnání s pozitivní kontrolou - u markeru -H2AX o 37,1 %, u 53BP1 o 21,5 % a u MDC1 o 5 %.

Při srovnání transfekovaných MRC5 buněk s wild type a mutantní formou genu *RPL5* a *RPL11* bylo u buněk s mutantní formou genu pozorováno podstatně větší poškození nejlépe u buněk s wild type formou genu.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOL

53BP1	53 binding protein 1
A	adenin
AP	abazické místo (apurinové/apyrimidinové)
APE 1	apurinová/apyrimidinová endonukleáza 1
APLF	aprataxin-and-PNK-like factor
ATLD	ataxia telangiectasia like disorder
ATM	ATM serin/treonin kináza
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BER	bázová excizní oprava
BRCA1 (2)	breast cancer 1 (2)
BRCT	BRCA 1 C Terminus
C	cytosin
cDNA	komplementární DNA
CPD	cyklobutanové pyrimidinové dimery
CSA (CSB)	Cockayne syndrome A (B)
DBA	Diamond-Blackfanova anémie
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-PKcs	katalytická jednotka DNA dependentní protein kinázy
dRP	deoxyribozofosfát
DSB	dvou et zcový zlom (double strand break)
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ERCC1	excision repair cross-complementing group 1
FEN1	flap structure-specific endonukleáza 1
FP	forward primer
G	guanin
GG-NER	global genomic NER
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer
HR	homologní rekombinace
HR23B	UV excision repair protein RAD23 homolog B
IR	pozitivní kontrola (ionizující záření)
kb	kilobáze

Lig I	DNA ligáza I
M	mutant
MDC1	mediator of DNA damage checkpoint 1
MDM2	mouse double minute 2 homolog
MGMT	O ⁶ -methylguanin-DNA-methyltransferáza
MMR	chybné párování bází (DNA mismatch repair)
Mre11	meiotic recombination 11
mRNA	mediátorová RNA
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1
NER	nukleotidová excizní oprava
NHEJ	nonhomologous end joining
nonIR	negativní kontrola
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerázová a inverzní reakce
PP	fotoprodukty
Pu	purinová báze
Py	pyrimidinová báze
Rad50	RAD50 homolog, double strand break repair protein
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní kyslíkový radikál
RP	reverse primer
RPA (C)	replication protein A (C)
RPL	ribosomal protein large
RPS	ribosomal protein small
rRNA	ribozomální RNA
RS-SCID	radiosensitive severe combined immunodeficiency
SSB	jednostranný zlom (single strand break)
T	tymin
TC-NER	transcription coupled NER
TFIIH complex	transcription factor II human
TP53	tumor protein P53
ÚMTM	Ústav molekulární a translační medicíny
UV	ultrafialové záření
XLF	XRCC4-like factor

XPA (B, C, D, F, G)	Xeroderma Pigmentosum, complementation group A (B, C, D, F,G)
XRCC1	X-Ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
XRCC4	X-ray cross complementing protein 4
WT	wild type
-H2AX	gamma histon 2AX sm rodatná odchylka

9 SEZNAM LITERATURY

- Abbotts R., Madhusudan S. (2010): Human AP endonuclease 1 (APE1): from mechanistic insights to druggable target in cancer. *Cancer Treat Rev* 36 (5): 425 - 435.
- Akbari M., Krokan H. E. (2008): Cytotoxicity and mutagenicity of endogenous DNA base lesions as potential cause of human aging. *Mech Ageing Dev.* 129 (7-8): 353 - 365.
- Bartek J., Lukas J. (2007): DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Current Opinion in Cell Biology* 19: 238 - 245.
- Bernstein N. K., Williams R. S., Rakovszky M. L., et al. (2005): The molecular architecture of the mammalian DNA repair enzyme, polynucleotide kinase. *Mol Cell* 17: 657 - 670.
- Bhat, K.P.; Itahana, K.; Jin, A.; Zhang, Y.(2004): Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation. *Embo. J.* 23, 2402-2412.
- Boyd, M.T.; Vlatkovic, N.; Rubbi, C.P. (2011): The nucleolus directly regulates p53 export and degradation. *J. Cell Biol.*, 194, 689-703.
- Bridge, G., Rashid, S., & Martin, S. A. (2014). DNA Mismatch Repair and Oxidative DNA Damage: Implications for Cancer Biology and Treatment. *Cancers*, 6(3), 1597-1614
- Buck D., Malivert L., de Chasseval R., Barraud A., Fondanèche M. C., Sanal O., Plebani A., Stéphan J. L., Hufnagel M., le Deist F., Fischer A., Durandy A., de Villartay J. P., Revy P. (2006): "Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly". *Cell* 124 (2): 287-299.
- Burger K., Muhl B., Harasim T., Rohrmoser M., Malamoussi A., Orban M., Kellner M., Gruber-Eber A., Kremmer E., Holzner M., et al. (2010): Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J. Biol. Chem.* 285: 12416 - 12425.
- Burma S., Chen B. P., Murphy M., Kurimasa A., Chen D. J. (2001): ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276: 42462-42467.
- Bursac S, Brdovcak MC, Pfannkuchen M, Orsolic I, Golomb L, Zhu Y, Katz C, Daftuar L, Grabusic K, Vukelic I, Filic V, Oren M, Prives C and Volarevic S. (2012): Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 109(50):20467-20472.
- Cadet J., Berger M., Douki T., Ravanat J. L. (1997): Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 131: 1 - 87.

- Caldarola S., De Stefano M.C., Amaldi F., Loreni F. (2009): Synthesis and function of ribosomal proteins - fading models and new perspectives. *FEBS J.* 276; 31996210.
- Caldecott K. W. (2003): XRCC1 and DNA strand break repair. *DNAREpair (Amst)* 2 (9): 955 - 969.
- Cary R. B., Peterson S. R., Wang J., et al. (1997): DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4267 - 4272.
- Cmejla R., Cmejlova J., Handrkova H., Petrak J., Pospisilova D. (2007): Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat.* 28 (12): 1178 - 1182.
- Connor F., Bertwistle D., Mee P. J., Ross G. M., Swift S., Grigorieva E., Tybulewicz V. L., Ashworth A. (1997): Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation. *Nat Genet* 17: 423 - 430.
- Costa R. M., Chigancas V., Galhardo Rda S., Carvalho H., Menck C. F. (2003): The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochemie* 85 (11): 1083 - 1099.
- Critchlow S., Bowater R., Jackson S. P. (1997): Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr. Biol.* 7: 588 - 598.
- Da Costa L., Tchernia G., Gascard P., et al. (2003): Nucleolar localization of RPS19 protein in normal cells and mislocalization due to mutations in the nucleolar localization signals in 2 Diamond-Blackfan anemia patients: potential insights into pathophysiology. *Blood* 101 (12): 5039 - 5045.
- Dai Y., Kysela B., Hanakahi L. A., Manolis K., Riballo E., Stumm M., Harville T. O., West S. C., Oettinger M. A., Jeggo P. A. (2003): Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor, *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (5): 2462 - 2467.
- decondensation, loss of nucleolar structure, and dispersion of chromosomal domains. *Exp. Cell Res.* 224, 163-173.
- Defossez P. A., Stancheva I. (2011): Biological functions of methyl-CpG-binding proteins. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 101: 377 - 398.
- Denny W. A. (1995): *Cancer Chemotherapeutic Agents*. Foye, WA., editor. American Chemical Society; Washington DC: 491-493.
- Diamond L. K., Blackfan K. D. (1938): Hypoplastic anemia. *Am J Dis Child.* 56: 464.
- Draptchinskaia N., Gustavsson P., Andersson B., Pettersson M., Willig, T. N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia G., Klar J., Matsson H., et al. (1999): The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat. Genet.* 21: 169 - 175.

- Drygin D., Siddiqui-Jain A., O'Brien S., Schwaebe M., Lin A., Bliesath J., Ho C. B., Proffitt C., Trent K., Whitten J. P., et al. (2009): Anticancer activity of CX-3543: A direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res.* 69: 7653 - 7661.
- Durocher D., Jackson S. P. (2001): DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol* 13: 225-231.
- Erickson, L. C., Bradley, M. O., Ducore, J. M., Ewig, R. A., & Kohn, K. W. (1980). DNA crosslinking and cytotoxicity in normal and transformed human cells treated with antitumor nitrosoureas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(1), 467-471.
- Fortini P., Dogliotti E. (2007): Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)* 6 (4): 398 - 409.
- Foster E. R. and Downs J. A. (2005): Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J* 272: 3231-3240.
- Fousteri M., Mullenders L. H. (2008): Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.*18 (1): 73-84.
- 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 Dev.* 26: 1028 - 1040.
- Galio L., Bouquet C., Brooks P. (1999): ATP hydrolysis-dependent formation of a dynamic ternary nucleoprotein complex with MutS and MutL. *Nucleic Acid Res* 27 (11): 2325 - 2331.
- Gazda H. T., Sheen M. R., Vlachos A., et al. (2008): Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet.* 83 (6): 769 - 780.
- Godfrey, V.L.; Evan, G.I.; Zhang, Y.(2007): Targeted inactivation of Mdm2 ring finger E3 ubiquitinligase activity in the mouse reveals mechanistic insights into p53 regulation. *Cancer Cell.* 12: 355-366.
- Gottlieb T. M., Jackson S. P. (1993): The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 72: 131 - 142.
- Gould E. S. (1959): *Mechanism and Structure in Organic Chemistry*. Holt, Rinehart and Winston, New York, 452- 458.

- Grawunder U., Wilm M., Wu X., et al. (1997): Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 388: 492 - 495.
- Haaf, T.; Ward, D.C. (1996): Inhibition of RNA polymerase II transcription causes chromatin decondensation, loss of nuclear structure, and dispersion of chromosomal domains. *Exp. Cell Res.* 224 (1): 163-173.
- Hanawalt P. C., Spivak G. (2008): Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (12): 958 - 970.
- Hayflick L., Moorhead P. S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585 - 621.
- Henras A. K., Soudet J., G erus M., et al. (2008): The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* 65 (15): 2334 - 2359.
- Heyer, W. D., Ehmsen, K. T. & Liu, J. (2010): Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 44, 113-139.
- Hill-Perkins, Jones M., Karran P, M. D. (1986): Site-specific mutagenesis in vivo by single methylated or deaminated purine bases. *Mutat. Res.* 162: 153 - 163.
- Hoeijmakers J. H. (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366 - 374.
- Modrich P. (2006): Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem* 281 (41): 30305 - 30309.
- Hoeijmakers J. H. (2009): DNA damage, aging and cancer. *N Engl J Med* 361: 1475 - 1485.
- Holliday, R. (1974): Molecular aspects of genetic Exchange and gene conversion. *Genetics*, 78: 273 - 287.
- Hurt E. (2003): Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* 13 (5): 255 - 263.
- Chamberland S.; Gr uschow S.; Sherman D. H.; Williams R. M. (2009): Synthesis of Potential Early-Stage Intermediates in the Biosynthesis of FR900482 and Mitomycin C. *Org. Lett.* 11: 791 - 794.
- Chang E. H., Furth M. E., Scolnick E. M., Lowy D. R.; Furth; Scolnick; Lowy (1982): Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 297 (5866): 479-483
- Chappell C., Hanakahi L. A., Karimi-Busheri F., Weinfeld M., Stephen C. Wes (2002): Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *The EMBO Journal* 21: 2827 - 2832.

- Ikeda M., Kurose A., Takatori E., Sugiyama E., Tragakonos F., Darzyniewicz W., Sawai T. (2010): DNA damage detected with γ H2AX in endometrioid adenocarcinoma cell lines; *Int. J. Oncol.* 36 (5); 1081 ó 1088.
- Itahana, K.; Mao, H.; Jin, A.; Itahana, Y.; Clegg, H.V.; Lindström, M.S.; Bhat, K.P., Goldfrey V. L., Evan G., Zhang Y. (2007): Targeted inactivation of Mdm2 RING finger E3 ubiquitin ligase activity in the mouse reveals mechanistic insights into p53 regulation. *Cancer Cell.* 12 (4): 355-366.
- Iwabuchi, K., B. Li, H.F. Massa, B.J. Trask, T. Date, and S. Fields (1998): Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2. *J. Biol. Chem.* 273;26061ó26068.
- Iwabuchi, K., P.L. Bartel, B. Li, R. Marraccino, and S. Fields (1994): Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91;6098ó6102.
- Izzotti A., Cartiglia C., Taningher M., De Flora S., Balansky R. (1999): Age-related increases of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and DNA-protein crosslinks in mouse organs. *Mutat. Res.* 446: 215 - 223.
- Jackson P. S., Khanna K. K. (2001): DNA double strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics* 27, 247 ó 254.
- Jaffe N., Paed D., Traggis D., Salian S., Cassady J. R. (1976): Improved outlook for Ewing's sarcoma with combination chemotherapy (vincristine, actinomycin and cyclophosphamide) and radiation therapy. *Cancer* 38: 1925 - 1930.
- Jentsch S., Lademann C. A. (2014): Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 369ó383.
- Johnson R. D., Jasin M. (2000): Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *The EMBO Journal* 19 (13): 3398-3407.
- Josephs H. W. (1936): Anaemia of infancy and early childhood. *Medicine.* 15: 307.
- Kamiya H., Suzuki M., Ohtsuka E. (1993): Mutation-spectrum of a true abasic site in codon 12 of a c-Ha-ras gene in mammalian cells. *FEBS Lett.* 328: 125 - 129.
- Kataoka Y., Binkdokas V. P., Duggan R. C., Murley J. S., Grdina D. J. (2006): Flow cytometric analysis of phosphorylated histone H2AX following exposure to ionizing radiation in human microvascular endothelial cells. *J Radiat Res* 47: 245-257.
- Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972): Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26 (4): 239-257.

- Khanna K. K., Jackson S. P. (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27 (3): 247 - 254.
- Kim, T. H., Leslie, P., Zhang, Y. (2014): Ribosomal proteins as unrevealed caretakers for cellular stress and genomic instability. *Oncotarget*, 5(4), 860-871.
- Kirkwood T. B. (2005): Understanding the odd science of aging. *Cell* 120: 437 - 447.
- Kochetkov N. K., Budovskii E. I. (1972): Hydrolysis of N-glycosidic bonds in nucleosides, nucleotides and their derivatives. *Org. Chemistry of Nucleic Acids* NY: 425 - 448.
- Kolodner R. D. (1995): Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem Sci.* 20 (10): 397 - 401.
- Kornberg A, and Baker TA (1992): *DNA Replication*, 2nd Edition WH Freeman and Company, New York, New York.
- Krogh B. O., Symington L. S. (2004): Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* 38: 233 - 271.
- Kruse JP, Gu W.(2009): Modes of p53 regulation. *Cell*.137: 609-622.
- Kunkel T. A., Erie D. A. (2005): DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 74: 681-710.
- Lane D. P. (1992): Cancer p53 guardian of the genome. *Nature* 358: 15 - 16.
- Lawley P. D., Thatcher C. J. (1970): Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured cells by *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. The influence of cellular thiol concentrations on the extent of methylation and the 6-oxygen atom of guanine as a site of methylation. *Biochem J.* 116 (4): 693 - 707.
- Lawrence A., Loeb, Bradley D., Preston (1986): Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites. *Ann. Rev. Genet.* 20: 201 - 230.
- Leary D. J. and Huang S. (2001): Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus, *FEBS Lett.* 509, 149 - 150.
- Leibeling D., Laspe P., Emmert S. (2006): Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol* 37: 225-238.
- Li X., Heyer W. D. (2008): Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 18 (1): 99 - 113.
- Liang F., Han M., Romanienko P. J., Jasin M. (1998): Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (9): 5172 - 5177.
- Lindahl T. (1974): An N-Glycosidase from *Escherichia coli* That Releases Free Uracil from DNA Containing Deaminated Cytosine Residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 71 (9): 3649 - 3653.

- Lindahl T. (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362 (6422): 709 - 715.
- Lindahl T., Byberg B. (1972): Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11 (19): 3610 - 3618.
- Lindström M. S. (2009): Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379: 167 - 170.
- Lipton J. M. , Ellis S. R. (2009): Diamond-Blackfan anemia: diagnosis, treatment, and molecular pathogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 23 (2): 261 - 282.
- Llanos S., Efeyan A., Monsech J., Dominguez O., Serrano M. (2006): A high-throughput loss-of-function screening identifies novel p53 regulators. *Cell Cycle* 5;188061885.
- Llanos S., Serrano M. (2010): Depletion of ribosomal protein L37 in response to DNA damage and activities p53 through the L11/MDM2 pathway. *Cell Cycle* 9 (19); 4005 ó 4012.
- Lutsenko E.; Bhagwat A. S. (1999): The role of the Escherichia coli mug protein in the removal of uracil and 3,N(4)-ethenocytosine from DNA. *J. Biol. Chem.* 274: 31034 - 31038.
- Mahajan K. N., Gangi-Peterson L., Sorscher D. H., et al. (1999): Association of terminal deoxynucleotidyl transferase with Ku. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13926 - 13931.
- Manfredi J. J. (2010): The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor supressor. *Genes Dev.* 24 (15); 1580-1589.
- Marechal V., Elenbaas B., Piette J. (1994): The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Mol Cell Biol.*, 14: 7414-20.
- McIlwraith M.J., Vaisman A., Liu Y., Fanning E., Woodgate R., West S.C. (2005): Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol Cell* 20 (5): 7836792.
- Misteli T., Soutoglou E. (2009): The emrerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (4): 243 ó 254.
- Modesti M., Kanaar R. (2001). Homologous recombination: from model organisms to human disease. *Genome Biology*, 2 (5): 1014.1 - 1014.5.
- Noll D. M., Mason T. M., Miller P. S. (2006): Formation and repair of interstrand cross-links inDNA. *Chem Rev* 106 (2): 277 - 301.
- O'Connor T. R., Laval J. (1989): Physical association of the 2,6-diamino-4-hydroxy 5Nformamidopyrimidine-DNA glycosylase of Escherichia coli and an activity nicking DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5222 - 5226.

- Ochs, R.L. (1998): Methods used to study structure and function of the nucleolus. *Methods Cell Biol.* 53, 303-321.
- Ojwang J. O., Grueneberg D. A., Loechler E. L. (1999): Synthesis of a duplex oligonucleotide containing a nitrogen mustard interstrand DNA-DNA. *Cancer Res* 49: 6529 - 6537.
- Olson M. O. (2004): Sensing cellular stress: Another new function for the nucleolus? *Sci* 10.
- Orfali K. A., Ohene-Abuakwa Y., Ball S. E. (2004): Diamond-Blackfan anaemia in the UK: clinical and genetic heterogeneity. *Br J Haematol.* 125 (2): 243 - 252.
- Palombo F, Iaccarino I, Nakajima E, Ikejima M, Shimada T, Jiricny J. (1996): hMutSbeta, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr Biol.*; 6 (9):1181-4.
- Pang D., Yoo S., Dynan W., et al. (1997): Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy. *Cancer Res* 57: 1412 - 1415.
- Panse V.G., Johnson A.W. (2010): Maturation of eukaryotic ribosomes: Acquisition of functionality. *Trends Biochem. Sci.* 35, 260-266.
- Peltomaki P. (2001): Deficient DNA mismatch repair. *Cell Res* 18(1): 85-98.
- Politz JC, Polena I, Trask I, Bazett-Jones DP, Pederson T. (2005): A nonribosomal landscape in the nucleolus revealed by the stem cell protein nucleostemin. *Mol Biol Cell*; 16:3401-10.
- Rahman N., Stratton M. R. (1998): The genetics of breast cancer susceptibility. *Annu. Rev. Genet.* 32: 95 - 121.
- Raska I., Shaw P. J., Cmarko D. (2006): New insights into nucleolar architecture and activity. *Int. Rev. Cytol.* 255: 177 - 235.
- Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P., and Lopez, B. S. (2012): Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining. *Cancer Radiother* 16, 1-10.
- Robledo S., Idol R. A., Crimmins D. L., Ladenson J. H., Mason P. J., Bessler M. (2008): The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *RNA* 14 (9): 1918-1929
- Rogakou E. P., Pilch D. R., Orr A. H., Ivanova V. S. and Bonner W.M. (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273: 5858-5868.
- Rogakou E. P., Pilch D.R., Orr A.H, Ivanova V.S., Bonner W.M (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.*, 273, 5858-5868.

- Rogakou, E. P., C. Boon, et al. (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double strand breaks in vivo. *J Cell Biol.* 146 (5): 905-916.
- Rubbi C. P., Milner J. (2003): Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *Embo. J.* 22: 6068 - 6077.
- Ruggero D., Pandolfi P. P. (2003) Does the ribosome translate cancer? *Nat. Rev. Cancer* 3: 179 - 192.
- Spahn CM, Beckmann R, Eswar N, Penczek PA, Sali A, Blobel G, Frank J. (2001): Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell.* 107: 373-86.
- Samir Acharya, Teresa Wilson, Scott Gradia, Michael F. Kane, Shawn Guerrette, Gerald T. Marsischky, Richard Kolodner, and Richard Fishel (1996): hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24): 13629-13634.
- Sanchez J. F., Racine M. D., Mamet-Bratley (1994): Effect of abasic sites on bacteriophage T7 protein synthesis. *Mutat. Res.* 325: 39 - 45.
- Sedgwick B., Bates P. A., Paik J., Jacobs S. C., Lindahl T. (2007): Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair (Amst)* 6: 429 - 442.
- Shapiro J. A. (1966): Chromosomal location of the gene determining uridine diphosphoglucose formation in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 92: 518 - 520.
- Shigenaga M. K., Gimeno C., Ames B. N. (1989): Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86; 9697 - 9701.
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R. and Schneider E. L. (1998): Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
- Sipley J. D., Menninger J. C., Hartley K. O., Ward D. C., Jackson S. P., Anderson C. W. (1995): "Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (16): 7515-69.
- Spahn C.M., Beckmann R., Eswar N. (2001): Structure of the 80S ribosome from
- Stracker, T. H. & Petrini, J. H. (2011): The MRE11 complex: starting from the ends. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 906-103.

- Stucki M., Clapperton J.A., Mohammad D, Yaffe M.B, Smerdon S.J., Jackson S.P. (2005): MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks, *Cell* 123; 121361226.
- Sugasawa K. (2008): XPC: its product and biological roles. *Adv Exp Med Biol* 637: 47-56.
- Sugasawa K., Ng J. M., Masutani C. et al (1998): Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* 2 (2): 223 - 232.
- Sun X. X., Dai M. S., Lu H (2007): 5-fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction. *J. Biol. Chem.* 282: 8052 - 8059.
- 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. *J Biol Chem.* 285; 25812621.
- Symington, L. S. & Gautier, J. (2011): Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.* 45, 2476271.
- Thoms K. M., Kuschal Ch., Emmert S. (2007): Lessons learned from DNA repair defective syndrome. *Experimental Dermatology* 16: 532 - 544.
- Totter J. R. (1980): Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1763 - 1767.
- Trends Cell Biol.*13: 255-63.
- Truglio J. J., Croteau D. L., Van Houten B., Kisker C. (2006): Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. *Chem Rev* 106: 233 - 252.
- Tudek B., Swoboda M., Kowalczyk P., Olinski R. (2006): Modulation of oxidative DNA damage repair by the diet, inflammation and neoplastic transformation. *Institute of Biochemistry and Biophysics.*
- Umar A., Buermeier A. B., Simon J. A., et al. (1996): Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* 87: 65 - 73.
- Vasen H. F., Moslein G., Alonso A., Bernstein I., Bertario L., Blanco I., Burn J., Capella G., Engel C., Frayling I., Friedl Hes F. J., Hodgson S., Mecklin J. P., Moller P., Nagengast F., Parc Y., Renkonen-Sinisalo L., Sampson J. R., Stormorken A. (2007): Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *Med Genet* 44: 353 - 362.
- Venema J, Tollervey D. (1999): Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet.* 33:261-311

- Vermeulen W., de Boer J., Citterio E. et al (1997): Mammalian nucleotide excision repair and syndromes. *Biochem Soc Trans* 25 (1): 309 - 315.
- Vlachos A., Federman N., Reyes-Haley C., Abramson J., Lipton J.M. (2001): Hematopoietic stem cell transplantation for Diamond-Blackfan anemia: a report from the Diamond-Blackfan Anemia Registry. *Bone Marrow Transplant*. 27 (4): 381 - 386.
- Vogel E. W., Barbin A., Nivard M. J., Stack H. F., Waters M. D., Lohman P. H. (1998): Heritable and cancer risks of exposures to anticancer drugs: inter-species comparisons of covalent deoxyribonucleic acid-binding agents. *Mutat Res* 400: 509 - 540.
- Vogelstein B., Lane D., Levine A. J. (2000): Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307 - 310.
- Vousden K. H., Lane D. P. (2007): p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 275 - 283.
- Vousden K. H., Prives C. (2009): Blinded by the light: The growing complexity of p53. *Cell* 137: 413 - 431.
- Walker J. R., Corpina R. A., Goldberg J. (2001): Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412: 607 - 614.
- Walker J.R., Corpina R. A., Goldberg J. (2001): Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair". *Nature* 412 (6847): 607-614.
- Ward J. F. (1988): DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 35: 95 - 125.
- Watson J. D., Crick F. H. C. (1953): Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171: 737 - 738.
- Williams R. S., Williams J. S., Tainer J. A. (2007): Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol.* 85(4): 509 - 520.
- Wink D. A., Kasprzak K. S., Maragos C. M., Elespuru R. K., Misra M., Dunams T. M., Cebula T. A., Koch W. H., Andrews A. W., Allen J. S. et al. (1991): DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254 (254): 1001 - 1003.
- Wood R. D. (1999): DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochemie* 81: 39 - 44.
- Wool I.G. (1979): The structure and function of eukaryotic ribosomes; *27* (1): 41-55.
- Xu-Welliver M., Pegg A.E. (2002): Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* 23: 823 - 830.

- Yano J. K., Wester M. R., Schoch G. A., Griffin K. J., Stout C. D., Johnson E. F. (2004): The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *J Biol Chem.*279: 38091-38094
- Zhang, Y.; Lu, H. Signaling to p53 (2009): Ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell* 16, 369 - 377.