

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Buněčná odpověď na ribozomální stres

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Ondřej Šanovec
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	1406R012 Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Pavel Moudrý, Ph.D.
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

Rád bych poděkoval panu Ing. Pavlu Moudrému, Ph.D. za trpělivost, jeho odborné znalosti, a rady které mi během řešení mé práce poskytl. Také bych chtěl poděkovat ostatním zaměstnancům laboratoře Integrity genomu, zejména Markétě Šenkyříkové, za pomoc při překonávání praktických problémů.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Ondřej Šanovec
Název práce	Buněčná odpověď na ribozomální stres
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř integrity genomu, Ústav Molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	Ing. Pavel Moudrý, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá chováním ATP dependentní RNA helikasy DDX56 po ovlivnění různými chemickými a fyzikálními činidly. DDX56 je protein z rodiny DEAD a je lokalizován v jadérku. Je zapojen do sestavování velké podjednotky ribozomu, konkrétní úloha však není známa. Přestože o tomto proteinu není mnoho informací, ví se, že po inhibici transkripce dochází k jeho translokaci do nukleoplasmu a následné degradaci. Pro porovnání byl analyzován příbuzný protein DDX51.

Klíčová slova	DDX56, biogeneze ribozomů, ribozomální stres, DDX51, U-2 OS
Počet stran	63
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Ondřej Šanovec
Title	Cellular response to ribosomal stress
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of genome integrity, Institute of molecular and translational medicine
Supervisor	Ing. Pavel Moudrý, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

This bachelor's thesis focuses on ATP dependent RNA helicase DDX56 after treatment with diverse chemical and physical factors. DDX56 belongs to DEAD box protein family and is located in the nucleolus. It has a role in assembly of large ribosomal subunit, precise function is still unknown. Only a few pieces of information is known about this protein. After inhibition of transcription, this protein is translocated to the nucleoplasm and degraded. To compare their properties, a familiar protein DDX51 was analysed too.

Keywords	DDX56, ribosomal biogenesis, ribosomal stress, DDX51, U-2 OS
Number of pages	63
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	1
2	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	Jadérko.....	2
2.1.1	Struktura a funkce jadérka	2
2.1.2	Jadérko jako strážce integrity genomu.....	3
2.2	Eukaryotické ribozomy	5
2.2.1	Charakteristika ribozomů	5
2.2.2	Biosyntéza ribozomů.....	5
2.2.2.1	Transkripce rRNA a mRNA ribozomálních proteinů.....	5
2.2.2.2	Modifikace rRNA	6
2.2.2.3	Vznik preribozomů	6
2.2.2.4	Transport ribozomálních podjednotek	7
2.2.2.5	Dozrávání ribozomálních podjednotek.....	7
2.2.3	Regulace biosyntézy ribozomů	8
2.2.3.1	Geny rodiny myc	9
2.2.3.2	mTOR	9
2.2.3.3	RP-Mdm2-p53 dráha	10
2.3	RNA HELIKASY.....	12
2.3.1	DEAD box protein family	12
2.3.1.1	DDX56.....	13
2.3.1.2	DEAD box proteiny a patogeny.....	14
2.3.1.3	DDX51	15
2.3.2	RNA helikasy a rakovina	15
2.4	Činidla použitá k ovlivnění buněčné kultury	16
2.4.1	Aktinomycin D.....	16
2.4.2	Aphidicolin.....	16

2.4.3	BMH-21	17
2.4.4	Camptothecin	17
2.4.5	Doxorubicin	18
2.4.6	Hydroxyurea.....	18
2.4.7	Olaparib.....	19
2.4.8	Peroxid vodíku	19
2.4.9	UV záření	20
2.4.10	Rentgenové záření	20
3	MATERIÁL A METODY	22
3.1	Přístrojové a laboratorní vybavení	22
3.2	Použité chemikálie	23
3.3	Použité roztoky.....	24
3.4	Použité protilátky	25
3.4.1	Primární protilátky	25
3.4.2	Sekundární protilátky pro Imunofluorescenční mikroskopii	25
3.4.3	Sekundární protilátky pro Western Blot	25
3.5	Buněčná linie	26
3.6	Kultivace buněk a pasážování	26
3.7	Ovlivnění buněk	27
3.7.1	Ovlivnění UV zářením	27
3.7.2	Ovlivnění Rentgenovým zářením	27
3.7.3	Ovlivnění chemickými látkami	27
3.8	Imunofluorescenční mikroskopie	27
3.8.1	Příprava vzorků	27
3.8.2	Barvení mikroskopických preparátů	28
3.8.3	Mikroskopické pozorování	28
3.9	Western Blot.....	28

3.9.1	Příprava lyzátů	28
3.9.2	Měření proteinové koncentrace.....	29
3.9.3	SDS-PAGE lyzátů.....	29
3.9.4	Semi-dry blot.....	30
3.9.5	Detekce proteinů	30
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	32
4.1	Změny v lokalizaci proteinu DDX56	32
4.2	Změny v množství proteinu DDX56	36
4.3	Degradace proteinů po inhibici translace	39
5	ZÁVĚR	44
6	SEZNAM LITERATURY	45
7	SEZNAM ZKRATEK.....	52

Cíle práce

Cílem teoretické části této bakalářské práce bylo popsání jednotlivých kroků ribozomální biosyntézy a její regulace, popsat proteinovou rodinu ATP dependentních RNA helikas DEAD box a charakterizovat dva její zástupce, DDX56 a DDX51. Poslední kapitola teoretické části obsahuje popis, mechanismus působení a využití chemických látek a záření použitých v praktické části.

Praktická část se zabývá chováním proteinu DDX56 po ovlivnění různými chemickými a fyzikálními činidly (aktinomycin D, aphidicolin, BMH-21, camptothecin, doxorubicin, hydroxyurea, olaparib, peroxid vodíku, UV a rentgenové záření). Cílem bylo sledovat změnu v buněčné lokalizaci proteinu DDX56 pomocí imunofluorescenční mikroskopie a změnu v množství proteinů DDX56 a příbuzného DDX51 pomocí western blotu.

1 ÚVOD

Ribozomy, jakožto jedna z nejdůležitějších organel v buňce, hrají kromě proteosyntézy roli v regulaci buněčného cyklu a odpovědi na stres. Ve stresových podmínkách dochází k disociaci polyzomů a také ke zpomalení biogeneze nových ribozomů. Pokud dojde k narušení tohoto procesu, mluvíme o ribozomálním stresu.

Ribozomální biogeneze je jedním z energeticky a koordinačně nejnáročnějších procesů v buňce. Jsou do něj zapojeny všechny tři RNA polymerasy a celá řada modulujících faktorů jako jsou GTPasy, ATPasy, kinasy, molekuly malé jadéřkové RNA a RNA helikasy.

RNA helikasy jsou ATP dependentní enzymy, které se účastní veškerých procesů spojených s metabolismem RNA, od alternativního sestřihu RNA přes biosyntézu ribozomů až po degradaci RNA. Jedním z těchto enzymů je protein DDX56, který je zapojený do sestavování velké podjednotky ribosomu, ovšem jeho funkce není známá. Byla pozorována jeho translokace z jadérka a proteazomální degradace po působení inhibitoru RNA polymeras a oxaliplatinu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

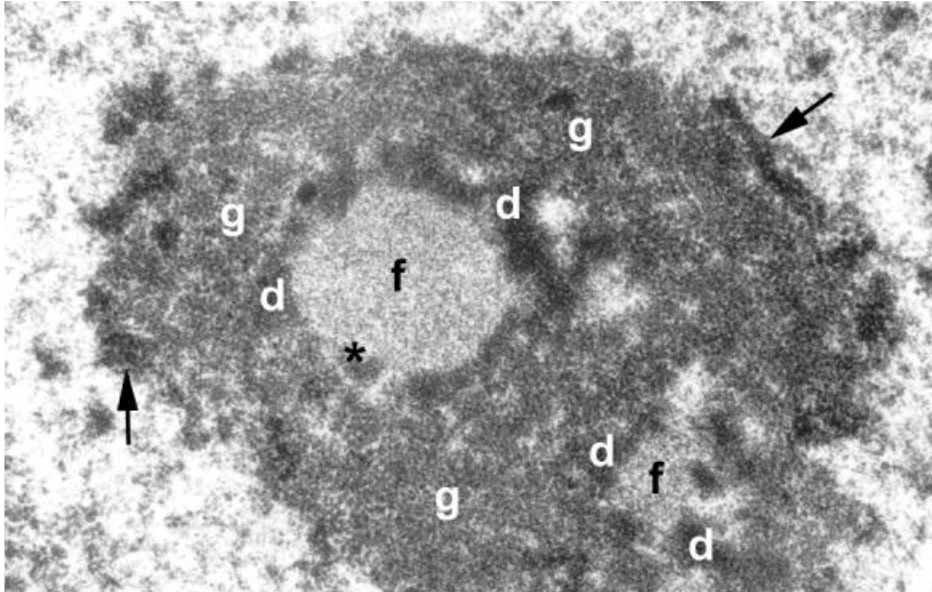
2.1 Jadérko

2.1.1 Struktura a funkce jadérka

Jadérko je nemembránová podjednotka jádra, jejíž nejdůležitější funkcí je zahájení syntézy ribozomů. Dochází zde k transkripci ribozomální DNA v 47S preribozomální RNA (pre-rRNA), její následné zpracování, upravení a spojení s 5S rRNA dohromady s některými ribozomálními proteiny za vzniku 90S preribozomální podjednotky. Kromě toho má jadérko vliv na odpověď na stres, zpracování pre-mRNA a nekódující mRNA nebo na metabolismus telomer (Lam a Trinkle-Mulcahy, 2015).

Jadérko vzniká v průběhu G1 fáze buněčného cyklu a zaniká během profáze mitózy. Jadérka u člověka vznikají kolem akrocentrických ramen chromozomů 13, 14, 15, 21 a 22. Tato oblast je známá jako jadérko organizující oblast (NOR, z angl. nucleolus organizing region) a obsahuje geny kódující ribozomální DNA (rDNA) (McStay, 2016). Rozpad jadérka kontroluje komplex kinasy Cdk1 a cyklinu B. Ten fosforyluje některé transkripční faktory RNA polymerasy I (RNA pol I) (EC 2.7.7.6), čímž inhibuje její činnost. Potlačení transkripce rDNA a tvorby preribozomálních podjednotek vede k rozpadu jadérka (Hernandez-Verdun, 2011).

Jadérko se skládá ze tří částí: fibrilární centrum (FC, z angl. fibrillar center), které obklopuje denzní fibrilární komponent (DFC, z angl. dense fibrillar component) a granulární komponent (GC, z angl. granular component). Uspořádání jadérka ilustruje obrázek 1. Fibrilární centrum obsahuje transkripční faktory RNA polymerasy I, jako je například upstream binding faktor (UBF, z angl. upstream binding factor). Na hranici FC a DFC probíhá transkripce. DFC obsahuje faktory potřebné pro zpracování a úpravu pre-rRNA, například ribozomální proteiny, které slouží jako chaperony pro sestavení preribozomální podjednotky. V granulárním komponentu dochází k úpravě pre-rRNA a zároveň zde dochází ke vzniku preribozomální podjednotky (Lam a Trinkle-Mulcahy, 2015).



Obr. 1: Snímek jádérka myší buňky z elektronového mikroskopu. (f) fibrilární centrum, (d) denzní fibrilární komponent, (g) granulární komponent, (šipky) jadérový heterochromatin, (hvězdička) denzní fibrilární komponent v rámci fibrilárního centra (jedná se příležitostně pozorovaný úkaz).

Zdroj: Raška I. (2003): Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends in cell biology*, **13**, 517-525).

2.1.2 Jadérko jako strážce integrity genomu

Buněčný genom je každý den nějakým způsobem poškozen. Na vině jsou jak vnější (např. UV záření) tak i vnitřní faktory (např. oxidativní stres). Z tohoto důvodu se vyvinula celá řada obranných buněčných mechanismů, které zajišťují, aby vzniklé poškození nebylo pro organismus smrtelné a zároveň byla zachována integrita genomu.

V případě příliš velkého poškození DNA může dojít k buněčné senescenci nebo ke spuštění programované buněčné smrti. Klíčovou roli v zahájení odpovědi na poškození DNA hrají kinasy ATM (z angl. ataxia telangiectasia mutated), ATR (z angl. ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) a DNAPK (z angl. DNA-dependent protein kinase), které jsou odvozené od fosfatidylinositol-3-kinasy, (PIK), (Halim *et al.*, 2018).

Geny rDNA patří k nejvíce transkribovaným genům v eukaryotické buňce. Díky tomu je u nich frekvence poškození nebo mutací větší, než v jiných genech. Zároveň je rDNA rozdělena na pět chromozomů, což představuje další překážku, se kterou se RNA pol I musí vypořádat. (McStay, 2016).

Narušení replikace a transkripce rDNA důsledkem stresu může vést k ohrožení integrity genomu. Například pokud dojde ke sblížení replikační a transkripční vidličky, dochází ke vzniku lokálního pozitivního supercoilingu, který může vést až k zastavení replikace. To může mít za následek vznik jednovláknového zlomu, jelikož jednovláknová DNA nevydrží pnutí a praskne. Jednovláknové zlomy jsou detekovány ATR a Checkpoint 1 kinasou (Chk1), které spouští řadu kroků, které zajišťujících přežití buňky. Prvním z nich je odpojení RNA polymerasy z vlákna DNA ať nedochází ke vzniku dalšího pnutí, čímž dojde k terminaci transkripce. Současně dochází k pozastavení replikace. Důsledkem těchto kroků dochází ke zpomalení buněčného cyklu a opravě poškozené DNA (Lindström *et al.*, 2018).

Biosyntéza ribozomů je z hlediska zdrojů a energie velice náročný proces. Jsou zapotřebí všechny tři RNA polymerasy, asi 200 druhů malé jadéřkové RNA (snoRNA, z angl. small nucleolar RNA) a více než 250 modulujících faktorů (Rodríguez-Galán *et al.*, 2013). Jelikož většina kroků biosyntézy ribozomů probíhá v jadérku a jádře, je poškození DNA přímo spojeno s ribozomálním stresem. Z tohoto důvodu jsou ribozomy dalším z důležitých regulátorů buněčného cyklu. Ve svém výzkumu Halim *et al.*, (2018) ukazují, že během stresových podmínek polyzomy (řada ribozomů postupujících podél jednoho vlákna mRNA) disociují a dochází k zastavení translace. Nedostatečnou syntézou proteinů je buňce zabráněn průchod buněčným cyklem, což prodlužuje čas potřebný na opravu poškozené DNA.

2.2 Eukaryotické ribozomy

2.2.1 Charakteristika ribozomů

Ribozomy jsou pro buňku zcela nepostradatelnou organelou, jelikož zde probíhá přepis mRNA v proteiny. Ribozomy se skládají ze dvou podjednotek tvořených ribozomálními proteiny (RP) a ribozomální RNA (rRNA). Velkou podjednotku ribozomu u eukaryot tvoří 49 RP a 3 druhy rRNA (28S, 5,8S a 5S RNA). Malou podjednotku eukaryot tvoří 33 RP a 1 typ rRNA (18S rRNA). Sedimentační koeficient celého prokaryotního ribozomu je 80S. Velká podjednotka má sedimentační koeficient 60S a koeficient malé podjednotky je 40S (Alberts *et al.*, 2015).

Proteosyntéza začíná spojením malé a velké podjednotky ribozomu na vlákně mRNA poblíž poly A 5' konce. Malá podjednotka slouží jako místo intrakce mRNA a aminoacyl-tRNA. Velká podjednotka má katalytickou funkci, funguje jako peptidyltransferasa. Dochází v ní k syntéze polypeptidového řetězce na základě sekvence kodonů templátové mRNA. Pokud proteosyntéza neprobíhá, nachází se obě podjednotky volně v cytoplazmě (Alberts *et al.*, 2015).

2.2.2 Biosyntéza ribozomů

Studia prováděná na *Saccharomyces cerevisiae* ukazují, že zhruba 80 % z celkové transkribované RNA je rRNA. Jedna buňka kvasinky obsahuje zhruba 200 000 ribozomů. Jelikož se jednotlivá buňka dělí zhruba každých sto minut, musí dojít ke vzniku 2 000 ribozomů za minutu (Warner, 1999).

Ribozomální biosyntéza se odehrává v jadérku, jádře a také v cytoplazmě. (Pelletier *et al.*, 2018).

2.2.2.1 Transkripce rRNA a mRNA ribozomálních proteinů

RNA polymerasa přepisuje geny ribozomální DNA (rDNA) za vzniku polycistronního prekurzoru 47S rRNA (pre-rRNA). Přepisované geny obsahují sekvence kódující 18S, 5,8S a 28S rRNA. Tento proces probíhá v jadérku (Thomson *et al.*, 2013).

RNA polymerasa II (2.7.7.6) se nachází v nukleoplazmě a přepisuje geny kódující ribozomální proteiny. mRNA ribozomálních proteinů je následně exportována do cytoplasmy, kde dojde k translaci. Vzniklé ribosomální proteiny jsou ihned po svém vzniku importovány do jádra (Pelletier *et al.*, 2018).

RNA polymerasa III (2.7.7.6) působí v nukleoplazmě a má na starosti přepis genů kódujících 5S rRNA. Ta se v jadérku shlukuje s 47S pre-rRNA a ribozomálními proteiny za vzniku 90S preribozomální jednotky (Pelletier *et al.*, 2018). RP slouží jako RNA chaperony, stabilizují rRNA a zajišťují její správné složení do preribozomální podjednotky (Xu *et al.*, 2016). Tento proces probíhá kotranskripčně (Turowski a Tollervey, 2014).

2.2.2.2 Modifikace rRNA

Modifikace rRNA začínají již během transkripce a dochází k nim během celého průběhu biogeneze ribozomů (Decatur a Fournier 2002).

Mezi nejvýznamnější modifikace rRNA patří metylace bází, metylace 2' hydroxylové skupiny ribosy a izomerace uridinu na pseudouridin. V tomto kroku vstupují do hry snoRNA. Tyto krátké molekuly RNA se přechodně vážou na specifické sekvence rRNA a tím určují, které báze mají být modifikovány. Modifikaci zajišťují malé jadérové ribonukleoproteiny (snoRNPs, z angl. small nucleolar ribonucleoproteins) (Rodríguez-Galán *et al.*, 2013).

K modifikacím rRNA dochází nejčastěji v konzervovaných oblastech. Modifikace jsou důležité pro správnou funkčnost zralého ribozomu a zároveň regulují průběh jeho dozrávání (Decatur a Fournier, 2002). Přítomnost konkrétní modifikace ovlivňuje vazbu některého z ribozomálních faktorů a konformaci preribozomálních podjednotek (Liang *et al.*, 2009).

2.2.2.3 Vznik preribozomů

V tomto kroku se preribozomální 90S prekurzor rozdělí na dvě nezralé podjednotky – pre-40S a pre-60S (Pelletier *et al.*, 2018). Pro správný průběh ribozomální biogeneze je esenciální přítomnost modulujících faktorů. Těmito faktory jsou RNA helikasy, ATPasy, GTPasy a kinasy. (Rodríguez-Galán *et al.*, 2013).

Zároveň dochází k napojení dalších jadérových ribozomálních proteinů, které nejsou součástí zralého ribozomu, ale slouží jako chaperony při sestavování nezralých ribozomálních podjednotek. Z tohoto důvodu je poměr molekulových hmotností proteinu ku RNA větší než ve zralých ribozomech (Pederson, 2018).

2.2.2.4 Transport ribozomálních podjednotek

Export nezralých ribozomálních podjednotek z jádra do nukleoplazmy probíhá skrz jaderné póry (NPC z angl. nuclear pore complex) a vyžaduje přítomnost karyopherinů a Ran GTPasový cyklus. Ribozomální podjednotky jsou označeny jaderným exportním signálem (NES, z angl. nuclear export signal). Rozpoznání NES zajišťují adaptorové proteiny, které napojí ribozomální podjednotku na exportérový protein Crm1. Ten zajistí transport podjednotek z jádra do nukleoplazmy skrz NPC (Henras *et al.*, 2008). Adaptor zprostředkovávající vazbu 60S podjednotky s Crm1 je protein hNmd3. Ten se váže na ribozomální protein Rpl10 (Trotta *et al.*, 2003). Pro vazbu 40S podjednotky jsou potřebné adaptorové proteiny hRio2 a Hrr25p. Vazebným proteinem pro tyto adaptory je protein Rps3 (Caroon *et al.*, 2010).

2.2.2.5 Dozrávání ribozomálních podjednotek

Po transportu nezralých ribozomálních podjednotek dochází pomocí GTPas a ATPas k odstranění transportních adaptorových proteinů a ribozomálních faktorů zapojených do vzniku preribozomálních podjednotek. Všechny uvolněné faktory jsou recyklovány do jádra a znovu použity. Zároveň dochází k připojení posledních ribozomálních proteinů (Thomsone *et al.*, 2013).

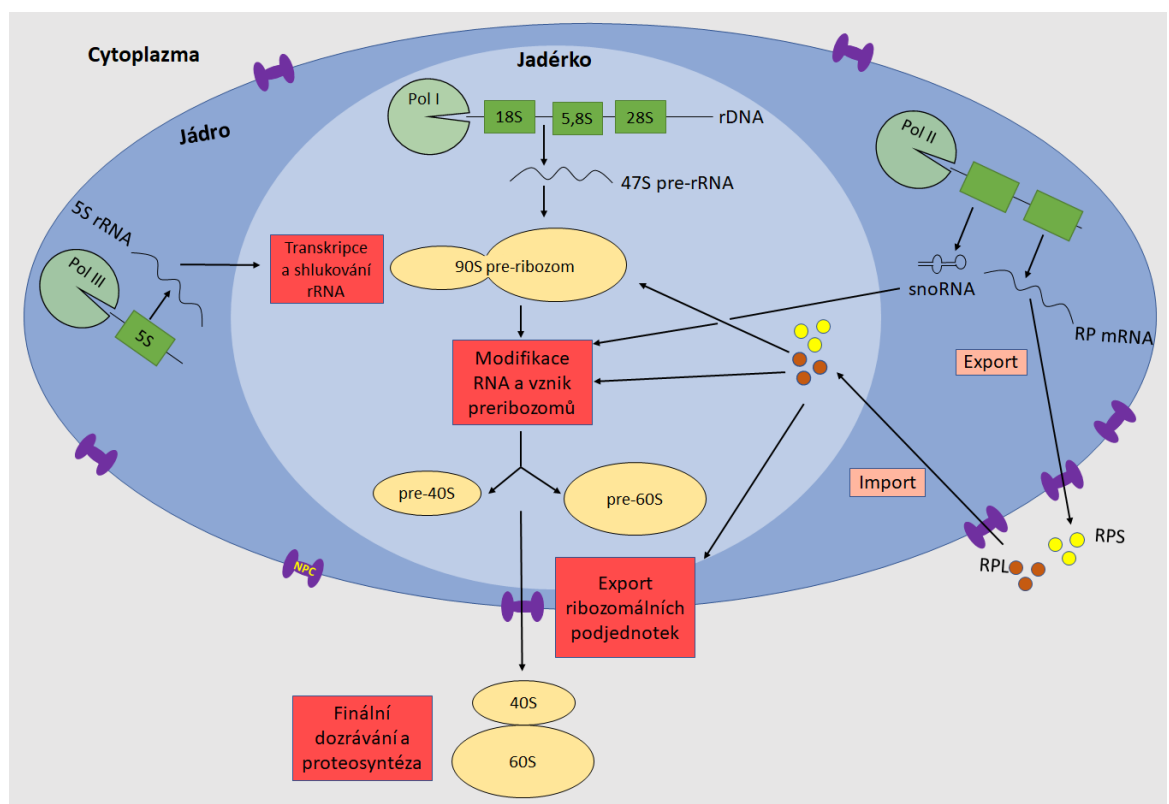
Jako první působí na velkou podjednotku ATPasa Drg1, která odstraní některé ribozomální faktory, čímž umožní proteinu Rpl24 navázat se na velkou podjednotku. Rpl24 umožňuje vazbu proteinu Rei1, který recykluje uvolněné ribozomální faktory zpět do jádra. K odstranění adaptorového proteinu Nmd3 je zapotřebí GTPasa Lsg1. Lsg1 způsobuje konformační změnu Rpl10 čímž dojde k uvolnění adaptoru Nmd3 z velké podjednotky. Uvolněný Nmd3 je díky Rei1 recyklován do jádra (Pertschy *et al.*, 2007).

Malá preribozomální podjednotka prochází během dozrávání dvěma kroky. Tím prvním je změna struktury. Zde hraje důležitou roli kinasa Hrr25, která fosforyluje protein Rps3 a adaptorové proteiny. Díky tomu dojde k oslabení vazebných sil mezi proteinovými komplexy a k jejich odpojení od ribozomální podjednotky. Následná defosforylace stabilizuje uvolněný protein Rps3, který se naváže na čelní část ribozomální podjednotky a vytvoří „zobákovou“ strukturu nezbytnou pro fungování ribozomu (Schäfer *et al.*, 2006).

Druhým krokem potřebným pro dozrání malé ribozomální podjednotky je sestřih pre-rRNA ve funkční 18S rRNA. RNA helikasa Prp43 a kinasa hRio2 způsobují konformační změny pre-rRNA, čímž umožňují přístup nukleáze Nob1. Ta zajistí sestřih pre-rRNA ve zralou 18S rRNA (Panse a Johnson, 2010). Kinasová aktivita hRio2 je zároveň esenciální pro transport uvolněných modulačních faktorů. Mutovaná nebo nefunkční hRio2 kinasa má za následek hromadění LTV1, hDim2 a Nob1 v cytoplazmě, kvůli čemuž nedojde k jejich zpětnému transportu do jádra. Správná funkce hRio2 kinasy je nutná také pro sestřih (Zemp *et al.*, 2009).

2.2.3 Regulace biosyntézy ribozomů

Biosyntéza ribozomů je esenciální proces pro přežití buňky. Pokud dojde k narušení tohoto procesu, mluvíme o ribozomálním stresu. Ten může být způsoben například inhibicí transkripce a sestřihu rRNA, špatným shluknutím rRNA a RP do preribozomálních podjednotek nebo narušením exportu preribozomálních podjednotek od jádra. Z toho důvodu existuje celá řada regulačních drah, které kontrolují správný průběh ribozomální biogeneze (Golomb *et al.*, 2014).



Obr.2: Grafické znázornění biosyntézy ribozomů

AKT1 je Rac- α serin/treonin kinasa zapojená do celé řady metabolických procesů. AKT1 ovlivňuje metabolismus glukosy, apoptózu, buněčnou proliferaci, transkripci a celou řadu dalších buněčných dějů. Ve vztahu k biogenezi ribozomů AKT1 ovlivňuje dvě regulační dráhy a s další dráhou se doplňuje. AKT1 přímo reguluje dráhu kinasy mTOR a dráhu Mdm2-p53. Doplnuje se s geny rodiny *myc* (Sarbasov *et al.*, 2005, Riggelen *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2016).

2.2.3.1 Geny rodiny *myc*

Myc je rodina regulačních genů a protoonkogenů kódujících fosfoproteiny, které slouží jako transkripční faktory. MYC proteiny ovlivňují celou řadu různých buněčných procesů jako je transkripce, translace, DNA replikace, přestavba chromatinu a také biogeneze ribozomů (Riggelen *et al.*, 2010).

Jedním ze způsobů regulace biosyntézy ribozomů je regulace transkripce rRNA. MYC proteiny se přímo vážou na lokusy rDNA, kde přestavují chromatin a tím umožňují navázání RNA polymerasy I a následnou transkripci rRNA. MYC proteiny zároveň ovlivňují činnost RNA polymerasy II, která je zodpovědná za transkripci

mRNA ribozomálních proteinů a některých modulujících faktorů. Mezi nejvýznamnější patří nukleolin (NCL), který je zodpovědný za sestřih 47S pre-rRNA v 18S, 5,8S a 28S rRNA. Zároveň jeho nepřítomnost v jadérku způsobuje zastavení buněčného cyklu a akumulaci buněk v G2 fázi. Zároveň dochází ke zvýšení apoptózy (Ugrinova *et al.*, 2007). Dalším významným proteinem je nukleofosmin (NPM), který ovlivňuje stabilitu ribozomálních proteinů a transport preribozomálních podjednotek do cytoplasmy (Riggelen *et al.*, 2010).

Myc nejsou přímo ovlivňovány AKT1. Oba tyto faktory jsou potřebné pro správnou transkripci rDNA. MYC proteiny jsou deregulovány zhruba v 15-20 % případů rakoviny u člověka. AKT1 pravděpodobně slouží jako pojistka kontroly růstu a proteosyntézy (Chan *et al.*, 2011).

2.2.3.2 mTOR

mTOR, (z angl. mammalian target of rapamycin) je kinasa patřící do skupiny fosfatidylinositol-3-kinas (PI3K), která slouží jako výhybka mezi anabolickými a katabolickými reakcemi organismu. mTOR interaguje s celou řadou proteinů různých

metabolických drah za vzniku komplexů (mTORC1 nebo mTORC2), aby zajistil optimální tempo růstu buňky a homeostázu. Zároveň je mTOR důležitým regulátorem v řadě onemocnění jako je rakovina, obezita nebo diabetes mellitus 2. typu (Laplane a Sabatini, 2012).

Jedním z proteinů zapojených do biogeneze ribozomů regulovaných kinasovou aktivitou mTOR je protein S6K1. Tento protein slouží k regulaci translace mRNA. S6K1 je aktivní pouze pokud je dvojitě fosforylovaný. Primární fosforylací, kterou zajišťuje mTORC1, dojde ke změně konformace proteinu. Díky tomu může nastat sekundární fosforylace fosfatidylinositol dependentní kinasou (PDK1). S6K1 slouží jako přenašeč fosfátové skupiny a fosforyluje další proteiny. Z nich nejvýznamnější je eukaryotický iniciační faktor 4B (eIF4B) a protein PDCD4 (z angl. programmed cell death protein 4), který slouží jako represor translace. eIF4B dále fosforyluje protein eIF4A, který je součástí iniciačního komplexu translace. Protein eIF4A je inhibovaný PDCD4. Odstranění PDCD4 způsobuje jeho fosforylace proteinem S6K1. Fosforylovaný PDCD4 se váže na ubikvitin ligasu E3, čímž dochází k jeho proteasomální degradaci a je zachována kontinuita buněčného cyklu (Gentiella *et al.*, 2015).

mTORC1 také zasahuje do translace rRNA. Fosforylací proteinem S6K1 dochází k aktivaci CAD (karbamoylfosfát syntasa II, aspartát karbamolytransferasa a dihydroorotasa). Tento multidoménový enzymový komplex katalyzuje první tři kroky *de novo* syntézy pyrimidinů, čímž stimuluje syntézu RNA a DNA (Ben-Sahra *et al.*, 2013). Dále se mTORC1 podílí na aktivaci RNA polymerasy III. mTORC1 fosforylací způsobuje konformační změny proteinu Maf1, který slouží jako represor RNA polymerasy III (Kantidakis *et al.*, 2010).

mTORC2 fosforylací aktivuje AKT1. Aktivovaná AKT1 poté může regulovat vznik nebo zánik komplexu mTORC1 (Sarbasov *et al.*, 2005).

2.2.3.3 RP-Mdm2-p53 dráha

Tumor supresorový protein p53 je transkripční faktor, který souží jako hlavní strážce integrity genomu a regulátor buněčné proliferace. V případě nepříznivých nebo stresových podmínek způsobí tento protein zastavení buněčného cyklu, buněčnou senescenci nebo apoptózu. Za standardních podmínek je jeho hladina díky proteinu Mdm2 nízká. Mdm2 je ubikvitin E3 ligasa, která se váže s p53 čímž způsobí jeho

degradaci v proteazomu. Některé ribozomální proteiny se dokáží vázat na protein Mdm2 a tím inhibovat jeho schopnost vázat se na p53, čímž brání jeho degradaci. (Deisenroth a Zhang, 2011).

Narušením některého z kroků ribozomální biosyntézy nebo nedostatkem živin může dojít k nerovnoměrné produkci rRNA a RP. Důsledkem tohoto nemusí dojít k využití všech RP k sestavení nového ribozomu. Některé nevyužité RP mohou přejít z jadérka do nukleoplazmy, interagovat s Mdm2 a tím inhibovat jeho schopnost vázat se na p53. Konkrétně se jedná o proteiny: Rpl5, Rpl6, Rpl11, Rpl27, Rpl37, Rsp3, Rsp7, Rsp14, Rsp20, Rsp26, Rsp25, Rsp27, Rsp27a, Rsp27L (Liu *et al.*, 2016)

Dva z těchto proteinů jsou zřejmě důležitější než ostatní. Jedná se o proteiny Rpl5 a Rpl11. Ribozomální proteiny, které se neshluknou do preribozomálních podjednotek jsou degradovány v proteazomu, avšak Rpl5 a Rpl11 tomuto procesu unikají (Bursac *et al.*, 2012). Tyto dva proteiny jsou esenciální pro vznik velké podjednotky. Rpl5 se váže na 5S rRNA za vzniku 5S ribonukleoproteinu. RNP se v jadérku sloučí s Rpl11 a společně vytváří základ pro sestavení 60S podjednotky (Liu *et al.*, 2016).

AKT1 slouží jako donor fosfátové skupiny, která fosforyluje Mdm2 v pozici Ser186. Díky tomu dochází k intenzivnějšímu odbourávání p53 (Ogawara *et al.*, 2002).

2.3 RNA HELIKASY

RNA helikasy jsou vysoce konzervované enzymy, které se účastní téměř veškerých aspektů metabolismu RNA. Nalézají uplatnění při transkripci a degradaci RNA, iniciaci a terminaci translace, biosyntéze ribozomů nebo sestřihu pre-mRNA. RNA helikasy se vážou na dvouvláknovou RNA (dsRNA) nebo RNA-proteinové komplexy a tím je remodelují. Oba tyto procesy jsou ATP dependentní (Janowski, 2011; Owtrim 2013). RNA helikasy se vážou výhradně na cukr-fosfátovou kostru RNA. Jejich funkce není vázána na specifitu nukleotidové sekvence (Rodríguez-Galán *et al.*, 2013).

RNA helikasy se společně s DNA helikasami dělí do šesti super rodin (SF1-SF6). Každá super rodina se dále dělí na rodiny. Dělení helikas do super rodin je založeno na podobnosti konzervované sekvence v kódující oblasti, struktuře enzymu a také na mechanismu působení helikas na DNA nebo RNA (Fairman-Williams *et al.*, 2010).

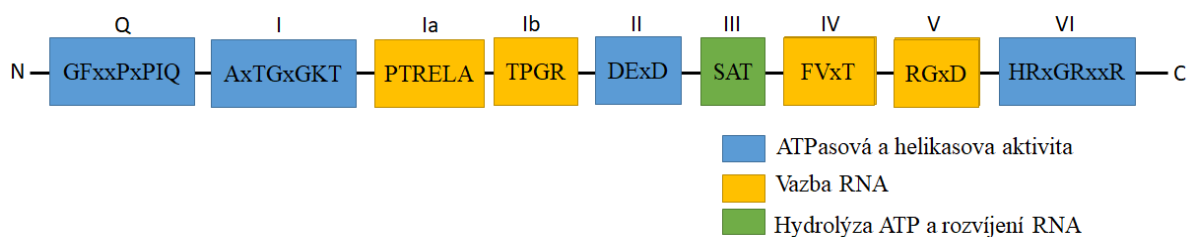
Helikasy ve svém katalytickém centru obsahují protein RecA, který se váže na DNA nebo RNA. Helikasy ze super rodiny 1 a 2 mají v katalytickém jádru monomer RecA proteinu. Oproti tomu katalytické jádro helikas super rodiny 3 až 6 je složeno ze šesti jednotek RecA proteinu uspořádaných do kruhu (Williams *et al.*, 2010).

Dělení super rodin je založeno na typu vlákna, na které se helikasa váže a na směru ve kterém helikasa po vlákně DNA nebo RNA putuje. α helikasy se vážou na jednovláknovou DNA, zatímco β helikasy se vážou na dvouvláknovou DNA. Helikasy typu A čtou vlákno DNA nebo RNA ve směru 3'-5' a helikasy typu B čtou vlákno DNA nebo RNA ve směru 5'-3' (Singleton *et al.*, 2007).

Drtivá většina RNA helikas spadá do super rodiny 2, typ A. Jedinou výjimkou je rodina XPD, která spadá do typu B helikas. RNA helikasy super rodiny 2 sdílí devět konzervovaných aminokyselinových motivů. Jsou to motivy Q, I, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI. (Fairman-Williams *et al.*, 2010, Singleton *et al.*, 2007)

2.3.1 DEAD box protein family

Rodina DEAD proteinů je jednou z nejpočetnějších podskupin helikasové super rodiny 2. Své jméno dostala podle konzervovaného motivu aminokyselinové sekvence Asp-Glu-Ala-Asp. Bylo identifikováno více než 500 proteinů a RNA helikas s touto konzervovanou sekvencí. Funkce každého proteinu DEAD skupiny určuje celkem



Obr. 3: Grafické znázornění konzervovaných motivů rodiny DEAD proteinů a jejich funkce

devět konzervovaných aminokyselinových sekvencí (viz obr 3.): Nicméně pět členů DEAD rodiny má některý z motivů vynechaný nebo výrazně změněný. Jsou to proteiny DDX1, DDX11, DDX12, DDX58 a DDX60. Tyto motivy hrají roli při hydrolýze ATP, vázání se na RNA, rozvíjení dsRNA a hydrolýzu NTP (Umate *et al.* 2011).

Proteiny z DEAD rodiny jsou zapojeny do téměř všech buněčných procesů, které zahrnují RNA. Mají svou roli od transkripce až po rozpad RNA. Jsou také zapojeny do biosyntézy ribozomů, kde se účastní dozrávání rRNA (Cordin *et al.* 2006).

2.3.1.1 DDX56

Protein DDX56 (EC 3.6.4.13), také nazývaný NOH61, je ATP dependentní RNA helikasa a patří do rodiny DEAD box proteinů. Má molekulovou hmotnost 61,5 kDa, isoelektrický bod 9,9 a nachází se v granulárním centru jaderka. Na základě lokalizačních a biochemických studií se předpokládá, že je tento protein zapojen do sestavování velké podjednotky ribozomu a zpracování pre-rRNA. Zároveň má tento protein vysoce konzervovanou strukturu napříč živočišné říše, což naznačuje jeho důležitou funkci v průběhu ribozomální biogeneze (Zirwes *et al.* 2000).

Bylo zjištěno, že po navození ribosomálního stresu Aktinomycinem D dochází k translokaci proteinu DDX56 z jaderka do nukleoplazmy a jeho následné degradaci v proteazomu. Degradaci DDX56 v důsledku stresu anebo umlčení proteinu pomocí siRNA dochází k akumulaci proteinu p53 v buňkách (Haroková 2018). Stejný efekt, tedy degradaci a translokaci DDX56, je také možné pozorovat u buněk ošetřených oxaliplatinou. Oxaliplatina se váže mezi vlákna DNA, čímž znemožňuje replikaci a transkripci DNA. Z proteomické analýzy vyplývá, že oxaliplatina v buňce aktivuje dráhy typické pro odpověď na poškození DNA a zároveň spouští ribozomální a jadérový stres (Ozdian *et al.*, 2017).

2.3.1.2 DEAD box proteiny a patogeny

Přestože RNA viry kódují své RNA helikasy, potřebují některé DEAD proteiny jako kofaktory. Xu a jeho kolegové ukázali, že protein DDX56 hraje důležitou roli při nákaze západonilskou horečkou. Toto virové onemocnění patří společně s hepatitidou C nebo horečkou dengue do virové čeledi Flaviviriade. Z jejich výzkumu vyplývá, že virový kapsid interaguje s proteinem DDX56. Přestože se jedná o helikasu, výsledky naznačují, že v tomto konkrétním případě není helikasová aktivita proteinu DDX56 pro sekreci infekčních virových částic nutná (Xu *et al.*, 2011).

48 hodin od začátku infekce dochází k translokaci proteinu DDX56 z jádérka do jádra a následné proteazomální degradaci. Tento jev se ovšem vyskytuje pouze u západonilské horečky. Virus horečky dengue ani hepatitidy C degradaci proteinu DDX56 nezpůsobuje. Data ze semikvantitativní PCR ukazují, že degradace proteinu se odehrává na post-transkripční úrovni. Hladina DDX56 mRNA se oproti nenakaženým buňkám nezměnila (Xu a Hobman, 2012).

O pár let později tým ze stejné laboratoře ukázala, že DDX56 v jádře interaguje s virovým kapsidem viru západonilské horečky. Po této interakci následuje translokace komplexu DDX56-kapsid do endoplasmatického retikula a následně DDX56 vymizí. V endoplasmatickém retikulu pravděpodobně dochází ke vzniku nových virových částic a poté se komplex DDX56-kapsid rozpadá. Kolokalizace kapsidu a DDX56 v cytoplasmě nebyla zaznamenána (Reid a Hobman, 2017).

DDX56 není jedinou DEAD helikasou potřebnou pro replikaci západonilské horečky. Svou roli v tomto onemocnění mají také DDX15, DDX28 a DDX42. DDX1 a DDX3 jsou zase potřebné pro funkci HIV-1 Tat proteinu. HIV nekóduje RNA helikasu ve svém genomu, a proto je závislý na ATPasové aktivitě hostitelské RNA helikasy. DDX3 se s HIV-1 shlukuje v cytoplasmě a podporuje funkci Tat proteinu. Tat je regulační protein, který zvyšuje účinnost transkripce HIV-1. Oproti tomu hostitelské proteiny DDX1, DDX5, DDX17, DDX21 a DDX56 stimulují export virové RNA ven z buňky (Yasuda-Inoue *et al.*, 2013).

Prozatimní výsledky různých studií (např. Mulhern a Bowie, 2010, Jin *et al.*, 2017) ukazují, že pro virová onemocnění není důležitá helikasová aktivita DEAD proteinů, ale spíše jde o jejich schopnost vázat se na kapsidu a pomáhat v tvorbě a exportu virových částic.

Role DEAD proteinů je studována také při bakteriálních infekcích (*Helicobacter pylori*, *Clostridium perfringens*), houbových infekcích (*Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*) anebo při kontaktu parazitických prvoků s člověkem (*Trypanosoma cruzi*) (Heung a Poeta, 2005). Obecně lze říct, že patogeny vyžadují pro kontakt s hostitelem pro ně specifické DEAD proteiny.

2.3.1.3 DDX51

DDX51 (EC 3.6.4.13) je ATP dependentní helikasa z rodiny DEAD box proteinů. Nachází se v jadérku a má funkci v biosyntéze velké podjednotky ribozomů. DDX51 je zapojený do zpracování 5,8S a 28S rRNA prekurzorů. DDX51 se váže na pre-60S podjednotku ribozomu a zahájuje přemístění U8 snoRNA pryč z 3' konce 28S rRNA. (Srivastava *et al.*, 2010).

DDX51 také slouží jako iniciátor buněčné proliferace skrz aktivaci cyklinu D1 a také negativně reguluje apoptické efekty proteinu p53. Buňky rakoviny plic linie H1299 po umlčení DDX51 pomocí siRNA rostly pomaleji, zastavily buněčný cyklus v S fázi a také podstoupily apoptózu častěji než buňky kontrolní (Wang *et al.*, 2016). Z toho důvodu má tento protein možnou budoucnost v protinádorové terapii. Protein DDX51 je v této práci používán jako kontrolní helikasa.

2.3.2 RNA helikasy a rakovina

Úprava a hlavně alternativní sestřih pre-mRNA hrají důležitou roli v životě buňky. Tento sestřih zajišťují RNA helikasy. Jestliže dojde k chybnému sestřihu pre-mRNA, může dojít k rozvoji patologických jevů, například nádorových onemocnění. Z tohoto důvodu je důležité prostudovat vztah aktivity RNA helikas a rozvoje rakovinových onemocnění (Abdelhaleem, 2004).

Bylo identifikováno několik DEAD box proteinů, které mají spojitost s konkrétními druhy rakoviny. Jedná se například o proteiny DDX1 (nadexprese v neuroblastomu a retinoblastomu), DDX2 (nadexprese v melanomu a karcinomu jater), DDX5 (nadexprese v kolorektálním karcinomu) a další. Z tohoto důvodu jsou RNA helikasy slibným cílem nových metod léčby rakoviny. Komplikací ovšem je, že RNA helikasy existuje velké množství, většina z nich zatím nemá jasně definovanou funkci a jsou zapojeny do více než jednoho molekulárního procesu (Abdelhaleem, 2004).

2.4 Činidla použitá k ovlivnění buněčné kultury

2.4.1 Aktinomycin D

Aktinomycin D je cyklické antibiotikum tvořené polypeptidy, produkované bakteriemi rodu *Streptomyces*. Aktinomycin D se váže na β -šroubovici DNA a tím inhibuje syntézu RNA. Fenoxazonový kruh aktinomycinu D se vmezeří mezi pár nukleotidových bází a jeho pentapeptidový řetězec se vodíkovou vazbou naváže na postranní skupiny guaninu v malém žlábků DNA (Sobell, 1985). Při dávkách větších než 1 $\mu\text{g/ml}$ aktinomycin blokuje transkripci všech druhů RNA. Naopak při nízkých koncentracích (pod 100 ng/ml) blokuje aktinomycin D transkripci 47S rRNA (Kleeff *et al.*, 2000). Selektivita aktinomycinu je dána molekulovou hmotností transkribovaného RNA produktu a také jeho složením. Čím více nukleotidových párů gen obsahuje, tím je citlivější na přítomnost aktinomycinu D. Zároveň se aktinomycin D preferenčně váže na úseky bohaté na GC páry bází (Perry a Kelley, 1970).

2.4.2 Aphidicolin

Aphidicolin (APH) je tetracyklické diterpenoidní antibiotikum izolované z houby *Nigrospora sphaerica*. APH se váže na aktivní místo DNA polymerasy α (EC 2.7.7.7) čímž blokuje inkorporaci deoxycitidin trifosfátu. Výsledkem je akumulace buněk v kontrolním bodě S buněčného cyklu. Funkce DNA helikasy není aphidicolinem nijak ovlivněna, proto vzniká jednovláknová DNA, která je velice náchylná na poškození (Ma *et al.*, 2012). Dochází ke vzniku zlomů DNA v takzvaných fragilních místech. Jedná se o lokusy mitotických chromozomů, které jsou náchylnější na poškození než zbytek genomu. Podle látky, která genom ve fragilních místech poškozují, rozdělujeme několik skupin fragilních míst. Aphidicolin se váže na 76 lokusů, které jsou bohaté na AT páry bází (Durkin a Glover, 2007).

Důsledkem inhibice DNA polymerasy α a tvorby zlomů ve fragilních místech může dojít k předčasné senescenci buněk, zpomalení syntézy a opravy DNA, zastavení replikační vidličky, případně ke vzniku mikrojadér během buněčného dělení. Konkrétní efekt aphidicolinu na buňky závisí na použité koncentraci. Ve výzkumných laboratořích se mimo jiné aphidicolin používá k synchronizaci buněčného cyklu (koncentrace 0,2 μM po dobu 7 až 24 hodin) (Veselá *et al.*, 2017).

Jelikož není aphidicolin rozpustný ve vodě, pro praxi byl testován jeho derivát, aphidicolin glycinát. První fáze klinických testů ukázala velmi rychlé odbourávání této

látky z těla pacientů a žádné protinádorové účinky. Z tohoto důvodu není aphidicolin ani žádný z jeho derivátů používán pro léčbu onkologických pacientů (Sessa *et al.*, 1991). Aphidicolin nicméně nalézá uplatnění i v jiných odvětvích medicíny. Santos (2016) a její tým demonstrují účinky semisynetických derivátů aphidicolinu k léčbě parazitických onemocnění.

2.4.3 BMH-21

BMH-21 je planární, tetracyklická sloučenina, která se váže na DNA bohatou na GC páry bází, tedy hlavně na geny rDNA. Alifatickým řetězcem se BMH-21 reverzibilně váže na fosfátovou kostru DNA, zatímco jeho aromatická část se vmezeří mezi GC páry bází. Díky tomu dochází k inhibici činnosti RNA polymerasy I (Pol I). V důsledku inhibice aktivity RNA Pol I, dochází k reorganizaci jadérka a aktivaci proteinu p53, což může vést k apoptóze a nižší viabilitě buněk (Fu *et al.*, 2017).

Dále BMH-21 způsobuje proteazomální degradaci největší podjednotky Pol I zvané RPA194 (Peltonen *et al.*, 2014). Díky tomu je pro léčbu rakoviny účinnější, než ostatní inhibitory RNA Pol I řady BMH. Zároveň má BMH-21 rychlý nástup účinků. V praxi proto BMH-21 nalézá uplatnění v onkologii, jelikož se jedná o širokospektrální nádorový supresor (Wei *et al.*, 2018).

2.4.4 Camptothecin

Camptothecin (CPT) je přírodní látka s širokým spektrem protinádorových účinků, izolovaná z čínského stromu *Camptotheca acuminata*. Kůra tohoto stromu je používána v tradiční čínské medicíně. Po chemické stránce se jedná o pentacyklický alkaloid odvozený od chinolinu. CPT se v buňce váže na topoisomerasu I (EC 5.99.1.2) (Topo1) (Eng *et al.*, 1988, Nitiss a Wang 1988). CPT se reverzibilně váže mezi DNA-TOPO1 komplex, čímž dojde ke vzniku nefunkčního komplexu Topo1-CPT-DNA. Jedná se o nekompetitivní inhibici. (Liu *et al.*, 2000). Jelikož Topo1 odstraňuje supercoiling DNA, působením CPT dochází k zastavení replikační vidličky. Následkem toho dojde k akumulaci buněk v S-fázi buněčného cyklu (Staker *et al.*, 2002).

Kromě inhibice replikace a následné akumulace buněk v S-fázi, způsobuje CPT vznik zlomů v DNA, buněčnou smrt nebo fragmentaci DNA. Efekt je vždy závislý na použité koncentraci CPT. Samotný CPT se v praxi nepoužívá, jelikož není rozpustný

ve vodě, je toxický pro zdravé buňky a je nestabilní. Existují tři deriváty CPT, které se v medicíně používají při chemoterapii (Veselá *et al.*, 2017).

2.4.5 Doxorubicin

Doxorubicin je chemická látka ze skupiny antracyklinů, produkovaná bakteriemi rodu *Streptomyces*. Doxorubicin se interkaluje mezi obě vlákna DNA současně. Důsledkem toho dochází k inhibici Topoisomerasy II (EC 5.99.1.3) a vzniku dvouvláknových zlomů. Dalším efektem doxorubicinu je zvyšování hladiny volných kyslíkových radikálů a peroxidace lipidů. Příliš velká koncentrace kyslíkových radikálů může způsobit poškození membrán a buněčnou smrt (Gerwitz, 1999).

Kromě výše zmíněných účinků, způsobuje doxorubicin aktivaci transkripčního faktoru CREB3L1. Tento transkripční faktor aktivuje transkripci genů (například *p21*) zodpovědných za inhibici buněčného cyklu (Denard *et al.*, 2012).

I přes své vedlejší účinky se doxorubicin v praxi používá jako širokospektrální chemoterapeutikum. Kremel *et al.*, (2001) uvádí, že působením volných kyslíkových radikálů dochází ke zvýšení rizika selhání srdce u pacientů léčených antracykliny. Je to důsledkem kumulace antracyklinů v těle pacienta.

2.4.6 Hydroxyurea

Hydroxyurea je látka, která inhibuje enzym ribonukleotidreduktasa (EC 1.17.4.1). Tento enzym způsobuje redukci ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy. Z tohoto důvodu dochází ke zpomalení syntézy DNA, buněčného cyklu a akumulaci buněk v S fázi (Skog *et al.*, 1987).

Dále hydroxyurea, podobně jako aphidicolin způsobuje poškození DNA. Vlivem jejího působení dochází ke zlomům DNA ve fragilních místech genomu, ovšem ne tak specificky jako aphidicolin (Durkin a Glover, 2007).

Výzkum na kvasinkách dokazuje, že hydroxyurea je schopna pozměnit Fe-S centra, které slouží jako kofaktory pro oxidoreduktasy (Huang *et al.*, 2016). Dlouhodobé působení hydroxyurey v nízké koncentraci (2 týdny při koncentraci 0,2 mM) má za následek ireversibilní senescenci. Replikační blok způsobuje hydroxyurea již od koncentrace 2 mM při době působení 2 hodiny (Veselá *et al.*, 2017).

Kromě léčby rakoviny se hydroxyurea v medicíně používá k léčbě chronické leukémie, srpkovité anémie nebo AIDS (Huang *et al.*, 2016).

2.4.7 Olaparib

Olaparib je chemická látka inhibující poly (ADP-ribose) polymerasy (EC 2.4.2.30) (PARPs). Enzymy z rodiny PARP přenášejí ADP-ribosu na cílový protein. Tato posttranslační modifikace je součástí mnoha metabolických drah od buněčné signalizace, přes regulaci genové exprese a odpovědi na poškození DNA až po regulaci apoptózy (Berger *et al.*, 2004). Velmi důležitou roli hrají tyto polymerasy při odpovědi na poškození DNA. Rozpoznávají jednovláknové zlomy DNA a indukují opravné dráhy. Příkladem opravných drah, ve kterých jsou PARP zahrnuty je oprava vystřihnutím bází (BER, z angl. base excision repair) nebo oprava sestřihem nukleotidů (NER, z angl. nucleotide excision repair) (Morales *et al.*, 2014).

PARP1 společně s p53 řídí rychlost postupu replikační vidličky. Pokud je PARP inhibována, dochází k urychlení postupu replikační vidličky, což může způsobit replikační stres a poškození DNA (Maya-Mendoza, 2018). Důsledkem replikačního stresu může dojít ke zlomům DNA, zastavení buněčného cyklu v S fázi, tvorbě mikrojader nebo chybné inkorporaci bází (Zeman a Cimprich, 2014).

V praxi se olaparib prodává pod názvem Lynparza. Tento lék se používá k léčbě rakoviny vaječníku a rakoviny prsu.

2.4.8 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku je jednou z reaktivních forem kyslíku (ROS z angl. Reactive Oxygen Species). Tyto látky snadno odebírají elektrony jiným molekulám, přičemž se z nich stává radikál. Kromě peroxidu vodíku se mezi ROS řadí hydroxylový radikál, superoxidový iont nebo singletový kyslík (Ray *et al.*, 2012).

Na molekulární úrovni může kvůli oxidativnímu stresu dojít k poškození DNA, lipidů, membrán nebo inaktivaci proteinů. Radikálová OH skupina reaguje s bazemi DNA a způsobuje jejich rozpad případně vznik diastereoisomerů (Cadet a Wagner, 2013). Tyto změny ovlivňují strukturu DNA, čímž dochází k inhibici replikace a transkripce.

Oxidační stres může působit na makromolekulární úrovni a jeho projevem je například stárnutí, ateroskleróza nebo poškození neuronů, které má za následek rozvoj neurodegenerativních onemocnění jako je Parkinsonova choroba či Alzheimerova choroba (Ray *et al.*, 2012).

Oxidační stres kromě DNA poškozuje také proteiny. Radikálová skupina OH může oxidovat postranní zbytky aminokyselin. Pokud dojde ke změně postranních skupin nějakého proteinu, může dojít ke změně funkce nebo úplné inaktivaci daného proteinu (Dean *et al.*, 1997).

V praxi nalézá peroxid vodíku uplatnění v celé řadě průmyslů. Je to díky tomu, že se rozkládá na netoxické produkty (vodu a vodík). V potravinářství se peroxid vodíku používá k oplachování ovoce po sklizni. Díky tomu lze ovoce skladovat delší dobu. Peroxid vodíku je také aktivní složkou desinfekčních přípravků pro ústní hygienu, čistících prostředků pro domácnost nebo desinfekcí do lékárníček (Linley *et al.*, 2012).

2.4.9 UV záření

UV záření je neionizující záření o vlnových délkách 15 až 390 nm. Podle vlnových délek se UV záření dělí na UVA (320-390 nm), UVB (290-320 nm) a UVC (200-290 nm) záření. Vlnové délky pod 200 nm jsou pro živé organismy neškodné, jelikož jsou absorbovány vzduchem. Nejvíce nebezpečné je pro živé organismy UVC záření. UV záření negativně působí na DNA buněk tím, že indukuje tvorbu cyklobutan-pyrimidinových dimerů a 6-4 pyrimidin-pyrimidon fotoproduktů, případně jejich izomerů. Dalším efektem UV záření na DNA může být tvorba křížových vazeb mezi komplementárními řetězcí DNA. Díky změně struktury DNA dochází k inhibici replikace a transkripce (Illichmanová, 2006).

V případě příliš velké dávky ozáření může dojít k zastavení buněčného cyklu, případně apoptóze. Působením UV záření také dochází k oxidativnímu stresu. Reaktivní kyslíkové radikály mohou poškodit strukturu DNA, RNA, proteinů nebo lipidů a tím způsobit narušit jejich funkčnost (Perluigi *et al.*, 2010).

UV záření je používáno pro sterilizaci povrchů, vzduchu nebo vody. Použití UV záření ke sterilizaci vnitřku uzavřených nádob není možné, jelikož UV záření je snadno absorbováno celou řadou materiálů. UV záření se také využívá v kriminalistice či při studiu starých obrazů a maleb.

2.4.10 Rentgenové záření

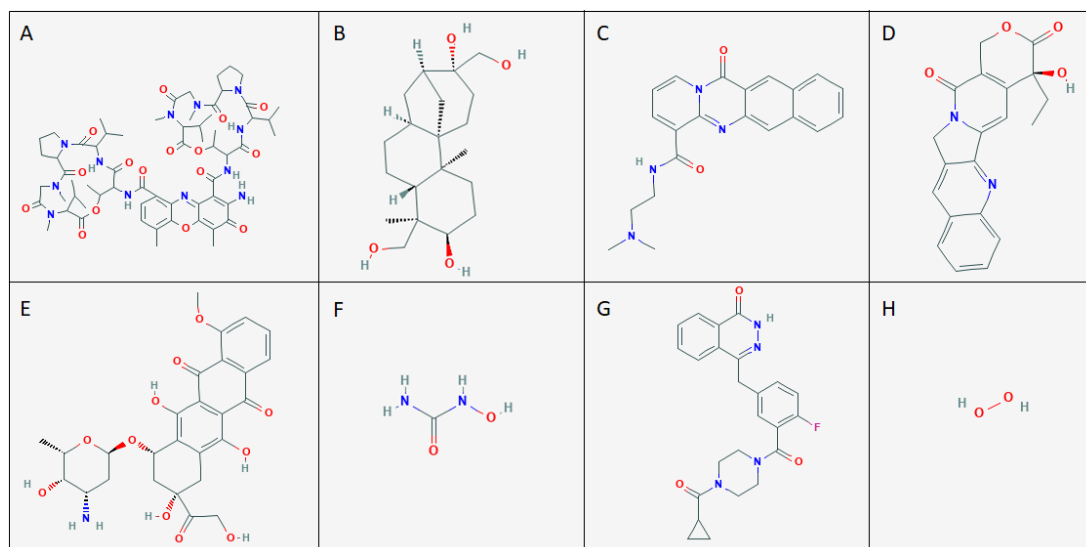
Rentgenové záření je ionizující záření s rozsahem vlnových délek 1 pm až 10 nm. Podle vlnové délky rozlišujeme dva druhy rentgenového záření. Měkké rentgenové

záření má větší vlnovou délku než 0,1 nm, tvrdé záření má vlnovou délku pod 0,1 nm a jeho vlastnosti se blíží gama záření. Povahu záření ovlivňuje anoda, která slouží jako zdroj napětí. Čím je zdrojové napětí vyšší, tím větší energii má emitované záření. S rostoucí energií se zmenšuje vlnová délka záření, naopak roste jeho energie a pronikavost (Svoboda *et al.*, 2012).

Díky svým ionizujícím vlastnostem je rentgenové záření pro živé organismy nebezpečnější než UV záření. Přímým efektem rentgenového záření je poškození DNA. Vlivem záření dochází ke dvouvláknovým a jednovláknovým zlomům DNA. Pokud je počet zlomů příliš velký nebo buňka není schopná poškozenou DNA opravit, může dojít k předčasné senescenci případně apoptóze buňky (Baskar *et al.*, 2014).

Jelikož má rentgenové záření ionizující vlastnosti, může DNA poškodit i nepřímo. Interakcí ionizujícího záření s vodou vznikají volné radikály. Tyto volné radikály mohou vést k dalšímu poškození DNA (Barcellos-Hoff *et al.*, 2005).

V praxi se rentgenového záření používá jako zobrazovací metoda v medicíně, nebo výzkumných metodách jako je Rentgenová strukturní analýza. Použití ionizujícího záření se také uplatňuje při léčbě onkologicky nemocných pacientů.



Obr. 4: Chemické vzorce výše uvedených látek. (A) Aktinomycin D, (B) Aphidicolin, (C) BMH-21, (D) Camptothecin, (E) Doxorubicin, (F) Hydroxyurea, (G) Olaparib, (H) Peroxid vodíku.

Zdroj: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Přístrojové a laboratorní vybavení

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

Automatické pipety (Eppendorf)

Automatický počítač buněk Vi-Cell XR (Beckman Coulter)

Box hlubokomrazící -80°C (New Brunswick Scientific)

Blotovací aparatura Panther Owl-HEP1 (Thermo Scientific)

Centrifuga Combi-Spin FVL-2400N (Biosan)

CO₂ inkubátor (Thermo Scientific)

CCD skener Bio-RAD ChemiDoc™ MP System imaging (Bio-Rad)

Kultivační lahve T25 a T75 (TPP)

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

Míchačka Thermo Mixer C (Eppendorf)

Mikroskop Olympus CKX41 (Olympus)

Mikroskop Olympus IX81S1F-ZDC2 (Olympus)

Laboratorní digestoř (MERCİ)

Laminární box s vertikálním prouděním HeraSafe (Thermo Scientific)

Petriho misky 60 mm (TPP)

Podložní a krycí skla (Waldemar Knittel)

Předvážky BPS 51 (Boeco Germany)

Zdroj rentgenového zařízení Xstrahl RS Research Cabinet (RS225 systém)

(Canberra-Packard s.r.o)

Sérologické pipety (TPP)

Spektrofotometr INFINITE M200 PRO (Tecan)

Termoblok BIOSAN TS-100C (Biosan)

Třepačka orbitální GRANT PSU-10i (Grant)

Ultraviolet Crosslinker CL-1000 (UVP)

Vodní lázeň Memmert WNB (Memmert)

Zdroj napětí Consort EV202 (Sigma-Aldrich)

Výrobce (stát): BioRad (USA), Biosan (Lotyšsko), Beckman Coulter (USA), Boeco Germany (Německo), Canberra-Packard s.r.o (Česká Republika), Eppendorf (Německo), Grant (Velká Británie), Memmert (Německo), MERCİ (Česká republika),

New Brunswick Scientific, an Eppendorf Company (Německo), Olympus (Japonsko), Sigma-Aldrich (USA), Thermo Scientific (USA), Tecan (Švýcarsko), TPP(Švýcarsko), UVP (USA), Waldemar Knittel (Německo)

3.2 Použité chemikálie

30% akrylamid/bis-akrylamid (29:1)(Bio-Rad)

Aktinomycin D (Sigma-Aldrich)

Aphidicolin (Sigma-Aldrich)

Azid sodný (Sigma-Aldrich)

BCA protein assay kit (Thermo Scientific)

BMH-21 (Sigma-Aldrich)

Bromfenolová modř (BPB) (Sigma-Aldrich)

Camptothecin (Sigma-Aldrich)

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄) (Penta)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (AppliChem)

Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich)

Dodecylsírán sodný (SDS) (Sigma-Aldrich)

Doxorubicin (Sigma-Aldrich)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Biosera)

Ethanol 70% a 96% (Fagron)

Fetální bovinní sérum (FBS) (Thermo Scientific)

Formaldehyd (Sigma-Aldrich)

Glycerol (Penta)

Glycin (Sigma-Aldrich)

Hoechst 33342 (Molecular Probes)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Na₂HPO₄ * 12H₂O) (Penta)

Hydroxyurea (Sigma-Aldrich)

Chemiluminiscenční činidlo SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific)

Chemiluminiscenční činidlo SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)

Chlorid draselný (KCl) (Sigma-Aldrich)

Chlorid sodný (NaCl) (Sigma-Aldrich)

Kyselina octová (Penta)
Methylalkohol (Penta)
Olaparib (Selleckchem)
Penicilin (Sigma-Aldrich)
Peroxodisíran amonný (APS) (Sigma-Aldrich)
Peroxid vodíku (Fargon)
Ponceau S (Sigma-Aldrich)
Proteinový marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad)
Streptomycin (Sigma-Aldrich)
Sušené odtučněné mléko (Artifex Instant s.r.o.)
Tetramethylethylenediamin (TEMED) (Sigma-Aldrich)
Triton X-100 (Carl Roth GbmH)
Trypsin (Thermo Scientific)
Tween 20 MP (Biomedicals)
Vectashield (VectorLaboratories)

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

3.3 Použité roztoky

10% APS: 1 g APS / 10 ml H₂O

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

10x PBS: 80 g NaCl; 2 g KCl; 2 g KH₂HPO₄; 32,1 g Na₂HPO₄ * 12H₂O v 1 l destilované vody; pH = 7,4 – 7,5

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

10% SDS: 10 g SDS / 100 ml H₂O

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

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

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

2x LSB: 1,5 ml 4x LSB; 1,5 ml ddH₂O

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

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

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

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

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

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

Ponceau's: 0,2% v 1% kyselině octové

3.4 Použité protilátky

3.4.1 Primární protilátky

anti-DDX56: králík, polyklonální, ředění 1:500, Abcam (Velká Británie), ab. 115158

anti-DDX56: myš, monoklonální, ředění 1:200, Progen (Německo), 652126

anti-DDX51: králík, polyklonální, ředění 1:2 000, Abcam (Velká Británie), ab. 72292

anti-nukleolin: králík, polyklonální, ředění 1:2 000, Abcam (Velká Británie), ab. 70493

anti-p53: myš, monoklonální, ředění 1:500, Santa Cruz Biotechnologies (USA), sc.126

anti-β-aktin: myš, monoklonální, ředění 1:2 000, Santa Cruz Biotechnologies (USA), sc. 47778

3.4.2 Sekundární protilátky pro Imunofluorescenční mikroskopii

anti-myš IgG: koza, konjugovaná s Alexa Fluor 488, ředění 1:1 000, Thermo Fisher Scientific (USA)

anti-králík IgG: koza, konjugovaná s Alexa Fluor 568, ředění 1:1 000, Thermo Fisher Scientific (USA)

3.4.3 Sekundární protilátky pro Western Blot

anti-mouse IgG: ovce, konjugovaná s Horseradish peroxidase, linked whole antibody, ředění 1:1 000, GE Healthcare (USA)

anti-rabbit IgG: osel, konjugovaná s Horseradish peroxidase, linked whole antibody, ředění 1:1 000, GE Healthcare (USA)

3.5 Buněčná linie

V praktické části této bakalářské práce jsem pracoval s buněčnou linií U-2 OS (ATCC® HTB-96™). Jedná se o osteosarkom, nádorovou linii odvozenou z nádoru kosti. Osteosarkom je maligní (zhoubný) typ rakoviny, který roste v kosti odkud poté napadá okolní měkkou tkáň a tvoří metastáze. Tato buněčná linie roste adherentně na dně kultivační lahve.

3.6 Kultivace buněk a pasážování

Buňky byly kultivovány v inkubátoru v plastových lahvích v médiu DMEM s 10% přídatkem fetálního bovinního séra (FBS) a 1% směsi antibiotik (penicilin a streptomycin). Inkubátor byl vyhříván na 37°C a udržoval hladinu CO₂ na 5%. Pasážování probíhalo dle potřeby při buněčné konfluenci 90–95 %. Buněčná konfluencia byla kontrolována pomocí světelného mikroskopu. Veškerá manipulace s buněčným materiálem probíhala v aseptických podmínkách ve flowboxu za použití sterilních nástrojů.

Při pasážování a vysazování kultur nejprve došlo k odsátí kultivačního média a opláchnutí buněk 10 ml fosfátového pufru (PBS) vytemperovaným na 37°C. PBS bylo odsáto a do kultivační lahve byl přidán 1 ml trypsinu. Jemným nakláněním misky ze strany na stranu se zajistila rovnoměrná distribuce trypsinu po celém povrchu misky. Miska se poté na 5 minut umístila do inkubátoru, aby nedocházelo ke zbytečnému stresování buněk a zároveň se zvýšila proteolytická aktivita trypsinu. Cílem trypsinizování je narušit extracelulární matrix buněk, což vede k jejich odlepení ode dna misky.

Po pěti minutách inkubace buněk s trypsinem byly buňky zkontrolovány pod světelným mikroskopem, zda došlo k jejich odlepení. Pokud ne, byly buňky vráceny do inkubátoru na další 2 minuty. V opačném případě byly buňky rozsuspendovány v 9 ml čerstvého kultivačního média vytemperovaném na 37°C. Buněčná suspenze byla přepipetována do 15 ml zkumavky. Bylo odebráno 0,5 ml suspenze k přístrojovému počítání počtu buněk (zařízení Vi-Cell XR). Následně byl proveden výpočet kolik mililitrů suspenze je potřeba k vysazení požadovaného množství buněk.

Do čisté kultivační lahve nebo do Petriho misek bylo dáno určité množství čerstvého, vyhřátého kultivačního média a následně bylo přidáno vypočítané množství buněčné suspenze. Jemným pohybem do stran došlo k rovnoměrnému rozptýlení

buněk do celého objemu média. Následně byly misky a lahev řádně popsány a uloženy do inkubátoru.

3.7 Ovlivnění buněk

Ovlivnění buněčné kultury probíhalo v plastových Petriho miskách o průměru 60 mm. Do každé Petriho misky byla vložena dvě sterilní kulatá krycí skla o průměru 12 mm. Poté bylo do každé misky vysazeno 800 000 buněk do celkového objemu 5 ml. K ovlivnění byly používány misky porostlé z 80–90%. Kultivace ošetřených buněk probíhala 6 nebo 24 hodin. Poté byly buňky fixovány nebo lyzovány.

3.7.1 Ovlivnění UV zářením

Pomocí sterilní sérologické pipety došlo k odsátí kultivačního média z porostlé Petriho misky do 15 ml centrifugační zkumavky. Otevřená Petriho miska byla vložena do přístroje UV Crosslinker CL-1000 a ozářena UV zářením o intenzitě 50 J/m². Odebrané médium bylo po ozáření vráceno zpět do Petriho misky, ta byla uzavřena a navrácena do inkubátoru ke kultivaci.

3.7.2 Ovlivnění Rentgenovým zářením

Porostlá Petriho miska byla vložena do rentgenového přístroje Xstrahl RS Research Cabinet (RS225 systém) emitujícího RTG záření. Poté byly buňky vystaveny záření o síle 10 Gy. Po ozáření byla Petriho miska navrácena do inkubátoru.

3.7.3 Ovlivnění chemickými látkami

V aseptických podmínkách flowboxu bylo k buňkám kultivovaných v Petriho misce přidáno definované množství chemické látky. Pomocí pipety bylo kultivační médium s danou chemickou látkou řádně propipetováno, aby se zajistila homogenní distribuce chemické látky v celém objemu. Poté byla Petriho miska uzavřena a navrácena do inkubátoru ke kultivaci. Použité látky a jejich koncentrace zobrazuje tabulka 3.

3.8 Imunofluorescenční mikroskopie

3.8.1 Příprava vzorků

Po ukončení inkubace ovlivněných buněk došlo k odsátí kultivačního média z Petriho misky a opláchnutí buněk roztokem PBS. Kulaté krycí sklíčko porostlé buňkami bylo

pomocí pinzety vyjmuto a uloženo do plastové krabičky vystlané parafilmem. Poté byly buňky po dobu 15 minut fixovány 10% formaldehydem vychlazeným na 4°C. Následně byla sklíčka použita k přípravě preparátů pro imunofluorescenční mikroskopii, případně byla uskladněna v lednici v roztoku PBS pro pozdější použití.

3.8.2 Barvení mikroskopických preparátů

Krycí sklíčka se zafixovanými buňkami byla permeabilizována roztokem 0,2% Triton X-100 v PBS po dobu pěti minut. Následně bylo nanášeno 150 μ l primární protilátky zředěné v ADB médiu. Inkubace probíhala přes noc v lednici. Druhý den byla sklíčka třikrát opláchnuta v PBS. Poté byly nanášeny fluorescenčně značené sekundární protilátky Alexa Fluor 488 a Alexa Fluor 568 zředěné v ABD médiu. Inkubace probíhala hodinu ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí času byla sklíčka opět třikrát opláchnuta roztokem PBS a poté byla 5 minut inkubována ve tmě s barvivem HOECHST 34580 ředěným v PBS na koncentraci 0,89 μ M. Poté byla sklíčka jednou opláchnuta PBS a usušena při pokojové teplotě ve tmě. Na podložní sklo byly nanášeny 4 μ l Vectashield. Poté bylo přiloženo krycí sklo s nabarvenými buňkami tak, aby se porostlá strana dotýkala Vectashield. Následně bylo krycí sklo po okrajích zafixováno pomocí průhledného laku na nehty.

3.8.3 Mikroskopické pozorování

Pro sledování lokalizace proteinů byl použit fluorescenční mikroskop Olympus IX81S1F-ZDC2 se softwarem Scan^R acquisition a Scan^R analysis. Mikroskopování probíhalo při zvětšení 40x10. Pro úpravu získaných snímků byl použit software ImageJ.

3.9 Western Blot

3.9.1 Příprava lyzátů

Po ukončení inkubace ovlivněných buněk došlo k odsátí kultivačního média z Petriho misky a opláchnutí buněk roztokem PBS, které bylo následně odsáto. Do Petriho misky bylo přidáno 300 μ l lyzačního pufru (2x LSB) bez SDS a BPB. Za použití silikonové škrabky byl lyzační pufr rozprostřen po celém povrchu misky a smíchán s buňkami. Vzniklý viskózní lyzát byl přenesen do mikrozkuhavky a vytřepán v termotřepačce vyhřáté na 98°C při 1400 RPM po dobu 8 minut.

3.9.2 Měření proteinové koncentrace

K měření proteinové koncentrace byl použit BCA protein assay kit od firmy Thermo Scientific. V mikrotitrační destičce bylo smícháno 5 μ l buněčného lyzátu a 200 μ l komerčního reakčního roztoku. Pro kalibraci byla použita koncentrační řada roztoku albuminu smíchaného s reakčním roztokem. Po dvou hodinách inkubace byla při vlnové délce 562 nm měřena absorbance na spektrofotometru INFINITE M200 PRO firmy Tecan. Na základě naměřené absorbance byly připraveny vzorky pro elektroforézu smícháním 2x LSB s buněčným lyzátem tak aby výsledná koncentrace proteinů byla 30 μ g/ μ l.

3.9.3 SDS-PAGE lyzátů

Mezi dvě skla elektroforetické komůrky Mini-PROTEAN Tetra Cell Biorad byl nalit 8% dělicí polyakrylamidový gel a hladina byla zarovnána isopropanolem. Po zatuhnutí dělicího gelu (zhruba 25 minut) byl isopropanol odstraněn a gel byl vysušen filtračním papírem. Poté byl namíchan zaostřovací gel a ten byl nanesen na dělicí gel. Do zaostřovacího gelu byl vložen 15jamkový hřebínek.

Tabulka 1: Složení 8% dělicího gelu

Složka	Objem (ml)
H ₂ O	7,00
30% Acrylamid mix	4,00
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,80
10% SDS	0,15
10% APS	0,15
TEMED	0,009

Tabulka 2: Složení zaostřovacího gelu (5%)

Složka	Objem (ml)
H ₂ O	3,40
30% Acrylamid mix	0,83
0,5 M Tris (pH 6,8)	0,63
10% SDS	0,05
10% APS	0,05
TEMED	0,005

Po zatuhnutí zaostřovacího gelu byl gel ve skle vložen do elektroforetické vany a zalit 1x running pufrem. Následně byl vyjmut hřebínek. Do krajní jamky bylo napipetováno 10 μ l proteinového markeru Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, do ostatních jamek bylo napipetováno 18 μ l proteinového lyzátu. Aparatura byla připojena k elektrickému zdroji a bylo spuštěno elektroforetické dělení za konstantního proudu 0,04 A (pro dva gely). Doba trvání elektroforézy byla zhruba 90 minut.

3.9.4 Semi-dry blot

Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z komůrky, zaostřovací gel byl odříznut a vyhozen, dělicí gel byl vložen do aparatury pro přenos proteinu Panther Owl-HEP1. Aparatura se kromě samotného zařízení skládá z filtračních papírů a nitrocelulóзовé membrány namočených v 1x transfer pufru. Přenos proteinů z gelu na membránu probíhal 2 hodiny při konstantním proudu 0,3 A (pro dva gely).

Po skončení přenosu byla membrána s imobilizovanými proteiny vyjmuta z aparatury, opláchnuta destilovanou vodou a nabarvena roztokem Ponceau S. Z membrány byly pomocí skalpelu vyříznuty pásy s cílovými proteiny. Následně byly pásy odbarveny v roztoku 1x TBS + 0,1% Tween a blokovány v blokačním činidle na orbitální třepačce. Po hodině blokování byly pruhy membrány přeneseny do plastové krabičky vystlané parafilmem a byly na ně nanесeny primární protilátky ředěné v blokačním činidlem. Inkubace probíhala přes noc v lednici

Druhý den byly membrány třikrát promyty, vždy po dobu 10 minut, v 1x TBS + 0,1% Tween. Poté probíhala hodinová inkubace při laboratorní teplotě se sekundární protilátkami značenými křenovou peroxidasou, zředěnými v blokačním činidle. Následně byly membrány promyty v 1x TBS + 0,1% Tween, opět třikrát 10 minut.

3.9.5 Detekce proteinů

K detekci imobilizovaných proteinů se využilo chemiluminiscenčních vlastností křenové peroxidasy. Chemiluminiscenční činidlo SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate bylo smícháno se SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate v poměru 1:3 nebo 1:1 (pro detekci p53 a DDX51).

Vyvolávání snímků probíhalo pomocí CCD kamery v zařízení CCD skener Bio-RAD ChemiDoc™ MP Systém imaging pomocí softwaru Image Lab.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Laboratorní část této bakalářské práce probíhala na Ústavu Molekulární a Translační Medicíny v Laboratoři integrity genomu. Veškeré experimenty byly provedeny ve třech opakováních.

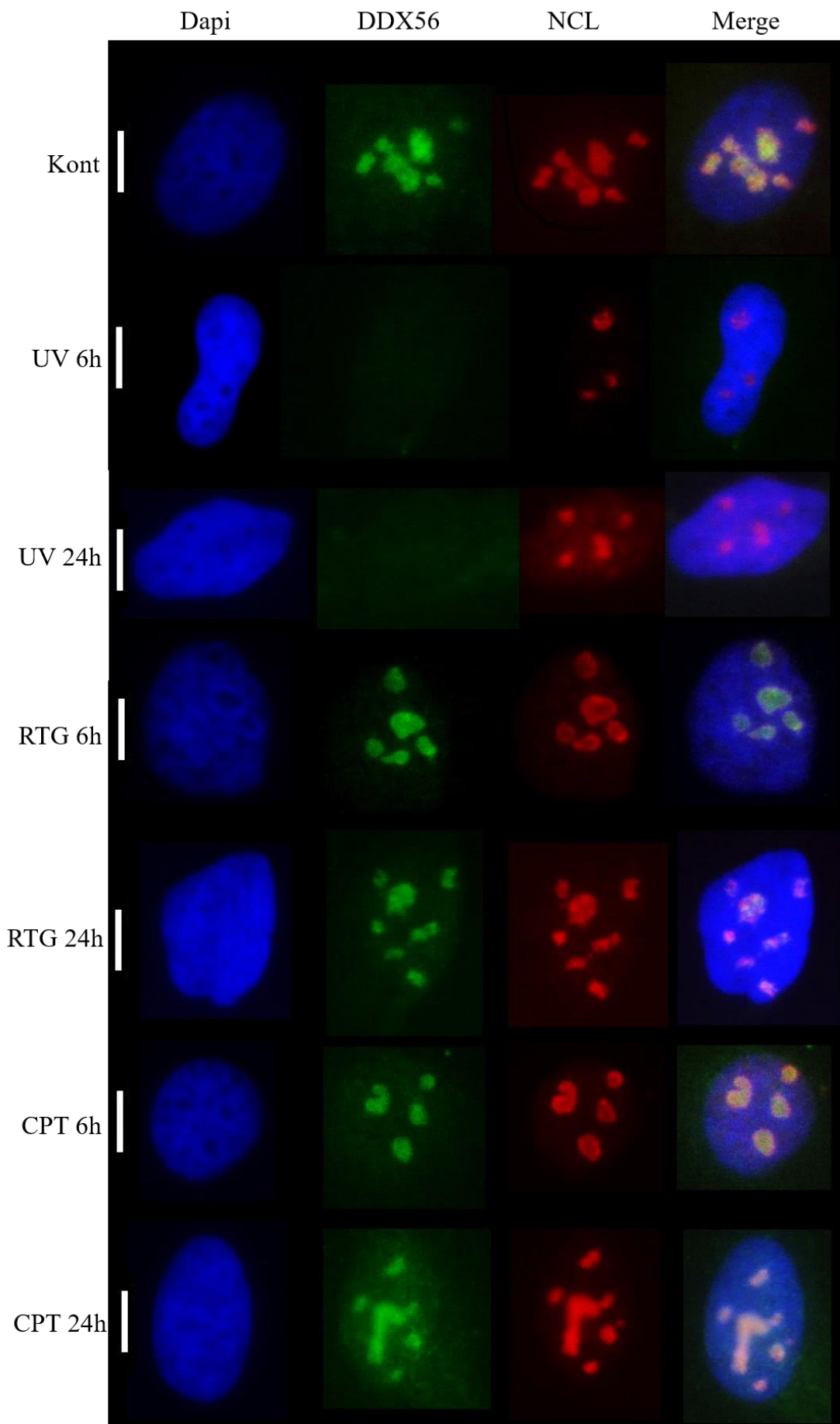
Cílem této práce bylo zjistit vliv vybraných chemických látek a záření na lokalizaci a množství proteinu DDX56 v buněčné linii U-2 OS.

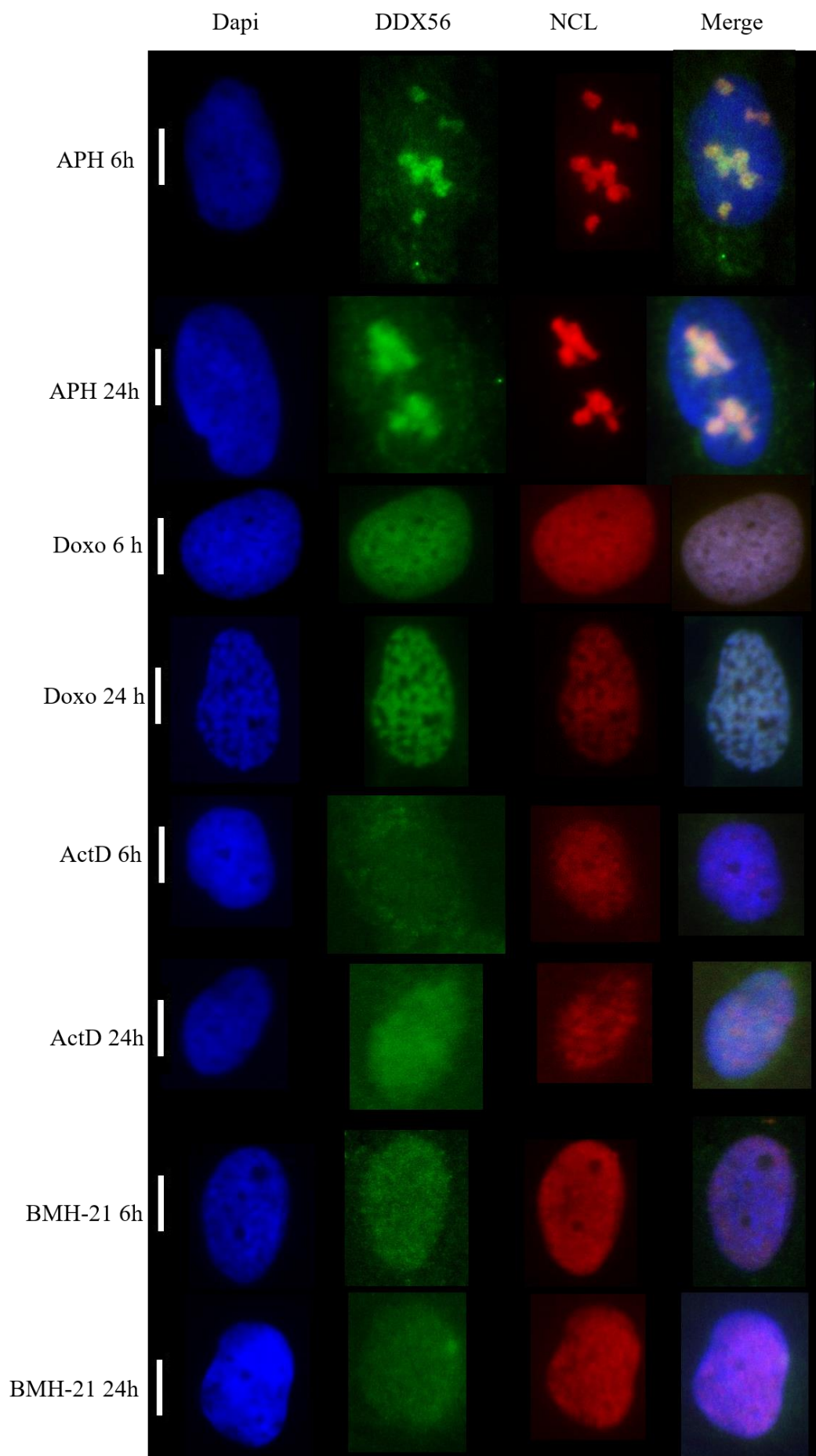
4.1 Změny v lokalizaci proteinu DDX56

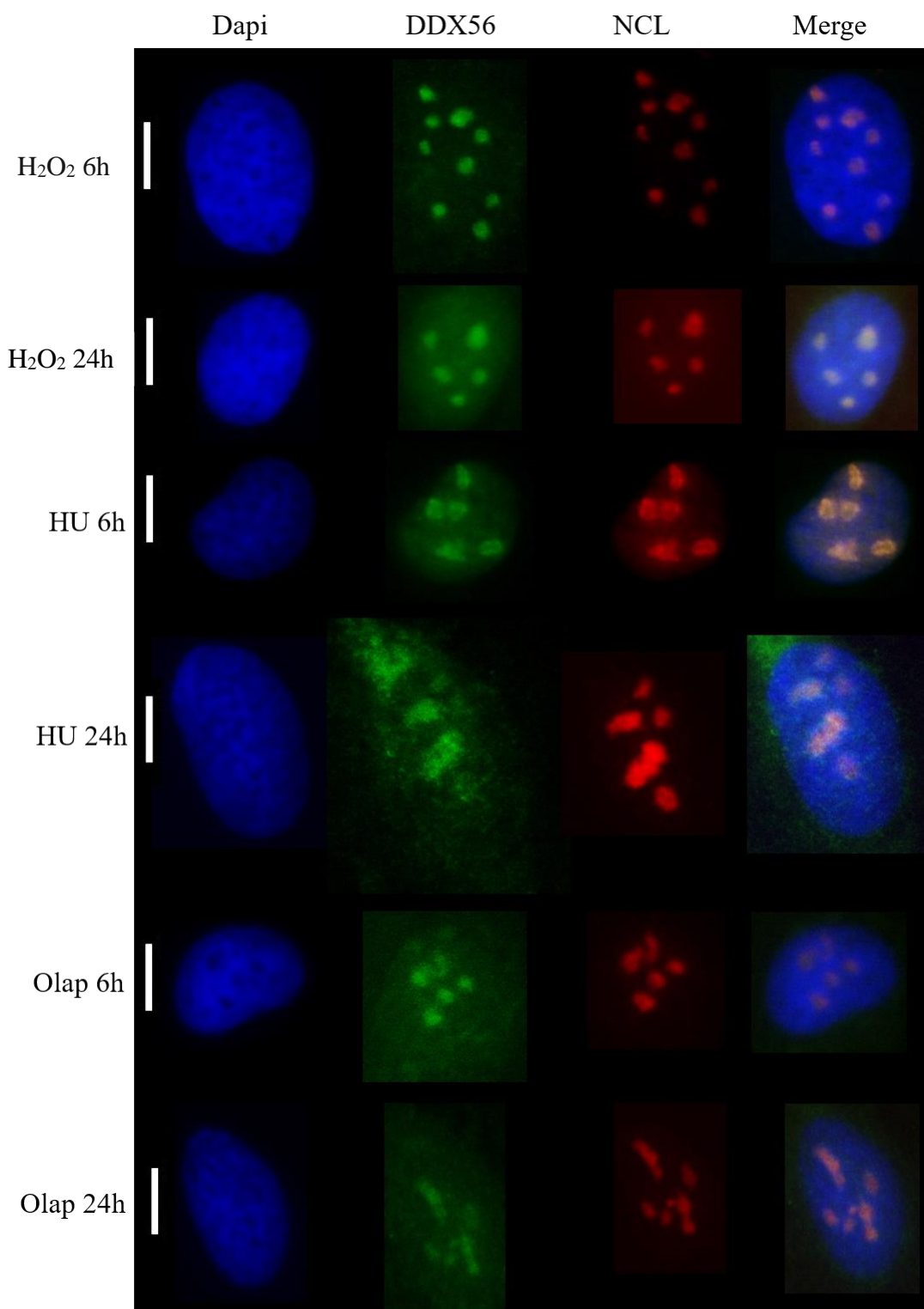
Abychom mohli určit změnu lokalizace proteinu DDX56, byla buněčná linie U-2 OS ovlivněna pomocí vybraných činidel (viz tabulka 3). Délka ovlivnění byla 6 a 24 hodin. Buňky byly značeny trojitým barvením metodou nepřímé imunofluorescence: Dapi pro vizualizaci jádra, Alexa Fluor 488 pro vizualizaci DDX56 a Alexa Fluor 568 pro vizualizaci nukleolinu (NCL). NCL souží ke značení jadérek a zároveň jako ukazatel ribozomálního stresu. Snímky byly pořízeny mikroskopem Olympus IX81S1F-ZDC2 se softwarem Scan^R acquisition při zvětšení 40x10 a upraveny pomocí softwaru Image J (FiJi). Pro publikační účely byla jas a kontrast u níže prezentovaných snímků upraven, proto na těchto snímcích nelze vzájemně porovnávat hladinu proteinu DDX56.

Tabulka 3: Shrnutí činidel aplikovaných na buněčnou linii, jejich zkratka a použitá koncentrace nebo intenzita (v případě záření).

Ovlivňující faktor	Zkratka	Použití koncentrace/intenzita
Aktinomycin D	ActD	5 nM
Aphidicolin	APH	2 μ M
BMH-21	BMH21	0,5 μ M
Camptothecin	CPT	0,5 μ M
Doxorubicin	Doxo	1 μ M
Hydroxyurea	HU	2 mM
Olaparib	Olap	10 μ M
Peroxid vodíku	H ₂ O ₂	50 μ M
UV záření	UV	50 J/m ²
Rentgenové záření	RTG	10 Gy







Obr. 5: Imunofluorescenční lokalizace proteinu DDX56 po ovlivnění různými činidly. Zvětšení 40x10. Měrka představuje 10 μ m.

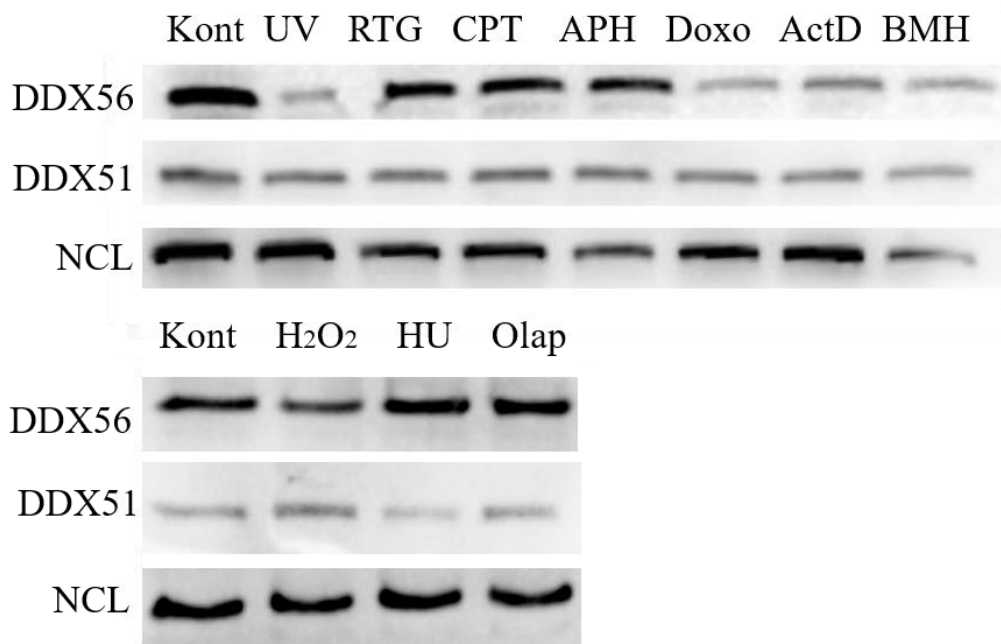
Kolokalizace proteinu DDX56 s NCL v kontrolních buňkách potvrzuje jeho lokalizaci v jadérku za přirozených podmínek (obrázek 5, kontrola). Z mikroskopických snímků je zřejmé, že k translokaci proteinu DDX56 z jadérka do nukleoplazmy dochází u buněk ošetřených UV zářením, doxorubicinem, aktinomycinem D a BMH-21. Všechny tyto látky ovlivňují transkripci. Naše výsledky se shodují s již dříve publikovanými daty, kdy Zirwes a jeho kolegové (2000) ukazují, že po inhibici transkripce dochází k degradaci DDX56. Po působení inhibitoru transkripce ADM došlo k translokaci tohoto proteinu z jadérka do nukleoplazmy.

Ve všech vzorcích, kde dochází k translokaci DDX56, kromě UV záření, dochází zároveň k dezintegraci jadérek. Tuto změnu ukazuje translokace NCL do nukleoplazmy. To může být důležitým krokem buněčné odpovědi na stres – pozastavení buněčného cyklu poskytne buňce delší čas na vypořádání se s následky stresu.

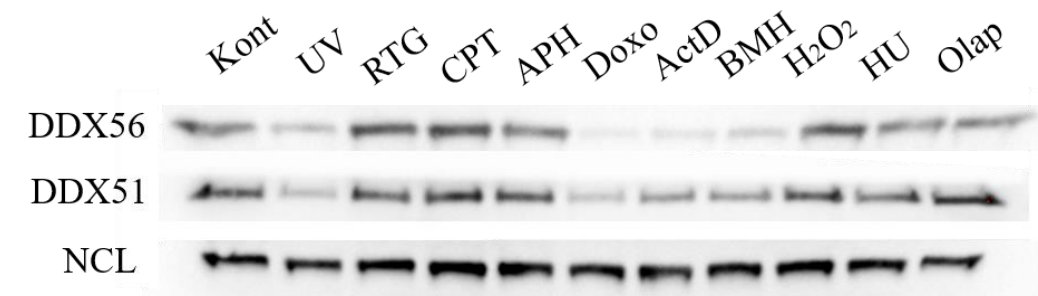
Inhibice transkripce má za následek změnu struktury jadérka, dochází k rozvolnění jeho jednotlivých komponentů. Jelikož sestavování preribozomálních podjednotek probíhá v GC jadérka, jeho rozpad znemožní správný průběh tohoto procesu (Grummt, 2013). DDX56 se také nachází v GC jadérka (Zirwes *et al.*, 2000) a z tohoto důvodu je degradace po narušení transkripce očekávaný jevem.

4.2 Změny v množství proteinu DDX56

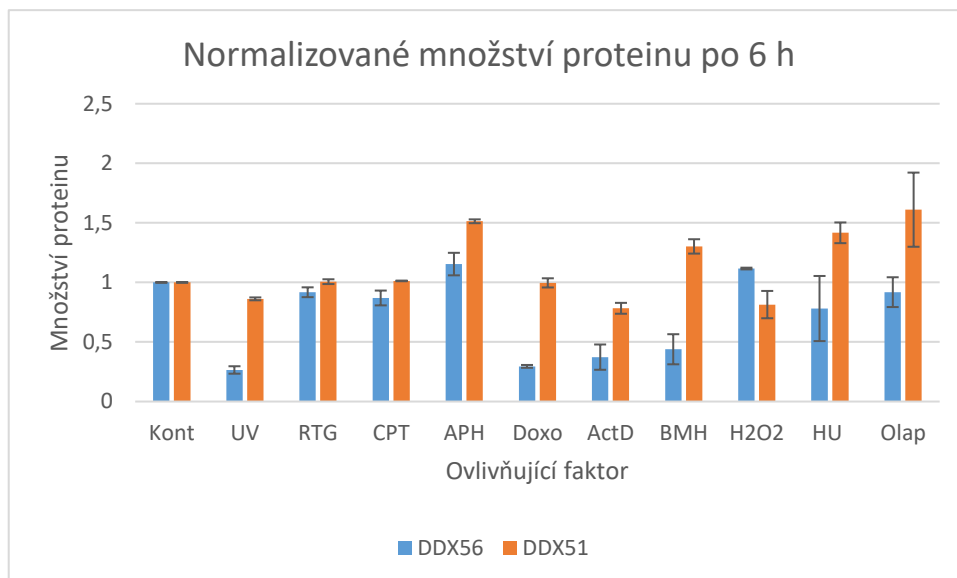
Pro identifikaci změn v množství DDX56 byla použita metoda Western blot. Buněčné lyzáty o koncentraci 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ byly elektroforeticky rozděleny na 8% polyakrylamidovém gelu a následně imobilizovány na nitrocelulosové membráně. Pomocí metody nepřímého imunoznačení byly detekovány proteiny DDX56, DDX51 a nukleolin. Získané snímky byly analyzovány softwarem ImageJ kde byla měřena intenzita získaného signálu. Data byla analyzována v softwaru Microsoft Excel, kde byla vypočtena hodnota normalizovaného množství proteinu DDX56 a DDX51 vzhledem k nukleolinu (ten slouží jako kontrola naneseného množství proteinu). DDX51 je také členem DEAD box proteinové rodiny a slouží jako kontrolní helikasa.



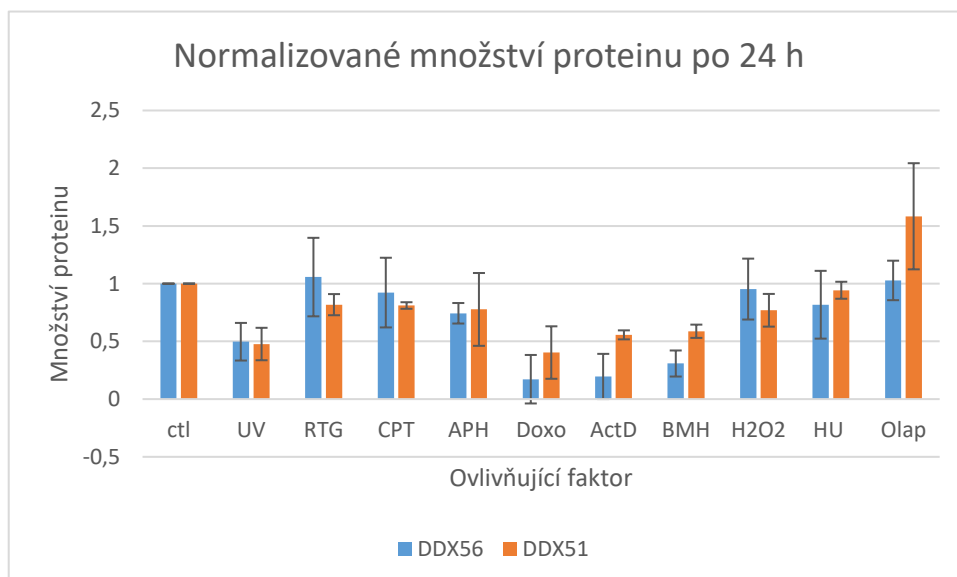
Obr. 6: Detekce množství proteinů NCL, DDX51 a DDX56 po 6hodinovém ovlivnění různými činidly



Obr. 7: Detekce množství proteinů NCL, DDX51 a DDX56 po 24hodinovém ovlivnění různými činidly



Obr. 8: Normalizované množství protein DDX56 a DDX51 po 6hodinovém ovlivnění různými činidly.



Obr. 9: Normalizované množství protein DDX56 a DDX51 po 24hodinovém ovlivnění různými činidly.

Z výsledků pozorování vyplývá, že již po 6 hodinách dochází ke značnému snížení množství proteinu DDX56 v buňkách ovlivněných UV zářením, doxorubicinem, aktinomycinem D a BMH-21 (obrázky 6 a 7). V ostatních vzorcích není pokles tohoto proteinu významný (camptothecin, hydroxyurea, Olaparib) nebo nenastal vůbec (rentgenové záření, aphidicolin, H₂O₂). Tento pokles je v souladu s mikroskopickým pozorováním (obrázek 5), kde lze sledovat translokaci DDX56 z jádérka do nukleoplazmy po ovlivnění buněk činidly, která narušují transkripci. Oproti

tomu se hladina proteinu DDX51 po šesti hodinách příliš nezměnila, signifikantní pokles ani nárůst množství DDX51 nevykazuje žádný ze vzorků.

Po 24 hodinách se chování proteinu DDX56 nezměnilo (obrázky 7 a 9). Hladina proteinů zůstává prakticky neměnná s výjimkou vzorků ovlivněných UV zářením, doxorubicinem, aktinomycinem D a BMH-21, kde lze sledovat pokles v hladině DDX56. Stejně chování vykazuje také kontrolní helikasa DDX51.

Po inhibici transkripce nebo po poškození DNA dochází k rozpadu jadérka (Boulon *et al.*, 2010) a tím pádem k pozastavení syntézy ribozomů, jelikož nedochází ke vzniku 47S pre-rRNA. Aby mohla buňka úspěšně projít buněčným cyklem, potřebuje mimo jiné dostatek proteinů. Množství proteinů je ovlivněno počtem ribozomů a rychlostí jejich syntézy (Dez a Tollevrey, 2004). Zároveň je pokles v hladině DDX56 doprovázen nárůstem proteinu p53 (Haroková, 2018), který funguje jako senzor poškození DNA a strážce integrity genomu. Takovéto chování může naznačovat zapojení proteinu DDX56 do signálních drahách zajišťujících odpověď na poškození DNA.

Jak již bylo zmíněno v úvodu (kap. 2.3.2 a 2.3.1), proteiny DDX51 a NCL mají vliv na regulaci buněčného cyklu a biosyntézu ribozomů. Při silné a dlouhodobé (24 h) inhibici transkripce jsme pozorovali částečnou degradaci proteinu DDX51. Ve vzorcích ovlivněných UV zářením, doxorubicinem, aktinomycinem D a BMH-21 došlo k poklesu hladin DDX51 oproti kontrolnímu vzorku. (obrázky 7 a 9). Jelikož se jedná o příbuzné proteiny a DDX56 je také zapojen do biosyntézy velké podjednotky ribozomu, není shodné chování obou proteinů překvapivé. Zároveň degradace obou proteinů nahrává myšlence, že po narušení transkripce dochází ke zpomalení syntézy nových ribozomů.

4.3 Degradace proteinů po inhibici translace

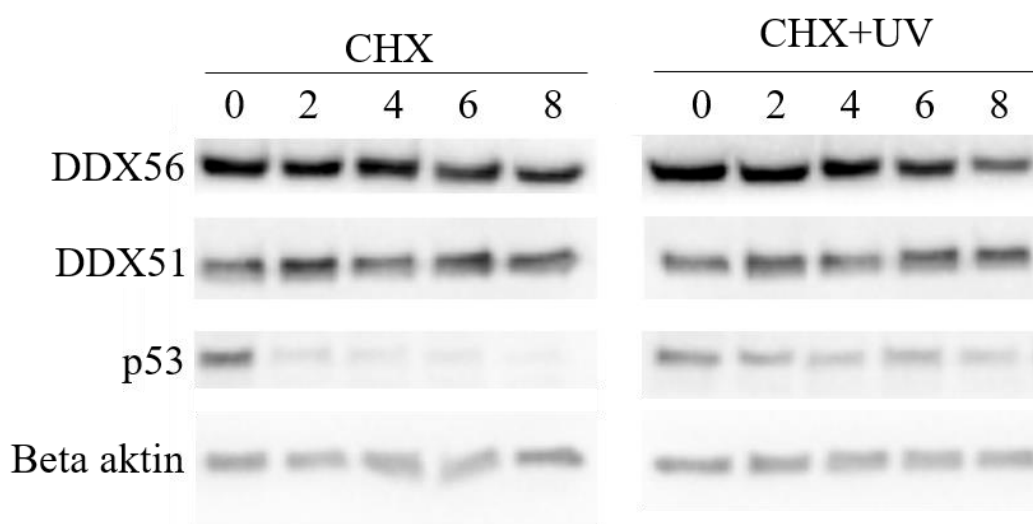
Díky inhibici syntézy nových proteinů bylo možné porovnat odbourávání DDX56 a DDX51 za přirozených a stresových podmínek. K inhibici proteosyntézy byl využit cykloheximid (CHX). Ten se váže na E místo velké podjednotky ribozomu čímž inhibuje elongační fázi proteosntézy (Schneider-Poetsch *et al.*, 2010).

Do média dostatečně porostlých Petriho misek byl přidán CHX (výsledná koncentrace 0,17 mM) a po 2, 4, 6 a 8 hodinách byly připraveny lyzáty. Pro sledování rychlosti degradace DDX56 ve stresovaných buňkách jsme druhou sadu porostlých

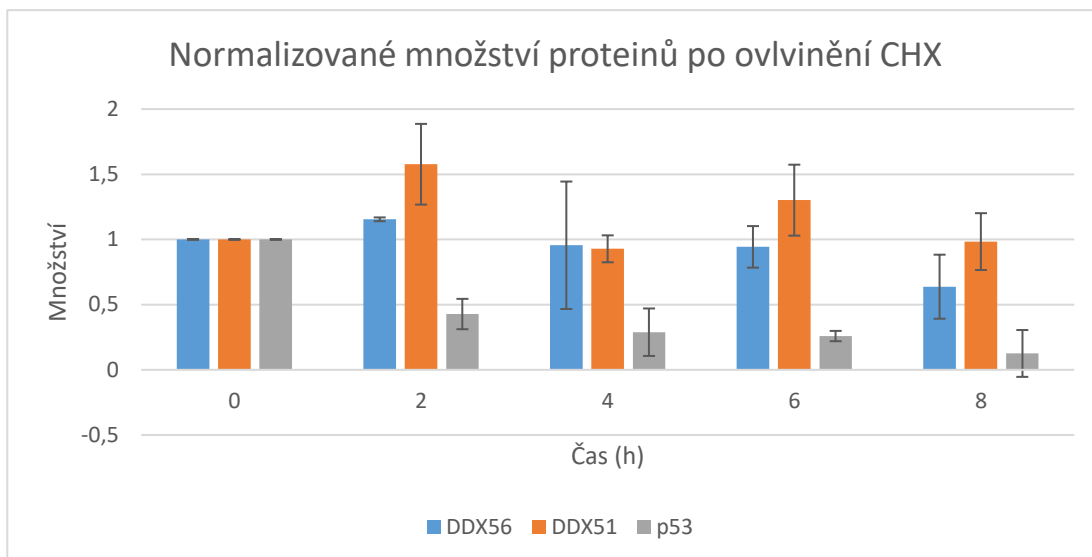
Petriho misky ozářili UV zářením o intenzitě 50 J/m^2 a inkubovali s médiem obohaceným o CHX.

Následně proběhla analýza množství proteinů DDX51, DDX56, p53 a β -aktin pomocí Western blotu. β -aktin v tomto experimentu slouží jako kontrola naneseného množství proteinu, jelikož má dlouhý poločas rozpadu (8,7 hodin) (Brinster et al., 1979). Oproti tomu protein p53 má velice krátký poločas rozpadu (okolo 20 minut) a proto slouží jako kontrola funkčnosti CHX. (Giaccia a Kastan, 1998).

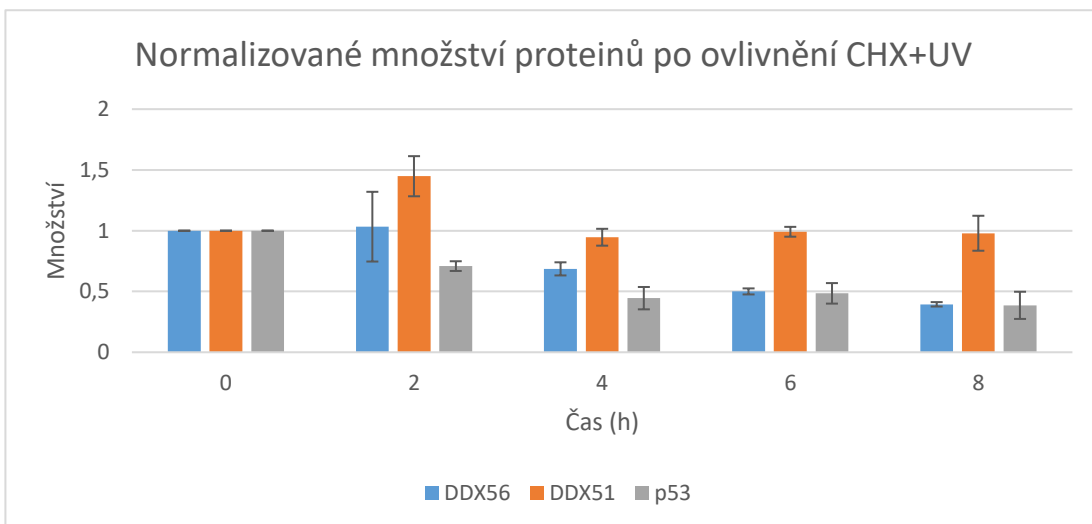
Analýza získaných snímků proběhla opět softwarem ImageJ a naměřená intenzita signálu byla zpracována v programu Microsoft Excel. Byly sestaveny grafy ukazující pokles normalizovaného množství proteinů DDX56, DDX51 a p53 vůči β -aktinu. Také byl pomocí programu WolframAlpha proveden výpočet poločasů rozpadu proteinů po inhibici translace z exponenciálních rovnic vygenerovaných softwarem Microsoft Excel.



Obr. 10: Detekce množství proteinů DDX56, DDX51, p53 a β -aktin po ovlivnění cykloheximidem (CHX) a cykloheximidem v kombinaci s UV zářením (CHX+UV)



Obr. 11: Graf normalizovaného množství proteinů DDX56, DDX51 a p53 po ovlivnění cyklohexamidem.



Obr. 12: Graf normalizovaného množství proteinů, DDX56, DDX51 a p53 po ovlivnění cyklohexamidem v kombinaci s UV zářením.

Tabulka 4: Poločasy rozpadu proteinů DDX56, DDX51 a p53 po ovlivnění CHX+UV a pouhým CHX.

Protein	Poločas rozpadu (h)	
	CHX	CHX + UV
DDX56	21,66	6,36
DDX51	22,35	13,59
p53	2,655	5,25

Výsledky naznačují, že proteiny DDX56 a DDX51 mají přirozeně dlouhý poločas rozpadu. Pozorování je v souladu s tvrzením Brinstera a jeho kolegů (1979), že proteiny s izoelektrickým bodem v kyselé oblasti se degradují rychleji než proteiny bazické. Oba proteiny DDX56 i DDX51 mají svůj izoelektrický bod (Pi) v bazické oblasti (9,9 a 8,16), zatímco p53 jej má v kyselé oblasti (6) (Chalkley et al., 1994, Zirwes et al., 2000).

Oproti tomu buňky ovlivněné UV zářením a inkubované v médiu s CHX vykazují zrychlenou degradaci proteinů DDX56 a DDX51. Poločas rozpadu proteinů DDX56 a DDX51 po ozáření UV je několikanásobně menší než za přirozených podmínek (viz tabulka 4). Naopak u proteinu p53 došlo po ozáření UV k jeho stabilizaci. Několik publikací uvádí, že po poškození DNA (například UV zářením) dochází ke stabilizaci tohoto proteinu v rámci aktivace odpovědi na poškození DNA (Blattner et al., 1999). Data prezentovaná v tabulce 4 ovšem nejsou nikterak přesná. Pro měření poločasu rozpadu proteinů existují mnohem přesnější a vhodnější metody jako je například SILAC a hmotnostní spektrometrie.

Jak již bylo výše zmíněno (kap. 2.1.2 a 2.2.3.3), mohou ribozomální proteiny a ribozomy samotné hrát roli v buněčné odpovědi na stres. Z tohoto důvodu je očekávána rychlejší degradace proteinů zapojených do ribozomální biosyntézy a inhibice syntézy modulujících faktorů po navození stresových podmínek. Jestliže chybí důležité modulační faktory, buňka nevytvoří dostatek ribozomů, aby mohla projít buněčným cyklem a tím pádem má čas na opravu poškozené DNA. Zároveň je kvůli rozpadu jadérek zpomalena biosyntéza nových ribozomů.

Dále výsledky pozorování proteinů DDX56 a DDX51 v ovlivněných buňkách (obrázky 6 a 8) společně s výsledky měření poločasu rozpadů (tabulka 4) ukazují, že

protein DDX51 je stabilnější a vůči narušení transkripce odolnější než protein DDX56. Přestože je poločas rozpadu obou proteinů v kontrolních podmínkách přibližně stejný, je poločas DDX51 v buňkách ošetřených UV zářením zhruba dvakrát tak delší než poločas rozpadu DDX56. Stejně tak degradaci DDX51 lze sledovat až po dlouhodobém a silném působení látek ovlivňujících transkripci (24 hodin), zatímco degradaci DDX56 lze sledovat již po šesti hodinách.

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá pozorováním změn v buněčné lokalizaci a množství proteinu DDX56 po ovlivnění různými činidly. Všechny cíle práce byly naplněny. Autor došel k následujícím závěrům:

- Po ošetření buněk činidly, které ovlivňují transkripci dochází k translokaci proteinu DDX56 z jádérka do nukleoplazmy a jeho degradaci.
- Při silné a dlouhotrvající inhibici transkripce dochází k degradaci proteinu DDX51.
- Poločas rozpadu proteinu DDX56 se po aplikaci UV záření snížil z 21,66 na 6,36 h.

6 SEZNAM LITERATURY

Abdelhaleem M. (2004): Do human RNA helicases have a role in cancer?. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1704**, 37-46.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2015): *Molecular Biology of the Cell*. 6th ed. Garland Science, USA, 1342 stran.

Aratani S., Fujii R., Fujita H., Fukamizu A., Nakajima T. (2003): Aromatic residues are required for RNA helicase A mediated transactivation. *International journal of molecular medicine*, **12**, 175-180.

Barcellos-Hoff M. H., Park C., Wright E.G. (2005): Radiation and the microenvironment -tumorigenesis and therapy. *Nature Reviews Cancer*, **5**, 867-875.

Baskar R., Dai J., Wenlong N., Yeo R., Yeoh K.W. (2014): Biological response of cancer cells to radiological treatment. *Frontiers in molecular bioscience*, **1** <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2014.00024/full>.

Bates G. J., Nicol S. M., Wilson B. J., Jacobs A. M., Bourdon J. C., Wardrop J., Gregory D. J., Lane D. P., Perkins N. D., Fuller-Pace F. V. (2005): The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *The EMBO journal*, **24**, 543-553.

Ben-Sarah I., Howell J. J., Asara J. M., Manning B. D. (2015): Stimulation of *de novo* pyrimidine synthesis by growth signalling through mTOR and S6K1. *Science*, **339**, 1323-1328.

Berger F., Ramírez-Hernández M.H., Ziegler M. (2004): The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends in biochemical sciences*, **29**, 111–8.

Betzl C., Rachev R., Dolashka P., Genov N. (1993): Actinomycins as proteinase inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, **1161**, 47-51.

Blattner Ch., Tobiasch E., Liften M., Rahmsdorf H. J., Herrlich P. (1999): Original Paper | Published: 05 March 1999. *Oncogene*, **18**, 1723-1732.

DNA damage induced p53 stabilization: no indication for an involvement of p53 phosphorylation

Brinster R. L., Brunner S., Joseph X., Levey I. L. (1979): Protein degradation in the mouse blastocyst. *The journal of biological chemistry*, **25**, 1927-1931.

Bursac S., Brdovčak M. C., Pfannkuchen M., Orsolíć I., Golomb L., Zhu Y., Katz Ch., Daftuar L., Grabušić K., Vukelić I., Filić V., Oren M., Prives C., Volarevića S. (2012): Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **109**, 20467–20472.

Cadet J., Wagner J.R. (2013): DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**, <http://cshperspectives.cshlp.org/content/5/2/a012559.long>

Carron C., O'Donohue M., Choemmel V., Faubladiet M., Faubladiet P. (2010): Analysis of two human pre-ribosomal factors, bystin and hTsr1, highlights differences

in evolution of ribosome biogenesis between yeast and mammals, *Nucleic acid research*, **39**, 280-291.

Cordin O., Banroques J., Tanner N. K., Linder P. (2006): The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, **367**, 17-37.

Danilova N., Gazda H. T. (2015): Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *The company of biologists*, **8**, 1013-1026.

Dean R. T., FU S., Stocker R., Davies M. J. (1997): Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, **15**, 1-18.

Decatur W. A., Fournier M. J. (2002): rRNA modifications and ribosomal function. *Trends in biochemical sciences*, **27**, 344-351.

Deisenroth Ch., Zhang Y. (2011): The ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway and energy metabolism. *Genes and cancer*, **2**, 392-403.

Denard B., Lee Ch., Ye J. (2012): Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1. *Elife*, <https://elifesciences.org/articles/00090#abstract>.

Dez C., Tollervey D. (2004): Ribosome synthesis meets the cell cycle. *Current opinion in microbiology*, **7**, 631-637.

Durkin S. G., Glover T. W. (2007): Chromosome fragile sites. *Annual Review of Genetics*, **41**, 169-192.

Eng W. K., Faucette L., Johnson R. K., Sternglanz R. (1988): Evidence that DNA topoisomerase I is necessary for the cytotoxic effects of camptothecin. *Molecular Pharmacology*, **34**, 755-760.

Fairman-Williams M.E., Guenther U.P., Janowsky E. (2010): SF1 and SF2 helicases: family matters. *Current Opinion in Structural Biology*, **20**, 313-324.

Fu X., Xu L., Qi L., Tian H., Yi D., Yu Y., Liu, S., Li S., Xu Y., Wang Ch., (2017): BMH-21 inhibits viability and induces apoptosis by p53-dependent nucleolar stress responses in SKOV3 ovarian cancer cells. *Oncology reports*, **38**, 859-865.

Gentiella A., Kozma S. C., Thomas G. (2015): A liaison between mTOR signaling, ribosome biogenesis and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1849**, 812-820.

Gewirtz D.A. (1999): A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, **57**, 727-741.

Giaccia A. J., Kastan M. B. (1998): The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes & development*, **12**, 2973-2983.

Golomb L., Volarevic S., Oren M., (2014): p53 and ribosome biogenesis stress: The essentials. *FEBS letters*, **588**, 2571-2579.

Grummt I. (2013): The nucleolus—guardian of cellular homeostasis and genome integrity. *Chromosoma*, **122**, 487-497.

Halim V.A., García-Santisteban I., Warmerdam D.O., van den Broek B., Heck A. J. R., Mohammed S., Medema R. H. (2018): Doxorubicin-induced DNA damage

causes extensive ubiquitination of ribosomal proteins associated with a decrease in protein translation. *Molecular & Cellular Proteomics*, **17**, 2297-2308.

Haroková B. (2018): *Ribozomální stres a aktivace p53*. Diplomová práce, Univerzita Palackého Olomouc, Česká republika.

Henras A. K., Soudet J., Gêrus M., Lebaron S., Caizergues-Ferrer M., Mougin A., Henry Y. (2008): The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**, 2334-2359.

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

Heung L. J., Poeta M. D. (2005): Unlocking the DEAD-box: a key to cryptococcal virulence? *Journal of clinical investigation*. **115**, 593-595.16

Huang M.E., Facca C., Fatmi Z., Baïlle D., Bénakli S., Vernis L. (2016) DNA replication inhibitor hydroxyurea alters Fe-S centers by producing reactive oxygen species *in vivo*. *Scientific reports*, **6**, <https://www.nature.com/articles/srep29361>.

Chalkley E. G., Knowles P. P., Whitehead P. C., Coffey A. I. (1994): Biochemical characterisation of purified human wild-type p53 overexpressed in insect cells. *European Journal of Biochemistry*, **221**, 167-175.

Chan J.C., Hannan K. M., Riddell K., Ng P. Y., Peck A., Lee r. S., Hung S., Astle M. V., Bywater M., Wall M., Poortinga G., Jastrzebski K., Sheppard K. E., Hemmings B. A., Hall M. N., Johnstone R. W., McArthur G. A., Hannan R. D., Pearson R. B. (2011): AKT promotes rRNA synthesis and cooperates with c-MYC to stimulate ribosome biogenesis in cancer. *Science signaling*, <http://stke.sciencemag.org/content/4/188/ra56.long>

Illichmanová A. (2006): *Reparace plazmidové DNA v buňkách E. coli po působení UV záření a cytostatik*. Diplomová práce, Masarykova Univerzita Brno, Česká republika.

Janowsky E. (2011): RNA Helicases at work: binding and rearranging, *Trends in Biochemical Sciences*, **36**, 19-29.

Jin H., Zhou L., Ge X., Zhang H., Zhang R., Wang C., Wang L., Zhang Z., Yang H., Guo X. (2017): Cellular DEAD-box RNA helicase 18 (DDX18) Promotes the PRRSV Replication via Interaction with Virus nsp2 and nsp10. *Virus research*, **238**, 204-212

Kantidakis T., Ramsbottom B. A., Birch J. L., Dowding S. N., White R. J. (2010): mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 11823-11828.

Kleeff J., Kornmann M., Sawhney H., Korc M. (2000): Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. *International journal of cancer*, **86**, 399-407.

Kremer L.C., van Dalen E.C., Offringa M., Ottenkamp J., Voûte P.A. (2001): Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: long-term follow-up study. *Journal of clinical oncology*. **19**, 191-196.

Lam Y. W., Trinkle-Mulcahy L. (2015): New insights into nucleolar structure and function. *F1000Prime Reports*, **7**, <https://f1000.com/prime/reports/b/7/48/>

Laplanche M., Sabatini D. M. (2012): mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, **149**, 274-293.

Liang X., Liu Q., Fournier M. J. (2009): Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. *RNA*, **15**, 1716-1728.

Lindstöröm M. S., Jurada D., Bursac S., Orsolich I., Bartek J., Volarevic S. (2018): Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis. *Oncogene*, **37**, 2351-2366.

Linley E., Denyer S.P., McDonnell M., Simons C., Maillard J.Y. (2012): Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **67**, 1589-1596.

Liu L. F., Desai S. D., Li T. K., Mao Y., Sun M., Sim S. P. (2000): Mechanism of action of camptothecin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **922**, 1-10.

Liu Y., Deisenroth Ch., Zhang Y. (2016): RP-MDM2-p53 Pathway: Linking ribosomal biogenesis and tumor surveillance. *Trends in cancer*, **2**, 191-204.

Ma K., Qiu L., Mrasek K., Zhang J., Liehr T., Quintana L.C., Li Z. (2012): Common Fragile Sites: Genomic Hotspots of DNA Damage and Carcinogenesis. *International journal of molecular science*, **13**, 11974-11999.

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

McStay B. (2016): Nucleolar organizer regions: genomic 'dark matter' requiring illumination. *Genes & Development*, **30**, 1598-1610.

Morales J.C., Li L., Fattah F.J., Dong Y., Bey E.A., Patel M., Gao J., Boothman D.A. (2014): Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in cancer and Other Diseases. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, **24**, 15-28.

Mulhern O., Bowie A. G. (2010): Unexpected roles for DEAD-box protein 3 in viral RNA sensing pathways. *European Journal of Immunology*, **40**, 933-935.

Negi S. S., Olson M. O. (2006): Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23. *Journal of cell science*, **119**, 3676-3685.

Nitiss J., Wang J. C. (1988): DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **85**, 7501-7505.

Ogawara Y., Kishishita S., Obata T., Isazawa Y., Suzuki T., Tanaka K., Masuyama N., Gotoh Y. (2002): Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 21843-21850.

Owtrim G. W. (2013): RNA helicases, *RNA biology*, **10**, 96-110.

Ozdian T., Holub D., Maceckova Z., Varanasi L., Rylova G., Rehulka J., Vaclavkova J., Slavik H., Moudry P., Znojek P., Stankova J., de Sanctis J. B., Hajdich M., Dzubak P. (2017): Proteomic profiling reveals DNA damage, nucleolar and ribosomal stress are the main responses to oxaliplatin treatment in cancer cells. *Journal of proteomics*, **162**, 73-85.

Panse V. G., Johnson A. W. (2010): Maturation of Eukaryotic Ribosomes: Acquisition of Functionality. *Trends in biochemical sciences*, **35**, 260-266.

Pederson (2011): The nucleolus. *Cold spring harbor laboratory press*, **9**, <https://cshperspectives.cshlp.org/content/3/3/a000638>

Pelletier J., Thomas G., Volarevic S. (2018): Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nature reviews cancer*, **18**, 51-63.

Peltonen K., Colis L., Liu H., Trivedi R., Moubarek M. S., Moore H. M., Bai B., Rudek M. A., Bieberich Ch. J., Laiho M. (2014):

Perluigi M., Domenico F.D., Blarzino C., Foppoli C., Cini Ch., Giorgi A., Grillo C., Marco F.D., Butterfield D.A., Schininà M.E., Coccia R. (2010): Effects of UVB-induced oxidative stress on protein expression and specific protein oxidation in normal human epithelial keratinocytes: a proteomic approach. *Proteome Science*, **8**, <https://proteomesci.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-5956-8-13>.

Perry R. P., Kelley D. E. (1970): Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *Journal of cellular physiology*, **76**, 127-139.

Pertschy B., Saveanu C., Zisser G., Lebreton A., Tengg M., Jacquier A., Liebinger E., Nobis B., Kappel L., van der Klei I., Högenauer G., Fromont-Racine M., Bergler H. (2007): Cytoplasmic recycling of 60S preribosomal factors depends on the AAA protein Drg1. *Molecular and cellular biology*, **27**, 6581-6592.

Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. (2012): Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signalling. *Cell signal*, **24**, 981-990.

Reid C. R., Hobman T.C. (2017): The nucleolar helicase DDX56 redistributes to West Nile virus assembly sites. *Virology*, **500**, 169-177.

Riggelen J., Yetil A., Felsher D. W. (2010): MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nature reviews cancer*, **10**, 301-309.

Rodríguez-Galán O., García-Gómez J. J., de la Cruz J. (2013): Yeast and human RNA helicases involved in ribosome biogenesis: Current status and perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1829**, 775-7790.

Romero-Perez L., Chen L., Lambertson D., Madura K. (2007): Sts1 can overcome the loss of Rad23 and Rpn10 and represents a novel regulator of the ubiquitin/proteasome pathway. *The journal of biological chemistry*, **282**, 35574-35582.

Santos G.B., Krogh R., Magalhaes L.G., Andricopulo A.D., Pupo M.T., Emery F.S. (2016) Semisynthesis of new aphidicolin derivatives with high activity against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **26**, 1205–1208.

Sarbassov D. D., Quertin Q. A., Ali S. M., Sabatiny D. M. (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, **307**, 1098-1101.

Sessa, C., Zucchetti M., Davoli E., Califano R., Cavalli F., Frustaci S., Gumbrell L., Sulkes A., Winograd B., D'Incalci M. (1991): Phase I and clinical pharmacological evaluation of aphidicolin glycinate. *Journal of the National Cancer Institute*, **83**, 1160–1164.

Schäfer T., Maco B., Petfalski E., Tollervey D., Böttcher B., Aebi U., Hurt E. (2006). Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature*, **441**, 651–655.

Singleton M. R., Dillingham M. S., Wigley D. B. (2007): Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annual Review of Biochemistry*. **76**, 23–50.

Skog S., Tribukait B., Wallström B., Eriksson S. (1987): Hydroxyurea-induced cell death as related to cell cycle in mouse and human T-lymphoma cells. *Cancer research*, **47**, 6490-6493

Sobell H. M. (1985): Actinomycin and DNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **82**, 5328-5331.

Staker B.L., Hjerrild K., Feese M.D., Behnke C.A., Burgin A.B., Stewart L. (2002): The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 15387-15392.

Svoboda E., Bartuška K., Bednařík M., Lepil O., Šíroká M. (2012): *Přehled středoškolské fyziky*. 4. ed. Prometheus, spol s. r. o., ČR, 531 stran.

Thomson E., Ferreira-Cerca S., Hurt E. (2013): Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *Cell science at a glance*, **126**, 4815-4821.

Trotta Ch. R., Lund E., Kahan L., Johnson A. W., Dahlberg J. E. (2003): Coordinated nuclear export of 60S ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates, *The EMBO journal*, **22**, 2841-1851.

Turowski T. W., Tollervey D. (2014): Cotranscriptional events in eukaryotic ribosome synthesis. *Wiley Interdisciplinary Rev RNA*, **6**, 129-139.

Ugrinova I., Monier K., Ivaldi C., Thiry M., Storck S., Mongelard F., Bouvet P. (2007): Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC molecular biology*, **8**, <https://bmcmolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2199-8-66>

Umate P., Tuteja N., Tuteja R., (2011): Genome-wide comprehensive analysis of human helicases. *Communicative & Integrative Biology*, **4**, 118-137.

Vesela E., Chroma K., Turi Z., Mistrik M. (2017): Common Chemical Inductors of Replication Stress: Focus on Cell-Based Studies. *Biomolecules*, **7**, <http://www.mdpi.com/2218-273X/7/1/19>

Wang X., Liu H., Zhao C., Li W., Xu H., Chen Y. (2016): The DEAD-box RNA helicase 51 controls non-small cell lung cancer proliferation by regulating cell cycle progression via multiple pathways. *Scientific reports*, **20**, <https://www.nature.com/articles/srep26108>

Warner J. R. (1999): The economics of ribosome biosynthesis in yeasts. *Trends in biochemical sciences*, **24**, 437-440.

Wei T., Najmi S.M., Liu H., Peltonen K., Kucerova A., Schneider D.A., Laiho M. (2018): Small-molecule targeting of RNA Polymerase I activates a conserved transcription elongation checkpoint. *Cell Reports*, **23**, 404-414.

Wei X., Pacyna-Gengelbach M., Schlüns K., An Q., Gao Y., Cheng S., Petersen I. (2004): Analysis of the RNA helicase A gene in human lung cancer. *Oncology reports*, **11**, 253-258.

Xu X., Xiong X., Sun Y. (2016): The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis and genomic integrity. *Science China*, **59**, 656-672.

Xu Z., Anderson R., Hobman T.C. (2011): The Capsid-Binding Nucleolar Helicase DDX56 Is Important for Infectivity of West Nile Virus. *Journal of virology*, **85**, 5571-5580.

Xu Z., Hobman T. C. (2012): The helicase activity of DDX56 is required for its role in assembly of infectious West Nile virus particles. The helicase activity of DDX56 is required for its role in assembly of infectious West Nile virus particles. *Virology*, **433**, 226-235.

Yasuda-Inoue M., Kuroki M., Ariumi Y. (2013): DDX3 RNA helicase is required for HIV-1 Tat function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **441**, 607-6011.

Zeman M. K., Cimprich K. A. (2014): Causes and Consequences of Replication Stress. *Nature Cell Biology*, **16**, 2-9.

Zemp I., Wild T., O'Donohue M. F., Wandrey F., Widmann B., Gleizes P. E., Kutay U. (2009): Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2. *Journal of cell biology*, **185**, 1167-1180.

Zirwes R.F., Eilbracht J., Kneissel S., Schmid-Zachmann M. S., (2000): A novel helicase-type protein in the nucleolus: Protein NOH61. *Molecular biology of the cell*, **11**, 1153-1167.

Internetové zdroje:

<https://enzyme.expasy.org/>

<https://www.uniprot.org/>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

<https://www.wolframalpha.com/>

7 SEZNAM ZKRATEK

ActD	Aktinomycin D
APH	Afidikolin
APS	Peroxosíran amonný
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BER	Base excision repair
CAD	Karbamoylfostfát syntasa II, aspartát karbamolytransferasa a dihydroorotasa
CFSs	Common fragile sites
CPT	Camptotecin
DFC	Dense fibrillar component
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetyl sulfoxid
DNAPK	DNA-dependent protein kinase
dsRNA	Dvouvláknová RNA (z angl. Double stranded RNA)
DTT	Dithiothreitol
eIF4	Eukaryotický iniciační faktor
FBS	Fetální bovinní sérum
FC	Fibrillar component
GC	Granular component
HIV-1	Human immunodeficiency virus 1
HU	Hydroxyurea
CHX	Cyclohexamide
LSB	Laemmli sample buffer

mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC	Mammalian target of rapamycin complex
NER	Nucleotide excision repair
NES	Nuclear export signal
NOR	Nucleolus organizing region
NPC	Nuclear pore complex
PARPs	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerázová řetězcová reakce
PDCD4	Programmed cell death protein 4
PDK1	Fosfatidylinositol dependentní kinasa
PIK	Fosfatidylinositol-3-kinasy
pre-rRNA	Pre ribosomální RNA
rDNA	ribosomální DNA
RNA pol I	RNA polymerasa
RNP	Ribonukleoprotein
ROS	Reactive oxygen species
RPL	Ribosomální protein 60S podjednotky
RPM	Otáček za minutu (z angl. rounds per minute)
RPS	Ribosomální protein 40S podjednotky
rRNA	Ribosomal RNA
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
siRNA	Small interfering RNA
snoRNA	Small nucleolar RNA
snoRNPS	Small nucleolar ribonucleoproteins
Tat	Transactivator protein
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylenediamine
UBF	Upstream binding factor