

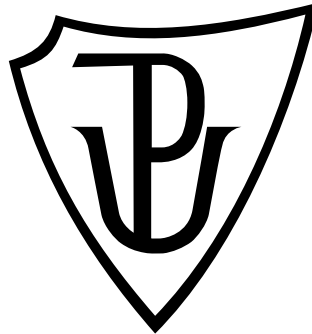
Univerzita Palackého v Olomouci

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Olomouc 2017

Bc. Martin Ondra

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Buněčný model ribozomálního stresu

Diplomová práce

Bc. Martin Ondra

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: Mgr. Zuzana Macečková

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval zcela samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Bc. Martin Ondra

SOUHRN

Diplomová práce se zabývá studiem ribozomálního stresu. V teoretické části diplomové práce jsou shrnuty základní poznatky a informace o jadérku, ribozomální biogenezi, Mdm2, p53 a ribozomálním stresu dependentním a independentním na p53.

V praktické části byly vytvořeny vektory exprimující fúzní nukleolin (NCL) a fibrilarin (FBL) se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) na jejich N-konci. Transfekcí lidských U2OS buněčných linií plazmidy exprimujícími GFP-NCL a následnou selekcí byla vytvořena stabilní buněčná linie s fluorescenčně značeným nukleolinem (U2OS-pEGFP-NCL). Transfekcí U2OS buněčné linie plazmidy exprimujícími GFP-FBL a následnou selekcí byla vytvořena buněčná linie s fluorescenčně značeným fibrilarinem (U2OS-pEGFP-FBL).

Pro validaci FBL a NCL jako možných márků ribozomálního stresu, byla na vytvořené U2OS-pEGFP-FBL a U2OS-pEGFP-NCL buněčné linie aplikována vybraná cytostatika, která narušují ribozomální biogenezi. Po aplikaci cytostatik byla následně provedena double rRNA fluorescenční *in situ* hybridizace na specifické oblasti rRNA. Cisplatina, oxaliplatina a aktinomycin-D způsobily rozpad integrity jadérka a uvolnění FBL a NCL z jadérka do jádra, zatímco 5-fluorouracil neovlivnil integritu jadérka a lokalizaci FBL a NCL. Z výsledků double rRNA FISH bylo patrné, že cisplatin, oxaliplatina a aktinomycin-D zablokovaly transkripci 47S rRNA, ale neblokovaly zpracování pre-rRNA. Aplikace 5-fluorouracilu způsobila zastavení zpracování pre-rRNA, avšak transkripce 47S rRNA nebyla ovlivněna.

Buněčná linie U2OS-pEGFP-NCL byla transfekována siRNA-RPL11 pro umlčení exprese RPL11. Deplece RPL11 nezpůsobila rozpad integrity jadérka a nedošlo ke spuštění p53 dependentního ribozomálního stresu. U buněk transfekovaných siRNA-RPL11 byla identifikována akumulace pre-rRNA prekurzorů.

Kombinace určení lokalizace těchto fluorescenčně značených proteinů s metodou double rRNA FISH pro specifické oblasti na pre-rRNA, se ukázala být vhodným systémem pro identifikaci látek, které mohou způsobovat ribozomální stres.

SUMMARY

The theoretical part of the diploma thesis summarizes information about nucleolus, ribosomal biogenesis, Mdm2 and p53 dependent and independent ribosomal stress.

In the experimental part, vectors expressing nucleolin (NCL) and fibrillarin (FBL) fused with green fluorescent protein at its N-terminus were created. Transfection of human U2OS cells with plasmids expressing GFP-NCL and subsequent selection resulted in a stable fluorescent- labeled nucleoline (U2OS-pEGFP-NCL) cell line. By transfecting the U2OS cell line with plasmids expressing GFP-FBL and subsequent selection, fluorescent-labeled fibrillarin cell line (U2OS-pEGFP-FBL) was created.

For the validation of FBL and NCL as possible markers of ribosomal stress, selected cytostatics known to disturb ribosomal biogenesis have been applied to U2OS-pEGFP-FBL and U2OS-pEGFP-NCL cell lines. Double RNA fluorescent *in situ* hybridization on specific rRNA locus was performed after application of cytostatic. Cisplatin, oxaliplatin and actinomycin-D caused the breakdown of the nucleus integrity and the release of FBL and NCL from the nucleolus to the nucleus, whereas 5-fluorouracil did not affect the integrity of the nucleus and the localization of FBL and NCL. From the results of the double rRNA FISH was evident that cisplatin, oxaliplatin and actinomycin-D blocked transcription of 47S rRNA, but did not block processing of pre-rRNA. Application of 5-fluorouracil caused stopping pre-rRNA processing, but transcription of 47S rRNA was not affected.

The U2OS-pEGFP-NCL cell line was transfected with siRNA-RPL11 to silence expression of RPL11. The RPL11 depletion did not cause the loss of integrity of the nucleus and did not trigger p53 dependent ribosomal stress. Cells transfected with siRNA-RPL11 have been identified to accumulate pre-rRNA precursors.

The combination of localization of these fluorescently labeled proteins with the double rRNA FISH method for pre-rRNA specific regions has proven to be a suitable system for identifying substances that may cause ribosomal stress.

Poděkování:

Na prvním místě bych rád touto cestou poděkoval své vedoucí práce Mgr. Zuzaně Macečkové za odborné vedení diplomové práce, cenné rady, připomínky a čas. Dále bych rád poděkoval své rodině za psychickou i finanční podporu po dobu mého studia.

OBSAH

CÍL PRÁCE.....	8
ÚVOD.....	9
SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	10
1. Jadérko	10
1.1. Struktura	11
1.2. Funkce	16
1.2.1. Ribozomální biogeneze	16
1.2.2. Regulační funkce buněčného cyklu	19
2. p53 a Mdm2	23
3. Ribozomální stres.....	28
3.1. Mechanismus ribozomálního stresu dependentního na p53	29
3.2. Mechanismus ribozomálního stresu independentního na p53	34
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4. Metodika a materiál.....	37
4.1. Příprava plazmidu pEGFP-FBL a pEGFP-NCL	37
4.2. Kultivace buněčných linií a transfekce	42
4.3. Reverzní transkripce a kvantitativní real-time PCR, stanovení exprese RPL11	44
4.4. Aplikace cytostatik na U2OS-pEGFP-FBL a U2OS-pEGFP-NCL buněčné linie.....	45
4.5. Double rRNA FISH U2OS-pEGFP-NCL/FBL cytostatiky ošetřených buněk a U2OS-pEGFP-NCL buněk transfekovaných siRNA-RPL11	46
4.6. Imunofluorescenční značení p53 u U2OS-pEGFP-NCL buněk transfekovaných siRNA-RPL11	46
4.7. Vyhodnocení trvalých preparátů	47
4.8. Biologický materiál	47
4.9. Přístroje	47
4.10. Použité chemikálie	48
4.11. Použité komerční kity.....	48
4.12. Primery, protilátky a siRNA.....	49
5. Výsledky	50

5.1. Příprava plazmidu pEGFP-FBL a pEGFP-NCL	50
5.2. Transfekce U2OS buněk pEGFP-NCL a pEGFP-FBL	53
5.3. Post-transkripční umlčování RPL11	53
5.4. Inhibice transkripce a zpracování rRNA souvisí se ztrátou nukleolární integrity	55
5.5. Transkripční umlčení RPL11 nezpůsobuje rozpad struktury jadérka ani zvýšení hladiny p53	59
6. Diskuze.....	61
ZÁVĚR.....	64
LITERATURA	65
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	79
PŘÍLOHA.....	82

CÍL PRÁCE

Vytvoření selekčního systému pro buňky v ribozomálním stresu a jeho následná validace.

ÚVOD

Jadérko je bez membránové jaderné tělísko, které je vystavěno okolo chromozomálních oblastí obsahujících tzv. organizátory jadérka (NOR). Probíhá zde transkripce ribozomální DNA (rDNA) a biogeneze ribozomů (Busch *et Smetana* 1970; Scheer *et Hock* 1999, Olson *et al.*, 2000). Ribozomální biogeneze je proces velmi citlivý na různé poruchy v buněčném metabolismu. Chyba nebo poškození jakéhokoliv kroku ribozomální biogeneze způsobené jak endogenním nebo exogenním stimulem, způsobuje ribozomální stres (Dai *et al.*, 2006).

Kromě své primární funkce při biosyntéze ribozomů, právě jadérko působí jako senzor ribozomálního stresu (Olson, 2004). Při nesprávném sestavování nebo funkci ribozomů se volné ribozomální proteiny dostávají z jadérka do nukleoplazmy, kde hrají klíčovou roli při zastavení buněčného růstu a dělení (Zhang *et Lu*, 2009). Ribozomální stres může vést k zastavení buněčného cyklu nebo k apoptóze nejen za pomoci aktivace p53, ale také pomocí dalších mechanismů nezávislých na p53 (James *et al.*, 2014).

Fibrilarin (FBL) a nukleolin (NCL) jsou proteiny, které jsou za běžných podmínek přítomny v jadérku a zpracovávají pre-RNA, která je následně zabudována do struktury ribozomálních podjednotek. Lokalizace a akumulace těchto proteinů v jádře, nikoliv v jadérku, naznačuje rozpadu integrity jadérka (Olson *et al.*, 2000, Ochs *et al.*, 1985).

SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1. Jadérko

Interfázní jádro buňky se skládá z morfologicky a funkčně odlišných částí, kterými jsou chromatinové domény a jaderná tělíska. Chromatinové domény jsou tvořeny převážně chromatinem, zatímco jaderná tělíska tvoří z většiny proteiny. Jaderná tělíska se vytvářejí na konci mitózy, respektive na konci jednoho buněčného cyklu, a jsou udržována až do začátku příští mitózy. Během interfáze mohou být jejich jednotlivé komponenty vzájemně vyměňovány. Největším a nejvýznamnějším jaderným tělískem je jadérko, přítomné u všech eukaryotických buněk. (Matera *et al.*, 2009; Lanctot *et al.*, 2007).

Aktivně rostoucí a dělící se buňky vyžadují ke svému životu velké množství proteinů. K zajištění permanentního přísunu proteinů je potřeba neustále produkovat a doplňovat ribozomy. Jadérko, jehož primární funkcí je právě syntéza ribozomální RNA a následné skládání ribozomálních podjednotek, dodává ribozomy pro zajištění takovýchto požadavků buňky. K samotnému objevení jadérka došlo oficiálně v letech 1835 až 1839, ale odpovědnost jadérka za tvorbu a sestavení ribozomů byla prokázána až v roce 1960 (Busch *et Smetana*, 1970; Pederson, 2011). Mimo to u jadérka byly zjištěny i další funkce nesouvisející přímo se vznikem ribozomů. Mezi takové funkce můžeme zařadit například regulaci mitózy, buněčného cyklu, proliferace, senescence nebo dokonce reakce na stresové podněty (Raška *et al.*, 2006; Andersen *et al.*, 2005). U proliferujících buněk je jadérko metabolicky nejaktivnější organela. Obsahuje desítky až stovky aktivních ribozomálních genů, které produkují více než 80 % celkové buněčné RNA (Moss *et Stefanovsky*, 2002).

1.1. Struktura

Stejně jako většina jaderných tělísek ani jadérko není ohraničeno membránou. Nemá povahu statické struktury, protože neustále dochází k výměně jednotlivých komponent mezi jadérkem a okolní nukleoplazmou (Phair *et* Misteli, 2000). Doba setrvání většiny nukleolárních proteinů v jadérku se pohybuje v řádu desítek sekund. Ve skutečnosti je tedy struktura jadérka dána součtem molekul vstupujících a opouštějících určený subjaderný prostor. Celková organizace se řídí dobou setrvání jednotlivých molekul v jadérku. Doba setrvání je určena vzájemnými interakcemi mezi molekulami v jadérku. Což znamená, čím je afinita mezi jednotlivými nukleolárními složkami vyšší, tím delší je doba zdržení v jadérku. Ribozomální proteiny se zdržují v jadérku nejdéle, protože mají vysokou afinitu k ostatním složkám pre-ribozomálních částic a dochází díky této afinitě ke skládání pre-ribozomálních částic (Chen *et* Huang, 2001; Dundr *et al.*, 2000).

V podstatě má jadérko vlastnost samouspořádávání. Struktura jadérka závisí jak na jeho funkčnosti vytvářet ribozomy, tak i na existenci organizačních center. V oblasti zvané organizátor jadérka (NOR) se nachází mnohočetné kopie rDNA v tandemových repetících. Transkripcí rDNA vzniká pre-rRNA, která není pouze materiálem pro vznik ribozomů, ale zároveň tvoří kostru denzního fibrilárního komponentu (DFC) a posléze granulárního komponentu (GC). Právě z tohoto důvodu je jadérko vystavěno okolo NOR. Počet NOR v jedné buňce se liší v závislosti na druhu organismu a pohybuje se v rozmezí od jednoho NOR u haploidních kvasinkových buněk, až po 10 u lidských somatických buněk (Roussel *et al.*, 1996). V lidských somatických buňkách se NOR nachází na krátkých ramenech akrocentrických chromozomů 13, 14, 15, 21 a 22. Při specifickém barvení mitotických chromozomů stříbrem (pomocí AgNO₃-dusičnanu stříbrného), můžeme tuto oblast pozorovat jako sekundární zúžení na konci chromozomů, tzv. sekundární konstrikci. Barvení NOR je možné díky nepřetržité asociaci NOR s malou podskupinou argyrofilních proteinů, které jsou součástí transkripčního aparátu rDNA (Caburet *et al.*, 2005).

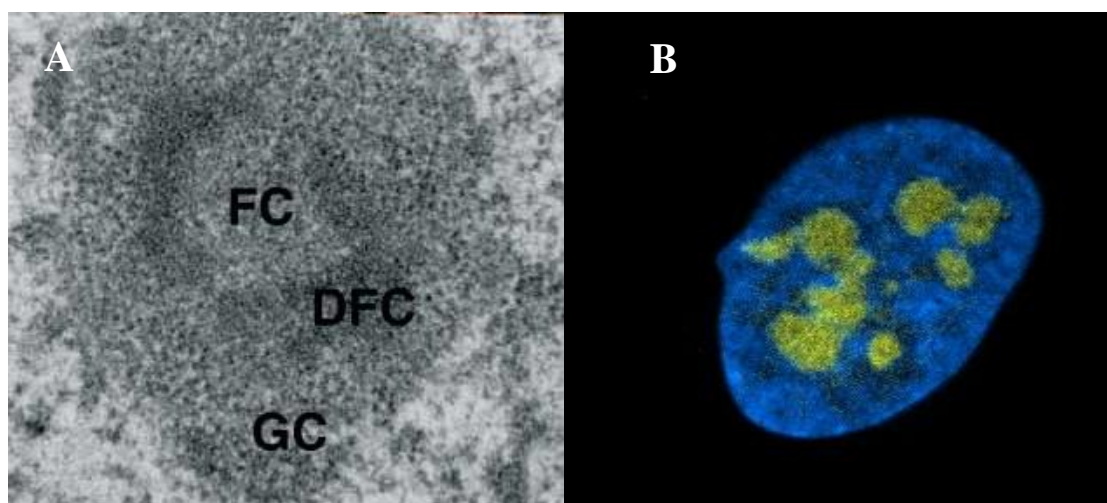
K pozorování jadérek v interfázním jádře se používá mikroskopie s fázovým kontrastem. Díky použití imunoznačení a konfokální mikroskopie můžeme detailněji jadérko rozčlenit na několik odlišných domén, avšak jednotlivé funkce domén zůstávají do značné míry neznámé (Phair *et* Misteli, 2000). Výskyt, tvar a počet jadérek závisí na typu buněk, fázi buněčného cyklu a dokonce na fyziologickém stavu jednotlivých buněk. U dělících se buněk

dochází ke zvětšení objemu jadérek mezi G1 a G2 fází buněčného cyklu, ale celkový počet fibrilárních center se zdvojnásobí až v G2 fázi (Junera *et al.*, 1995). Naopak u buněk v terminálním stádiu diferenciaci, kdy dochází k zastavení biogeneze ribozomů, vznikají malá prstencovitá jadérka nebo nukleolární pozůstatky na místě původních jadérek. Typickým příkladem terminálně diferenciovaných buněk jsou erytrocyt a lymfocyty (Hernandez-Verdun *et al.*, 2010). Prstencovitá jadérka jsou tvořena jednou zřetelnou oblastí obsahující chromatin a zbytky denzního fibrilárního komponentu na periferii (Laval *et al.*, 1981). U jadérek erytrocytů nebyla nalezena aktivní RNA polymeráza I, ale byla zjištěna přítomnost modifikované formy upstream binding faktoru (UBF), stejně jako přítomnost fibrilarinu, nukleolinu, nukleofosminu (NPM/B23), U3 a U8 malých nukleolárních RNA (snoRNAs) a částečně zpracované pre-rRNA. Fúzí erytrocytů s dělicími se buňkami dochází k reaktivaci biogeneze ribozomů a ke znovuoobnovení typické organizace jadérka (FC, DF, GC) z nukleolárních pozůstatků. Jedná se o nejdynamičtější buněčnou organelu přítomnou u všech eukaryotických buněk (Verheggen *et al.*, 2001; Hernandez-Verdun *et Bouteille*, 1979).

Obecně je známo, že u eukaryotických buněk se vyskytují jadérka tvořena ze tří základních morfologicky odlišných kompartmentů, nicméně toto tvrzení neplatí u všech eukaryot (Thiry *et Lafontaine*, 2005). U eukaryotických buněk se vyskytují dva typy jadérek. Jedním typem jsou jadérka u amniot, která se právě skládají ze tří hlavních kompartmentů. U všech ostatních eukaryot jako např. u hmyzu, obojživelníků, rostlin jsou jadérka rozčleněná pouze na dva morfologické kompartmenty (Lamaye *et al.*, 2011). V průběhu evoluce došlo ke vzniku tří-kompartimentového jadérka. Předpokládá se, že za přechod ze dvou na tři kompartmenty je zodpovědné podstatné zvětšení velikosti intergenového spaceru v rDNA. U druhů s trojdílným jadérkem je intergenový spacer vždy mnohem větší než transkribovaná sekvence. Výjimkou u amniot je třída plazů, ve které můžeme nalézt živočichy, kteří mají buňky s jadérky morfologicky rozlišenými pouze na dva kompartmenty. Třída plazů je považována za přechodný článek mezi dvou a tří kompartmentovým jadérkem (Thiry *et Lafontaine*, 2005). Dále se budeme zabývat pouze strukturou jadérka tvořeného ze tří kompartmentů.

Jadérko u lidí se skládá ze tří strukturních a funkčních komponent: fibrilárních center (FC), denzního fibrilárního komponentu (DFC) a granulárního komponentu (GC) viz obrázek č. 1 A a B (Busch *et Smetana*, 1970). FC mají kruhové struktury proměnlivé velikosti složené

z jemných fibril o velikosti 50Å v průměr a jsou obklopeny DFC. FC a DFC se společně nacházejí uvnitř GC, který se skládá převážně z granul v průměru o velikosti 15 - 20 nm. (Thiry *et al.*, 2000). Transkripčně aktivní ribozomální geny se nacházejí uvnitř fibrilárních center (Derenzini *et al.*, 2006). Každý ribozomální gen se skládá z transkribované sekvence, intergenového spaceru a je ohraničen sekvencí promotoru a terminátoru. (Dimario, 2004; Olson *et Dunder*, 2005). Transkripce rDNA probíhá uvnitř FC i na rozhraní FC a DFC a vzniká 47S pre-rRNA. Z tohoto důvodu FC a DFC lze považovat za funkční jednotky jádérka produkující rRNA molekuly, které se následně hromadí v GC, kde jsou podrobeny zráním a dále jsou zabudovávány do ribozomálních podjednotek společně s ribozomálními proteiny. Lidské jádérko je navíc obklopeno kondenzovaným chromatinem (CH), který občas proniká hluboko až do FC. Tyto invaginace CH jsou často nazývány jako "nukleolární mezery" (Scheer *et al.*, 1993).



Obrázek č. 1: Lidského jádérko: A) struktura zobrazena elektronovým mikroskopem (převzato a upraveno podle Hernandez-Verdun *et al.*, 2010); B) zobrazeno konfokálním mikroskopem (modrá barva – jádro značeno barvivem Hoeschst 33342, žlutá – fibrilarin značený YFP)

Kromě odlišných morfologických vlastností se komponenty jádérka (FC, DFC, GC) vyznačují také odlišným biochemickým složením. FC obsahují rDNA připravenou k transkripci, vznikající pre-RNA, transkripční faktory, RNA polymerázu I, upstream vazebné faktory a DNA topoizomerázu (Derenzini *et Ploton*, 1991; Derenzini *et Trere*, 2001). V DFC probíhají reakce zpracovávající a modifikující pre-RNA, tudíž se zde nacházejí enzymy jako

např. fibrilarin, který je hlavní součástí malých nukleolárních ribonukleoproteinových částic (snoRNPs) zapojených do RNA modifikací. FC a DFC, na rozdíl od GC, jsou citlivá na stříbro. Detekce pomocí AgNO_3 se často používá při diagnostice tvaru, počtu a velikosti jadérek (Lafontaine *et* Tollervey, 1998). Více než 75 % hmoty jadérka u aktivně dělících se buněk zabírá GC, ve kterém jsou sestavovány a zrají pre-ribozomy. Nukleární mezery jsou morfologicky dosti podobné nukleoplazmě. Obsahují DNA včetně inaktivované rDNA, chybí zde transkripční faktory a proteiny citlivé na stříbro (Thiry *et* Lafontaine, 2005).

K nejrazantnější a nejdynamičtější změně struktury jadérka dochází během mitózy, kdy je jadérko rozloženo a transkripce rDNA zastavena. Na začátku profáze dochází k rapidnímu zvýšení koncentrace cyklinu B1 a cyklin dependentní kinázy 2 (Cdk2), což má za následek fosforylaci důležitých nukleolárních transkripčních faktorů (Dimario, 2004; Heix *et al.*, 1998). Hyperfosforylace složek iniciačního komplexu RNA polymerázy I (RNA Pol I) může být považována za spouštěč rozpadu jadérka v mitóze. Jako první dochází k oddělení podjednotky RNA Pol I RPA39 z FC před rozpadem jaderného obalu (Leung *et al.*, 2004). Některé další podjednotky RNA Pol I jako RPA16, RPA20 a RPA194, včetně dříve zmíněné RPA39, se přechodně oddělí od NOR v průběhu metafáze a znovu asociují v anafázi, zatímco jiné rRNA transkripční faktory, jako například upstream vazebný faktor, zůstává spojen s NOR po celou dobu mitózy (Dundr *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2004). Zbytek transkripčního aparátu RNA pol I zůstává po celou dobu mitózy připojený k rDNA v aktivním NOR (Roussel *et al.*, 1996). Na rozdíl od rDNA transkripčního aparátu, rRNA zpracovávající aparát nezůstává připojen k NOR během mitózy, na místo toho je redistribuován do cytoplazmy společně s pre-RNA již během profáze. Mezi zajímavé skutečnosti patří časová korelace mezi disociací fibrilarinu z DFC a rozpadem jaderného obalu. Předpokládá se, že tyto události mohou být spouštěny podobným mechanismem (Leung *et al.*, 2004). Ne úplně všechny oddělené komponenty jadérka jsou během mitózy redistribuovány do cytoplazmy. Některé z těchto komponent jako například ribonukleoproteiny, malé nukleolární RNA (snoRNA), pre-RNA, fibrilarin společně s komponenty ne-nukleolárního původu, jako například fosforylovaný nukleoplasmin, se vážou na povrch kondenzovaných chromosomů a vytváří vrstvu nepravidelné tloušťky tzv. perichomozomální oblast (PR). Tato vrstva pokrývá celé chromozomy vyjma centromer. Přesná role PR zůstává neznámá, ale bylo navrženo několik funkcí PR: ochrana a oddělení samotných chromosomů od cytoplazmy, vazebné místo pro

transportní proteiny a rovnoměrné rozdělení komponentů jadérka mezi vznikající dceřiné buňky (Dimario, 2004; Gautier *et al.*, 1992). Komponenty rRNA zpracovávajícího aparátu, které nejsou součástí PR, se soustřeďují v cytoplazmě do nucleolar-derived foci (NDF). NDF je vysoce mobilní struktura o průměru 0,1 - 0,3 μm . V buňce během mitózy se vyskytuje přibližně 100 NDF (Dundr *et al.*, 1996). Na rozhraní anafáze a telofáze dochází k poklesu hladiny cylinu B1 a Cdk1, což má za následek reaktivaci rDNA transkripce (Sirri *et al.*, 2000). Během samotné telofáze dochází k disociaci NDF a znovuoobnovení jaderného obalu (Dundr *et al.*, 2000). Komponenty rRNA zpracovávajícího aparátu přecházejí z NDF do jádra přes nově vzniklý jaderný obal, ale nejsou transportovány rovnou do vznikajícího jadérka. Nejprve se stávají součástí pre-nukleolárních částic (PNB), které se imobilizované nacházejí na povrchu chromozomů (Savino *et al.*, 2001). PNB se nacházejí jak u rostlinných, tak i u živočišných buněk a fungují jako tranzitní místa rRNA zpracovávajících faktorů (Dimario, 2004; Hernandez-Verdun, 2006). V průběhu dekondezace chromozomů se imobilizované PNB přibližují k jadérku a při určité vzdálenosti postupně dodávají svůj obsah jadérku pomocí "můstků", které jsou tvořeny tenkými vlákny. Komponenty pro zpracování pre-rRNA jsou do jadérka následně propuštěny v určeném pořadí (Dundr *et al.*, 2000, Savino *et al.*, 2001).

Jadérka procházejí rozložením a složením pokaždé, když buňky podstupují mitózu. Jedná se o komplexní a vysoce regulovaný sled akcí a na sebe navazujících drah, které stále ještě nejsou plně objasněny. Zdá se, že rDNA-transkripční a rRNA-zpracovávající aparát může být regulován nezávisle na sobě v průběhu buněčného cyklu. Například, inhibice cyklin B1-Cdk1 dráhy *in vivo* vede k opětovnému zahájení transkripce rDNA, ale nedochází k obnovení zpracování pre-rRNA (Sirri *et al.*, 2002).

1.2. Funkce

Nejnovější proteomické studie za použití hmotností spektrometrie odhalily skutečnost, že nukleolární proteom obsahuje daleko více proteinů, než se v minulosti předpokládalo. Tyto studie identifikovaly v izolovaných jadérkách více než 200 proteinů u rostlin a více než 700 proteinů u lidských buněk. Nukleolární proteom je v rámci evoluce velmi konzervativní. Při porovnání lidského nukleolárního proteomu a nukleolárního proteomu kvasinek, bylo nalezeno přibližně 90 % homologů lidských proteinů u kvasinek. Z celkového množství proteinů nacházejících se v jadérku, má přibližně 30 % funkci související s výrobou ribozomálních podjednotek. Funkce ostatních nukleolárních proteinů je v souladu s dalšími procesy, které se vyskytují v jadérku (Andersen *et al.*, 2005). Unikátnost jadérka spočívá ve faktu, že objevování jeho všech funkcí trvá mnohem déle, než tomu bylo u většiny ostatních složek buněk. V průběhu času došlo k postupnému odhalení, že jadérko není pouze místo biogeneze ribozomů. Probíhá zde například biosyntéza SRP (signal recognition particle) a mnoho forem reakcí na stresové podněty. Slouží také jako regulační centrum proliferace a mediátorů ovlivňujících progresi buněčného cyklu a je místem četného transportu mRNA a mikroRNA. Jadérko je daleko dynamičtější jaderným tělískem a plní více funkcí, než se dříve předpokládalo (Boisvert *et al.*, 2007).

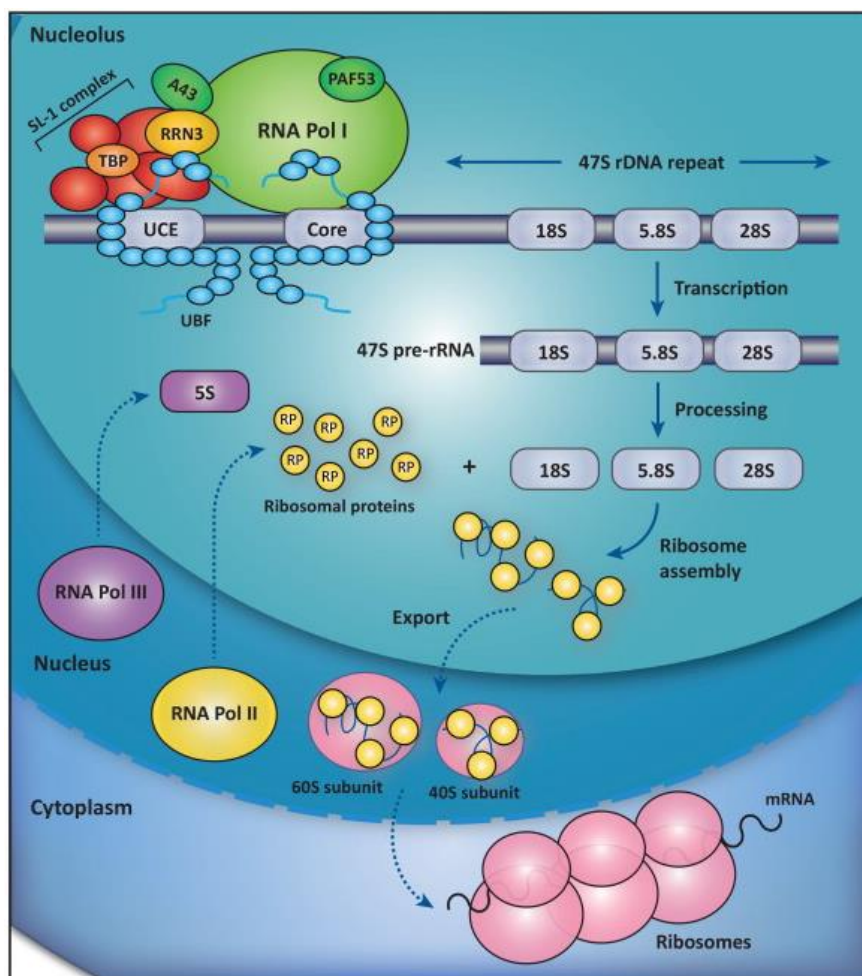
1.2.1. Ribozomální biogeneze

Správná koordinace růstu a proliferace je velmi důležitá pro každou dělící se buňku (Jin *et al.*, 2004). Ribozomální biogeneze patří mezi energeticky nejnáročnější procesy. Správné sestavení ribozomů je klíčovým aspektem buněčné homeostázy (Morgado-Palacin *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2004). Jedná se o velmi konzervativní děj u všech eukaryotických organismů. Produkce ribozomů je velmi dynamický a koordinovaný několikastupňový proces, který vyžaduje syntézu, zpracování, modifikaci pre-rRNA a následnou kompletaci rRNA s ribozomálními proteiny. Sestavení ribozomů napomáhá velké množství non-ribozomálních faktorů, které zajišťují správnost tohoto procesu. Většinou jde o enzymy potřebující ke své funkci energii ve formě ATP nebo GTP, jako např. ATP-dependentní RNA helikázy, GTPázy a kinázy (Kressler *et al.*, 2010). Jak již bylo naznačeno dříve, tvar, velikost a struktura jadérka přímo souvisí s jeho funkcí produkovat ribozomy (Hadjiolov, 1985). Struktura a funkce

samotných ribozomů je dobře známá, avšak úplná znalost upravování a zrání jednotlivých podjednotek ribozomů se teprve postupně rozvíjí (Tschochner *et* Hurt, 2003).

Eukaryontní ribozom se skládá ze dvou podjednotek tvořených 79 ribozomální proteiny (78 proteinů u kvasinek) a čtyřmi odlišnými rRNA (Klinge *et al.*, 2012). Malou podjednotku 40S ribozomu tvoří 18S rRNA společně s 33 ribozomálními proteiny (RPs), zatímco velká podjednotka 60S obsahuje 5S, 5.8S a 28S (25S u kvasinek) rRNA spojenou s 46 RPs (Tschochner *et* Hurt, 2003). Biogeneze eukaryotických ribozomů závisí na koordinované činnosti všech tří RNA polymeráz (I, II a III) (Kressler *et al.*, 1999). Tento proces začíná v jadérku, kde tři ze čtyř rRNA (18S, 5.8S a 25S/28S rRNA) jsou vytvořeny RNA polymerázou I jako dlouhý primární transkript z tandemových repetací rDNA (Worton *et al.*, 1988). RNA polymeráza II přepisuje mRNA pro vznik ribozomálních proteinů a RNA polymeráza III syntetizuje 5S rRNA (Kressler *et al.*, 1999). U všech eukaryot kromě kvasinek vzniká transkripcí rDNA polycistronní 47S rRNA. U kvasinek vzniká 35S rRNA (Fatica *et* Tollervey, 2002). Pouze u kvasinek rDNA také kóduje 5S rRNA, která je ovšem transkribována v opačném směru (Fedoriw *et al.*, 2012). Vznikající primární transkripty polymerázy I se post-transkripčně asociují s vybranými ribozomálními proteiny (RP), řadou pre-ribozomálních faktorů a malými nukleolárními ribonukleoproteinovými částicemi, kdy společně vytváří velké ribonukleoproteinové částice (RNPs), ve kterých probíhá pre-rRNA skládání, modifikace, štěpení a asociace s dalšími RPs (Tschochner *et* Hurt, 2003). Před štěpením prekurzorového transkriptu 47S na 28S, 18S a 5.8S rRNA jsou jednotlivé rRNA od sebe odděleny vnitřními transkribovanými spacery 1 (ITS1) a 2 (ITS2) a na koncích obklopeny 5' a 3' vnějšími transkribovanými spacery (5'-ETS a 3'-ETS) (Kent *et al.*, 2009). Transkribované spacery jsou odstraněny pomocí složité řady endonukleotických a exonukleolytických štěpení. Proces maturace malé a velké ribozomální podjednotky se rozchází po štěpení v ITS1 (Fatica *et* Tollervey, 2002; Hernandez-Verdun *et al.*, 2010). Zrání pre-rRNA začíná vyštěpením 18S rRNA z prekurzorového transkriptu 35S/47S, které probíhá odštěpením 5'-ETS a štěpení v ITS1. Načasování odstranění 5'-ETS vzhledem k ITS1 štěpení v primárním transkriptu se liší mezi organismy a dokonce se může lišit u mnohobuněčných organismů od jednoho buněčného typu ke druhému. Předpokládá se, že odlišné štěpení pre-rRNA představuje potenciální zdroj strukturní a funkční heterogenity mezi ribozomy, ovšem tento předpoklad vyžaduje další experimentální výzkum. Tyto alternativní dráhy úprav

a štěpení pre-rRNA mohou také přispívat k robustnosti procesu zrání a její regulace (Gerbi *et al.* Borovjagin, 2004). Na obrázku č. 2 je zjednodušeně zobrazena výše popsaná ribozomální biogeneze a její jednotlivé kroky.



Obrázek č. 2: Přehled ribozomální biogeneze (převzato z Hein *et al.*, 2013)

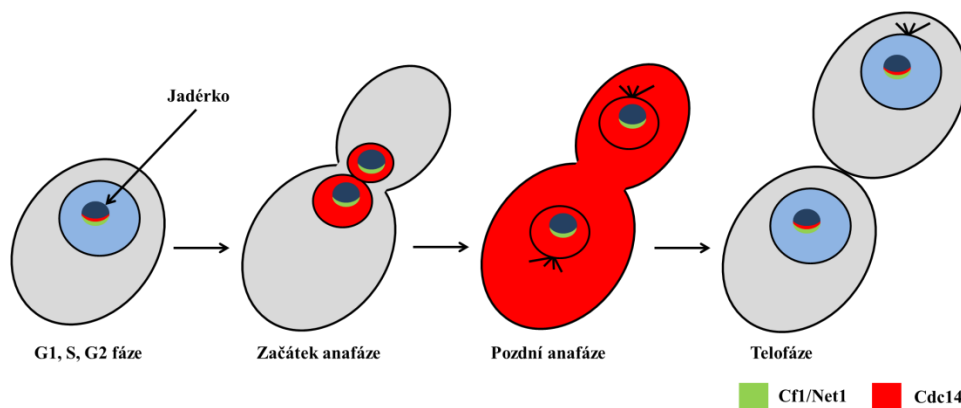
U kvasinek, jako jediných eukaryot, probíhá zpracování pre-rRNA, vzhledem k transkripci 35S rRNA, ko-transkripčně. Neúplný transkript je již v průběhu transkripce upravován ze svého 5' konce. Tento způsob zpracování pre-RNA bývá označován jako „Christmas tree“, protože vznikají transkripty variabilních délek úměrné jejich vzdálenost od promotorové oblasti, s koncovými globulárními strukturami na svém 5' konci (Mougey *et al.*, 1993). Tyto struktury na 5' konci jsou tvořeny procesomem malé ribozomální podjednotky, který se podílí na počátečních krocích zrání malé ribozomální podjednotky (Phipps *et al.*,

2011; Osheim *et al.*, 2004). Jakmile DNA polymeráza dosáhne 5' konec sekvence DNA kódující 25S RNA, dochází ke zmizení 2/3 terminálních struktur a prekurzor malé podjednotky je exonukleázou uvolněn z neúplného prekurzorového transkriptu (Milkereit *et al.*, 2001; Osheim *et al.*, 2004). Hlavní část maturace pre-ribosomálních jednotek probíhá už v jadérku, ale další maturace pokračuje v nukleoplasmě. Zrající pre-60S částice tvoří tzv. granulární složku jadérka, viditelnou pod elektronovým mikroskopem, zatímco pre-40S částice jsou mnohem rychleji exportovány do nukleoplazmy (Hernandez-Verdun *et al.*, 2010). Před exportem do cytoplazmy jsou podjednotky sestaveny interakcí s dalšími ribosomálními proteiny. V cytoplasmě pak probíhá finální zpracování a vznikají zde zralé ribosomální podjednotky (Tschochner *et Hurt*, 2003).

1.2.2. Regulační funkce buněčného cyklu

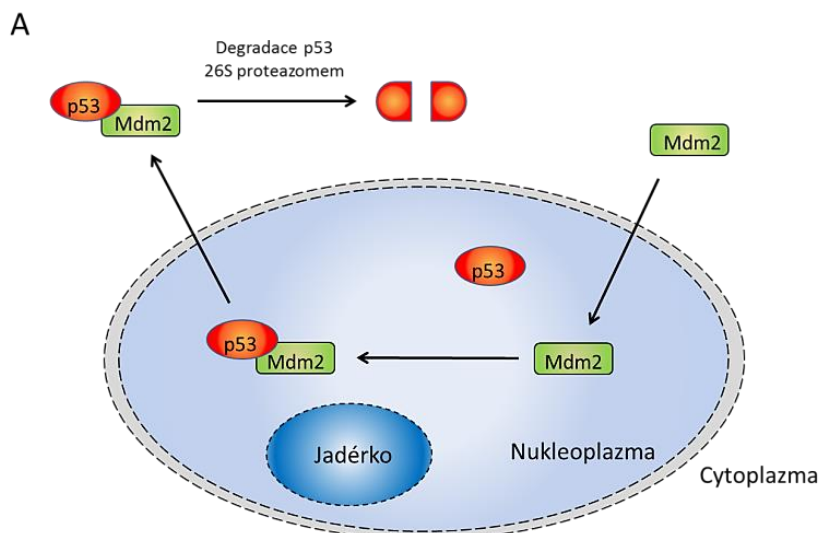
Buněčný cyklus eukaryotických buněk je nevratný, přesně načasovaný sled událostí. Rozdělujeme ho na G1, S, G2 a M fázi. Během S fáze je genetický materiál zdvojnásoben a v M fázi rozdělen rovnoměrně mezi dvě dceřiné buňky za pomoci mitózy. Buňka může následně po mitóze vstoupit znovu do G1 fáze nebo do klidové fáze G0 (Elledge, 1996). Jako mechanismy dohledu slouží kontrolní body, které zajišťují správnost chodu a zabraňují buňkám, u kterých se vyskytují defekty, postupovat dále v buněčném cyklu. Kontrolní body reagují na intracelulární stres, jako je například poškození DNA nebo mitotického vřeténka, zastavením progresu buněčného cyklu, dokud není opraveno poškození, nebo dokážou dokonce indukovat apoptózu. Mezi klíčové regulátory buněčného cyklu, které podporují přechody kontrolních bodů v buněčném cyklu, patří cyklindependentní kinázy (Cdk) a ubikvitin-dependentní degradace. Cdk se asociují s různými druhy cyklinů a spouští vstup do buněčného cyklu, S fáze a mitózy (Morgan, 1997). Specializovaná ubikvitin-dependentní proteolýza reguluje vstup do buněčného cyklu, ale odlišným mechanismem, degradací inhibitorů Cdk (Skowrya *et al.*, 1997). Proteiny zapojené do regulace buněčného cyklu mohou být jadérkem „uvězněny“. Takto uvězněné proteiny pak nemohou plnit svou funkci v jiných oblastech buňky. Tři regulátory buněčného cyklu podléhají nukleolárnímu uvěznění a jejich činnost je regulována tímto způsobem. Jedná se o Cdk14, Mdm2 a Pch2 (Visintin *et Amom*, 2000).

Výstup z mitózy a její ukončení je u buněk ovlivňováno Cdk14 (Visintin *et al.*, 1998). V průběhu G1, S, G2 fáze a metafáze je Cdk14 zadržována v jadérku v neaktivním stavu až do nástupu anafáze, čímž se zabrání předčasnému mitotickému výstupu. Lokalizace Cdk14 v průběhu BC je znázorněna na obrázku č. 3. Za zadržení Cdk14 v jadérku je zodpovědný nukleolární protein Cfi1/Net1 (Shou *et al.*, 1999; Straight *et al.*, 1999; Visintin *et al.*, 1999). Cfi1/Net1 se přímo váže na rDNA a následně na sebe ukotvuje řadu proteinu, mezi které patří Cdk14. Přesné oblasti Cdk14 a Cfi1/Net1 zodpovědné za společnou vazbu a nukleolární lokalizaci nejsou zatím známy (Straight *et al.*, 1999). Při anafázi dochází nejprve k uvolnění Cdk14 z jadérka do jádra a následně i do cytoplazmy, kde způsobuje inaktivaci mitotických kináz, které podporují vstup buňky do mitózy a její průběh (Shou *et al.*, 1999). Cdk14 defosforyluje Cdh1/Hct1, čímž indukuje jejich degradaci a tím i inaktivaci mitotických kináz. Dále také podporuje akumulaci inhibitoru mitotických kináz Sic1, čímž zajišťuje úplnou inaktivaci mitotických kinázy na konci mitózy (Visintin *et al.*, 1998).



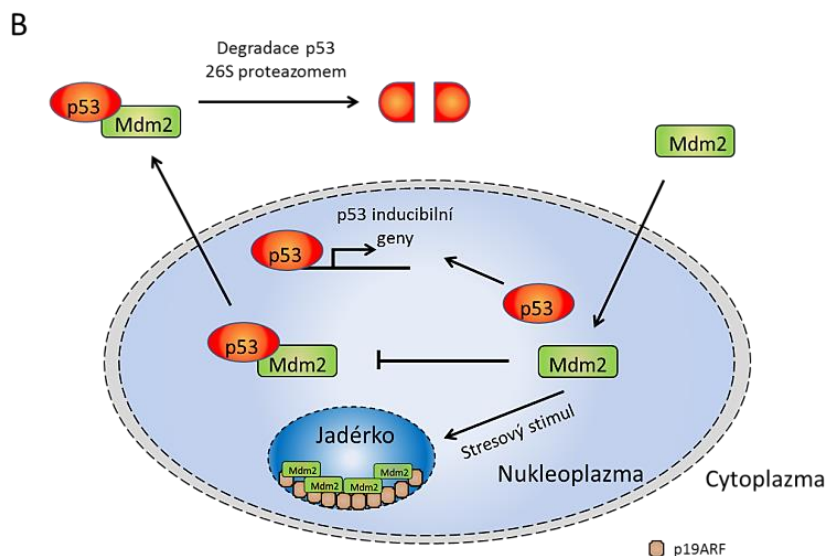
Obrázek č. 3: Lokalizace Cdk14 v průběhu buněčného cyklu (převzato a upraveno podle Visintin *et Amon*, 2000)

Mdm2 (mouse double minute 2) protein (lidský homolog Hdm2) je produktem p53-dependentního genu a má klíčovou úlohu v regulaci hladiny a aktivity p53, jako transkripčního faktoru viz obrázek č. 4A (Momand *et al.*, 1992). Nádorový supresor p53 funguje jako senzor poškození DNA a buněčného stresu. Jeho základní funkcí je udržovat genomovou stabilitu prostřednictvím kontroly a regulace progresu buněčného cyklu, nebo apoptózy (Shaulsky *et al.*, 1990). Detailnější popis jejich vzájemné vazby, funkcí a regulace je popsán v následující kapitole.



Obrázek č. 4A: Vazba Mdm2 na p53 a následná degradace p53 proteazomem

Onkogenní signály nebo virové infekce vedou ke zvýšení exprese proteinu p19Arf (Hdm2 a p14Arf u lidí), který se váže ke Mdm2. Vzhledem k tomu, že p53 a Mdm2 jsou primárně proteiny vyskytující se v nukleoplazmě a p19Arf se nachází uvnitř jádérka, dochází k fyzické separaci Mdm2 a p53 do různých subcelulárních kompartmentů viz obrázek č. 4B (Prives, 1998; Weber *et al.*, 1999; Lohrum *et al.*, 2000). Zároveň při navázání Mdm2 na p19Arf dochází k inhibici ubikvitinační funkce Mdm2 a stabilizaci p53 (Midgley *et al.*, 2000). Lidský a myší Arf jsou velmi zásadité proteiny (~20 % zbytků Arg). Na jejich N-konci se nachází nukleolární lokalizační signál (NoLS). Poté co se na p19Arf naváže Mdm2, stává se NoLS Arf maskovaným. Na druhou stranu vytvoření komplexu p19Arf-Mdm2 vede k expozici kryptických NoLS Mdm2. V důsledku toho, komplex p19Arf-Mdm2 zůstává lokalizován v jádru (Weber *et al.*, 1999; Lohrum *et al.*, 2000). Jak již bylo zmíněno, p19Arf je nukleolární protein, u kterého se předpokládá, že dokáže regulovat ribozomální biogenezi zpomalením zpracování časných 47S a 32S rRNA prekurzorů, pravděpodobně skrze interakci s proteinem NPM/B23 (Bertwistle *et al.*, 2004).



Obrázek č. 4B: Stabilizace p53 a lokalizace Mdm2-p19Arf v jadérku

Během meiózy je jedním z klíčových kroků párování homologních chromozomů a následná homologní rekombinace. Defekty vzniklé při rekombinaci nebo vzniku synaptonemálního komplexu vedou k zastavení meiózy díky aktivaci meiotického kontrolního bodu v pachytene (Lydall *et al.*, 1996; Mckee *et Kleckner*, 1997). Pch2 (pachytene checkpoint protein) u kvasinek je součástí meiotického kontrolního bodu, který zabraňuje progresi meiózy. Jedná se o protein specifický pro meiózu a jeho produkce začíná před vstupem buňky do první části meiózy (Mitchell, 1994; San-Segundo *et Poeder*, 1999). Během pachytene, jakmile jsou chromozomy zcela kondenzovány a homologně spárovány, se většina Pch2 nachází v jadérku, kde potlačuje synapse a interhomologní rekombinace ribozomální DNA. Malá část Pch2 se vyskytuje ve přerušovaném vzoru podél synapsí chromozomů (San-Segundo *et Poeder*, 1999). Jak přesně Pch2 lokalizovaný v jadérku inhibuje progresi meiózy při poruše synapsí nebo chybné rekombinaci chromozomů zůstává v současné době nejasné. Předpokládá se, že při nesprávném průběhu meiózy dochází k uvolnění a akumulaci proteinu Pch2, který je při správném průběhu meiózy lokalizován podél správně spárovaných homologů. Tento Pch2 je rozpoznán v jadérku jako "ne-nukleolární" Pch2, což má za následek aktivaci kontrolního bodu v pachytene a zastavení meiózy (Visintin *et Amon*, 2000).

2. p53 a Mdm2

TP53 je tumor supresorový gen kódující protein p53, který přenáší signály vyplývající z různých forem buněčného stresu, včetně poškození DNA, hypoxie, nukleotidové deprivace onkogenetickými signálů (nadměrná exprese buněčných onkogenů), na geny a faktory, které indukují zastavení buněčného cyklu, senescenci nebo apoptózu. p53 hraje důležitou roli v udržování genomové integrity a prevenci tumorogeneze. Mezi jeho aktivátory patří také ribozomální stres, kterému je věnována samostatná kapitola (viz kapitola č. 3). Stresové stimuly nejsou jediným způsobem, jak může docházet ke stabilizaci a aktivaci p53. DNA viry a adenoviry kódují proteiny, které způsobují zvýšení hladiny p53 proteinu v buňkách. Jedná se o T antigen a E1a protein. Kromě toho, za určitých podmínek exprese buněčných faktorů, jako je Myc (myelocytomatosis protein) nebo Ras, může také vést k indukci p53. Při stabilizaci a zvýšení jeho hladiny dochází navíc ke změně z inertní formy na formu transkripčně specifickou pro určitou genovou sekvenci. (Prives, 1998; Meek, 2009). p53 je transkripční faktor, který up-reguluje proteiny buněčného cyklu, jako například p21, Gadd45. V případě, kdy reparační mechanismy nedokážou obnovit normální stav buňky, up-reguluje také pro-apoptotické proteiny Bax (Bcl-2-associated X protein) a Puma (p53-upregulated modulator of apoptosis) (Vousden *et Prives*, 2009). Například akumulace proteinu p21 nebo Gadd45 v buňce vyvolává inhibici CDK2, jejíž aktivita je nezbytná pro vstup buňky do mitózy, což má za následek zastavení buněčného cyklu v G2 fázi. Mutace v genu kódující protein p53 jsou přítomny u více než 50 % ze všech lidských karcinomů (Prives, 1998; Shangary *et Wang*, 2009).

Schopnost p53 zastavit buněčný cyklus nebo dokonce spustit apoptózu musí být u zdravých buněk přísně regulována, protože zvýšená hladina proteinu p53 může být škodlivá pro normální růst a vývoj buněk. Exprese p53 kolísá v průběhu buněčného cyklu a nejvyšší koncentrace dosáhne v G1 fázi (Shaulsky *et al.*, 1990). Protein p53 má krátkou dobu výskytu a je za normálních podmínek přítomen v buňce v sotva detekovatelné úrovni, díky proteinu Mdm2 (murine double minute) (Moll *et Petrenko*, 2003). Lidským homologem myšího proto-onkoproteinu Mdm2 je Hdm2 (Jin *et al.*, 2004). Mdm2 reguluje činnost a hladinu p53 jak přímou interakcí s p53, čímž zamezuje jeho funkci jako transkripčního faktoru, tak

i následným navázáním ubikvitinu a transportem do cytoplazmy. V cytoplazmě pak dochází k jeho degradaci proteazomem (Kruse *et Gu*, 2009; Zhang *et Lu*, 2009).

Mdm2 protein se skládá ze 491 aminokyselinových reziduí. Ve své struktuře obsahuje 4 konzervativní domény, viz obrázek č. 5 (Marine *et al.*, 2007; Wade *et al.*, 2010). Na N-konci se nachází hlavní vazebné místo pro p53. V centrální oblasti je lokalizována acidická oblast a ZINC FINGER doména. Na C-konci Mdm2 se nalézá RING FINGER doména, která plní funkci E3 ubikvitin-ligázy a také slouží jako vazebné místo pro blízce příbuzný protein MdmX. Centrální oblast je složena přibližně z 300 aminokyselinových zbytků a je důležitá především, protože obsahuje mnohočetná vazebná místa pro navázání různých buněčných faktorů regulujících při stresových podnětech funkci Mdm2 (Tanimura *et al.*, 1999).

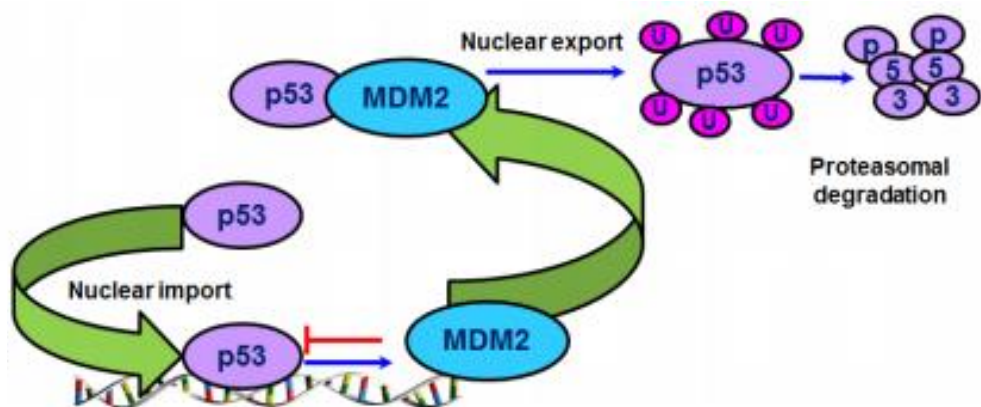


Obrázek č. 5: Struktura a vazebné místa na Mdm2 (převzato z Manfredi, 2010)

Mdm2 se váže na p53 mezi 17 až 27 aminokyselinovým residuem od svého N-konce. Tato oblast je zajímavá z několika důvodů. Jedná se o velmi konzervovanou oblast a to nejen mezi různými druhy živočichů, ale i mezi souvisejícími členy genové P53 rodiny (p73). Ve stejné oblasti se nachází transkripční aktivační doména, kterou se p53 váže na geny jím regulované. V blízkosti se nalézá velký počet fosforylačních míst, které se zdají být zapojeny do regulace p53 (Prives, 1998).

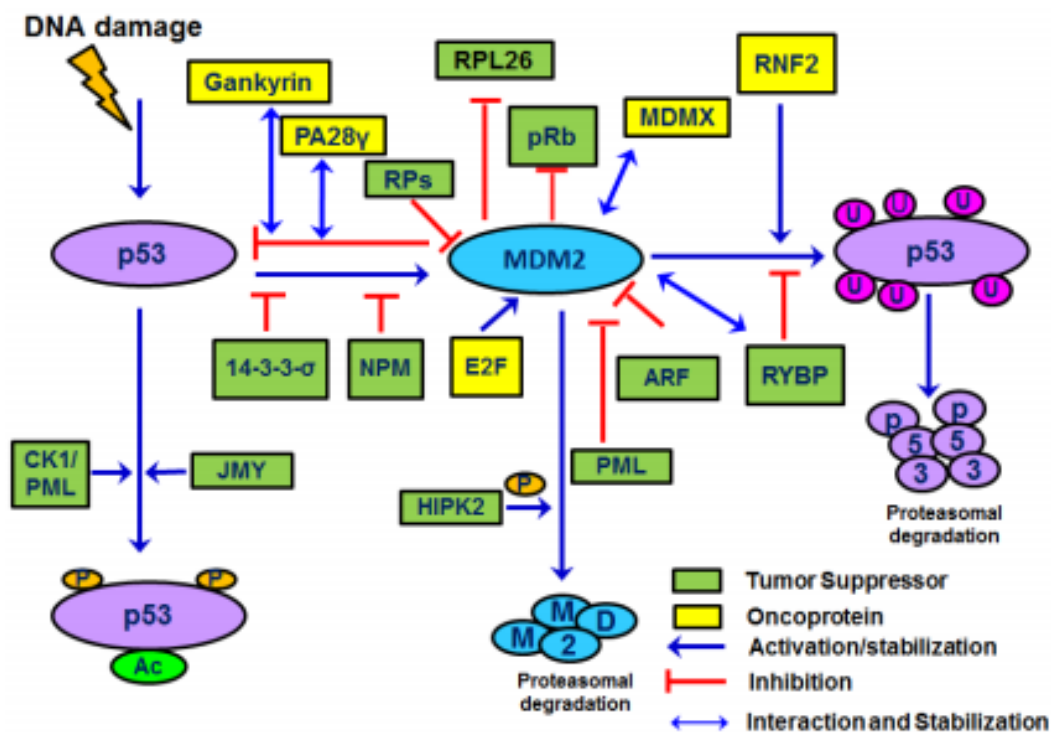
Mdm2 a p53 společně vytvářejí negativní zpětnovazebnou smyčku, kdy p53 je aktivátorem exprese Mdm2, který na druhou stranu způsobuje degradaci a zastavuje aktivitu p53 (Moll *et Petrenko*, 2009). Na obrázku č. 6 je znázorněn základní koncept interakce Mdm2-p53. Transkripce Mdm2 indukovaná p53 probíhá z promotoru P2, zatímco bazální

transkripce Mdm2 probíhá z odlišného promotoru P1. Tato elegantní autoregulační smyčka napomáhá udržet nízkou buněčnou hladinu p53 v normálních buňkách (Barak *et al.*, 1994).



Obrázek č. 6: Mdm2-p53 zpětnovazebná smyčka (převzato z Nag *et al.*, 2013)

Důležitost Mdm2-p53 zpětnovazebné smyčky je také evidentní ze skutečnosti, že různé stresové stimuly aktivují p53 interferencí této smyčky. Tyto regulátory dokážou změnit konformaci, lokalizaci, expresi Mdm2 nebo p53 a dokonce modulovat aktivitu Mdm2 jako E3 ubikvitin-ligázy směrem k sobě, p53 a jiným substrátům. V důsledku toho pak dochází k regulaci množství různých buněčných procesů (Nag *et al.*, 2013). V podstatě, stabilizace a aktivace p53 může být zapříčiněna interferencí vzájemné interakce Mdm2 a p53 nebo pozměněním vazebného místa na p53 pro Mdm2. Kovalentní modifikace (fosforylace, acetylace) změní strukturu vazebných míst a následkem toho nemůže vzniknout komplex Mdm2-p53 (Prives, 1998). Například poškození DNA indukované ionizujícím zářením a UV zářením, spouští fosforylaci jak p53 tak Mdm2, čímž zabraňuje jejich fyzické a funkční interakci (Vogelstein *et al.*, 2000). Druhým způsobem, jak dochází k přerušení zpětnovazebné smyčky a zamezení jejich vzájemné asociace, jsou nekovalentními regulátory. Například při aberantních proliferujících signálech indukovaných nadměrnou expresí onkogenů, dochází k indukci exprese p19Arf nádorového supresoru (Zhang *et al.*, 2001). p19Arf se váže k centrální kyselé oblasti Mdm2 a způsobuje jeho lokalizaci v jadérku. Navíc p19Arf při navázání inhibuje jeho ubikvitin ligázovou aktivitu vůči p53 (Zhang *et al.*, 2001; Sherr *et al.*, 2000). Je zajímavé, že tyto dva mechanismy jsou oddělené a na sobě nezávislé (Prives, 1998). Interakce mezi Mdm2-p53 není tedy pouze vazba dvou proteinů a jejich vzájemná regulace. Na obrázku č. 7 jsou znázorněny příklady regulátorů dráhy Mdm2-p53.



Obrázek č. 7: Nádorové supresory a onkoproteiny regulující Mdm2-p53 zpětnovazebnou smyčku (převzato z Nag *et al.*, 2013)

Mezi buněčné molekuly, které ovlivňují interakce mezi Mdm2 a p53 patří například: MdmX, p19Arf a nukleofosmin (Barak *et al.*, 1994). MdmX je blízce příbuzný protein Mdm2, který vzniká odlišným sestřihem mRNA. Oba proteiny mají vysoký stupeň homologie a neredundantní roli při udržování nízké hladiny p53 ve zdravých buňkách (Marine *et Jochemsen*, 2004; Marine *et Jochemsen*, 2005). MdmX se přímo váže k transkripční doméně p53 a inhibuje aktivitu p53, ale neindukuje degradaci p53. Hetero-oligomerizace Mdm2 a MdmX prostřednictvím svých RING domén potlačuje aktivitu p53 a dochází k zvýšení proliferace buněk a snížení apoptózy. MdmX je nadměrně exprimován u mnoha druhů karcinomů, kdy reguluje funkci Mdm2 jako E3 ligázy (Marine *et Jochemsen*, 2004; Huang *et al.*, 2011). Při DNA poškození může Mdm2 přímo ubiquitinovat MdmX a způsobit tak jeho degradaci (Marine *et Jochemsen*, 2004).

p19Arf je protein, který vzniká díky alternativnímu čtecímu rámci INK4a lokusu. Jeho exprese způsobuje zadržení Mdm2 v jadérku a zároveň podporuje jeho rychlou degradaci.

Zabraňuje tak aktivitě Mdm2 fyzickým oddělením od p53 (Den Besten *et al.*, 2006; Honda *et Yasuda*, 1999).

Nukleofosmin (NPM) soutěží s Mdm2 o navázání do stejné oblasti na p53, což vede ke snížení ubikvitinace p53. Navíc stabilizuje p19Arf v jadérku, a v důsledku toho zvyšuje jeho koncentraci a naopak snižuje degradaci p53 (Korgaonkar *et al.*, 2005).

Mezi relativně nedávno objevené regulátory Mdm2-p53 zpětnovazebné smyčky patří ribozomální proteiny. Při ribozomálním stresu nebo nadměrné expresi ribozomálních proteinů dochází ke zvýšení hladiny a transkripční činnosti p53, což vede k zastavení buněčného cyklu nebo apoptóze (Zhan *et Lu*, 2009; Nag *et al.*, 2013). Vztah mezi ribozomálními proteiny, respektive ribozomálním stresem a Mdm2-p53, je detailněji popsán v kapitole číslo 3.

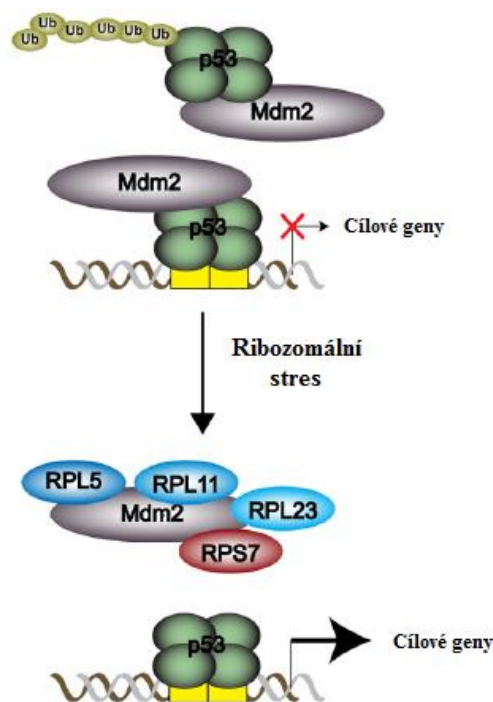
3. Ribozomální stres

Ve většině případů buňky obvykle odpovídají rychle na stres přizpůsobením (pozměněním) svého metabolismu. Buněčný stres a jeho následná signalizace může vést k zastavení buněčného cyklu nebo apoptóze. Záleží na závažnosti poškození buněk a jejich schopnosti obnovení (Boulon *et al.*, 2010). Ribozomální biogeneze je proces velmi citlivý na různé poruchy v buněčném metabolismu. Může být narušena nedostatkem živin v buňce, vyčerpáním nukleotidů, chemickými látkami (aktinomycin-D, 5-fluorouracil), poškozením DNA, hypoxií nebo oxidativním stresem. Poškození v ribozomální biogenezi má za následek vznik ribozomálního stresu (Dai *et al.*, 2006). Inhibice buněčného cyklu ribozomálního stresem může být považován za obranný mechanismus, který chrání buňky před replikací DNA a růstem v neoptimálních metabolických podmínkách (Pestov *et al.*, 2001). Při nesprávném sestavování ribozomů způsobeném jak endogenním či exogenním stimulem se volné ribozomální proteiny dostávají z jaderka do nukleoplazmy, kde hrají klíčovou roli při zastavení buněčného růstu a dělení (Zhang *et al.*, 2009). V posledním desetiletí bylo zjištěno, že transformace zdravých buněk na buňky rakovinové není způsobována pouze dysregulací aktivity onkogenů, jako jsou mutace, delece nebo epigenetické umlčování nádorových supresorů. Jedním z nově objevených způsobů, jak se může ze zdravé buňky stát rakovinná, je narušení kontrolních mechanismů ribozomální biogeneze (Hanahan *et al.*, 2011). Ribozomální biogeneze zahrnuje expresi rRNA genů, syntézu ribozomálních proteinů a velkého množství dalších faktorů napomáhajících skládání ribozomů. Tento proces spotřebovává až 80 % energie u proliferujících buněk. Z pohledu spotřeby energie můžeme ribozomální biogenezi považovat za hlavní komponentu buněčného růstu a také jako kontrolní bod, který slouží ke sledování buněčného růstu a jeho poškozením vzhledem k buněčnému cyklu (Thomas, 2000; Zhang *et al.*, 2003). Mutace nebo delece v genech kódujících ribozomální proteiny, které vedou k haploinsuficienci jednotlivých ribozomálních proteinů, způsobují nemoc zvanou Diamond-Blackfan anémie. Mutace ve faktorech ovlivňujících ribozomální biogenezi způsobují další ribozomopatie (Treacher Collins syndrom, Shwachman Diamond syndrome a další) (Danilova *et al.*, 2015).

3.1. Mechanismus ribozomálního stresu dependentního na p53

Biogenezi ribozomů můžeme rozdělit na tři základní kroky: exprese ribozomální RNA (rRNA) a ribozomálních proteinů, zpracování a posttranslační modifikace rRNA a sestavení 40S a 60S pre-ribozomálních podjednotek v jadérku (Perry, 2007; Lindström *et al.*, 2007). Chyba nebo poškození jakéhokoli kroku ribozomální biogeneze způsobené jak endogenním nebo exogenním stimulem, způsobuje ribozomální stres. Ve většině případů dochází k rozpadu struktury jadérka, což má za následek uvolnění a akumulaci ribozomálních proteinů (Zhang *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2004). Volné ribozomální proteiny se vážou na Mdm2 a inhibují jeho ubikvitinační funkci vůči p53, nebo přímo znemožňují jeho vazbu s p53 viz obrázek č 8. V důsledku pak dochází ke stabilizaci a aktivaci p53 (Morgado-Palacin *et al.*, 2012).

Signální dráha ribozomální proteiny-Mdm2-p53 je považována za kontrolní mechanismus správného skládání ribozomů a má důležitou roli při inhibici buněčného růstu a cyklu (Zhang *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2004). Při interakci ribozomálních proteinů s Mdm2 dochází ke vzniku odlišných signálů, díky kterým je následně možné zjistit jednotlivé chybné kroky v biogenezi ribozomů (Jin *et al.*, 2004). Jedná se o ribozomální proteiny jak velké, tak i malé podjednotky jako například RPL5 (Dai *et al.*, 2004a), RPL11 (Zhang *et al.*, 2003), RPL23 (Dai *et al.*, 2004b), RPS7 (Zhu *et al.*, 2009), RPS14 (Zhou *et al.*, 2013a), RPS25 (Zhang *et al.*, 2013) a RPS27/RPS27L (He *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2011). U těchto proteinů bylo prokázáno, že hrají roli v regulaci Mdm2-p53 zpětnovazebné smyčky právě jako odezva na ribozomální stres. RPL5 a RPL11 jsou klíčové pro aktivaci p53 (Bursač *et al.*, 2012, Zheng *et al.*, 2015). Snížení hladiny těchto proteinů například specifickými siRNA významně zeslabuje aktivaci p53 indukovanou ribozomálním stresem (Zhu *et al.*, 2009; Teng *et al.*, 2013). Současná deplece proteinů velké a malé ribozomální podjednotky má za následek ještě větší stabilizaci a aktivaci p53, než inhibice jedné podjednotky, což naznačuje, že mechanismy jsou na sobě nezávislé. Při stabilizaci p53 zprostředkovanou disrupcí obou ribozomálních podjednotek dochází k zastavení buněčného cyklu, spíše než k apoptóze, která se očekává vzhledem k vysoké hladině a aktivitě p53. Mechanismus a důvod je v současné době neznámý (Fumagalli *et al.*, 2012).

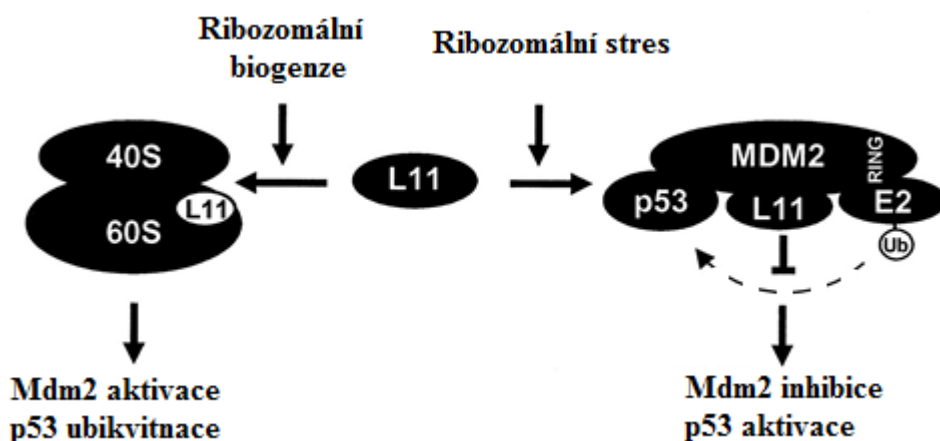


Obrázek č 8: Vazba ribozomálních proteinů na Mdm2 při ribozomálním stresu a aktivace p53 (převzato a upraveno podle Manfredi, 2010)

RPL5, RPL11, RPL23 a RPS14 se váží na centrální kyselou doménu Mdm2 a inhibují jeho E3 ubikvitin ligázovou aktivitu vůči p53 (Xiong *et al.*, 2011). Každý z těchto proteinů potřebuje pro své účinné navázání na Mdm2 specifickou sekvenci (Lindstöm *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2004). RPS7 a RPS25 proteiny se vážou jak ke Mdm2, tak i k p53. Kromě toho RPS7 protein může sloužit jako substrát pro Mdm2 namísto p53 (Zhu *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2007). Aktivace a stabilizace p53 ribozomálními proteiny je odlišná od aktivace p53 DNA poškozením nebo aktivací onkogenů, kdy dochází k fosforylaci N-terminálního konce p53 nebo aktivaci p19Arf. Díky navázání ribozomálních proteinů na Mdm2 se p53 stává transkripčně aktivním i přes vysokou hladinu Mdm2 bez modifikace, která by zabraňovala jeho navázání k p53 (Lohrum *et al.*, 2003; Ashcroft *et al.*, 2000). Nedávno bylo prokázáno, že RPL11 a RPS7 jsou také potřebné pro aktivaci p53 vyvolanou poškozením DNA, což naznačuje, že ribozomální proteiny mohou hrát klíčovou roli v aktivaci p53 i v závislosti na různých stresových podnětech (Zhu *et al.*, 2009). RPL5 a RPL11 jsou hlavními mediátory dráhy ribozomální proteiny-Mdm2-p53 (Teng *et al.*, 2013). Kromě toho bylo prokázáno, že RPL11 může stabilizovat p53 nezávisle na RPL5 (Zhang *et al.*, 2003). Vzhledem k tomu lze

RPL11 považovat za hlavního zprostředkovatele stabilizace p53 v průběhu ribozomálního stresu (Fumagalli *et al.*, 2012).

RPL11 je důležitou součástí 60S ribozomální podjednotky. Primárně se nachází v jadérku. K uvolnění RPL11 z jadérka dochází při poruše syntézy rRNA, nadměrné expresi RPL11 nebo při poruše sestavování ribozomů (Kressler *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001). RPL11 se váže přímo na ZINC finger doménu v centrální oblasti Mdm2 (viz obrázek č. 9) prostřednictvím hydrofilních reziduí. Tato vazba může být narušena mutací non-cysteinových aminokyselin v ZINC finger doméně Mdm2. Bazické aminokyselinové rezidua RPL11 jsou nezbytné pro stabilní vazbu Mdm2-RPL11 a pro potlačení ubikvitinační aktivity Mdm2 vůči p53 (Zhang *et al.*, 2011).

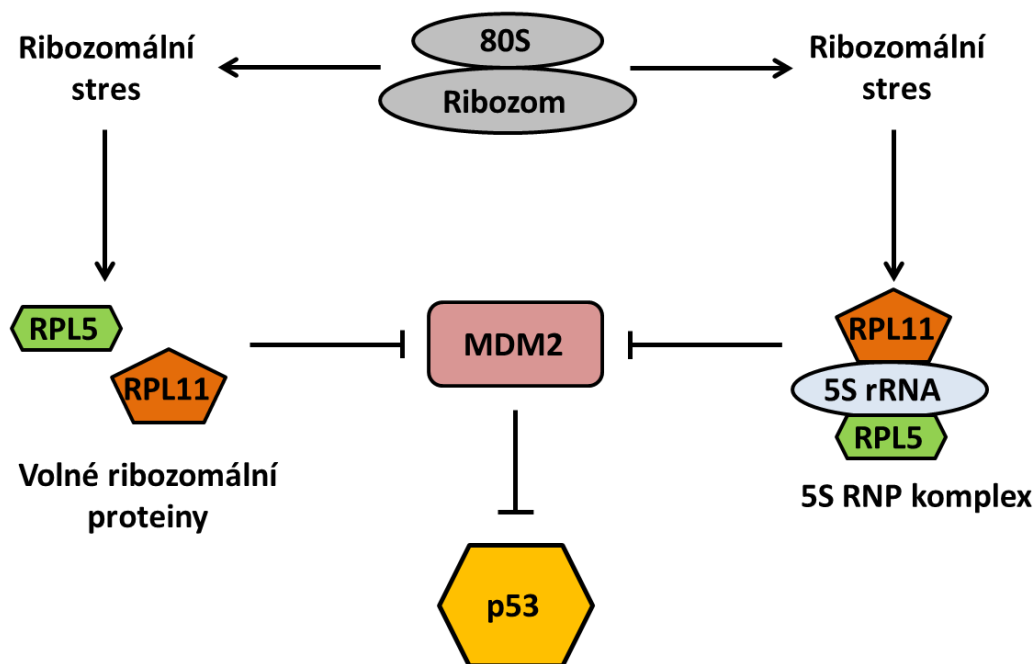


Obrázek č. 9: Schématický model RPL11 regulace Mdm2 při ribozomálním stresu (převzato a upraveno podle Zhang *et al.*, 2003)

RPL11 se váže na Mdm2 a reguluje jeho aktivitu podobným způsobem jako p19Arf. Jak RPL11 tak p19Arf se za běžných podmínek nacházejí v jadérku. Musí tedy dojít k jejich přemístění do nukleoplazmy, kde interagují s Mdm2 (Zhang *et al.*, 2003; Llanos *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1999). Oba proteiny se mohou nezávisle vázat přímo s Mdm2 a samostatně vytvořit ternární komplexy p53-Mdm2-L11 nebo p53-Mdm2-p19Arf, protože jejich vazebná místa se nacházejí mimo vazebné místo pro p53. Po navázání dochází k inhibici ubikvitinace p53 a obnoví se transkripční aktivita p53 i v přítomnosti Mdm2. Jak RPL11 a p19Arf inhibují funkci Mdm2 jako ubikvitin ligázy není stále jasné. Je zde však jeden významný rozdíl mezi RPL11- a p19Arf- zprostředkovaným regulačním mechanismem buněčného cyklu.

p19Arf inhibuje Mdm2 jaderný export do cytoplazmy, zatímco RPL11 ne (Zhang *et al.*, 2003; Zhang *et Xiong*, 1999). p19Arf a RPL11 se váží na dvě různé, nepřekrývající se oblasti v centrální doméně Mdm2, protože dochází v některých případech ke vzniku kvartérního komplexu p53-Mdm2-p19Arf-RPL11. U buněk, ve kterých se setkává současně hyperproliferační, onkogenní stimul s ribozomálním stresem, se můžou tedy současně vázat p19Arf i RPL11 na p53 a vyvolat rychlejší a účinnější zastavení buněčného cyklu. Při *in vitro* testech bylo zjištěno, že samotné navázání RPL11 na Mdm2 neinhibuje ubikvitinaci p53. Je tedy možné, že další faktor jsou zapojeny do RPL11 zprostředkované inhibice ubikvitinace p53 *in vivo* (Zhang *et al.*, 2003).

Jak již bylo zmíněno dříve, volné RPL5 a RPL11 se mohou vázat na Mdm2 a inhibovat jeho funkci. Avšak je nepravděpodobné, že tuto inhibici provádějí individuálně jako volné ribozomální proteiny (Lam *et al.*, 2007). Téměř všechny ribozomální proteiny jsou syntetizovány v nadbytku, ale volné jsou rychle degradovány. Důležité je tedy, aby volné ribozomální proteiny byly dostatečně stabilní pro interakci s Mdm2. Stabilita a akumulace RPL5 a RPL11 během ribozomálního stresu je umožněna díky jejich vzájemné interakci (Bursač *et al.*, 2012). RPL5 a RPL11 spolu s 5S rRNA vytvářejí 5S ribonukleoproteinovou částici (RNP), která je stabilním stavebním komponentem velké ribozomální podjednotky (Chakraborty *et al.*, 2011). 5S RNP poskytuje způsob, kterými se RPL5 a RPL11 mohou hromadit v buňce v případě, kdy je produkce ribozomů blokována (Burcač *et al.*, 2012; Sloan *et al.*, 2013). Buňky obsahují velké množství RPL5/5S rRNA komplexů, které jsou meziproduktem při vzniku 5S RNP. Připojení RPL11 ke RPL5/ 5S rRNA komplexu za vzniku 5S RNP je limitující faktor pro vznik 5S RNP (Sloan *et al.*, 2013). RPL5 a RPL11 můžou reagovat s Mdm2 samostatně nebo jako 5S RNP viz obrázek č. 10.



Obrázek č. 10: Mechanismus aktivace p53 volnými ribozomálními proteiny RPL5, RPL11 a 5S RNP (převzato a upraveno podle Zhu *et al.*, 2009)

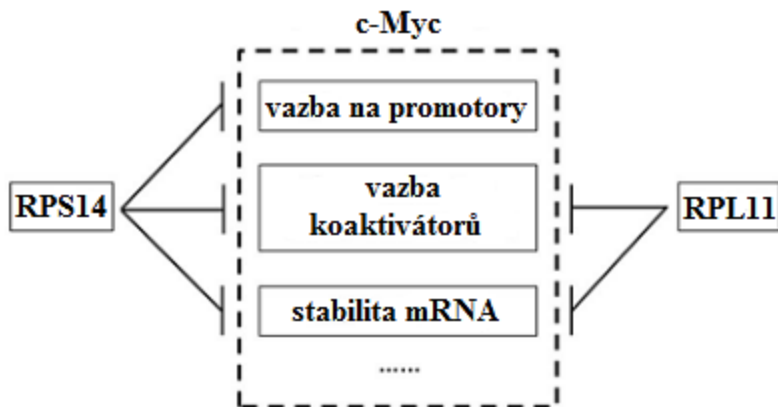
Hladina 5S RNP je u normálních buněk nízká, tudíž jakákoliv změna odpovídá rychlosti a integritě ribozomální biogeneze (Hirsch *et al.*, 1966). Mimo to, chyba při tvorbě malé ribozomální podjednotky (SSU) může také vést k 5S RNP zprostředkované aktivaci p53 i v nepřítomnosti poruchy při vzniku velké ribozomální podjednotky (LSU). V tomto případě se předpokládá, že defekt při skládání malé podjednotky vede k up-regulaci produkce ribozomálních proteinů a zvýšené produkci 5S RNP (Fumagalli *et al.*, 2012). Začlenění 5S RNP do LSU, nebo vazba k Mdm2 jsou dvě události, které se vzájemně vylučují. Stejně vazebné místo na RPL11 je potřebné v obou případech, čímž se u normálních buněk při správné ribozomální biogenezi zabrání interakci 5S RNP s Mdm2 (Zheng *et al.*, 2015). Vytváření, lokalizace a integrace 5S RNP do LSU je řízena řadou regulačních proteinů, které mají klíčovou roli při regulaci aktivity Mdm2 a hladiny p53. Důležitým proteinem je Pict1, který slouží k integraci 5S RNP do ribozomů. Proteiny Rrs1 a Bxdc1 způsobují lokalizaci 5S RNP v jádru. 5S RNP se řadí mezi klíčové koordinátory signálních drah. Propojuje buněčnou proliferaci s ribozomální biogenezí (Sloan *et al.*, 2013).

3.2. Mechanismus ribozomálního stresu independentního na p53

Základní úlohou ribozomálních proteinů je stabilizace struktury malé i velké ribozomální podjednotky. Ribozomální proteiny jsou zapojeny do skládání pre-ribozomální částic, včetně stabilizace, zpracování a transportu rRNA (Tschochner *et al.*, 2003). Přesto u ribozomálních proteinů byla identifikována řada extraribozomálních funkcí souvisejících například s buněčným růstem, dělením, nebo apoptózou (Lindstöm, 2009). Ribozomální proteiny mají daleko více funkcí, než se předpokládalo v minulosti, a je pravděpodobné, že v budoucnosti může dojít k identifikaci regulačních funkcí u dalších buněčných procesů. (Deisenroth *et al.*, 2016). Přítomnost p53-independentní dráhy u savčích buněk regulující vztah mezi ribozomální biogenezí a proliferací buněk byla poprvé navržena na základě pozorování selektivní inhibice syntézy rRNA aktinomycinem-D. Zastavení buněčného cyklu, i když pomalejší než v přítomnosti p53, probíhá i u buněk s umlčenou expresí p53 (Montanaro *et al.*, 2007).

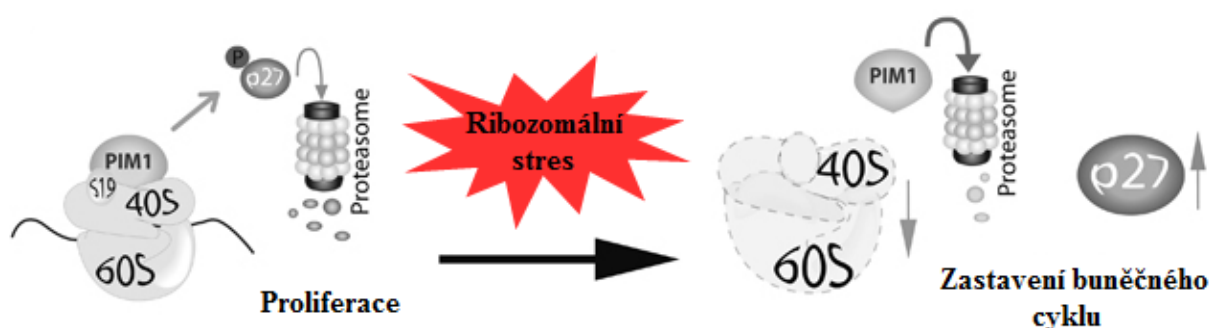
Dobrym příkladem je deplece nukleolárního proteinu pescadillo (Pes), který se za běžných podmínek nachází v komplexu PeBoW společně s proteiny Bop1 a Wdr12. Pescadillo hraje důležitou roli při zpracování pre-RNA během skládání LSU. Deplece Pes inhibuje ribozomální biogenezi a způsobuje stabilizaci p53 vedoucí k zastavení buněčného cyklu podobným způsobem jako u ostatních ribozomálních poškození (Grimm *et al.*, 2006). Nicméně deficit Pes způsobuje navíc narušení proliferace i v buňkách nesoucích mutovaný nebo chybějící p53 a reguluje fosforylaci retinoblastoma proteinu (pRB) (Li *et al.*, 2009). pRb je produktem genu RB1, nádorového supresoru, a ve své hypofosforylované aktivní formě se váže na E2F, čímž brání aktivitě E2F jako transkripčnímu faktoru, který reguluje expresi genů zodpovědných za tvorbu produktů nezbytných pro syntézu DNA. U hyperfosforylované formy pRB nedochází k navázání na E2F, v důsledku pak E2F může aktivovat své cílové geny a dochází k progresi z G1 do S-fáze. U normálních buněk fosforylace pRb probíhá v G1 fázi za pomoci cyklin D-cyklin-dependentní kinázy (CDK) -4 a -6 a je dokončena na konci fáze G1 fáze cyklin E-CDK-2. Inhibitory CDK zabraňují fosforylaci pRB. CDK-2 je negativně regulována p21 a p27 (Sherr *et al.*, 2002). Ve skutečnosti, deplece Pes vede ke snížení exprese cyklinu D1 a up-regulaci p27, s následným významným snížením fosforylace pRb a zastavením v kontrolní bodu G1-S-fáze buněčného cyklu (Li *et al.*, 2009).

Další p53-independentní mechanismus, ovlivňující vztah mezi ribozomální biogenezi a buněčnou proliferací, je snížení exprese a inhibice funkce onkoproteinu c-Myc v odezvě na ribozomální stres (Van Riggelen *et al.*, 2010). c-Myc je transkripční faktor, který reguluje expresi velkého množství genů zapojených do progresu buněčného cyklu, proliferace, diferenciaci buněk, angiogeneze, metabolismu a podílí se na všech krocích ribozomální biogeneze (Meyer *et Penn*, 2008). Zvyšuje aktivitu RNA polymerázy I, stimuluje syntézu ribozomálních proteinů zvýšením transkripce RNA polymerázy II a zvyšuje transkripci RNA polymerázy III aktivací TFIIIB (Van Riggelen *et al.*, 2010). Při ribozomálním stresu se RPL11 váže na c-Myc. Zabraňuje vazbě koaktivátorů a navíc snižuje hladinu c-Myc mRNA prostřednictvím mechanismu miRNA. RPL11-zprostředkované snížení exprese c-Myc snižuje buněčnou proliferaci i u p53 deficientních buněk, což ukazuje další p53-nezávislý kontrolní mechanismus proliferace (Dai *et al.*, 2007). Nedávno objeveným inhibitorem c-Myc se stal další ribozomální protein a to RPS14. Je zajímavé a překvapující, že RPS14, který se strukturálně liší od RPL11 se váže na stejnou doménu c-Myc, která je rozhodující pro vazbu na DNA. Jak RPS14 tak RPL11 můžou negativně regulovat aktivitu c-Myc několika různými způsoby viz obrázek č. 9. Předpokládá se, že funkce c-Myc může být inhibována RPS14 třemi způsoby: redukcí vazby kofaktorů na c-Myc, navázáním RPL14 na DNA-vazebnou doménu c-Myc nebo snížením hladiny c-Myc mRNA (miRNA), a tím množství c-Myc proteinu v buňkách. RPS14 na rozdíl od RPL11, může přímo bránit vazbě c-Myc na sekvence svých cílových promotorů genů (Zhou *et al.*, 2013b).



Obrázek č. 9: Regulace c-Myc ribozomálními proteiny RPS14 a RPL11 (převzato a upraveno podle Zhou *et al.*, 2013b)

Ribozomální stres může také ovlivňovat funkce kináz (Iadevaia *et al.*, 2010). Pim1 je konstitutivně aktivní serin-threoninová kináza regulována cytokiny, růstovými faktory a hormony. Pim1 snižuje aktivitu inhibitoru CDK p27 a zvyšuje jeho degradaci (Morishita *et al.*, 2008). Za běžných podmínek dochází k interakci Pim1 s RPS19. Deplece RPS19 způsobí drastickou destabilizaci Pim1 a zvýšení degradace Pim1 proteazomem. Nižší hladina Pim1 vyvolává stabilizaci a aktivaci inhibitoru buněčného cyklu p27 a zástavu buněčného cyklu bez ohledu na přítomnost p53. (Iadevaia *et al.*, 2010). Na obrázku č. 10 je schematicky znázorněný vztah ribozomálního stresu (deplece RPS19) a Pim1.



Obrázek č. 10: Model vztahu mezi ribozomální stres a PIM1 (převzato a upraveno podle Iadevaia *et al.*, 2010)

Stále zůstává nezodpovězenou otázkou, zda ribozomální proteiny působí samostatně při svých extra ribozomálních funkcích, nebo působí v komplexu s jinými ribozomální proteiny. Překvapivým zjištěním je například, že RPS14 soupeří s RPL5 při vazbě na Mdm2, což naznačuje, že tyto dva ribozomální proteiny nemusí být schopny vzájemně spolupracovat při aktivaci p53. Na druhou stranu RPS14 a RPL11 se mohou vázat společně a spolupracovat navzájem při potlačení aktivity Mdm2 a c-Myc, protože mají různé vazebné místa na Mdm2, nebo c-Myc (Dai *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2003; Lohrum *et al.*, 2003).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. Metodika a materiál

4.1. Příprava plazmidu pEGFP-FBL a pEGFP-NCL

Amplifikace genu pro fibrilarin a nukleolin

Amplifikace lidských genů fibrilarinu (FBL) a nukleolinu (NCL) byla provedena pomocí PCR z cDNA U2OS buněk. Celková RNA byla izolována z U2OS buněk za použití miRNeasy Mini Kitu, podle protokolu výrobce. Z celkového množství vyizolované RNA byly použity 3 µg jako templát pro reverzní transkripci. Z celkového množství získané cDNA byl použit 1 µl pro PCR (složení PCR reakční směsi viz tabulka č. 1) se specifickými primery pro FBL a NCL (uvedeny níže). Primery pro amplifikaci byly navrženy podle cDNA sekvence fibrilarinu a nukleolinu přítomné v NCBI databázi. K základní sekvenci forward primeru jak pro FBL tak i NCL byla navíc připojena sekvence 12 oligonukleotidů, které obsahovaly specifické restrikční místo pro EcoRI restrikční endonukleázu. K reverse primeru FBL/NCL byla stejným způsobem připojena sekvence pro BamHI restrikční endonukleázu. Teplotní průběh PCR viz tabulka č. 2.

FBL_EcoRI_F: 5'-GTA**CTGAATTC**ATGAAGCCAGGATTCAGTC-3'

Sekvence forward primeru pro FBL s vyznačeným restrikčním místem (červeně) pro EcoRI a komplementární sekvencí k FBL (modře).

FBL_BamHI_R: 5'-GTA**CTGGATCC**AATCCTGACAGCGCTGAACTT-3'

Sekvence reverse primeru pro FBL s vyznačeným restrikčním místem (červeně) místem pro BamHI a komplementární sekvencí k FBL (zeleně).

FBL sekvence amplifikována z cDNA pomocí PCR viz Přílohy.

Celková velikost FBL PCR produktu s adaptory: 1009 bp

NCL_EcoRI_f : 5'-GTA**CTGAATTC**ATGGTGAAGCTCGCGAAGGCAG-3'

Sekvence forward primeru pro NCL s vyznačeným restrikčním místem (červeně) pro EcoRI a komplementární sekvencí k NCL (modře).

NCL_BamHI_R: 5'-GTA**CTGGATCC**TCCAAGGAGACCACAGGACT-3'

Sekvence reverse primeru pro NCL s vyznačeným restričníím místem (červeně) místem pro BamHI a komplementární sekvenci k NCL (zeleně).

NCL sekvence amplifikována z cDNA pomocí PCR viz Přílohy.

Celková velikost NCL PCR produktu s adaptory: 2 285 bp

Tabulka č. 1: Složení PCR reakční směsi

Reagencie	Objem (μl)
10x DNA polymerázový reakční pufr	2 μl
MgCl ₂	1,6 μl
DEPC-Voda	11,6 μl
10mM dNTP	0,4 μl
Směs primerů (f primer + r primer)	2 μl
cDNA	1 μl
100% DMSO	1 μl
5U/μl Taq DNA polymeráza	0,4 μl
CELKOVÝ OBJEM 1 REAKCE	20 μl

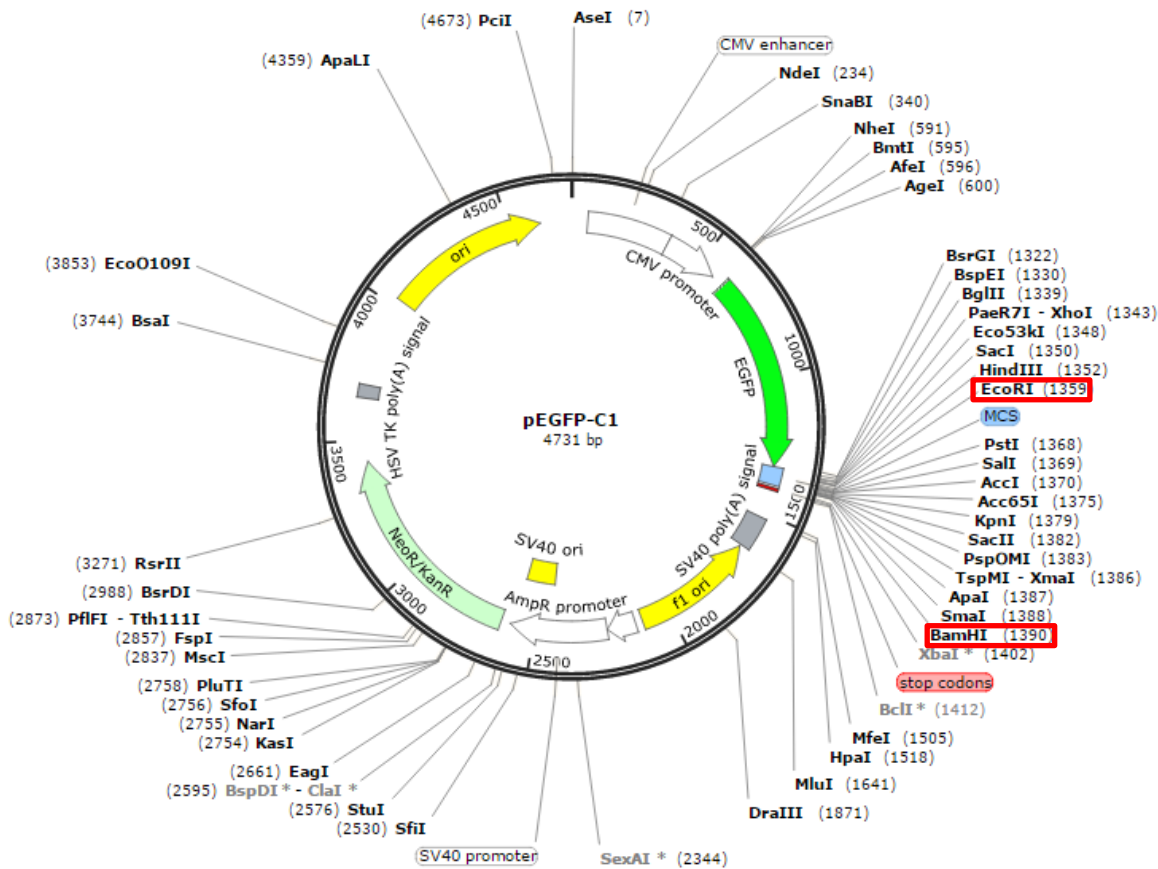
Tabulka č. 2: Teplotní průběh PCR

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Úvodní denaturace	95°C	2 min	1
PCR amplifikace	95°C	15 s	25
	58°C	15 s	
	72°C	45 s	
Závěrečná extenze	72°C	5 min	1

Úspěšnost amplifikace byla ověřena separací reakční směsi po PCR pomocí 1% agarózové gelové elektroforézy (ELFO) po dobu 1 hodiny při 110 V stejnosměrného napětí. Pro gelovou elektroforézu byl použit TBE pufr. S pomocí UV záření byly identifikovány požadované amplikony odpovídající velikosti cDNA FBL a NCL s adaptory. Následně byly amplikony pročištěny pomocí QIAquick PCR Purification Kitu, dle přiloženého postupu výrobce. Koncentrace izolovaných FBL a NCL amplikonů byla změřena fluorometricky na přístroji Qubit, dle přiloženého postupu výrobce.

Klonování FBL a NCL do pEGFP-C1 plazmidu

Vektor pEGFP-C1 byl komerčně zakoupen. Prvním krokem klonování do plazmidu byla restrikce plazmidu a PCR amplikonů FBL a NCL pomocí specifických restrikčních endonukleáz. Pro restrikci byly použity BamHI a EcoRI restrikční endonukleázy. Tyto enzymy štěpí pEGFP-C1 ve specifických místech mnohočetného klonovacího místa (viz obrázek č. 11) a vytváří tak kompatibilní (kohézní) konce stejně jako u inzertu. Byla provedena restrikce souběžně oběma restriktázami. Restrikční směs (viz tabulka č. 3 a tabulka č. 4) byla inkubována přes noc při 37 °C. Po inkubaci byl k ligační směsi obsahující rozštípnutý plazmid pEGFP-1 přidán 1 µl alkalické fosfatázy, aby nedošlo k opětovné ligaci plazmidu. Proběhla inkubace po dobu 30 minut při 37 °C. Fosfatáza odstraňuje 5' a 3' fosfáty a zabraňuje tak následně T4 DNA ligáze v opětovné recirkularizaci vektoru. Jak pEGFP tak FBL i NCL byly po restrikci separovány na 1% agarózovém gel v 1x TBE pufru při 100 V po dobu 60 minut. S pomocí UV záření byly identifikovány požadované fragmenty odpovídající velikosti FBL a NCL a pEGFP-C1 po restrikci. Následně byly vyříznuty z gelu a pročištěny pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu, dle přiloženého postupu výrobce. Koncentrace izolovaných FBL, NCL amplikonů a pEGFP-C1 plazmidu byla změřena fluorometricky na přístroji Qubit, dle přiloženého postupu výrobce.



Obrázek č. 11: Struktura pEGFP-C1 plazmidu s vyznačenými restrikčními místy

Tabulka č. 3: Složení restrikční směsi pro pEGFP-C1

Reagencie	Objem
pEGFP-C1	1 μ l (1 μ g)
10x K pufr	3 μ l
DEPC-Voda	24 μ l
BamHI	1 μ l
EcoRI	1 μ l
CELKOVÝ OBJEM 1 REAKCE	30 μl

Tabulka č. 4: Složená restriční směs pro FBL a NCL

Reagencie	Objem
FBL/NKL	19 μ l
10x K pufr	3 μ l
DEPC-Voda	6 μ l
BamHI	1 μ l
EcoRI	1 μ l
CELKOVÝ OBJEM 1 REAKCE	30 μl

Dalším krokem byla ligace přečištěného rozštípnutého plazmidu s FBL/NCL. Ligační směs se skládala z plazmidu (pEGFP-C1), inzertu (FBL/NCL), T4 DNA ligázy, pufru pro T4 DNA ligázu a DEPC-vody. Pro konkrétní velikosti DNA fragmentů byl použit molární poměr vektoru vůči inzertu 1:3, ligace probíhala 48 hodin při 4 °C v lednici. Následně byla T4 DNA ligáza teplotně inaktivována 10 minut při 65 °C.

Transformace bakterií, ověření plazmidu a izolace pEGFP-FBL a pEGFP-NCL plazmidu z bakterií

Pro transformaci bakterií plazmidem pEGFP-FBL a pEGFP-NCL byla použita metoda teplotního šoku. K 50 μ l kompetentních bakterií *E. Coli* DH5 α bylo přidáno 5 μ l ligační směsi. Bakterie s ligační směsí byly inkubovány 15 minut na ledu a pak umístěny do vodní lázně po dobu 30 sekund při 42 °C. Po teplotním šoku byly ihned bakterie umístěny na 2 minuty do ledu. K transformovaným bakteriím bylo přidáno 200 μ l LB média bez antibiotika a byly umístěny na 45 minut do třepačky při 37 °C. Po 45 minutách byly bakterie rozetřeny na agarovou plotnu v Petriho misce obsahující antibiotiku Kanamycin pro selekci pozitivních klonů. Plotny s bakteriemi byly po dobu 24 hodin umístěny do inkubátoru při 37 °C. Po inkubaci byly 3 narostlé pozitivní kolonie s pEGFP-FBL a tři kolonie s pEGFP-NCL přeneseny do 5 ml LB média s Kanamycinem a inkubovány za stálého třepání 4 hodiny při 37°C. Pro ověření, zda se v transformovaných bakteriích nacházejí plazmidy nesoucí geny FBL a NCL byla provedena PCR se stejnými primery i se stejným postupem jako při amplifikaci FBL/NCL z cDNA. Jako templát pro PCR byl použit 1 μ l z každé pozitivně narostlé kolonie v 5 ml LB média s Kanamycinem. Bakterie narostlé v 5 ml a ověřeně na přítomnost pEGFP-FBL a pEGFP-NCL plazmidu byly transferovány do 100 ml LB média

s antibiotikem a kultivovány za stálého třepání v inkubátoru při 37 °C po dobu 24 hodin. pEGFP-FBL a pEGFP-NCL plazmidy byly izolovány z transformovaných bakteriálních kultur použitím QIAGEN Plasmid Kitu, dle přiloženého postupu výrobce. Koncentrace vyizolovaných plazmidů byla změřena spektrofotometricky na Nanodrop spektrofotometru, dle přiloženého postupu výrobce.

4.2. Kultivace buněčných linií a transfekce

Kultivace U2OS buněk

Lidské buňky osteosarkomu U2OS byly pěstovány ve sterilních kultivačních nádobách s Dulbecco's Modified Eagle's médiem s vysokým obsahem glukózy doplněným 10% fetálním telecím sérem a antibiotiky (100 IU/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu). Buňky byly kultivovány při 37 °C v atmosféře 5% CO₂.

Transfekce U2OS buněk pEGFP-FBL a pEGFP-NCL

Do každé jamky dvou 6-jamkových panelů bylo vysazeno 2,5 x 10⁵ buněk. Po 24 hodinách byla provedena transfekce buněk jednoho panelu 2 µg pEGFP-FBL plazmidu a druhého 2 µg pEGFP-NCL plazmidu za použití X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagentu, dle přiloženého návodu. Po 72 hodinách byla úspěšnost transfekce analyzována fluorescenčním mikroskopem. Následně byly transfekované U2OS buňky kultivovány 14 dní, s výměnou média po 3 dnech, v přítomnosti 750 µg/ml Geneticinu (G418). Z obou buněčných linií byly následně za pomoci průtokové cytometrie vyselektovány pouze pozitivní buňky na pEGFP-FBL a pEGFP-NCL.

Selekce GFP-NCL a GFP-FBL pozitivních buněk průtokovým cytometrem

Adherované U2OS-pEGFP-NCL a U2OS-pEGFP-FBL buněčné linie byly opláchnuty 20 ml 1x PBS. K buňkám bylo přidáno 2,5 ml enzymu TrypLE a byly inkubovány 3 minuty v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂. Nakonec bylo přidáno 5 ml Dulbecco's Modified Eagle's média s vysokým obsahem glukózy doplněným 10% fetálním telecím sérem a antibiotiky. Buňky pozitivní na GFP signál byly vyselektovány pomocí průtokového cytometru Aria pracovníkem Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci.

Transfekce U2OS-pEGFP-FBL a U2OS-pEGFP-NCL buněk siRNA-RPL11

siRNA proti RPS11 byla komerčně zakoupena. Do jednoho 6-jamkového panelu bylo do každé jamky vysazeno 2×10^5 U2OS-GFP-FBL buněk a do druhého panelu 2×10^5 U2OS-GFP-NCL buněk. Po 24 hodinách od vysazení buněk byla provedena transfekce buněk ve 2 ze 6 jamek obou panelů 4 μ l siRNA-RPL11 a ve 2 zbylých jamkách byla provedena transfekce 4 μ l „scramble“ siRNA jako negativní kontrola. Scramble siRNA (SCR) má stejné nukleotidové složení, ale ne stejnou sekvenci, jako testovací siRNA. Transfekce byla v obou případech provedena jetPRIME transfection kitem, dle přiloženého návodu výrobce. Po 48 hodinách od transfekce byly transfekované buňky použity pro izolaci mRNA na reverzní transkripci a následnou kvantitativní real-time PCR (q RT-PCR). Po 72 hodinách byly transfekované buňky použity pro fixaci na double rRNA FISH viz schéma č. 1.

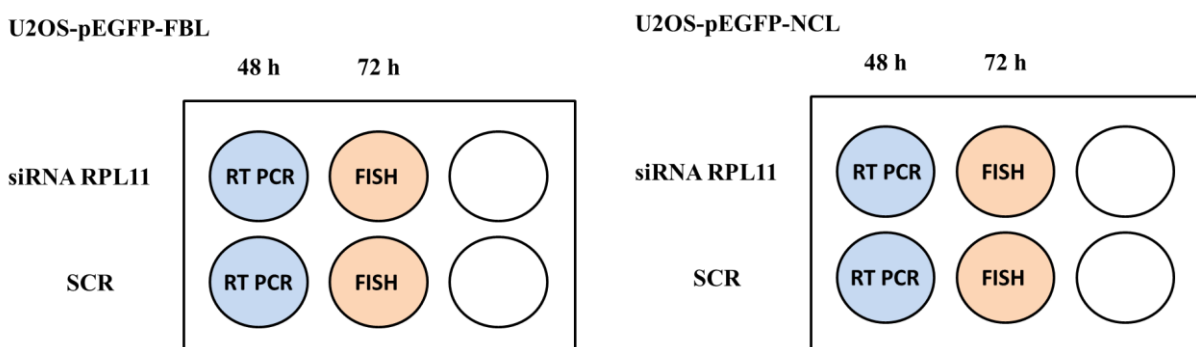


Schéma č. 1: 6-jamkový panel pro transfekci siRNA-RPL11 a scramble siRNA

4.3. Reverzní transkripce a kvantitativní real-time PCR, stanovení exprese RPL11

Celková RNA byla izolována z siRNA-RPL11 a SCR-siRNA transfekovaných U2OS-pEGFP-FBL a U2OS-pEGFP-NCL buněk za použití miRNeasy Mini Kitu, dle přiloženého postupu výrobce. Z celkového množství vyizolované RNA byly použity 3 µg jako templát pro reverzní transkripci. Reakční směs pro reverzní transkripci (30 µl/1 vzorek) se skládá z: 3 µg cDNA; 0,6 µl random primerů; 9,75 µl master mixu; 0,75 µl reverzní transkriptázy a DEPC-vody doplněné na celkový objem 30 µl. Master mix se skládá z 6 µl pufru pro reverzní transkriptázu, 3 µl dNTP a 0,75 µl RNAsinu. Teplotní profil reverzní transkripce viz tabulka č. 5.

Tabulka č. 5: Teplotní profil reverzní transkripce

Proces	Teplota	Čas
Iniciace (RNA + random primery + voda)	70°C	5 min
Reverzní transkripce	42°C	60 min
	70°C	10 min
	4°C	∞

Kvantitativní real-time PCR (qPCR) byla provedena standardním způsobem. Složení reakční směsi viz tabulka č. 6. Jako templát pro qPCR byly použity 2 µl cDNA z reverzní transkripce.

Pro qPCR byl použit následující primery pro RPL11:

Forward primer 5'-AAAGGTGCGGGAGTATGAGT-3'

Reverse primer 5'-GGCCTCCTCTTTGCTGATTC-3'

Pro relativní kvantifikaci exprese mRNA-RPL11 byly použity hodnoty Ct. Relativní kvantifikace byla provedena srovnáním exprese RPL11 ve vzorcích transfekovaných siRNA-RPL11 a negativní kontrolou scramble siRNA s kontrolním genem. Jako kontrolní gen byla použita glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH):

Forward primer 5'-ACCAGGGCTGCTTTAACTCTGGT-3'

Reverse primer 5'-CAAATTTCCATGGCACCGTCAAGG-3'

Množství mRNA transkriptů RPL11 v buňkách transfekovaných siRNA-RPL11 bylo stanoveno s použitím metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabulka č. 6: Složení qPCR reakční směsi

Reagencie	Objem (μl)
10x DNA polymerázový reakční pufr	2 μl
MgCl ₂	1,6 μl
DEPC-Voda	9,6 μl
10mM dNTP	0,4 μl
Směs primerů (f primer + r primer)	2 μl
cDNA	2 μl
EvaGreen	1 μl
100% DMSO	1 μl
5U/μl Taq DNA polymeráza	0,4 μl
CELKOVÝ OBJEM 1 REAKCE	20 μl

4.4. Aplikace cytostatik na U2OS-pEGFP-FBL a U2OS-pEGFP-NCL buněčné linie

Na sklíčka o rozměru 20x20 mm bylo vysazeno 2×10^5 U2OS-GFP-FBL a U2OS-GFP-NCL buněk. Po 24 hodinách byla na buňky samostatně aplikována vybraná cytostatika o určitých koncentracích, viz tabulka č. 7.

Tabulka č. 7: Použitá cytostatika a jejich koncentrace

Název cytostatika	Finální koncentrace
CISPLATINA	10 μM
OXALIPLATINA	6,25 μM
AKTINOMYCIN-D	5 nM
5-FLUOROURACIL	10 μM

Buňky po 24 hodinách od aplikace cytostatik byly fixovány a použity pro double rRNA FISH.

4.5. Double rRNA FISH U2OS-pEGFP-NCL/FBL cytostatiky ošetřených buněk a U2OS-pEGFP-NCL buněk transfekovaných siRNA-RPL11

Fixace buněk

Buňky pěstované na sterilních krycích sklíčkách o rozměru 20x20mm byly 2x po dobu 5 minut promyty ve 2 ml 1x PBS a fixovány po dobu 15 minut v roztoku 4% formaldehyd/1x PBS při pokojové teplotě. Poté byly promyty opět 2x po dobu 5 minut v 1x PBS a 5 minut v 70% etanolu.

Double rRNA FISH

Zafixované buňky na krycích sklíčkách byly promyty 2x po dobu 5 minut v RNA promývacím pufru (2x SSC, 10% formamid). Následně byla provedena hybridizace po dobu 4 hodin se sondami ITS1 a ITS2 specifickými pro určité oblasti na pre-rRNA.

Sekvence sondy ITS1 s Cy3: 5'-CCTCGCCCTCCGGGCTCCGTTAATGATC-3'

Sekvence sondy ITS2 s Cy5: 5'-GCGATTGATCGGCAAGCGACGCTC-3'

Složení hybridizačního média: 10% formamid, 2x SSC, 0.5 mg/ml tRNA, 10% dextran sulfátu, 250 µg/ml BSA, 10 mM ribonucleoside vanadyl complex a 0.5 ng/µl každé sondy. Po hybridizaci byla sklíčka promyta dvakrát po dobu 5 minut v nahřátém RNA promývacím pufru (37 °C). Následně byly promyty v 1x PBS a DNA buněk byla barvena 10 minut barvivem Hoechst 33342 (10 mg/ml) při pokojové. Po inkubaci byla krycí sklíčka promyta v 1x PBS. Nakonec byly vytvořeny trvalé preparáty upevněním krycích sklíček s buňkami na podložní mikroskopická skla montážním médiem a přelakována průhledným lakem.

4.6. Imunofluorescenční značení p53 u U2OS-pEGFP-NCL buněk transfekovaných siRNA-RPL11

U2OS-pEGFP-NCL buňky transfekované siRNA-RPL11 a SCR siRNA byly zafixovány v 4% formaldehydu/1x PBS. Buňky byly inkubovány v blokovací pufru (5% FCSi, 0,3% Triton X) 1 hodinu při pokojové teplotě. Následně byly buňky promývány 3x po dobu 5 minut v 1x PBS. Primární protilátka proti p53 byla naředěna v 5% FBS/1x PBS. Buňky byly s primární protilátkou inkubovány přes noc ve tmě při 4 °C. Po 24 hodinách byly krycí sklíčka

s buňkami opláchnuty 5 minut v 0,1% Tweenu 20/1x PBS, 5 minut v 1x PBS a 5 min v 0,1% Tweenu 20/1x PBS. Poté následovala inkubace 2 hodiny se sekundární protilátkou v 5% FCSi/1x PBS (ředění 1:1000). Následně byly sklička promyty 5 min v 0,1% Tweenu 20/1x PBS a 2x v destilované vodě. DNA buněk byla barvena 10 minut barvivem Hoechst 33342 (10 mg/ml) při pokojové. Nakonec byly vytvořeny trvalé preparáty upevněním krycích sklíček s buňkami na podložní mikroskopická skla montážním médiem a přelakovány průhledným lakem. Analyzována byla hladina a lokalizace p53 u buněk transfekovaných siRNA-RPL11 ve srovnání s negativní kontrolou (buňky transfekované SCR si-RNA).

4.7. Vyhodnocení trvalých preparátů

Trvalé preparáty byly snímány Zeiss konfokálním mikroskopem. Obrázky byly pořízeny a analyzovány ZEN blue softwarem.

4.8. Biologický materiál

Kompetentní bakterie *Escherichia coli* kmen DH5 α (Sigma-Aldrich), pEGFP-C1 plazmid (Clontech), U2OS buněčná linie (Dr. Martin Mistrík, Ústav molekulární a translační medicíny UP Olomouc)

4.9. Přístroje

Centrifuga Rotina 420 R (Hettich), Laminární box (BioAir), Chladnička (Gorenje), Vortex (Genie), Minicentrifuga (Hanil), Thermal cycler PTC (MJR), Analyzátor Vi-cell XR viability (Beckman), Centrifuga 5430 (Eppendorf), Centrifuga MiniSpin (Eppendorf), Flow box HeraSafe (ThermoScientific), CO₂ inkubátor (ThermoScientific), temperovaná vodní lázeň (Mettler), Analytické váhy (Scaltec), Míchačka MR Hei-Tec (Heidolph Instruments GmbH), pH metr (P-LAB), Zdroj stejnosměrného napětí PowerPack HC (Bio-Rad), Inkubátor C 24 Benchtop (New Brunswick Scientific), Mastercycler nexus (Eppendorf), Nanodrop spektrofotometr ND 1000 (Thermo Scientific), Fluorometr Qubit 2.0 (Invitrogen), Konfokální mikroskop Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss), Objektiv Plan Neofluar 100x NA 1,3 (Carl Zeiss), Průtokový cytometr BD FACS Aria II (BD Bioscience)

4.10. Použité chemikálie

Random primery (Promega), RNAsin inhibitor ribonukleáz (Promega), 10 mM deoxyribonukleotidy trifosfáty (Promega), RevertAid H Minus M-M-MuLV reverzní transkriptáza (Fermentas), DEPC-voda (Ambion), MgCl₂ (Thermo Scientific), Thermo-Start PCR pufr 10x (Thermo Scientific), 100% DMSO (Sigma Aldrich), Thermo-Start Taq DNA polymeráza 5 U/μl (Thermo Scientific) 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific), Agar (Thermo Scientific), GelRed (Biotium), GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific), 10x TBE pufr (Thermo Scientific), Agaróza (Sigma Aldrich), Alkalická fosfatáza (BioLabs), EcoRI 10 U/ml (Thermo Scientific), Etanol (Fagron), BamHI 10 U/ml (Thermo Scientific), Qubit dsDNA HS pufr (Thermo Scientific), Qubit dsDNA HS reagent (Thermo Scientific), Dulbecco's Modified Eagles Medium (Sigma Aldrich), Fetální bovinní sérum FCSi (Sigma Aldrich), 38% Formaldehyd (Fagron), Geneticin 418 (Sigma Aldrich), Glycerol (Sigma Aldrich), Hoechst 33342 (Thermo Scientific), Kanamycin (Sigma Aldrich), Penicilin/streptomycin (Sigma-Aldrich), 1x PBS (Invitrogen), 10% Formamid (Invitrogen), 200mM Ribonucleoside Vanadyl Complex (New England BioLabs), 20x SSC (Sigma Aldrich), Montážní médium (Sigma Aldrich), Dextran sulfát (Sigma Aldrich), 10x K restrikční pufr (Takara), T4 DNA ligáza (New England BioLabs), 10x T4 DNA ligační pufr (New England BioLabs), 20x EvaGreen (Biotium), 50 mg/ml 5-Fluorouracil (EBEWE), Aktinomycin-D (Sigma Aldrich), Oxaliplatina (EBEWE), Cisplatina (EBEWE), Tween 20 (Sigma Aldrich), Bovinní sérový albumin BSA (Sigma Aldrich)

4.11. Použité komerční kity

miRNeasy Mini Kit (QIAGEN), QIAquick DNA Gel Extraction Kit (Qiagen), QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), QIAGEN Plasmid Kit (Qiagen), X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent (Sigma Aldrich), jetPRIME Versatile siRNA transfection reagent (Polyplus)

4.12. Primery, protilátky a siRNA

RPL11, GAPDH, FBL a NCL primery; sondy pro rRNA FISH - ITS1 a ITS2 (vše Generi Biotech); siRNA-RPL11 a SCR siRNA (OriGene), primární protilátka p53 FL-393 králík (Santa Cruz), sekundární protilátka Alexa Fluor 568 anti-králík (Thermo Scientific)

5. Výsledky

5.1. Příprava plazmidu pEGFP-FBL a pEGFP-NCL

5.2. Transfekce U2OS buněk pEGFP-NCL a pEGFP-FBL

5.3. Post-transkripční umlčování RPL11

5.4. Inhibice transkripce a zpracování rRNA souvisí se ztrátou nukleolární integrity

5.5. Transkripční umlčení RPL11 nezpůsobuje rozpad struktury jadérka ani zvýšení hladiny p53

6. Diskuze

ZÁVĚR

Cílem práce bylo vytvoření modelu pro buňky v ribozomálním stresu a jeho následná validace. Jako možné markery pro buňky nacházející se v ribozomálním stresu, byly zvoleny dva nukleolární proteiny, nukleolin a fibrilarin. Kombinace určení lokalizace těchto fluorescenčně značených proteinů s metodou double rRNA FISH pro specifické oblasti na pre-rRNA, se ukázala být vhodným systémem pro identifikaci látek, které mohou způsobovat ribozomální stres. Tyto metody jsou vhodné také pro vysokokapacitní screening, který bude proveden v budoucnosti. Dále byla potvrzena funkce RPL11 jako klíčového aktivátoru p53 při p53- dependentním ribozomálního stresu.

LITERATURA

- ANDERSEN, J. S., LAM, Y. W., LEUNG, A. K., ONG, S. E., LYON, C. E., LAMOND, A. I., MANN, M. (2005): Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433: 77-83.
- ASHCROFT, M., TAYA, Y., VOUSDEN, K. H. (2000): Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Molecular and cellular biology* 20: 3224-3233.
- BARAK, Y., GOTTLIEB, E., JUVEN-GERSHON, T., OREN, M. (1994): Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes & development* 8: 1739-1749.
- BERTWISTLE, D., SUGIMOTO, M., SHERR, C. J. (2004): Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Molecular and cellular biology* 24: 985-996.
- BOISVERT, F. M., VAN KONINGSBRUGGEN, S., NAVASCUÉS, J., LAMOND, A. I. (2007): The multifunctional nucleolus. *Nature reviews Molecular cell biology* 8: 574-585.
- BOULON, S., WESTMAN, B. J., HUTTEN, S., BOISVERT, F. M., LAMOND, A. I. (2010): The nucleolus under stress. *Molecular cell* 40: 216-227.
- BURGER, K., MÜHL, B., HARASIM, T., ROHRMOSER, M., MALAMOUSI, A., ORBAN, M., KELLNER, M., GRUBER-EBER, A., KREMMER, E., HÖLZEL, M., EICK, D. (2010): Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *Journal of Biological Chemistry* 285: 12416-12425.
- BURSAĆ, S., BRDOVČAK, M. C., PFANNKUCHEN, M., ORSOLIĆ, I., GOLOMB, L., ZHU, Y., KATZ, CH., DAFTUAR, L., GRABUŠIĆ, K., VUKELIĆ, I., OREN, M., PRIVES, C., VOLAREVIĆ, S., FILIĆ, V. (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* 109: 20467-20472.
- BUSCH, H., SMETANA, K. (1970): *The nucleolus*. New York: Academic Press 557.

CABURET, S., CONTI, C., SCHURRA, C., LEBOFISKY, R., EDELSTEIN, S. J., BENSIMON, A. (2005): Human ribosomal RNA gene arrays display a broad range of palindromic structures. *Genome research* 15: 1079-1085.

CHAKRABORTY, A., UECHI, T., KENMOCHI, N. (2011): Guarding the 'translation apparatus': defective ribosome biogenesis and the p53 signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2: 507-522.

CHEN, D., HUANG, S. (2001): Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *The Journal of cell biology* 153: 169-176.

CHEN, D., ZHANG, Z., LI, M., WANG, W., LI, Y., RAYBURN, E. R., HILL, D. L., WANG, H., ZHANG, R. (2007): Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene* 26: 5029-5037.

DAI, M. S., ARNOLD, H., SUN, X. X., SEARS, R., LU, H. (2007): Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. *The EMBO journal* 26: 3332-3345.

DAI, M. S., LU, H. (2004a): Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *Journal of Biological Chemistry* 279: 44475-44482.

DAI, M. S., SHI, D., JIN, Y., SUN, X. X., ZHANG, Y., GROSSMAN, S. R., LU, H. (2006): Regulation of the MDM2-p53 pathway by ribosomal protein L11 involves a post-ubiquitination mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 281: 24304-24313.

DAI, M. S., ZENG, S. X., JIN, Y., SUN, X. X., DAVID, L., LU, H. (2004b): Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol. Cell. Biol.* 24: 7654-7668.

DANILOVA, N., GAZDA, H. T. (2015): Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *Disease models & mechanisms* 8: 1013-1026.

DEISENROTH, C., FRANKLIN, D. A., ZHANG, Y. (2016): The Evolution of the Ribosomal Protein-MDM2-p53 Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* a026138.

DEN BESTEN, W., KUO, M. L., TAGO, K., WILLIAMS, R. T., SHERR, C. J. (2006): Ubiquitination of, and sumoylation by, the Arf tumor suppressor. *Isr Med Assoc J.* 8: 249-251.

DERENZINI, M. AND PLOTON, D. (1991): Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32: 149-192.

DERENZINI, M., PASQUINELLI, G., O'DONOHUE, M.F., PLOTON, D., THIRY, M., (2006): Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. *J. Histochem. Cytochem.* 54: 131-145.

DERENZINI, M., TRERE, D. (2001): Silver-stained Nucleolar Organizer Regions (AgNOR). *Pathologica* 93: 99-105.

DIMARIO, P. J. (2004): Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. *International review of cytology* 239: 99-178.

DUNDR, M., LENO, G. H., LEWIS, N., REKOSH, D., HAMMARSKJOID, M. L., OLSON, M. O. (1996): Location of the HIV-1 Rev protein during mitosis: inactivation of the nuclear export signal alters the pathway for postmitotic reentry into nucleoli. *Journal of Cell Science* 109: 2239-2251.

DUNDR, M., MISTELI, T., OLSON, M. O. (2000): The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *The Journal of cell biology* 150: 433-446.

ELLEDGE, S. J. (1996): Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274: 1664.

FANG, F., HOSKINS, J., BUTLER, J. S. (2004): 5-fluorouracil enhances exosome-dependent accumulation of polyadenylated rRNAs. *Molecular and Cellular Biology* 24: 10766-10776

FATICA, A., TOLLERVEY, D. (2002): Making ribosomes. *Current opinion in cell biology* 14: 313-318.

FEDORIW, A. M., STARMER, J., YEE, D., MAGNUSON, T. (2012): Nucleolar association and transcriptional inhibition through 5S rDNA in mammals. *PLoS Genet* 8: e1002468.

FUMAGALLI, S., IVANENKOV, V. V., TENG, T., THOMAS, G. (2012): Suprainduction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. *Genes & development* 26: 1028-1040.

GAUTIER, T., ROBERT-NICOUD, M., GUILLY, M. N., HERNANDEZ-VERDUN, D. (1992): Relocation of nucleolar proteins around chromosomes at mitosis. A study by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Cell Science* 102: 729-737.

GERBI, S. A., BOROVJAGIN, A. V. (2004): Pre-ribosomal RNA processing in multicellular organisms. *The Nucleolus* 170-198.

GHOSHAL, K., JACOB, S. T. (1997): An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. *Biochemical pharmacology* 53: 1569-1575.

GILKES, D. M., CHEN, L., CHEN, J. (2006): MDMX regulation of p53 response to ribosomal stress. *EMBO J.* 25: 5614-5625.

GRIMM, T., HÖLZEL, M., ROHRMOSER, M., HARASIM, T., MALAMOUSI, A., GRUBER-EBER, A., EICK, D. (2006): Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex. *Nucleic acids research* 34: 3030-3043.

HADJIOLOV, A. A. (1985): Ribosome biogenesis in the life cycle of normal and cancer cells. *The Nucleolus and Ribosome Biogenesis*. Springer Wien 165-196.

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.

HE, H., SUN, Y. (2007): Ribosomal protein S27L is a direct p53 target that regulates apoptosis. *Oncogene* 26: 2707-2716.

HEIN, N., HANNAN, K. M., GEORGE, A. J., SANIJ, E., HANNAN, R. D. (2013): The nucleolus: an emerging target for cancer therapy. *Trends in molecular medicine* 19: 643-654.

HEIX, J., VENDE, A., VOIT, R., BUDDE, A., MICHAELIDIS, T. M., GRUMMT, I. (1998): Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *The EMBO journal* 17:7373-7381.

HERNANDEZ-VERDUN, D. (2006): Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochemistry and cell biology* 125: 127-137.

HERNANDEZ-VERDUN, D., BOUTEILLE, M. (1979): Nucleologensis in chick erythrocyte nuclei reactivated by cell fusion. *Journal of ultrastructure research* 69: 164-179.

HERNANDEZ- VERDUN, D., ROUSSEL, P., THIRY, M., SIRRI, V., LAFONTAINE, D. L. (2010): The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 1: 415-431.

HIRSCH, C. A., HIATT, H. H. (1966): Turnover of liver ribosomes in fed and in fasted rats. *Journal of Biological Chemistry* 241: 5936-5940.

HONDA, R., YASUDA, H. (1999): Association of p19ARF with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *The EMBO journal* 18: 22-27.

HUANG, L., YAN, Z., LIAO, X., LI, Y., YANG, J., WANG, Z. G., YUAN, Z. M. (2011): The p53 inhibitors MDM2/MDMX complex is required for control of p53 activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 12001-12006.

IADAVAIA, V., CALDAROLA, S., BIONDINI, L., GISMONDI, A., KARLSSON, S., DIANZANI, I., LORENI, F. (2010): PIM1 kinase is destabilized by ribosomal stress causing inhibition of cell cycle progression. *Oncogene* 29: 5490-5499.

JAMES, A., WANG, Y., RAJE, H., ROSBY, R., DIMARIO, P. (2014): Nucleolar stress with and without p53. *Nucleus* 5: 402-426.

JIN, A., ITAHANA, K., O'KEEFE, K., AND ZHANG, Y. (2004): Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol. Cell. Biol* 24: 7669-7680.

JORDAN, P., CARMO-FONSECA, M. (1998): Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA in vivo. *Nucleic acids research* 26: 2831-2836.

JUNERA, H. R., MASSON, C., GERAUD, G., HERNANDEZ-VERDUN, D. (1995): The three-dimensional organization of ribosomal genes and the architecture of the nucleoli vary with G1, S and G2 phases. *Journal of cell science* 108: 3427-3441.

KENT, T., LAPIK, Y. R., PESTOV, D. G. (2009): The 5' external transcribed spacer in mouse ribosomal RNA contains two cleavage sites. *RNA* 15: 14-20.

KLINGE, S., VOIGTS-HOFFMANN, F., LEIBUNDGUT, M., BAN, N. (2012): Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends in biochemical sciences* 37: 189-198.

KORGAONKAR, C., HAGEN, J., TOMPKINS, V., FRAZIER, A. A., ALLAMARGOT, C., QUELLE, F. W., QUELLE, D. E. (2005): Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Molecular and cellular biology* 25: 1258-1271.

KRESSLER, D., HURT, E., BABLER, J. (2010): Driving ribosome assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1803: 673-683.

KRESSLER, D., LINDER, P., DE LA CRUZ, J. (1999): Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 19: 7897-7912.

KRUSE, J. P., AND GU, W. (2009): Modes of p53 regulation. *Cell* 137: 609-622.

LAFONTAINE, D. L., TOLLERVEY, D. (1998): Birth of the snoRNPs: the evolution of the modification-guide snoRNAs. *Trends in biochemical sciences* 23: 383-388.

LAM, Y. W., LAMOND, A. I., MANN, M., ANDERSEN, J. S. (2007): Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Curr. Biol.* 17: 749-760.

LAMAYE, F., GALLIOT, S., ALIBARDI, L., LAFONTAINE, D. L., THIRY, M. (2011): Nucleolar structure across evolution: the transition between bi- and tricompartmentalized nucleoli lies within the class Reptilia. *Journal of structural biology* 174: 352-359.

LANCTÔT, C., CHEUTIN, T., CREMER, M., CAVALLI, G., CREMER, T. (2007): Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nature Reviews Genetics* 8: 104-115.

LAVAL, M., HERNANDEZ-VERDUN, D., BOUTEILLE, M. (1981): Remnant nucleolar structures and residual RNA synthesis in chick erythrocytes. *Experimental cell research* 132: 157-167.

LEUNG, A. K. L., GERLICH, D., MILLER, G., LYON, C., LAM, Y. W., LLERES, DAIGLE, N., ZOMERDIJK, J., ELLENBERG, J., LAMOND, A. I. (2004): Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *The Journal of cell biology* 166: 787-800.

- LI, J., YU, L., ZHANG, H., WU, J., YUAN, J., LI, X., LI, M. (2009): Down-regulation of pescadillo inhibits proliferation and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cancer science* 100: 2255-2260.
- LINDSTRÖM, M. S. (2009): Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation. *Biochemical and biophysical research communications* 379: 167-170.
- LINDSTRÖM, M. S., DEISENROTH, C., ZHANG, Y. (2007): Putting a finger on growth surveillance: Insight into MDM2 zinc finger ribosomal protein interactions. *Cell Cycle* 6: 434-437.
- LINDSTRÖM, M. S., NISTÉR, M. (2010): Silencing of ribosomal protein S9 elicits a multitude of cellular responses inhibiting the growth of cancer cells subsequent to p53 activation. *PloS one* 5: e9578.
- LLANOS, S., CLARK, P. A., ROWE, J., PETERS, G. (2001): Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus. *Nature cell biology* 3: 445-452.
- LOHRUM, M. A., ASHCROFT, M., KUBBUTAT, M. H., VOUSDEN, K. H. (2000): Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. *Nature cell biology* 2: 179-181.
- LOHRUM, M. A., LUDWIG, R. L., KUBBUTAT, M. H., HANLON, M., VOUSDEN, K. H. (2003): Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer cell* 3: 577-587.
- LONGLEY, D. B., HARKIN, D. P., JOHNSTON, P. G. (2003): 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* 3: 330-338.
- LYDALL, D., NIKOLSKY, Y., BISHOP, D. K., WEINERT, T. (1996): A meiotic recombination checkpoint controlled by mitotic checkpoint genes. *Nature* 383: 840.
- MANFREDI, J. J. (2010): The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes & development* 24: 1580-1589.
- MARINE, J. C. W., DYER, M. A., JOCHEMSEN, A. G. (2007): MDMX: from bench to bedside. *Journal of cell science* 120: 371-378.

MARINE, J. C., JOCHEMSEN, A. G. (2004): Mdmx and Mdm2: brothers in arms?. *Cell Cycle* 3: 898-902.

MARINE, J. C., JOCHEMSEN, A. G. (2005): Mdmx as an essential regulator of p53 activity. *Biochemical and biophysical research communications* 331: 750-760.

MATERA, A. G., IZAGUIRE-SIERRA, M., PRAVEEN, K., RAJENDRA, T. K. (2009): Nuclear bodies: random aggregates of sticky proteins or crucibles of macromolecular assembly?. *Developmental cell* 17: 639-647.

MCKEE, A. H., KLECKNER, N. (1997): Mutations in *Saccharomyces cerevisiae* that block meiotic prophase chromosome metabolism and confer cell cycle arrest at pachytene identify two new meiosis-specific genes SAE1 and SAE3. *Genetics* 146: 817-834.

MEEK, D. W. (2009): Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat. Rev. Cancer* 9: 714-723.

MEYER, N., PENN, L. Z. (2008): Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews Cancer* 8: 976-990.

MIDGLEY, C. A., DESTERRO, J. M., SAVILLE, M. K., HOWARD, S., SPARKS, A., HAY, R. T., LANE, D. P. (2000): An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo. *Oncogene* 19: 2312.

MILKEREIT, P., GADAL, O., PODTELEJNIKOV, A., TRUMTEL, S., GAS, N., PETFALSKI, E., TSCHOCHNER, H. (2001): Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. *Cell* 105: 499-509.

MITCHELL, A. P. (1994): Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* 58: 56-70.

MOLL, U. M., PETRENKO, O. (2003): The MDM2-p53 interaction. *Molecular Cancer Research* 1: 1001-1008.

MOMAND, J., ZAMBETTI, G. P., OLSON, D. C., GEORGE, D., LEVINE, A. J. (1992): The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69: 1237-1245.

MONTANARO, L., MAZZINI, G., BARBIERI, S., VICI, M., NARDI-PANTOLI, A., GOVONI, M., DONATI, G., TRERÉ, D., DERENZINI, M. (2007): Different effects of ribosome biogenesis inhibition on cell proliferation in retinoblastoma protein- and p53-deficient and proficient human osteosarcoma cell lines. *Cell proliferation* 40: 532-549.

MORGADO-PALACIN, L., LLANOS, S., SERRANO, M. (2012): Ribosomal stress induces L11- and p53-dependent apoptosis in mouse pluripotent stem cells. *Cell Cycle* 11: 503-510.

MORGAN, D. O. (1997): Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual review of cell and developmental biology* 13: 261-291.

MORISHITA, D., KATAYAMA, R., SEKIMIZU, K., TSURUO, T., FUJITA, N. (2008): Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer research* 68: 5076-5085.

MOSS, T., STEFANOVSKY, V. Y. (2002): At the center of eukaryotic life. *Cell* 109: 545-548.

MOUGEY, E. B., O'REILLY, M., OSHEIM, Y., MILLER, O. L., BEYER, A., SOLLNER-WEBB, B. (1993): The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes & Development* 7: 1609-1619.

NAG, S., QIN, J., SRIVENUGOPAL, K. S., WANG, M., ZHANG, R. (2013): The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res.* 27: 254-271.

OCHS, R. L. (1997): Methods used to study structure and function of the nucleolus. *Methods in cell biology* 53: 303-321.

OCHS, R. L., LISCHWE, M. A., SPOHN, W. H., BUSCH, H. (1985): Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biology of the Cell* 54: 123-133.

OLSON, M. O. (2004): Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus. *Sci STKE* 224:10.

OLSON, M. O. J., DUNDR, M. (2005): The moving parts of the nucleolus. *Histochemistry and cell biology* 123: 203-216.

OLSON, M. O., DUNDR, M., SZEBENI, A. (2000): The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends in cell biology* 10: 189-196.

OSHEIM, Y. N., FRENCH, S. L., KECK, K. M., CHAMPION, E. A., SPASOV, K., DRAGON, F., BASERGA, S. J., Beyer, A. L. (2004): Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell* 16: 943-954.

PEDERSON, T. (2011): The nucleolus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3: a000638.

PERRY, R. P. (2007): Balanced production of ribosomal proteins. *Gene* 401: 1-3.

PESTOV, D. G., STREZOSKA, Z., LAU, L. F. (2001): Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G1/S transition. *Molecular and cellular biology* 21: 4246-4255.

PHAIR, R. D., MISTELI, T. (2000): High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* 404: 604-609.

PHIPPS, K. R., CHARETTE, J. M., BASERGA, S. J. (2011): The small subunit processome in ribosome biogenesis-progress and prospects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 2: 1-21.

PRIVES, C. (1998): Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 95: 5-8.

RAŠKA, I., SHAW, P. J., CMARKO, D. (2006): Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Current opinion in cell biology* 18: 325-334.

ROUSSEL, P., ANDRÉ, C., COMAI, L., HERNANDEZ-VERDUN, D. (1996): The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *The Journal of Cell Biology* 133: 235-246.

RUGGERO, D., PANDOLFI, P. P. (2003): Does the ribosome translate cancer?. *Nature Reviews Cancer* 3: 179-192.

SAN-SEGUNDO, P. A., ROEDER, G. S. (1999): Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. *Cell* 97: 313-324.

SAVINO, T. M., GÉBRANE-YOUNÈS, J., DE MEY, J., SIBARITA, J. B., HERNANDEZ-VERDUN, D. (2001): Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *The Journal of cell biology* 153: 1097-1110.

SCHEER, U., HOCK, R. (1999): Structure and function of the nucleolus. *Current opinion in cell biology* 11: 385-390.

SCHEER, U., THIRY, M., GOESSENS, G. (1993): Structure, function and assembly of the nucleolus. *Trends in cell biology* 3: 236-241.

SHANGARY, S., WANG, S. (2009): Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology* 49: 223-241.

SHAULSKY, G., BEN-ZE'EV, A., ROTTER, V. (1990): Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene* 5: 1707-1711.

SHERR, C. J., MCCORMICK, F. (2002): The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell* 2: 103-112.

SHERR, C. J., WEBER, J. D. (2000): The ARF/p53 pathway. *Current opinion in genetics & development* 10: 94-99.

SHOU, W., SEOL, J. H., SHEVCHENKO, A., BASKERVILLE, C., MOAZED, D., CHEN, Z. S., DESHAIES, R. J. (1999): Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* 97: 233-244.

SIRRI, V., HERNANDEZ-VERDUN, D., ROUSSEL, P. (2002): Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. *The Journal of cell biology* 156: 969-981.

SIRRI, V., ROUSSEL, P., HERNANDEZ-VERDUN, D. (2000): In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *The Journal of cell biology* 148: 259-270.

SKOWYRA, D., CRAIG, K. L., TYERS, M., ELLEDGE, S. J., HARPER, J. W. (1997): F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91: 209-219.

SLOAN, K. E., BOHNSACK, M. T., WATKINS, N. J. (2013): The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell reports* 5: 237-247.

STRAIGHT, A. F., SHOU, W., DOWD, G. J., TURCK, C. W., DESHAIES, R. J., JOHNSON, A. D., MOAZED, D. (1999): Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* 97: 245-256.

SUN, X. X., DAI, M. S., LU, H. (2007): 5-fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction. *Journal of Biological Chemistry* 282: 8052-8059.

TANIMURA, S., OHTSUKA, S., MITSUI, K., SHIROUZU, K., YOSHIMURA, A., OHTSUBO, M. (1999): MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS letters* 447: 5-9.

TENG, T., MERCER, C. A., HEXLEY, P., THOMAS, G., FUMAGALLI, S. (2013): Loss of tumor suppressor RPL5/RPL11 does not induce cell cycle arrest but impedes proliferation due to reduced ribosome content and translation capacity. *Molecular and cellular biology* 33: 4660-4671.

THIRY, M., CHEUTIN, T., O'DONOHUE, M. F., KAPLAN, H., PLOTON, D. (2000): Dynamics and three-dimensional localization of ribosomal RNA within the nucleolus. *RNA* 6: 1750-1761.

THIRY, M., LAFONTAINE, D. L. (2005): Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends in cell biology* 15: 194-199.

THOMAS, G. (2000): An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nature cell biology* 2: 71-72.

TSAI, R. Y., PEDERSON, T. (2014): Connecting the nucleolus to the cell cycle and human disease. *The FASEB Journal* 28: 3290-3296.

TSCHOCHNER, H., HURT, E. (2003): Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends in cell biology* 13: 255-263.

VAN RIGGELEN, J., YETIL, A., FELSHER, D. W. (2010): MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nature reviews Cancer* 10: 301-309.

VERHEGGEN, C., LE PANSE, S., ALMOUZNI, G., HERNANDEZ-VERDUN, D. (2001): Maintenance of nucleolar machineries and pre-rRNAs in remnant nucleolus of erythrocyte nuclei and remodeling in *Xenopus* egg extracts. *Experimental cell research* 269: 23-34.

VISINTIN, R., AMON, A. (2000): The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Current opinion in cell biology* 12: 372-377.

VISINTIN, R., CRAIG, K., HWANG, E. S., PRINZ, S., TYERS, M., AMON, A. (1998): The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Molecular cell* 2: 709-718.

VISINTIN, R., HWANG, E. S., AMON, A. (1999): Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature* 398: 818-823.

VOGELSTEIN, B., LANE, D., LEVINE, A. J. (2000): Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310.

VOUSDEN, K. H., PRIVES, C. (2009): Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* 137: 413-431.

WADE, M., WANG, Y. V., WAHL, G. M. (2010): The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends in cell biology* 20: 299-309.

WEBER, J. D., TAYLOR, L. J., ROUSSEL, M. F., SHERR, C. J., BAR-SAGI, D. (1999): Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nature cell biology* 1: 20-26.

WHITE, J., STELZER, E. (1999): Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends in cell biology* 9: 61-65.

WORTON, R. G., SUTHERLAND, J., SYLVESTER, J. E., WILLARD, H. F., BODRUG, S., DUBÉ, I., RAY, P. N. (1988): Human ribosomal RNA genes: orientation of the tandem array and conservation of the 5'end. *Science* 239: 64-69.

XIONG, X., ZHAO, Y., HE, H., SUN, Y. (2011): Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator. *Oncogene* 30: 1798-1811.

ZHANG, Q., XIAO, H., CHAI, S. C., HOANG, Q. Q., LU, H. (2011): Hydrophilic residues are crucial for ribosomal protein L11 (RPL11) interaction with zinc finger domain of MDM2 and p53 protein activation. *Journal of Biological Chemistry* 286: 38264-38274.

ZHANG, X., WANG, W., WANG, H., WANG, M. H., XU, W., ZHANG, R. (2013): Identification of ribosomal protein S25 (RPS25)–MDM2–p53 regulatory feedback loop. *Oncogene* 32: 2782-2791.

ZHANG, Y., LU, H. (2009): Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer cell* 16: 369-377.

ZHANG, Y., WOLF, G. W., BHAT, K., JIN, A., ALLIO, T., BURKHART, W. A., XIONG, Y. (2003): Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Molecular and cellular biology* 23: 8902-8912.

ZHANG, Y., XIONG, Y. (1999): Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Molecular cell* 3: 579-591.

ZHANG, Y., XIONG, Y. (2001): Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. *Cell growth and differentiation* 12: 175-186.

ZHENG, J., LANG, Y., ZHANG, Q., CUI, D., SUN, H., JIANG, L., CHEN, Z., ZHANG, R., GAO, Y., TIAN, W., TANG, J., CHEN, Z., WU, W. (2015): Structure of human MDM2 complexed with RPL11 reveals the molecular basis of p53 activation. *Genes & development* 29: 1524-1534.

ZHOU, X., HAO, Q., LIAO, J. M., LIAO, P., LU, H. (2013b): Ribosomal protein S14 negatively regulates c-Myc activity. *Journal of Biological Chemistry* 288: 21793-21801.

ZHOU, X., HAO, Q., LIAO, J. M., ZHANG, Q., LU, H. (2013a): Ribosomal protein S14 unites the MDM2–p53 loop upon ribosomal stress. *Oncogene* 32: 388-396.

ZHU, Y., POYUROVSKY, M. V., LI, Y., BIDERMAN, L., STAHL, J., JACQ, X., PRIVES, C. (2009): Ribosomal protein S7 is both a regulator and a substrate of MDM2. *Molecular cell* 35: 316-326.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3'-ETS	3'-vnější transkribovaný spacer
5'-ETS	5'-vnější transkribovaný spacer
5S RNP	5S ribonukleoproteinová částice
p19Arf	alternate reading frame protein of CDKN2A locus
ATP	adenosintrifosfát
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bop1	block of proliferation 1 protein
BSA	bovinní sérový albumin
Bxdc1	brix-domain containing 1 protein
CDK	cyklin dependentní kinázy
c-Myc	myelocytomatosis protein
DFC	denzní fibrilární komponent
DNA pol	DNA polymeráza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E2F	E2F transkripční faktor
FBL	fibrilarin
FC	fibrilární centra
FCSi	fetální bovinní sérum
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
Gadd45	growth arrest and DNA damage-inducible 45 protein
GC	granulární komponent
GFP	green fluorescent protein
GTP	guanosintrifosfát
CH	kondenzovaný chromatin
ITS1	vnitřní transkribovaný spacer 1
ITS2	vnitřní transkribovaný spacer 2
LSU	velká ribozomální podjednotka
Mdm2	mouse double minute 2 protein
MdmX	homolog Mdm2 protienu

MYC	gen kódující c-myc protein
NCL	nukleolin
NDF	nucleolar-derived foci
NoLS	nukleolární lokalizační signál
NOR	organizátor jadérka
NPM/B23	nukleofosmin
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p27	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p53	tumor protein p53
PBS	phosphate buffered saline; fosfátový pufr
Pch2	pachytene checkpoint protein
Pict1	GLTSCR2, glioma tumor suppressor candidate region gene 2
Pim1	proto-oncogene, serine/threonine kinase
PNB	pre-nukleolární částice
PR	perichromozomální oblast
pRB	retinoblastomový protein
Puma	p53-upregulated modulator of apoptosis
RB1	retinoblastoma; retinoblastomový gen
rDNA	ribozomální DNA
RNA pol	RNA polymeráza
RNA	ribonukleová kyselina
RPA16	RNA polymerase I subunit 16
RPA194	RNA polymerase I subunit 194
RPA20	RNA polymerase I subunit 20
RPA39	RNA polymerase I subunit 39
RPL	ribozomální protein malé ribozomální podjednotky (40S)
RPS	ribozomální protein velké ribozomální podjednotky (60S)
RPs	ribozomální proteiny
rRNA	ribozomální RNA
Rrs1	ribosome biogenesis regulatory protein homolog
Sic1	stoichiometrický inhibitor of Cdk1

siRNA	small interfering RNA
snoRNA	malé nukleolární RNA
snoRNP	nukleolární ribonukleoproteinové částice
SRP	signal recognition particle
SSC	saline-sodium citrate buffer; citrátový solný pufr
TFIIIB	transkripční faktor b RNA polymerázy III
TP53	gen kódující p53 protein
U2OS	Homo sapiens bone osteosarcoma
UBF	upstream binding faktor
Wdr12	WD repeat domain 12 protein
YFP	yellow fluorescent protein

PŘÍLOHA

Sekvence FBL amplifikována z cDNA pomocí PCR:

ATGAAGCCAGGATTCAGTCCCCGTGGGGGTGGCTTTGGCGGCCGAGGGGGCTTTG
GTGACCGTGGTGGTCGTGGAGGCCGAGGGGGCTTTGGCGGGGGCCGAGGTCGAG
GCGGAGGCTTTAGAGGTCGTGGACGAGGAGGAGGTGGAGGCGGCGGCGGCGGTG
GAGGAGGAGGAAGAGGTGGTGGAGGCTTCCATTCTGGTGGCAACCGGGGTCGTG
GTCGGGGAGGAAAAGAGGAAACCAGTCGGGGAAGAATGTGATGGTGGAGCCGC
ATCGGCATGAGGGTGTCTTCATTTGTTCGAGGAAAGGAAGATGCACTGGTCACCAA
GAACCTGGTCCCTGGGGAATCAGTTTATGGAGAGAAGAGAGTCTCGATTTCCGAA
GGAGATGACAAAATTGAGTACCGAGCCTGGAACCCCTTCCGCTCCAAGCTAGCAG
CAGCAATCCTGGGTGGTGTGGACCAGATCCACATCAAACCGGGGGCTAAGGTTCT
CTACCTCGGGGCTGCCTCGGGCACCACGGTCTCCCATGTCTCTGACATCGTTGGTC
CGGATGGTCTAGTCTATGCAGTCGAGTTCTCCCACCGCTCTGGCCGTGACCTCATT
AACTTGGCCAAGAAGAGGACCAACATCATTCTGTGATCGAGGATGCTCGACACC
CACACAAATACCGCATGCTCATCGCAATGGTGGATGTGATCTTTGCTGATGTGGCC
CAGCCAGACCAGACCCGGATTGTGGCCCTGAATGCCACACCTTCCTGCGTAATG
GAGGACACTTTGTGATTTCCATTAAGGCCAACTGCATTGACTCCACAGCCTCAGCC
GAGGCCGTGTTTGCCTCCGAAGTGAAAAGATGCAACAGGAGAACATGAAGCCG
CAGGAGCAGTTGACCCTTGAGCCATATGAAAGAGACCATGCCGTGGTTCGTGGGAG
TGTACAGGCCACCCCCCAAGGTGAAGAAGTGAAGTTCAGCGCTGTCAGGAT

Sekvence NCL amplifikována z cDNA pomocí PCR:

ATGGTGAAGCTCGCGAAGGCAGGTAAAAATCAAGGTGACCCCAAGAAAATGGCT
CCTCCTCCAAAGGAGGTAGAAGAAGATAGTGAAGATGAGGAAATGTCAGAAGAT
GAAGAAGATGATAGCAGTGGAGAAGAGGTCGTCATACCTCAGAAGAAAGGCAAG
AAGGCTGCTGCAACCTCAGCAAAGAAGGTGGTTCGTTTCCCCAACAAAAAGGTTG
CAGTTGCCACACCAGCCAAGAAAGCAGCTGTCACTCCAGGCCAAAAAGGCAGCAG
CAACACCTGCCAAGAAGACAGTTACACCAGCCAAAGCAGTTACCACACCTGGCAA
GAAGGGAGCCACACCAGGCAAAGCATTGGTAGCAACTCCTGGTAAGAAGGGTGC
TGCCATCCCAGCCAAGGGGGCAAAGAATGGCAAGAATGCCAAGAAGGAAGACAG
TGATGAAGAGGAGGATGATGACAGTGAGGAGGATGAGGAGGATGACGAGGACG
AGGATGAGGATGAAGATGAAATTGAACCAGCAGCGATGAAAGCAGCAGCTGCTG
CCCCTGCCTCAGAGGATGAGGACGATGAGGATGACGAAGATGATGAGGATGACG
ATGACGATGAGGAAGATGACTCTGAAGAAGAAGCTATGGAGACTACACCAGCCA
AAGGAAAGAAAGCTGCAAAGTTGTTCCCTGTGAAAGCCAAGAACGTGGCTGAGG
ATGAAGATGAAGAAGAGGATGATGAGGACGAGGATGACGACGACGACGAAGAT
GATGAAGATGATGATGATGAAGATGATGAGGAGGAGGAAGAAGAGGAGGAGGA
AGAGCCTGTCAAAGAAGCACCTGGAAAACGAAAGAAGGAAATGGCCAAACAGAA
AGCAGCTCCTGAAGCCAAGAAACAGAAAGTGGAAAGGCACAGAACCGACTACGGC
TTTCAATCTCTTTGTTGGAAACCTAAACTTTAACAATCTGCTCCTGAATTA AAAA
CTGGTATCAGCGATGTTTTTGCTAAAAATGATCTTGCTGTTGTGGATGTCAGAATT
GGTATGACTAGGAAATTTGGTTATGTGGATTTTGAATCTGCTGAAGACCTGGAGA
AAGCGTTGGAACCTCACTGGTTTGAAAGTCTTTGGCAATGAAATTA AACTAGAGAA
ACCAAAGGAAAAGACAGTAAGAAAGAGCGAGATGCGAGAACA CTTTTGGCTAA
AAATCTCCCTTACAAAGTCACTCAGGATGAATTGAAAGAAGTGTTTGAAGATGCT
GCGGAGATCAGATTAGTCAGCAAGGATGGGAAAAGTAAAGGGATTGCTTATATTG
AATTTAAGACAGAAGCTGATGCAGAGAAAACCTTTGAAGAAAAGCAGGGAACAG
AGATCGATGGGCGATCTATTTCCCTGTACTATACTGGAGAGAAAGGTCAA AATCA
AGACTATAGAGGTGGAAAGAATAGCACTTGGAGTGGTGAATCAAAA ACTCTGGTT
TTAAGCAACCTCTCCTACAGTGCAACAGAAGAACTCTTCAGGAAGTATTTGAGA
AAGCAACTTTTATCAAAGTACCCAGAACCAAAAATGGCAAATCTAAAGGGTATGC
ATTTATAGAGTTTGCTTCATTCGAAGACGCTAAAGAAGCTTTAAATTCCTGTAATA

AAAGGGAAATTGAGGGCAGAGCAATCAGGCTGGAGTTGCAAGGACCCAGGGGAT
CACCTAATGCCAGAAGCCAGCCATCCAAAACCTCTGTTTGTCAAAGGCCTGTCTGA
GGATAACCACTGAAGAGACATTAAAGGAGTCATTTGACGGCTCCGTTTCGGGCAAGG
ATAGTTACTGACCGGGAAACTGGGTCCTCCAAAGGGTTTGGTTTTGTAGACTTCAA
CAGTGAGGAGGATGCCAAAGCTGCCAAGGAGGCCATGGAAGACGGTGAAATTGA
TGGAATAAAGTTACCTTGGACTGGGCCAAACCTAAGGGTGAAGGTGGCTTCGGG
GGTCGTGGTGGAGGCAGAGGCGGCTTTGGAGGACGAGGTGGTGGTAGAGGAGGC
CGAGGAGGATTTGGTGGCAGAGGCCGGGGAGGCTTTGGAGGGCGAGGAGGCTTC
CGAGGAGGCAGAGGAGGAGGAGGTGACCACAAGCCACAAGGAAAGAAGACGAA
GTTTGAATAGCTTCTGTCCCTCTGCTTTCCCTTTTCCATTTGAAAGAAAGGACTCTG
GGTTTTTACTGTTACCTGATCAATGACAGAGCCTTCTGAGGACATTCCAAGACAG
TATACAGTCCTGTGGTCTCCTTGGGA