

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Role proteinu MTBP při aktivaci kinasy ATR

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Adéla Baťová**
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: 1406R012 Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Ing. Pavel Moudrý, Ph.D.**
Rok: 2021

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

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především panu Ing. Pavlu Moudrému, Ph.D., za uvedení do dané problematiky, jeho ochotu, trpělivost a také veškerý čas, který mi jako školitel věnoval při vypracovávání této bakalářské práce. Děkuji také za jeho odborné rady týkající se problematiky řešeného tématu. Bez něj by tato práce nemohla vzniknout. Zároveň bych chtěla také poděkovat i ostatním zaměstnancům z Laboratoře integrity genomu Ústavu molekulární a translační medicíny, kteří mi byli nápomocni a poskytli mi rady při realizaci experimentální části této práce.

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Adéla Baťová |
| Název | Role proteinu MTBP při aktivaci kinasy ATR |
| Typ práce | bakalářská |
| Pracoviště | Laboratoř integrity genomu, Ústav Molekulární a translační medicíny |
| Vedoucí práce | Ing. Pavel Moudrý, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2021 |

Abstrakt

Ačkoli proteiny TopBP1, Treslin a MTBP spolu interagují a koordinují replikaci DNA, mají tyto proteiny opačné efekty na rychlost replikačních vidlic. Kinasa ATR se účastní checkpointových drah buněčného cyklu, ovlivňuje spouštění počátku replikace DNA a rychlosti postupu replikačních vidlic. Bylo prokázáno, že replikační proteiny TopBP1, a do jisté míry i Treslin, jsou potřebné pro aktivaci kinasy ATR. Tyto proteiny se spolu s MTBP účastní iniciační fáze replikace DNA, kdy jsou zodpovědné za vazbu replikačních faktorů. Zda má i protein MTBP roli v aktivaci kinasy ATR nebylo zatím objasněno. V této bakalářské práci byla otestována aktivita kinasy ATR pomocí fosforylace substrátu Chk1 za podmínek replikačního stresu indukovaného hydroxyureou a aphidicolinem v buňkách s a bez proteinu MTBP. Následně bylo posouzeno, do jaké míry přispívá protein MTBP k aktivaci kinasy ATR. Ukázali jsme, že protein MTBP má vliv na aktivaci kinasy, jelikož při umlčení exprese metodou siRNA transfekce došlo ke snížení míry fosforylace Chk1, substrátu kinasy ATR, ve srovnání s buňkami obsahujícími MTBP. Na závěr byl popsán i vztah proteinů Treslin a MTBP v komplexu Treslin–MTBP.

| | |
|---------------|---|
| Klíčová slova | Kinasa ATR, MTBP, spouštění počátků replikace DNA, rychlost replikace DNA, replikační stres, U-2 OS |
| Počet stran | 60 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|---------------------------------|---|
| Author's first name and surname | Adéla Baťová |
| Title | The possible role of MTBP in ATR activation |
| Type of thesis | Bachelor |
| Department | Laboratory of genome integrity, Institute of Molecular and Translational medicine |
| Supervisor | Ing. Pavel Moudrý, Ph.D |
| The Year of Presentation | 2021 |

Abstract

Whereas TopBP1, Treslin, and MTBP interact with each other and coordinate the DNA replication, not all of them have the same effects on replication fork speed. ATR kinase has a role in checkpoint signaling, triggering origin firing of DNA replication and DNA replication speed fork regulation. In the previous studies, it has been proved that TopBP1 and to some extent Treslin are required for ATR activation. Together with MTBP, these proteins cooperate together in initiation of DNA replication, where their function is loading replication factors into replication origins. It has not been proved whether the MTBP protein has a role in ATR activation. In this study the ATR activity was tested by observation of Chk1 phosphorylation under the conditions of replication stress induced by hydroxyurea and aphidicolin in the cells with and without MTBP protein. These experiment was followed by decision to what extent MTBP protein contribute to ATR activation. In conclusion it was demonstrated that MTBP has an impact on ATR activation because after MTBP knockdown the phosphorylation of Chk1, the ATR substrate, was reduced in comparison with the control cells. At the end the link between Treslin and MTBP which are in complex was mentioned.

| | |
|----------------------|--|
| Keywords | ATR kinase, MTBP, origin firing, DNA replication speed, replication stress, U-2 OS |
| Number of pages | 60 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

Obsah

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | ÚVOD..... | 9 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST..... | 10 |
| 2.1 | Buněčný cyklus a jeho regulace..... | 10 |
| 2.2 | Reakce na poškození DNA a PIKK..... | 10 |
| 2.3 | Kinasa ATR..... | 12 |
| 2.3.1 | Rozdíl mezi kinasami ATR a ATM..... | 12 |
| 2.3.2 | Mechanismus aktivace kinasy ATR..... | 13 |
| 2.3.3 | Substráty kinasy ATR..... | 17 |
| 2.3.3.1 | Chk1..... | 18 |
| 2.3.3.2 | RPA32..... | 19 |
| 2.4 | Mechanismus spouštění počátků replikace DNA..... | 21 |
| 2.4.1 | Komplex TopBP1–MTBP–Treslin..... | 24 |
| 2.4.1.1 | TopBP1..... | 24 |
| 2.4.1.2 | Treslin..... | 25 |
| 2.4.1.3 | MTBP..... | 26 |
| 2.4.2 | Vliv kinasy ATR na spouštění počátků replikace DNA..... | 29 |
| 3 | MATERIÁL A METODY..... | 32 |
| 3.1 | Materiál..... | 32 |
| 3.1.1 | Buněčná linie..... | 32 |
| 3.1.2 | Přístrojové a laboratorní vybavení..... | 32 |
| 3.1.3 | Používané roztoky..... | 33 |
| 3.1.4 | Používané chemikálie..... | 34 |
| 3.1.5 | Používané protilátky..... | 35 |
| 3.1.5.1 | Primární protilátky pro Western Blot..... | 35 |
| 3.1.5.2 | Sekundární protilátky pro Western Blot..... | 35 |
| 3.2 | Metody..... | 36 |
| 3.2.1 | Kultivace a pasážování buněk..... | 36 |
| 3.2.2 | Transfekce buněčné linie..... | 37 |
| 3.2.3 | Ovlivnění buněk činidly pro vyvolání replikačního stresu..... | 38 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.2.4 | Western Blot..... | 39 |
| 3.2.4.1 | Příprava vzorků..... | 39 |
| 3.2.4.2 | SDS PAGE | 39 |
| 3.2.4.3 | Blotování | 40 |
| 3.2.4.4 | Detekce proteinů..... | 41 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUSE..... | 42 |
| 4.1 | Testování specifity protilátek proti lidské MTBP | 42 |
| 4.2 | Vyvolání replikačního stresu | 43 |
| 4.3 | Ověření úspěšnosti umlčení proteinů MTBP, TopBP1 a Treslin..... | 45 |
| 4.4 | Role MTBP při aktivaci kinasy ATR..... | 46 |
| 5 | ZÁVĚR..... | 50 |
| 6 | LITERATURA..... | 51 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 57 |

Cíle práce

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo popsat mechanismus aktivace kinasy ATR, důvody a podmínky její aktivace včetně role replikačních proteinů MTBP, TopBP1 a Treslin, objasnit její funkci a signální dráhy, kterých se na molekulární úrovni účastní. Dále se zaměřit na substráty, které kinasa ATR fosforyluje a v neposlední řadě popsat, jaký je vliv aktivované či inaktivované kinasy ATR na spouštění počátků replikace DNA.

V praktické části byla pozornost zaměřena na pozorování aktivity kinasy ATR. V používané buněčné linii U-2 OS bylo nejprve nutno provést metodou siRNA transfekce umlčení hlavního proteinu zájmu MTBP a dále proteinů TopBP1 a Treslin, které mají význam v aktivaci kinasy ATR, ale zároveň i při spouštění počátků replikace DNA. Bylo nutno vyvolat replikační stres, jehož důsledkem byla aktivace signální dráhy, na níž se kinasa ATR podílí. Indukce stresových podmínek byla navozena dvěma chemickými činidly, hydroxyureou a aphidicolinem. Hlavním cílem bylo pozorovat fosforylace substrátu kinasy ATR Chk1 pomocí Western blotu a vyhodnotit do jaké míry přispívá protein MTBP k aktivaci kinasy ATR.

1 ÚVOD

Udržování genomické integrity je nezbytné pro zachování života na Zemi. Narušení integrity genomu vede ke genetickým poruchám, stárnutí a vzniku rakoviny (Harper a Elledge, 2007).

Rakovina jako nádorové onemocnění je v současné době čím dál častější příčinou úmrtí. Má molekulární podstatu v mutacích kritických genů, mezi které patří zejména geny podílející se na kontrole buněčného cyklu. Ty jsou zodpovědné za rozhodnutí, zda bude buňka postupovat buněčným cyklem do S fáze a bude docházet k abnormální syntéze DNA nebo bude cyklus pozastaven, aby mohlo dojít k opravě poškozené DNA. Každý buněčný cyklus obsahuje dva hlavní body, které rozhodují o následném dělení. První se nachází při vstupu do S fáze, druhý při vstupu do M fáze. Nazývají se kontrolní body buněčného cyklu (Snustad a Simmons, 2017).

Integrita genomu je udržována působením celé řady buněčných procesů, mezi které se řadí například replikace DNA či opravy DNA. Tyto procesy jsou regulovány a koordinovány kontrolními body buněčného cyklu. Jedná se o rozsáhlou signalizační síť, která je aktivována poškozením DNA nebo genomickou nestabilitou. Důsledkem jejich nefunkčnosti je nekontrolovatelná proliferace buněk, čímž dochází k tvorbě nádoru (Snustad a Simmons, 2017). Právě zvýšená či naopak snížená rychlost replikace vede k vyvolání replikačního stresu. Replikační stres tak lze definovat jako neefektivní replikaci DNA, která nastává v důsledku zpomalení či zastavení postupu replikačních vidlic (Vesela *et al.*, 2017).

Již roku 1980 se ukázalo, že se signalizace účastní fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K), které jsou rozhodující pro růst a přežití rakovinných buněk (Chen *et al.*, 2012). Z tohoto důvodu jsou považovány jako jeden z možných atraktivních cílů v terapii. V posledních letech již vzniklo mnoho studií, které poukazovaly na jejich roli v tumorigenezi.

Tato bakalářská práce je zaměřená na roli replikačních proteinů MTBP, TopBP1 a Treslin v aktivaci kinasy ATR. Stručně shrnuje mechanismus aktivace ATR, její substráty fosforylace a souvislosti s replikací DNA, včetně mechanismu spouštění počátků replikace DNA.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Buněčný cyklus a jeho regulace

Hlavní události buněčného cyklu u eukaryotických buněk jsou replikace DNA v S fázi a segregace chromosomů v M fázi. Poruchy v řízení replikace DNA nebo nekontrolovaný průchod mitózou má za následek vznik nádoru a v extrémních případech mohou být až neslučitelné se životem buňky. V případě mutací či ztrátě genů zodpovědných za regulaci buněčného cyklu může dojít ke ztrátě schopnosti pozastavit průchod buněčným cyklem nebo ke ztrátě životaschopnosti buňky. Nejvýznamnější roli hrají cyklin dependentní kinasy (CDK), které jsou zodpovědné za řízení S fáze a M fáze (Snustad a Simmons, 2017).

Tvorba nádorů souvisí se ztrátou schopnosti buňky ovládat buněčný cyklus nebo s defekty v signálních drahách zodpovědných za regulaci poškozené DNA. V současné době je popsáno stále více cest, které dávají do souvislosti onkogeny a nádorové supresory, které jsou přímo zodpovědné za regulaci replikace DNA, segregaci chromosomů a koordinaci těchto procesů. Cytokinetická vyšetření rakovinných buněk ukazují, že jsou často vysoce aneuploidní a geneticky nestabilní. To vede k tvorbě defektů v kontrolních bodech, které normálně řídí správný průchod buněčným cyklem (Paulovich *et al.*, 1997; Knowles a Selby, 2005).

Kontrolní body lze definovat jako geneticky podmíněné signální dráhy, které zpomalují průchod buněčným cyklem, aby byl zajištěn dostatek času pro dokončení procesů, které mají být bezpodmínečně dokončené ve správnou chvíli. Defekty v kontrolních bodech jsou příčinou genetické nestability. Zajišťují například zahájení mitózy až po dokončení replikace DNA nebo zastavení replikace DNA v reakci na poškození DNA (Knowles a Selby, 2005).

2.2 Reakce na poškození DNA a PIKK

Denně vznikají v lidských buňkách desetitisíce lézí DNA, které je třeba opravovat (Lindahl a Barnes, 2000). V průběhu evoluce bylo vyvinuto mnoho mechanismů, které mají za cíl neustále opravovat poškozenou DNA. Souhrnně je můžeme nazvat jako buněčná odpověď na poškození DNA.

Dráhy odpovědí na poškození DNA u savčích buněk se skládají z několika protein-kinasových rodin, které jsou nezbytné pro jejich regulaci. Mezi nejdůležitější se řadí rodina PIKK (z angl. phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase). Odpověď na poškození DNA zajistí aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu, aby mohlo dojít k opravě DNA. Podle druhu poškození DNA rozeznáváme více druhů oprav. V případě jednořetězcových zlomů to může být oprava vystřížením báze, oprava vystřížením nukleotidů nebo oprava chybného párování bází. V případě dvouřetězcových zlomů může dojít k opravě homologní rekombinací nebo opravě nehomologním spojováním konců DNA (Jackson a Bartek, 2009).

Jejich fungování je přísně koordinováno třemi hlavními PIKK, kterými jsou ATM (z angl. ataxia-telangiectasia mutated), ATR (z angl. ataxia telangiectasia and Rad3-related) a DNA-PK (z angl. DNA-dependent protein kinase) (Harper a Elledge, 2007).

PIKK jsou velké enzymy s molekulovou hmotností v rozmezí 300 kDa až 500 kDa, které byly objeveny v polovině devadesátých let 20. století (Baretic a Williams, 2014). Hrají důležitou roli v drahách odpovědí na poškození DNA, v kontrole buněčného růstu a proliferaci buněk (Lovejoy a Cortez, 2009). Vykazují značnou homologii s PI3K. Mají serin/treonin protein-kinasovou aktivitu stejně jako PI3K. Liší se absencí lipido-kinasové aktivity (Baretic a Williams, 2014). Do PIKK, které jsou exprimované savčími buňkami, se řadí ATM, ATR, DNA-PK, mTOR (z angl. mammalian target of rapamycin, dříve FRAP), SMG-1 (z angl. SMG1 nonsense mediated MRNA decay associated PI3K related kinase), které jsou považovány jako aktivní kinasy, a šestá TRRAP (z angl. transformation/transcription domain associated protein), která sice obsahuje katalytickou doménu jako předchozí, ale postrádá fosfotransferasovou aktivitu (McMahon *et al.*, 1998).

Komplexy PIKK s regulačními proteiny jsou stimulovány aktivátory. Aktivátorem mohou být proteiny nebo nukleové kyseliny, které stimulují kinasovou aktivitu po spuštění upstreamového signálu. Tím může být například poškození DNA nebo nadbytek nutrientů. Většina PIKK má podobnou enzymatickou aktivitu. Fosforylují serin nebo threonin následovaný glycinem (Matsuoka *et al.*, 2007).

2.3 Kinasa ATR

ATR je serin/threoninová kinasa o velikosti 301 kDa (Mannino *et al.*, 2001). Gen kódující ATR je lokalizován na lokusu 3q22-q24 (Cimprich *et al.*, 1996).

Aktivovaná ATR je v savčích buňkách jedním z hlavních regulátorů checkpointové odpovědi na poškození DNA, jako jsou pyrimidinové dimery, zhroucené replikační vidlice nebo jednovláknové zlomy DNA. Proteiny hrající roli v checkpointové odpovědi interagují s CDK, čímž koordinují duplikaci a rozdělování genomu (Nyberg *et al.*, 2002). Za nejdůležitější funkci je považována stabilizace replikačních vidlic vyvolaná replikačním stresem. Vzhledem k tomu, že je nezbytná pro životaschopnost buněk, je její aktivita velmi přísně regulována. Ztráta obou alel *ATR* vede k letalitě již během embryonální fáze vývoje (Brown a Baltimore, 2000).

K aktivaci ATR dochází během každé S fáze. Jejím hlavním úkolem je převážně inhibovat spouštění počátků replikace DNA a tím je pravděpodobně udržována správná rychlost replikace DNA (Shechter *et al.*, 2004; Toledo *et al.*, 2013; Maya-Mendoza *et al.*, 2018). Celý mechanismus je však poměrně složitý a detailněji popsán v samostatné kapitole dále.

Jejím strukturním ortologem v *Saccharomyces cerevisiae* je gen *MEC1* a v *Saccharomyces pombe* gen *RAD3*. Oba regulují analogické checkpointové odpovědi pro udržování buněčného cyklu jako ATR v savčích buňkách (Brown a Baltimore, 2003).

2.3.1 Rozdíl mezi kinasami ATR a ATM

Kinasy ATR a ATM, jako členové jedné kinasové rodiny, mají mnoho společného. Jejich signální dráhy se vzájemně překrývají, ale zároveň působí nezávisle na sobě. Hrají významnou roli v checkpointové odpovědi. Studie ukazují, že evolučně vznikaly odlišně. ATM má blíže k Tel1 vyskytující se v *Schizosaccharomyces pombe* a *Saccharomyces cerevisiae*. ATR má blíže k Rad3 v *S. pombe*, k Mec1 v *S. cerevisiae* a k Mei-41 v *Drosophila melanogaster* (Cimprich *et al.*, 1996; Elledge, 1996; Keegan *et al.*, 1996).

Obě jsou upstreamovými kinasami rodin Chk1 (z angl. checkpoint kinase 1) a Chk2 (z angl. checkpoint kinase 2). ATR má preferenci fosforylovat Chk1, zatímco ATM Chk2. I přesto, že jsou si podobné, jsou zde i jisté odlišnosti.

Mutace v *ATM* dává vzniknout onemocnění ataxie teleangiektázie (Savitsky *et al.*, 1995). Nedostatek ATM v buňkách neovlivňuje životaschopnost jedince. Dochází ke zpomalení růstu, neplodnosti, poruchám imunity a vzniku rakoviny (Barlow *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996). Buňky obsahující mutaci v *ATM* jsou citlivé na faktory způsobující dvouřetězcové zlomy DNA, například na IR záření. Při nedostatečném množství ATR nedochází po poškození DNA k pozastavení buněčného cyklu. Buňka ztrácí kontrolu nad jeho regulací. Chromosomy jsou v důsledku absence ATR fragmentovány. Z tohoto důvodu jsou defekty v genu *ATR* neslučitelné se životem. Onemocnění způsobené mutacemi v genu *ATR* se nazývá Seckelův syndrom (Brown a Baltimore, 2000; O'Driscoll *et al.*, 2003).

2.3.2 Mechanismus aktivace kinasy ATR

Aktivace ATR může být vyvolána replikačním stresem nebo poškozením DNA, ve kterém se vyskytují jednovláknové zlomy DNA. V obou případech musí být v buňce přítomná jednořetězcová DNA, která je nezbytná pro začátek aktivace (Zou a Elledge, 2003). Lokalizace ATR do míst poškození DNA je klíčovým faktorem v její regulaci. Mechanismus aktivace je vícestupňový proces, do kterého je zapojeno mnoho proteinů (Obr. 1).

Většina jednořetězcové DNA začne být v buňce obkloповána replikačním proteinem RPA (Fanning *et al.*, 2006). Důvodem vzniku jednořetězcové DNA je pozastavení replikačních vidlic. Jednořetězcová DNA pokrytá RPA v lidských buňkách je signálem pro lokalizaci ATR do těchto míst (Zou a Elledge, 2003). Pro správné rozpoznání je vyžadován ATRIP (ATR interacting protein) (Cortez *et al.*, 2001). Komplex ATR–ATRIP se nemůže na DNA navázat přímo. Za vazbu ATR–ATRIP k DNA jsou zodpovědné nukleární filamenta, která se tvoří mezi RPA a jednořetězcovou DNA (Zou a Elledge, 2003). ATR tvoří s ATRIP heterodimer, který ovlivňuje stabilizaci ATR. Tento heterodimer přispívá ke stabilitě i přesto, že vazba mezi ATR a ATRIP je poměrně slabá (Cortez *et al.*, 2001; Unsal-Kaçmaz a Sancar, 2004).

K tomu, aby ATR mohla být aktivována, je zapotřebí přítomnosti komplexu RAD9–RAD1–HUS1, také označovaného jako 9–1–1. Jedná se o heterodimerickou molekulu kruhovitého tvaru, která je svou strukturou a funkcí podobná replikační posuvné sorce PCNA (z angl. proliferating cell nuclear antigen) (Parrilla-

Castellar *et al.*, 2004). Nachází se v místech probíhající replikace DNA a slouží k udržování replikačních proteinů na molekule DNA pohromadě (Bell a Dutta, 2002).

Komplex 9–1–1 je lokalizován do míst dvouřetězcové DNA sousedící s jednořetězcovou DNA, která je pokrytá RPA. RPA je v této reakci nezbytný, neboť udává specifičnost, díky které dochází k vazbě na 5' konec vlákna. Lokalizace komplexu 9–1–1 je zprostředkována komplexem RAD17–RFC (Ellison a Stillman, 2003). RFC (z angl. replication factor C) je heteropentamer, který je spolu s PCNA doplňkový protein DNA polymeras při replikaci DNA (Venclovas *et al.*, 2002). I přesto, že jsou RAD17 a RAD9 substráty ATR, výše zmíněný mechanismus probíhá zcela nezávisle na ATR. Hlavní funkcí komplexu 9–1–1 je na sebe navázat klíčový, přímý aktivátor kinasové aktivity ATR, kterým je TopBP1 (z angl. DNA topoisomerase 2-binding protein 1). Navázáním dochází k jeho stabilizaci (Delacroix *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007). TopBP1 je do míst lézí DNA lokalizován s pomocí komplexu MRN (z angl. MRE11–RAD50–NBS1), který má pravděpodobně stimulační vliv na kinasovou aktivitu ATR (Duursma *et al.*, 2013). V lokalizaci TopBP1 hraje v neposlední řadě roli protein RHINO (z angl. RAD9–HUS1–RAD1 interacting nuclear orphan protein 1), který je vázán na komplex 9–1–1 a tím dopraven do míst lézí DNA. Zároveň váže TopBP1, a tak podporuje míru aktivity ATR (Cotta-Ramusino *et al.*, 2011).

TopBP1 stimuluje míru kinasové aktivity napojením na komplex ATR–ATRIP. K vazbě dochází skrz ATR aktivační doménu (AAD) proteinu TopBP1. AAD leží mezi dvěma BRCA1 C-koncovými doménami BRCT 6 a BRCT 7 (z angl. BRCA1 C Terminus). Interakce AAD s ATRIP a taktéž interakce s PIKK regulační doménou ATR jsou důležité pro aktivaci ATR (Kumagai *et al.*, 2006).

Navázání TopBP1 na komplex 9–1–1 je přes C-koncovou část podjednotky RAD9. Domény proteinu TopBP1 BRCT1 a BRCT2 se vážou do fosforylačního místa RAD9, kterým je serin 387. Mimo jiné je TopBP1 substrátem ATR i ATM. Po fosforylaci serinu 1131 díky ATM u *Xenopus laevis* byla prokázána zvýšená schopnost interakce mezi TopBP1 a komplexem ATR–ATRIP (Yoo *et al.*, 2007).

Do nedávna byl za hlavní aktivátor ATR považován jen TopBP1. V nejnovějších studiích byl popsán objev dalšího aktivátoru ATR, kterým je ETAA1 (Bass *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2016; Haahr *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016; Thada

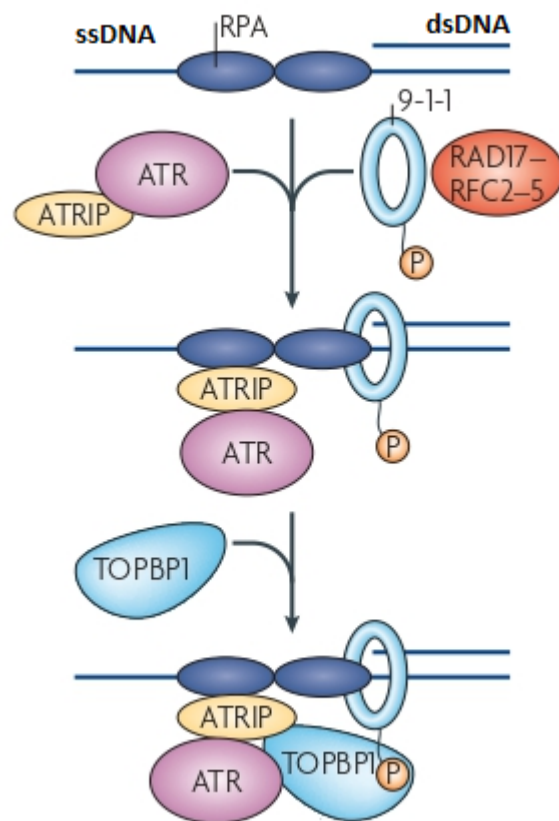
a Cortez, 2019; Thada a Cortez, 2021). TopBP1 a ETAA1 tedy společně stimulují kinasovou aktivitu ATR u mnohobuněčných živočichů.

ETAA1 (z angl. Ewing's tumor – associated antigen 1) je protein o délce 926 aminokyselin vyskytující se pouze u obratlovců. Obsahuje dvě vazebná místa pro podjednotky proteinu RPA. První vazebné místo RBM1 (z angl. RPA1-binding motif) je pro podjednotku RPA70 a druhé RBM2 (z angl. RPA2-binding motif) pro podjednotku RPA32. Funkcí ETAA1 je udržení stability replikačních vidlic. Je lokalizován do míst pozastavených replikačních vidlic, kde je zodpovědný za jejich restart při replikačním stresu. U správně fungujících replikačních vidlic není potřebný (Lee *et al.*, 2016; Bass *et al.*, 2016; Haahr *et al.*, 2016). Nově je považován jako nepostradatelný aktivátor ATR. Na rozdíl od TopBP1 je do míst jednořetězcové DNA pokryté RPA lokalizován přímo interakcí s RPA. ATR je následně aktivována obdobným způsobem jako při aktivaci v přítomnosti TopBP1 přes AAD, která obsahuje sekundární strukturu, tzv. „coiled-coil motiv“, který se vyznačuje seskupením dvou a více α -helixů. Tento motiv se vyskytuje i ve struktuře TopBP1. V obou případech podmiňuje maximální aktivitu ATR (Thada a Cortez, 2019).

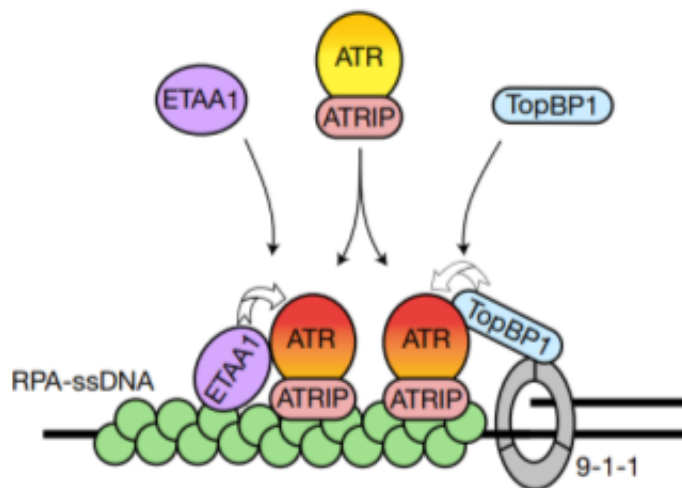
TopBP1 i ETAA1 jsou pro buňku nepostradatelné, jelikož v případě ztráty obou proteinů dochází k inaktivaci signální dráhy ATR, což vede k letalitě. Primární struktura obou proteinů je rozdílná. Jediná podobnost byla v sekvenci aminokyselin vyskytujících se před a za tryptofanem, který byl shledán nezbytným v aktivaci ATR. Kritický pro ETAA1 je tryptofan 107. Pro TopBP1 je to tryptofan 1145 (Thada a Cortez, 2019).

Použitý aktivátor ATR má vliv na fosforylaci jednak substrátu Chk1 (z angl. checkpoint kinase 1), jednak substrátu RPA. V případě aktivace díky TopBP1 dochází k fosforylaci Chk1, zatímco u ETAA1 dochází primárně k fosforylaci RPA (Haahr *et al.*, 2016) I přesto se zdá být mechanismus aktivace ATR u TopBP1 i ETAA1 biochemicky podobný. Dochází k jejich dimerizaci, která má za následek optimální checkpointovou odpověď s nejvyšší možnou mírou aktivity ATR (Obr. 2) (Thada a Cortez, 2021). Zdá se, že aktivátor ETAA1 je buňkou využíván i v nepřítomnosti replikačního stresu nebo poškození DNA, a tak reguluje průchod buněčným cyklem (Saldivar *et al.*, 2018; Bass a Cortez, 2019).

Poněvadž je známo, že se protein TopBP1 vyskytuje v komplexu s Treslin (z angl. TopBP1-interacting and replication-stimulating protein) byla vědci Hassan *et al.*, (2013) zkoumána role Treslin v aktivaci ATR, zejména zda je Treslin vázán přímo na ATR a do jaké míry stimuluje míru aktivity ATR. Bylo prokázáno, že Treslin hraje roli jako nepřímý aktivátor účastnící se aktivace ATR. Jeho vazba je zprostředkována skrze protein TopBP1. Podmínkou pro vazbu Treslin do komplexu Treslin–TopBP1 je přítomnost CDK, které během S fáze fosforylují serin 1000 proteinu Treslin, což umožňuje vazbu s TopBP1 (Kumagai *et al.*, 2011). Treslin, stejně jako TopBP1, je protein, který plní funkci během replikace DNA, a zároveň je to protein hrající roli v checkpointové odpovědi (Hassan *et al.*, 2013).



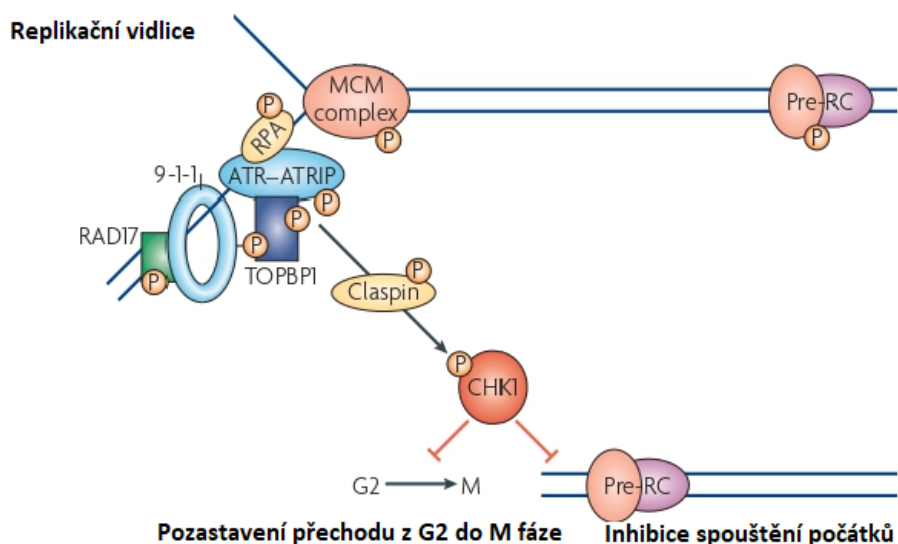
Obr. 1 Schéma aktivace ATR. Převzato a upraveno z Cimprich a Cortez, 2008.



Obr. 2 Schéma aktivace ATR znázorňující přítomnost aktivátorů TopBP1 i ETAA1. Změna barvy ze žluté na červenou značí zvyšování kinasové aktivity ATR po navázání TopBP1 a ETAA1. Převzato a upraveno z Haahr *et al.*, 2016.

2.3.3 Substráty kinasy ATR

Objevování stále nových substrátů vede k vytváření podrobnějších signálních drah a lepšímu pochopení dějů odehrávajících se na molekulární úrovni v buňkách. V současné době jsou známy stovky substrátů ATR. Jedná se převážně o proteiny zapojené do odpovědi při poškození DNA. Mnoho z nich je přímo zapojeno do aktivace ATR (Obr. 3). Jedná se například o RPA, ATRIP, komplex 9–1–1 nebo TopBP1 (Matsuoka *et al.*, 2007).



Obr. 3 Schéma fosforylace substrátů kinasy ATR; Převzato a upraveno z Cimprich a Cortez, 2008.

2.3.3.1 Chk1

Chk1 je hlavním a nejvíce zkoumaným substrátem ATR. Má molekulovou hmotnost 54 kDa a gen *Chk1* je lokalizován na 11q22–23 (Flaggs *et al.*, 1997). Jedná se o downstreamovou serin/threoninovou kinasu regulovanou kinasou ATR, která je hlavním přímým regulátorem fosforylace Chk1 na fosforylačních místech na serinu 317 a na serinu 345, které jsou důležité k translokaci Chk1 z nukleoplazmy do cytoplazmy (Zhao a Piwnica-Worms, 2001; Niida *et al.*, 2007). Mutace v obou fosforylačních místech Chk1 způsobují poruchy v kontrolních bodech poškození DNA (Niida *et al.*, 2007). Dalším fosforylačním místem je serin 296, na kterém dochází k autofosforylaci závislé na fosforylacích serin 317 i serin 345 (Okita *et al.*, 2012). Zároveň však bylo dokázáno, že existuje antagonist s funkcí defosforylovace, čímž je Chk1 udržována v průběhu S a G2 fáze v hypofosforylovaném stavu. Jedná se o PP2 (z angl. protein phosphatase 2), která mimo jiné plní funkci při replikaci DNA vazbou iniciačního faktoru CDC45 do počátků replikace DNA (Petersen *et al.*, 2006).

Chk1 disponuje velkým množstvím funkcí. Hlavní role je v checkpointové odpovědi na poškození DNA inhibicí spouštění replikačních počátků, stabilizací replikačních vidlic, remodelací chromatinu, ovlivnění průchodu S a G2 fází buněčného cyklu a tím potlačení tumorigeneze. Liu *et al.* (2000) ve své studii uvádějí, že v případě přerušení obou alel genu kódující Chk1 je důsledkem letalita myši. Dochází k vážným poruchám proliferace doprovázeným apoptózou, která je nezávislá na p53. Myši s heterozygotním přerušením genu Chk1 mají zvýšené procento výskytu tumorů, ale jsou plodné a životaschopné.

Fosforylací aktivovaná Chk1 dále fosforyluje p53 a substráty z fosfatasové rodiny Cdc25. Cdc25 jsou enzymy katalyzující odstraňování inhibičního fosfatasového zbytku z CDK, čímž jsou deaktivovány. Fosforylací Cdc25C na serinu 216 je ovlivněn kontrolní bod G2/M buněčného cyklu. Dochází k inhibici CDK2 a důsledkem je pozastavení přechodu z G2 fáze do M fáze (Sanchez *et al.*, 1997). Fosforylací Cdc25A dochází k pozastavení v S fázi. Z toho lze soudit, že Chk1 je regulátor pro vstup buněk do M fáze až po dokončení replikace DNA nebo opravě poškozené DNA (Brown a Baltimore, 2003).

Dalším substrátem Chk1 je p53, který je fosforylován na serinu 20 (Shieh *et al.*, 2000). Cdc25 i p53 jsou zodpovědné za pozastavení buněčného cyklu před vstupem do

M fáze. Avšak aby mohl Chk1 plně fosforylovat substráty, je vyžadován protein Claspin, který v interakci s Chk1 slouží jako upstreamový regulátor pozastavení buněčného cyklu (Kumagai a Dunphy, 2000). Claspin mimo jiné plní funkci i jako replikační faktor. Je potřebný k udržování normální rychlosti tvorby replikačních vidlic v průběhu nerušené replikace DNA. Hypotézou Smits *et al.* (2019) je, že by mohl mít vliv v regulaci spouštění počátku replikace DNA.

2.3.3.2 RPA32

RPA32 je podjednotka o velikosti 32 kDa proteinu RPA, jehož gen je lokalizován na chromosomu 1p35.3. Lidský RPA se skládá ze tří podjednotek lišících se od sebe molekulovou hmotností, podle kterých jsou pojmenovány. Jsou to RPA70, RPA32 a RPA14. RPA jako heterotrimer hraje roli v iniciační a prodlužovací fázi chromozomální replikace DNA, ale i v opravách DNA (Binz *et al.*, 2004). V průběhu iniciační fáze zprostředkovává RPA vazbu DNA polymerasy α , která je v počáteční fázi replikace důležitá díky své primasové aktivitě. Její aktivitou dochází k zahájení syntézy vláken DNA na vedoucím i opoždujícím vlákně. Během prodlužovací fáze podle všeho stimuluje RPA fungování DNA polymerasy δ a DNA polymerasy ϵ interakcí s PCNA interakcí (Oakley a Patrick, 2010).

Jeho aktivita je regulována fosforylací podjednotky RPA32, na které k fosforylacím primárně dochází. Tato podjednotka je rozdělena na tři části (Obr. 4): N-koncová fosforylační oblast o 35 aminokyselinách, centrální DNA vázající doména (DBD-D) a C-koncová oblast, která tvoří svazek šroubovic zodpovědných za heterotrimerizaci komplexu RPA (Bochkareva *et al.*, 2002).

Klíčovou funkcí fosforylované podjednotky RPA32 je právě výše zmíněná regulace aktivity RPA při replikaci DNA a opravách DNA. Mimo jiné fosforylace RPA také zvyšuje životaschopnost buněk v odpovědi na poškození DNA vznikajících během mitózy (Anantha *et al.*, 2008). RPA se váže primárně na jednořetězcovou DNA, ke které má ve srovnání s dvouřetězcovou DNA mnohem větší afinitu (Kim *et al.*, 1992; Lao *et al.*, 1999).

Podjednotka RPA32 je fosforylovaná v reakci na poškození DNA na N konci, kde se vyskytuje devět známých fosforylačních míst (Obr. 5). Za to jsou zodpovědné hlavně kinasy ze skupiny PIKK, zejména ATM, ATR a DNA-PK. Může být také zprostředkována i CDK (Binz *et al.*, 2004; Block *et al.*, 2004). Fosforylace jednotlivých

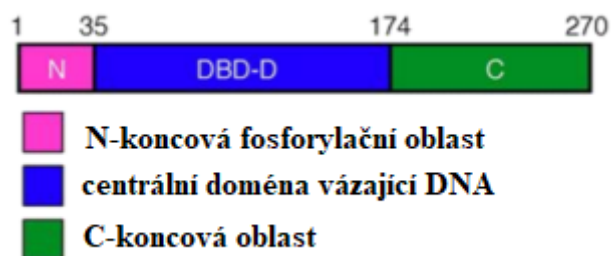
aminokyselinových zbytků RPA32 je závislá na typu poškození DNA nebo replikačním stresu (Anantha *et al.*, 2007; Vassin *et al.*, 2009).

ATM, ATR i DNA-PK fosforylují N konec podjednotky RPA32 na serinu 33 a threoninu 21. DNA - PK má navíc schopnost fosforylace serinů 4, 8, 11, 12 a 13. (Block *et al.*, 2004). Komplex cyklin–Cdk je zaprvé zodpovědný za fosforylaci na serinu 23 a 29 během mitózy v důsledku poškození DNA, zadruhé za fosforylaci těchto fosforylačních míst během interfáze v důsledku genotoxického stresu, čím je stimulována fosforylace serinu 33 kinasou ATR.

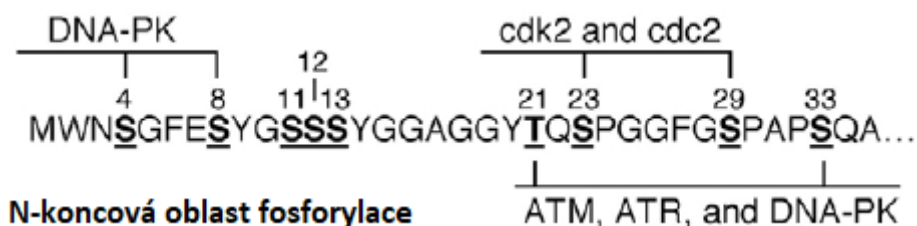
Fosforylace podjednotky RPA32 kinasou ATR může být přímá nebo nepřímá. Přímou jsou ATR fosforylována místa serin 33 a threonin 21 a nepřímo serin 4, 8, 11, 12 a 13 (Olson *et al.*, 2006). Fosforylace na serinu 4 a 8 je závislá na fosforylaci serinu 33 kinasou ATR, ale naopak fosforylace serinu 33 není regulována fosforylací serinu 4 a 8. Zároveň je fosforylace serinu 4 a 8 spolu se seriny 11, 12 a 13 méně důležitá v inhibici replikace DNA po indukci UV zářením než fosforylace serinu 33 a threoninu 21 (Olson *et al.*, 2006).

Bylo zjištěno, že fosforylace serinu 4 a 8 je nezbytným krokem v cestě k úplné aktivaci ATR při replikačním stresu a zároveň je důležitá pro správně načasovaný vstup do M fáze (Liu *et al.*, 2012). Fosforylace serinu 33 a threoninu 21 je také považována za nezbytnou pro úplnou aktivaci ATR, jelikož bylo zjištěno, že mutace ve fosforylačních místech serin 33 a threonin 21 způsobily sníženou kinasovou aktivitu ATR.

Fosforylovaný RPA plní v buňkách mnoho nezbytných funkcí, jako jsou lokalizace ATR do míst poškození DNA, zvýšená míra kinasové aktivity ATR, ale i usnadnění oprav chromosomální DNA, lokalizace replikačních proteinů do počátků replikace DNA, ovlivnění kontrolního bodu S fáze, inhibice replikace DNA, zvýšená asociace s komplexem 9–1–1 a další (Wu *et al.*, 2005; Olson *et al.*, 2006; Anantha *et al.*, 2007). Důsledkem mutací ve fosforylačních místech RPA32 jsou chyby v homologní rekombinaci, jelikož je narušena funkce fosfatasy PP4, která je RPA32 substrátem (Lee *et al.*, 2010). Defosforylace RPA32 na serinu 33 a threoninu 21 fosfatasou PP2 je potřebná pro opětovný vstup buněk z kontrolního bodu do buněčného cyklu (Feng *et al.*, 2009).



Obr. 4 Struktura RPA32. Zdroj: <http://documents.irevues.inist.fr/handle/2042/44940> a upraveno.



Obr. 5 Schéma známých fosforylačních míst RPA32. Fosforylační místa jsou podtržena a spojena s kinasami zodpovědnými za jejich fosforylací. Převzato a upraveno z Vassin *et al.*, 2009.

2.4 Mechanismus spouštění počátků replikace DNA

Iniciace replikace DNA začíná v konkrétních místech nazývaných počátky replikace. Jejich aktivita je přísně regulována, aby byla zabezpečena správná duplikace genomu v každém buněčném cyklu. Z toho důvodu může být každý počátek aktivován pouze jednou za buněčný cyklus. U vyšších eukaryotických buněk jsou počátky rozpoznávány díky shromažďování proteinů potřebných pro sestavení replikačního komplexu, který je zodpovědný za správný průběh replikace DNA (Bell a Dutta, 2002). Jedná se o sekvence obsahující specifické strukturní elementy nebo epigenetické mechanismy podílející se na organizaci genomu. Nejsou však rozpoznávány jako striktně určené sekvence DNA (Leonard a Mechali, 2013). Pochopení mechanismu spouštění počátků u eukaryot (Obr. 6) je založeno na znalostech mechanismu probíhajícího u kvasinek. Mechanismus u vyšších eukaryot není ani v současnosti zcela objasněn.

U eukaryot zahrnuje iniciační fáze dva kroky, kterými jsou licencování počátků, při kterém dochází k sestavování pre-RC (z angl. pre-replication complex), a spouštění počátků, po kterém dochází k aktivní syntéze nových vláken DNA. Licencování

počátků a spouštění počátků jsou dva děje, které jsou od sebe časově odděleny. U licencování počátků je vyžadována nízká aktivita CDK a DDK (z angl. Dbf4-dependent kinase), zatímco u spouštění počátků je třeba vysoké aktivity CDK a DDK (Diffley, 2004; Fragkos *et al.*, 2015).

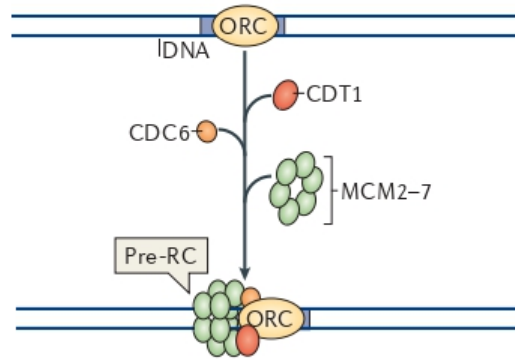
K licencování počátků dochází při opuštění M fáze a následné G1 fáze buněčného cyklu v místech nazývaných počátky replikace. V těchto místech dochází k navázání ORC (z angl. origin recognition complex). Komplex slouží jako vazebné místo pro navázání proteinů umožňujících iniciaci replikace DNA, DNA helikasu a DNA polymerasy. Následně dochází k navázání replikativní helikasy MCM2-7 (z angl. minichromosome maintenance) na ORC (Remus a Diffley, 2009). Replikativní helikasa se skládá z šesti podjednotek MCM2-7 a v průběhu iniciace tvoří dimer skládající se ze dvou hexamerů MCM2-7. Tento dimer obklopí DNA a spolu s proteiny, které jsou důležité pro vazbu MCM2-7, se nazývá pre-RC. Těmito důležitými proteiny jsou CDT1 (z angl. chromatin licensing and DNA replication factor 1) a CDC6 (z angl. cell division cycle 6) nazývané jako licenční faktory (Evrin *et al.*, 2009; Remus *et al.*, 2009).

V pre-RC je helikasa MCM2-7 neaktivní a není tedy schopna rozvíjet dvouvlákno DNA (Remus *et al.*, 2009). Pro její aktivaci je nezbytná přítomnost proteinů CDC45 (z angl. cell division cycle 45), MCM10 (z angl. minichromosome maintenance), RECQL4 (z angl. RecQ Like Helicase 4) a GINS (Ilves *et al.*, 2010; Kanke *et al.*, 2012). Mimo proteiny aktivující helikasu jsou do míst pre-RC navázány proteiny TopBP1, Treslin a MTBP (z angl. Mdm2-binding protein), které společně tvoří komplex (Boos *et al.*, 2013). Vazba výše zmíněných proteinů dává vzniku pre-IC (z angl. pre-initiation complex) z původního pre-RC (Obr. 6).

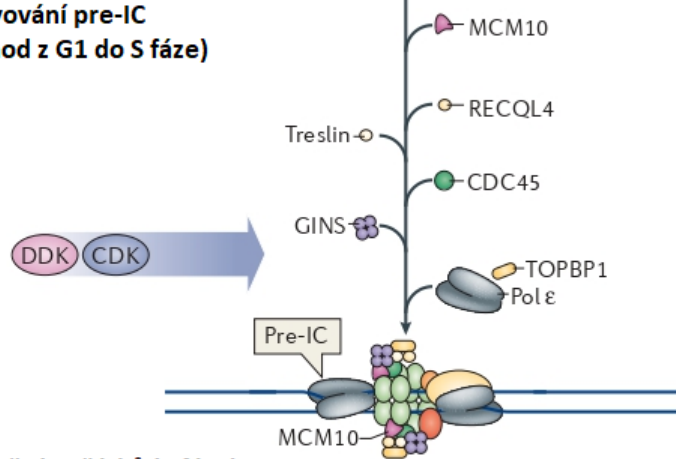
Přítomnost proteinů TopBP1 a Treslin umožňuje vazbu CDC45 do míst počátků replikace, což vede k přeměně neaktivní replikativní helikasy v aktivní (Ilves *et al.*, 2010; Kumagai *et al.*, 2010). Během aktivace helikasy MCM2-7 dochází k rozpadu dimeru MCM2-7 na dvě části, které se stanou následně dvěma komplexy CMG. Komplex CMG se skládá z CDC45, MCM2-7 a GINS. V buňce funguje CMG jako aktivní replikativní helikasa (Ilves, *et al.*, 2010). Důsledkem vytvoření CMG je navázání dalších důležitých proteinů (Obr. 6), které dávají vzniknout dvěma

replikačním vidlicím, které se pohybují v opačných směrech od aktivovaného počátku. Jedná se o proteiny RFC, PCNA, RPA a DNA polymerasy (Fragkos *et al.*, 2015).

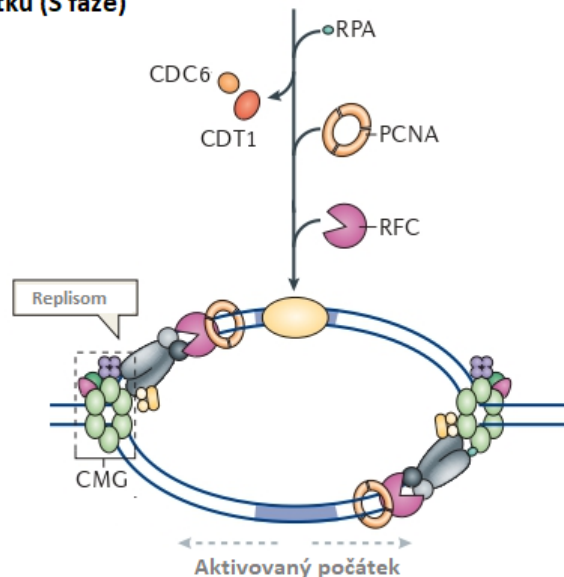
Licencování počátků (G1 fáze)



Sestavování pre-IC (přechod z G1 do S fáze)



Spouštění počátků (S fáze)



Obr. 6 Schéma tvorby a spouštění replikačních počátků DNA rozděleno na fázi licencování počátků, sestavování pre-IC a spouštění počátků. Převzato a upraveno z Fragkos *et al.*, 2015.

2.4.1 Komplex TopBP1–MTBP–Treslin

V průběhu sestavování pre-IC dochází k vazbě proteinů, které jsou následně zodpovědné za regulaci spouštění počátků. Naváží se proteiny TopBP1, Treslin a MTBP, které spolu interagují a tvoří heterotrimerní iniciační komplex nazývaný TMT (TopBP1–MTBP–Treslin). Tento komplex je analogický k SDS (Sld3/7–Dpb11–Sld2). SDS se nachází u kvasinek a plní analogické funkce při iniciaci replikace DNA jako TMT u vyšších eukaryot (Boos a Ferreira, 2019).

I přesto, že jsou všechny tři proteiny zapojené do spouštění počátků, mají zcela rozdílný vliv na rychlost replikace DNA (Maya-Mendoza *et al.*, 2018).

2.4.1.1 TopBP1

TopBP1 byl objeven jako protein interagující s C-koncovou oblastí DNA topoisomerasy II β (Yamane *et al.*, 1997). Obsahuje celkem 9 BRCT domén, které jsou zodpovědné za různé funkce, jako je replikace DNA, stabilizace replikačních vidlic nebo opravy DNA, a dále obsahuje AAD doménu zodpovědnou za aktivaci ATR (Kumagai *et al.*, 2006; Kumagai *et al.*, 2010; Moudry *et al.*, 2016).

Pro replikaci DNA je důležitá N-koncová oblast TopBP1 obsahující aminokyseliny 1–758. Konkrétně se jedná o domény BRCT 1–3, které v případě delece v TopBP1 narušovaly fungování replikace DNA. Domény BRCT 4–5, 5, 6, 7–8 nebo doména AAD se pro replikaci DNA ukázaly naopak jako postradatelné (Kumagai *et al.*, 2010).

K navázání Treslin na TopBP1 dochází skrze domény BRCT 1–2 proteinu TopBP1 v jádře buňky. Jedná se tak o část oblasti TopBP1, která je zároveň důležitá pro replikaci DNA. K interakci proteinů dochází pouze v přítomnosti CDK2, kdy v průběhu interfáze CDK2 fosforyluje Treslin. Fosforylace umožní vzniku komplexu Treslin–TopBP1. K vazbě dochází pouze v jádře buňky v blízkosti počátků replikace DNA (Kumagai *et al.*, 2010).

Mimo výše zmíněné funkce proteinu TopBP1 v replikaci DNA a aktivaci ATR byla popsána i jeho role v procesu oprav DNA. Homologní rekombinace, která slouží k opravám dvojitých zlomů DNA, je iniciována vznikem nukleoproteinového vlákna, které je tvořeno proteinem RAD51. TopBP1 se homologní rekombinace účastní jako protein zodpovědný za vazbu proteinu RAD51 na chromatin. K interakci RAD51

s chromatinem dochází skrze jeho doménu BRCT 2 a domény BRCT BRCT 7–8 byly označeny jako hrající roli v procesu homologní rekombinace (Moudry *et al.*, 2016).

Absence proteinu TopBP1 má vliv na rychlost replikace DNA. Při umlčení exprese TopBP1 dochází na rozdíl od ostatních členů komplexu TMT ke snížení rychlosti. Dochází k pomalejšímu sestavování asymetrických replikačních vidlic (Maya-Mendoza *et al.*, 2018). Při zohlednění jeho funkce v opravách DNA by se tento fakt dal odůvodnit pomalejšími opravami DNA v buňce, která z toho důvodu vyžaduje na replikaci DNA mnohem více času.

2.4.1.2 Treslin

Protein Treslin o molekulové hmotnosti 220 kDa byl objeven jako protein interagující s TopBP1 (Kumagai *et al.*, 2010). Analýzou primární struktury Treslin byly objeveny dvě od sebe oddělené oblasti, skrze které dochází k vazbě na protein TopBP1 (Kumagai *et al.*, 2011).

Oblasti interakce s TopBP1 se nacházejí na N-koncové části Treslin. Mutacemi v N-koncové oblasti Treslin obsahující aminokyseliny 1–1257 byla objevena sekvence aminokyselin 893 – 1257, která se dobře váže na domény BRCT 1–2 proteinu TopBP1. Další oblastí interakce je sekvence aminokyselin 1–463 (Kumagai *et al.*, 2011). Aby mohlo dojít k jejich interakci, je třeba fosforylace proteinu Treslin kinasou CDK2 (Kumagai *et al.*, 2010). Fosforylačním místem Treslin je serin 1000. Fosforylovaný serin 1000 je zároveň potřebný pro správnou replikaci DNA, jelikož buňky s mutací v serin 1000 vykazují problémy v replikaci DNA (Kumagai *et al.*, 2011). Jejich interakce byla popsána na základě vazby, ke které dochází i mezi proteiny Dbp11, analog lidské TopBP1, a Sld3, který byl popsán jako analog lidské Treslin (Boos *et al.*, 2011).

I přesto, že se v průběhu iniciace replikace DNA tvoří komplex TMT, interakce Treslin s MTBP není podmíněna přítomností TopBP1. Za vzájemnou interakci s MTBP je zodpovědná C-koncová doména Treslin (Boos *et al.*, 2013). Fosforylace Treslin kinasami CDK je důležitá pro vazbu Treslin na domény BRCT 1–2 na proteinu TopBP1 (Kumagai *et al.*, 2011). Treslin tedy může současně interagovat jak s TopBP1, tak s MTBP (Boos *et al.*, 2013). To je pravděpodobně důvodem, proč dochází k tvorbě komplexu TMT.

Treslin stejně jako TopBP1 hraje mimo jiné roli v aktivaci ATR i jako replikační protein nezbytný pro správnou replikaci DNA, kdy zprostředkovává spolu s proteinem TopBP1 vazbu CDC45 do míst počátků replikace DNA (Kumagai *et al.*, 2010). K vazbě Treslin a CDC45 dochází v jiné oblasti, než ve které dochází k interakci s TopBP1 (Kumagai *et al.*, 2011).

Dále Treslin výrazně ovlivňuje proliferaci buněk a slouží jako regulátor vstupu buněk do S fáze. Při nedostatku proteinu Treslin dochází k razantní inhibici replikace DNA o 80 %, což svědčí o jeho esenciální funkci v replikaci DNA (Kumagai *et al.*, 2010). Absence proteinu Treslin také způsobuje defekty v proliferaci. Buňky s absencí proteinu Treslin jsou navíc ve srovnání s buňkami obsahujícími Treslin větší a vyskytuje se u nich poškození DNA (Kumagai *et al.*, 2010). Možné vysvětlení vzniku poškození DNA v buňkách s absencí proteinu Treslin navrhl Maya-Mendoza *et al.* (2018), když ukázal, že bez Treslin dochází k nadměrnému zvýšení rychlosti replikace DNA. To pravděpodobně vede ke vzniku poškození DNA.

2.4.1.3 MTBP

Protein MTBP byl objeven jako protein interagující s MDM2, E3 ubiquitin ligasou, která udržuje hladinu proteinu p53 v buňkách jeho degradací (Boyd *et al.*, 2000). V současnosti je zkoumána zejména jeho funkce při spouštění počátků (Kumagai a Dunphy, 2020). Jeho molekulová hmotnost je 105 kDa a lokalizace genu je 8q24.12. Nachází se v jádře a podílí se na vstupu buněk do M fáze, správné segregaci chromosomů, buněčné migraci, iniciaci replikace DNA a transkripci (Agarwal *et al.*, 2011; Agarwal *et al.*, 2013; Grieb *et al.*, 2014; Köhler *et al.*, 2019). V roce 2013 byl popsán jako další protein hrající nezbytnou roli ve spouštění počátků (Boos *et al.*, 2013). Protein MTBP byl objeven jako analog proteinu Sld7 u kvasinek (Köhler *et al.*, 2019).

Množství proteinu MTBP v buňkách je podmíněno přítomností Treslin, který spolu s MTBP tvoří komplex. Metodou centrifugace v hustotním gradientu byl objeven komplex Treslin–MTBP o molekulové hmotnosti přibližně 800 kDa. Hypotézou Kumagai a Dunphy (2017) je, že tento komplex je minimálně tetramer obsahující dvě kopie každého proteinu. Hypotéza byla potvrzena ve studii Volpi *et al.* (2021), kde uvádějí, že se komplex v buňkách vyskytuje jako tetramer, avšak o molekulové hmotnosti 632 kDa. Tento komplex je přítomný po celou dobu buněčného cyklu.

V buňkách s absencí proteinu MTBP dochází k degradaci komplexu Treslin–MTBP. Tím je destabilizován protein Treslin a stejný destabilizační vliv má i absence Treslin na MTBP (Boos *et al.*, 2013; Kumagai a Dunphy, 2017). Vazba MTBP s Treslin se ukázala jako důležitá jak pro jejich stabilizaci, tak pro správnou replikaci DNA (Köhler *et al.*, 2019). Vazebné místo pro Treslin je lokalizováno na N-koncové doméně MTBP. Jedná se o oblast aminokyselin, která byla po sekvenční analýze objevena jako sekvence konzervovaná se sekvencí aminokyselin v Sld7 u kvasinek, která je zodpovědná za vazbu s Sld3 (Köhler *et al.*, 2019).

Obdobně je u kvasinek ovlivňována hladina Sld7 proteinem Sld3 a naopak. Odstranění Sld7 vede k snížení množství Sld3 (Tanaka *et al.*, 2011).

MTBP obsahuje specifickou doménu vázající DNA. Jedná se o sekvenci přibližně 90 aminokyselin nacházejících se na C-koncové části MBTP. C-koncová oblast zahrnuje aminokyseliny 526–904. Oblast vázající DNA je lokalizovaná v CTM (z angl. C-terminal MTBP), která obsahuje aminokyseliny 818–904. Největší afinitu k chromatinu vykazuje část CTM obsahující aminokyseliny 824–830. V případě mutace v této sekvenci aminokyselin 824–830 dochází k výrazně nižší asociaci s chromatinem než při mutacích v ostatních aminokyselinách domény CTM. Přítomnost CTM je mimo asociaci s DNA taktéž důležitá pro replikaci DNA (Kumagai a Dunphy, 2017). Ve studii Kumagai a Dunphy (2020) uvádějí, že i v případně odstranění CTM dochází k interakci s chromatinem. Z toho lze soudit, že se nejedná o jedinou doménu vázající se na chromatin.

Analogická sekvence k CTM byla objevena i u kvasinek v proteinu Sld7, který je homologem lidské MTBP. Strukturní analýza CTM objevila v sekundární struktuře stejné 3-helikální struktury, které byly popsány i v C-koncové oblasti Sld7 (Itou *et al.*, 2015). Porovnáním sekvencí těchto struktur byla zjištěna podobnost mezi MTBP a Sld7. Analogie byla zejména v oblasti CTM, tedy v oblasti silné interakce s chromatinem. CTM však na rozdíl od C-koncové oblasti Sld7 netvoří dimery (Itou *et al.*, 2015; Kumagai a Dunphy, 2017). Ve studii Köhler *et al.*, (2019) však uvádějí hypotézu, že by k dimerizaci CTM mohlo docházet i u MTBP a tato dimerizace by mohla ovlivňovat replikaci DNA.

V souvislosti se zkoumáním role MTBP v replikaci DNA byl popsán nový regulátor, jenž nese taktéž roli ve správném průběhu replikace DNA. Jedná se

o komplex CDK8/19–cyklin C. Za jeho vazbu je zodpovědná M doména MTBP (z angl. middle domain). CDK8/19–cyklin C přispívá k udržení správné replikace DNA, zabraňuje předčasnému vstupu buněk do M fáze před dokončením replikace DNA a kontroluje správnou segregaci chromozomů. Přesná role v procesu replikace DNA není zcela jasná, ale hypotézou je, že by vazba CDK8/19–cyklin C mohla být důležitá pro maximální aktivitu MTBP při spouštění počátků. Ve studii Köhler *et al.* (2019) nebyla vyloučena ani možná funkce při transkripci.

MTBP hraje roli v regulaci buněčného cyklu. Jeho funkce spočívá v udržování správné délky S fáze. V případě nedostatečného množství MTBP, ale také Treslin, je S fáze výrazně prodloužena. Na úkor prodloužení S fáze je ovlivněna i G2 fáze, která naopak trvá značně menší část buněčného cyklu. Bylo zjištěno, že tato regulace replikace DNA je zcela nezávislá na proteinu p53 (Boos *et al.*, 2013). Taktéž u kvasinek odstranění analogů Sld7 a Sld3 má vliv na délku S fáze jejím prodloužením (Tanaka *et al.*, 2011).

Přítomnost MTBP není nutná při licencování počátků, ale výrazně ovlivňuje následné spouštění počátků, kdy se účastní jako podjednotka komplexu TMT sestavování CMG (Boos *et al.*, 2013). Za to je zodpovědná C-koncová doména MTBP. M doména MTBP se jeví také jako nápomocná v replikaci DNA (Köhler *et al.*, 2019). Protein MTBP zprostředkovává vazbu CDC45 do míst počátků (Kumagai a Dunphy, 2017). Odstranění MTBP z buněk tak vede k nižšímu množství aktivovaných počátků. Zároveň dochází ke zvětšení vzdálenosti mezi jednotlivými aktivovanými počátky a zvýšení rychlosti replikace DNA (Maya-Mendoza *et al.*, 2018). Protože je rychlost replikace DNA závislá na množství aktivních počátků (Zhong *et al.*, 2013), je toto pravděpodobně důvodem, proč k tomuto zvýšení rychlosti dochází. Snaha buňky je včas dokončit replikaci DNA. I přes tuto kompenzaci zvýšením rychlosti však dochází k nezanedbatelnému prodloužení S fáze (Kumagai a Dunphy, 2017; Maya-Mendoza *et al.*, 2018).

V nejnovější studii vědců Kumagai a Dunphy (2020) byla popsána vazebná místa komplexu Treslin–MTBP. MTBP se v lidském genomu vyskytuje minimálně na 30 000 vazebných místech, která se nachází v oblastech elementů řídicích transkripci, které jsou typické nepřítomností nukleosomů. Zaprvé se jedná o místa v okolí TSS (z angl. transcriptional start site), kde RNA polymerasa počíná transkripci. Dále jsou

to oblasti blízko enhancerů a super-enhancerů a některá vazebná místa pro transkripční faktor CTCF (z angl. CCCTC-binding factor). Tato vazebná místa pro MTBP se z velké části nacházejí v transkripčně aktivním chromatinu, avšak stupeň transkripční aktivity konkrétního lokusu nekoreluje s mírou vazby MTBP do těchto oblastí (Kumagai a Dunphy, 2020). V oblastech vazeb TSS a enhancerů byly objeveny dva druhy sekvenčních elementů objevujících se v oblastech iniciace replikace DNA. Těmito elementy jsou transkripční faktor AP-1 (z angl. activator protein 1) a G4 (odvozeno z angl. G-quadruplex). Vazba MTBP do oblastí enhancerů je charakteristická vyšší přítomností AP-1, zatímco v místech vazby MTBP do oblastí TSS je vyšší výskyt motivů G4. V obou případech je charakteristickou oblastí vazby MTBP buď pravá, nebo levá strana od oblasti AP-1 nebo G4. Kumagai a Dunphy (2020) však spíše popírají možnost, že by AP-1 a G4 mohly regulovat samotnou iniciaci replikace DNA, jelikož je počet těchto oblastí s nenavázaným MTBP v lidském genomu mnohem vyšší než s navázaným MTBP.

Analýzou epigenetických modifikací histonů byl v 99 % objeven překryv vazeb MTBP s histonem H3K4me2. Jedná se o histon nacházející se v oblasti TSS a jeho funkce je regulace transkripce. Vazba MTBP se tedy většinou váže do oblastí bez nukleosomů, jako jsou TSS nebo enhancery obsahující AP-1 a G4, které sousedí s oblastmi obsahujícími nukleosomy, které obsahují epigenetický marker histon H3K4me2 (Kumagai a Dunphy, 2020).

2.4.2 Vliv kinasy ATR na spouštění počátků replikace DNA

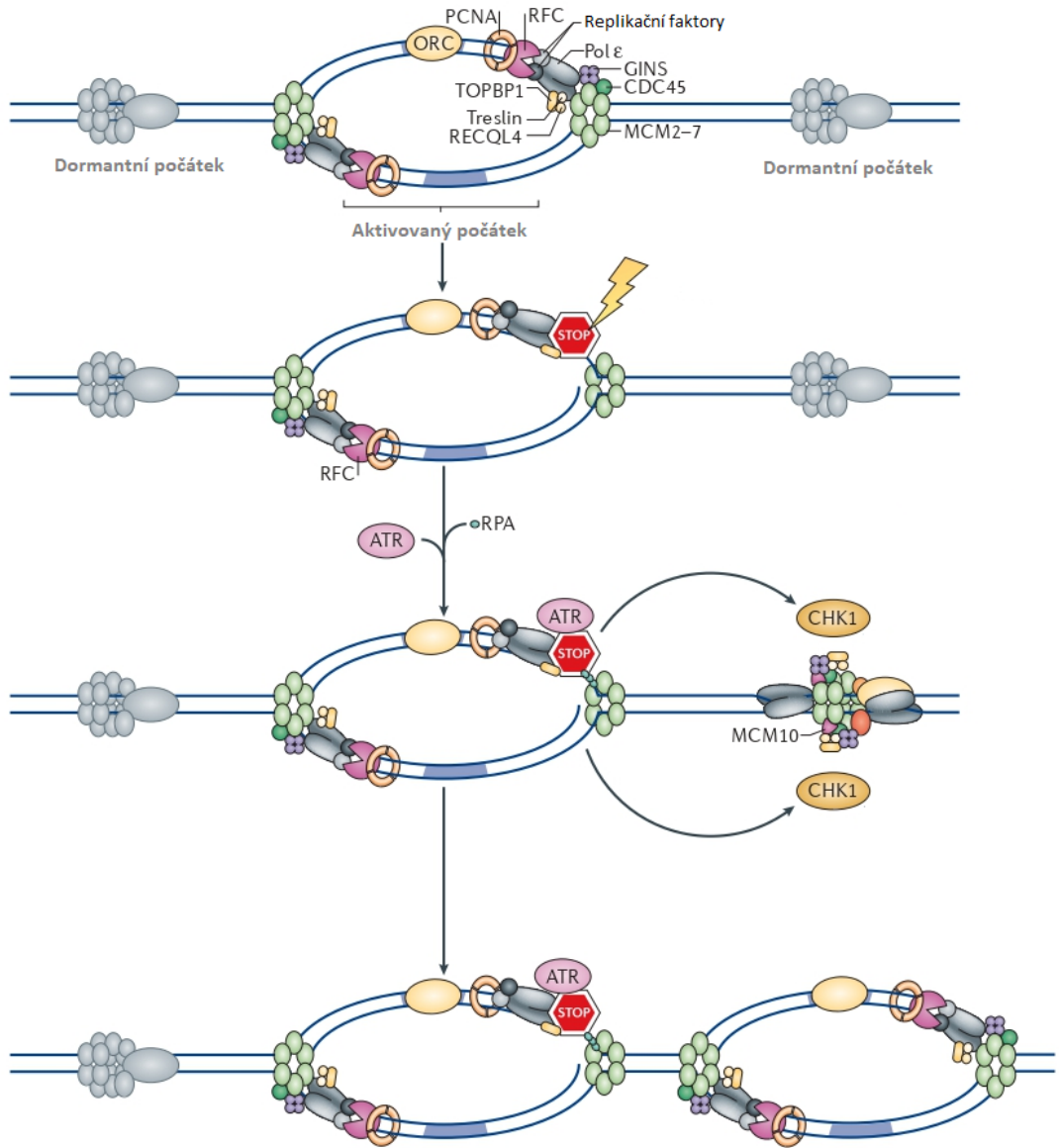
Omezení spouštění počátku je mechanismus checkpointové dráhy, který je buňkami využíván pro zpomalení průchodu buněčným cyklem a pozastavení v S fázi. Během každé S fáze funguje ATR spolu s Chk1 jako hlavní regulátor inhibice nadměrného spouštění počátků. Tento mechanismus má za cíl udržení správného množství aktivovaných počátků, které je dostačující pro včasné dokončení replikace před rozdělením buňky (Shechter *et al.*, 2004).

Mimo to je funkce ATR klíčová v přítomnosti replikačního stresu. Zastavené replikační vidlice jsou v důsledku replikačního stresu místem přítomnosti jednořetězcové DNA, která je pokrývána proteinem RPA. Aktivovaná ATR v buňce globálně inhibuje nadměrné spouštění počátků, čímž dochází k omezení počtu aktivních replikačních vidlic jen na ty, které byly aktivní již při vznikajícím

replikačním stresu. Tímto mechanismem ATR předchází vyčerpání RPA. Ve chvíli, kdy by byl veškerý protein RPA vyčerpán, by nedocházelo k ochraně jednovláknové DNA a začaly by se tvořit dvouvláknové zlomy DNA (Toledo *et al.*, 2013).

Zároveň však dochází k přenosu signálu skrze Chk1 do míst dormatních počátků, které jsou v důsledku toho aktivovány (Ge a Blow, 2010). Dormantní počátky jsou počátky schopné plně iniciovat tvorbu replikačních vidlic, ale nejsou nezbytné pro normální postup buňky S fázi. Buňka je využívá v závislosti na okolnostech pro zachování integrity genomu. Aktivovány jsou například právě při překonávání replikačního stresu, kdy dochází k zablokování replikačních vidlic (Woodward *et al.*, 2006). Jejich lokální aktivace je důležitá, protože se nacházejí v blízkosti replikačních vidlic, které v důsledku replikačního stresu nejsou schopny dokončit replikaci DNA (Obr. 7). Právě díky jejich aktivaci je umožněno dokončit replikaci DNA.

S nedostatkem RPA se potýkají pacienti trpící Seckelovým syndromem. I přesto, že by se mohlo zdát, že příčinou jsou defekty v genu kódující RPA, důvodem jsou defekty v genu *ATR*. Takové buňky se potýkají s replikačním stresem spojeným s poškozením DNA. Není inhibováno spouštění počátků a v důsledku nadměrného množství nechráněné jednovláknové DNA dojde k vyčerpání RPA a fragmentaci DNA. U pacientů dochází k předčasné senescenci (Murga *et al.*, 2009; Toledo *et al.*, 2013).



Obr. 7 Schéma lokálního spouštění počátků replikace DNA vyvolané kinasou ATR v důsledku replikačního stresu. Schéma ilustruje aktivaci dormantního počátku, který se nachází v těsné blízkosti pozastavené replikační vidlice. Šipkami vycházejícími z pozastaveného místa, místa lokalizované ATR, je naznačen přenos signálu pro tuto aktivaci skrze Chk1. Převzato a upraveno z Fragkos *et al.*, 2015.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Buněčná linie

V praktické části práce byla využívána buněčná linie U-2 OS (ATCC® HTB-96™). Tato nádorová linie odebrána roku 1964 z lidského osteosarkomu tibie, tedy nádoru kosti. Jedná se o adherentní typ buněčné linie s epiteliální morfologií, která při kultivaci přirozeně přilne povrchu.

3.1.2 Přístrojové a laboratorní vybavení

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

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

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

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

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

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

CO₂ inkubátor (Thermo Scientific, USA)

Kónické zkumavky 50 ml (TPP, Švýcarsko)

Kultivační lahve T25 (TPP, Švýcarsko)

Laboratorní digestoř (MERCİ, Česká republika)

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

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

Míchačka Thermo Mixer C (Eppendorf, Německo)

Mikroskop Olympus CKX41 (Olympus, Japonsko)

Mikrozkumavky Eppendorf 1,5 ml Safe-Lock (Eppendorf, Německo)

Petriho misky 60 mm (TPP, Švýcarsko)

Předvážky BPS 51 (Boeco Germany, Německo)

Sérologické pipety (TPP, Švýcarsko)

Sterilní mikrošpičky (Eppendorf, Německo)

Třepačka orbitální GRANT PSU-10i (Grant, Velká Británie)

Třepačka Vortex (Biosan, Latvia)

Vodní lázeň Memmert WNB (Memmert, Německo)

Zdroj napětí PowerPac™ Basic Power Supply (BioRad, USA)

3.1.3 Používané roztoky

10% APS: 1 g APS v 10 ml H₂O

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

10% SDS: 10 g SDS v 100 ml H₂O

10x PBS: 40 g NaCl; 1g KCl; 1g KH₂PO₄; 16,05 g Na₂HPO₄ * 12H₂O v 500 ml destilované vody; pH = 7,4 – 7,5

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

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

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

1x LSB: 0,5 ml 4x LSB; 1,5 ml ddH₂O

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

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

1x TBS 0,1% Tween: 100ml 10x TBS; 900 ml destilované vody; 1 ml Tween

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

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

Blokační činidlo: 5 g sušeného odtučněného mléka v 95 ml TBS 0,1% Tween

Ponceau S: 0,5 g Ponceau S; 5 ml kyseliny octové v 100 ml destilované vody

3.1.4 Používané chemikálie

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

Aphidicolin (Sigma-Aldrich, USA)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, Česká republika)

Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, USA)

Dodecylsírán sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, USA)

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

Ethanol 70% a 96% (Fagron, Česká republika)

Fetální bovinní sérum (FBS) (Thermo Scientific, USA)

Glycerol (Penta, Česká republika)

Glycin (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (Penta, Česká republika)

Hydroxyurea (Sigma-Aldrich, USA)

Chemiluminiscenční činidlo SuperSignalTM West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, USA)

Chemiluminiscenční činidlo SuperSignalTM West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA)

Chlorid draselný (KCl) (Sigma-Aldrich, USA)

Chlorid sodný (NaCl) (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina octová (Penta, Česká republika)

Methylalkohol (Penta, Česká republika)

Penicilin (Sigma-Aldrich, USA)

Peroxodisírán amonný (APS) (Sigma-Aldrich, USA)

Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA)

Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad, USA)

siCON: Ambion Silencer™ Negative Control No. 1 siRNA (Thermo Scientific, USA)

siMTBP: s25786 (Thermo Scientific, USA)

siTICCR: s40362 (Thermo Scientific, USA)

siTopBP1: s21823 (Thermo Scientific, USA)

Transfekční činidlo Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Thermo Scientific, USA)

Opti-MEM™ Reduced Serum Medium (Thermo Scientific, USA)

Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)

Samantha Sušené mléko Odtučněné 150 g (Simandl, Česká republika)

Tetramethylethylenediamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, USA)

Trypsin (Thermo Scientific, USA)

Tween 20 (MP Biomedicals, USA)

1,5 M Tris, pH 8,8 (Sigma-Aldrich, USA)

0,5 M Tris, pH 6,8 (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.5 Používané protilátky

3.1.5.1 Primární protilátky pro Western Blot

| | | |
|-------------------|-------------|---|
| anti-MTBP | ab115529 | králík, polyklonální (Abcam, Velká Británie) |
| anti-MTBP | sc137201 | myš, monoklonální (Santa Cruz Biotechnologies, USA) |
| anti-MTBP | 500-301-875 | myš, monoklonální (Rockland Immunochemicals, USA) |
| anti-Chk1 | sc8408 | myš, monoklonální, ředění 1 : 500 (Santa Cruz Biotechnologies, USA) |
| anti-pChk1 (S317) | 2344S | králík, polyklonální, ředění 1 : 250 (Cell Signaling, USA) |
| anti-RPA70 | ab79398 | králík, monoklonální, ředění 1 : 5000 (Abcam, Velká Británie) |

| | | |
|--------------|--------|--|
| anti-TopBP1 | ab2402 | králík, polyklonální, ředění 1 : 2000 (Abcam, Velká Británie) |
| anti-Treslin | | Prof. Dunphy (Kumagai <i>et al.</i> , 2010), kralík, polyklonální, ředění 1 : 2000 |

3.1.5.2 Sekundární protilátky pro Western Blot

| | | |
|-----------------|--|--|
| anti-mouse IgG | | ovce, konjugovaná s Horseradish peroxidase linked whole antibody, ředění 1 : 1000 (GE Healthcare, USA) |
| anti-rabbit IgG | | osel, konjugovaná s Horseradish peroxidase linked whole antibody, ředění 1 : 1000 (GE Healthcare, USA) |

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace a pasážování buněk

Rozmražené buňky linie U-2 OS byly *in vitro* kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% hladiny CO₂. Kultivace byla prováděna v médiu DMEM obohaceném o 10% FBS (fetální bovinní sérum) a 1% směs antibiotik, která obsahovala penicilin a streptomycin. Vždy byl používán jednorázový sterilní spotřební materiál určený ke kultivaci. Buněčná konfluencí byla pozorována s využitím světelného mikroskopu. V případě vysoké buněčné konfluencí byly buňky pasážovány. Tento proces zahrnuje odlepení adherentních buněk od povrchu kultivační nádoby a přenesení buněk do nové sterilní kultivační nádoby a přidání čerstvého kultivačního média.

Pasážování buněk bylo prováděno v aseptických podmínkách ve flowboxu následujícím postupem. Po přesunutí kultivačních lahví z inkubátoru do flowboxu bylo nejprve odsáto veškeré staré kultivační médium. Buňky nacházející se na dně kultivační nádoby byly promyty 5 ml PBS, který byl na vodní lázni předehřát na teplotu kultivace buněk, aby se předešlo vyvolání stresu u buněk náhlou změnou teploty. Po odsání PBS byl přidán 1 ml proteolytického enzymu trypsin, který byl také předehřát na teplotu kultivace. Jeho funkcí je štěpení peptidových vazeb v místě karboxylu bazických aminokyselin. Důsledkem je uvolnění buněk ode dna kultivační nádoby. S kultivační nádobou obsahující trypsin bylo mírně protřepáno ze strany na stranu pro rovnoměrné rozprostření enzymu po celé ploše dna nádoby a byla vrácena přibližně na 3–5 minut do inkubátoru, jelikož bylo třeba dodržet optimální teplotu enzymatické aktivity. Po uplynutí této doby by měly být veškeré buňky odlepeny od stěny nádoby

a nacházet se v kapalně fázi. To bylo ověřeno pozorováním pod světelným mikroskopem.

Pokud se tak nestalo, bylo třeba buňky jemně mechanicky sklepat ze dna kultivační nádoby, případně ještě vrátit kultivační nádobu zpět do inkubátoru na maximálně další 3 minuty. Po trypsinizaci bylo do kultivační láhve přidáno čerstvé kultivační médium, ve kterém došlo mechanickým promícháním k rozsuspendování buněk.

Pro metodu siRNA transfekce bylo třeba znát množství vysazených buněk na Petriho misky. K tomu bylo využito přístrojového vybavení laboratoře pro počítání buněk Vi-Cell XR. Postup měření spočíval v odebrání 500 μ l média obsahujícího rozsuspendované buňky do speciální nádoby a vložení do přístroje. Přístrojem byl automaticky spočítán počet buněk na 1 ml. Na základě tohoto množství byl dopočítán objem buněčné suspenze, kterou bylo třeba nasadit na Petriho misky o průměru 60 mm tak, aby bylo nasazeno 600 000 buněk. Petriho misky byly doplněny na celkový objem 5 ml čerstvým predehřátým kultivačním médiem. Pro rovnoměrné rozptýlení buněk v celém objemu bylo s Petriho miskami jemně pokýváno ze strany na stranu a byly vloženy ke kultivaci do inkubátoru.

3.2.2 Transfekce buněčné linie

Pro umlčení exprese cílových proteinů byla využívána metoda siRNA transfekce. Jedná se o metodu založenou na posttranskripční regulaci genové exprese, která je využívána pro cílové umlčení studovaných genů. Principem je štěpení dvouvláknové RNA na krátké úseky nazývané siRNA, které jsou komplementární k sekvenci studovaného genu a vstupují do dráhy interference. Rozpoznávají homologní sekvence mRNA studovaného genu a spárováním dochází k zabránění genové exprese.

Buňky byly transfekovány druhý den od nasazení buněk při buněčné konfluenci 50 %. Množství transfekčního činidla a ostatních reagentů bylo připraveno následujícím způsobem a veškerá práce byla prováděna v aseptických podmínkách ve flowboxu.

Nejprve bylo smícháno 500 μ l transfekčního média Opti-MEM s 10 μ l transfekčním činidlem RNAiMAX v mikrozkušavce, která byla krátce promíchána na vortexu. Zároveň bylo v druhé mikrozkušavce smícháno 500 μ l transfekčního média Opti-MEM s 2 μ l siRNA o koncentraci 20 μ M. Tato siRNA byla komplementární ke genu kódující protein, který byl umlčován. Připravený roztok byl promíchán na

vortexu. Obě mikrozkmavky byly inkubovány po dobu 5 minut a následně smíchány dohromady. Mikrozkmavka byla promíchána na vortexu a inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Transfekční činidlo bylo přidáno do 2 ml média na Petriho misce obsahující nasazené buňky. Miska byla krouživými pohyby promíchána a uložena do inkubátoru, kde probíhala inkubace po dobu 8 hodin. Po uplynutí této doby bylo odsáto staré médium, vyměněno za čerstvé a miska vrácena do inkubátoru. Po 24 hodinách od transfekce byly buňky pasážovány a po 72 hodinách byly ovlivňovány chemickými činidly pro vyvolání replikačního stresu.

3.2.3 Ovlivnění buněk činidly pro vyvolání replikačního stresu

Ovlivňování buněk pro vyvolání replikačního stresu bylo pomocí dvou chemických činidel. Jednalo se o hydroxyureu (HU) a aphidicolin (APH). HU i APH bylo k buňkám přidáváno po 72 hodinách od siRNA interference. Přídavek činidel byl prováděn ve flowboxu za aseptických podmínek. Požadované množství HU a APH bylo přidáno ke kultivovaným buňkám na Petriho miskách. Miskami bylo jemně pokýváno ze strany na stranu a byly vloženy do inkubátoru k inkubaci. Ovlivnění buněk HU o koncentraci 2 mM trvalo jednu hodinu. V případě APH o koncentraci 10 μ M trvalo ovlivnění dvě hodiny.

Obě chemická činidla se využívají pro vyvolání replikačního stresu, avšak mechanismus, kterým jej způsobují, není stejný. HU zpomaluje iniciaci replikace DNA a postup replikačních vidlic. Zabraňuje inkorporaci nukleotidů při procesu replikace DNA, kdy interferuje s enzymem ribonukleotidreduktasou. Funkcí ribonukleotidreduktasy je přeměna nukleotiddifosfátů a nukleotidtrifosfátů na deoxynukleotiddifosfáty a deoxynukleotidtrifosfáty. Důsledkem interference HU s ribonukleotidreduktasou je tvorba menšího množství deoxynukleotidů, což je důvodem zpomalení rychlosti replikace DNA. Ovlivnění buněk HU má vliv na počátky replikace, které budou aktivovány, a tedy i vliv na vzdálenosti mezi nimi (Vesela *et al.*, 2017).

Mechanismus působení APH spočívá v inhibici replikativních polymeras α , ϵ a δ , kdy s nimi v průběhu replikace DNA interferuje. Dochází k navázání APH do aktivního místa polymerasy α , čímž je blokována inkorporace deoxycitidintrifosfátů. Zároveň není ovlivněna funkce helikasy, tudíž dochází k tvorbě dlouhých jednořetězcových vláken. Dochází k ovlivnění buněk nacházejících se v S fázi. Ostatní

postupují buněčným cyklem až do kontrolního bodu G1/S, kde dochází k jejich hromadění (Vesela *et al.*, 2017).

3.2.4 Western Blot

3.2.4.1 Příprava vzorků

Vzorky pro Western blot byly připravovány následujícím postupem. Veškeré médium bylo z Petriho misek odsáto. K buňkám bylo přidáno přibližně 4 ml roztoku PBS, který sloužil k promytí buněk. Roztok PBS byl odsát. Celý proces promytí byl proveden ve třech opakováních. Po posledním odsátí PBS bylo přidáno 170–350 μ l lyzačního pufru LSB podle počtu buněk na Petriho miskách. Pomocí pipety s nasazenou sterilní špičkou byl LBS krouživými pohyby rovnoměrně rozprostřen po povrchu Petriho misky. Vytvořený lyzát byl přenesen do mikrozkušavky a vložen do termotřepačky na pět minut při teplotě 95 °C a 1400 RPM. Po ochlazení byly vzorky zmrazeny a skladovány při teplotě –20 °C.

3.2.4.2 SDS PAGE

Proteiny ve vzorcích byly rozděleny pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu s přídavkem SDS. Gel byl připravován 8% nebo 10% v digestoři. Nejprve byl připraven 8% nebo 10% dělicí gel (Tab. 1), který byl napipetován mezi skla připravené ve stojánku přibližně 3 cm pod horní hranu skla. Takto připravený gel byl převrstven isopropanolem, který byl po ztuhnutí odsán a prostor mezi skly opláchnut destilovanou vodou. Na dělicí gel byl napipetován 5% zaostřovací gel (Tab. 2), do kterého byl vložen hřebínek. Složení zaostřovacího gelu bylo stejné pro oba typy dělicích gelů.

Plně ztuhlý gel byl vyjmut z aparatury a přenesen do elektroforetické vany, kam byl nalit 1 \times running pufr přibližně do třetiny a také do meziprostoru umístěných gelů. Po zalití byl vyjmut hřebínek ze zaostřovacího gelu a do vzniklých jamek bylo napipetováno 15 μ l vzorku. Do první jamky bylo napipetováno 10 μ l markeru molekulové hmotnosti Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards. Separace probíhala za konstantního elektrického proudu 0,04 A na dva gely přibližně 75 minut.

Tab. 1 Složení dělicích gelů

| | 8% dělicí gel (ml) | 10% dělicí gel (ml) |
|---------------------------|--------------------|---------------------|
| Destilovaná voda | 7,000 | 5,900 |
| 30% Akrylamid | 4,000 | 5,000 |
| 1,5 M Tris, pH 8,8 | 3,800 | 3,800 |
| 10% SDS | 0,150 | 0,150 |
| 10% APS | 0,150 | 0,150 |
| TEMED | 0,009 | 0,006 |

Tab. 2 Složení zaostřovacího gelu

| | 5% zaostřovací gel (ml) |
|---------------------------|-------------------------|
| Destilovaná voda | 3,400 |
| 30% Akrylamid | 0,890 |
| 0,5 M Tris, pH 6,8 | 0,630 |
| 10% SDS | 0,050 |
| 10% APS | 0,050 |
| TEMED | 0,005 |

3.2.4.3 Blotování

Po rozdělení proteinů podle molekulových hmotností následoval přenos na nitrocelulosovou membránu metodou polosuchého (semi-dry) western blotu. Gel byl po SDS–PAGE vyjmut. Zaostřovací gel byl odříznut a vyhozen. Dělicí gel obsahující rozdělené proteiny byl vložen do blotovací aparatury na nitrocelulosovou membránu mezi filtrační papíry, které byly předem namočený v 1× transferovém pufru. Přenos probíhal 90 minut od připojení k elektrickému zdroji, který byl nastaven na konstantní proud 0,3 A pro dva gely.

Cílem byl přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu. Ke zjištění, zda byl přenos úspěšný, byla membrána promyta destilovanou vodou a barvena roztokem Ponceau S. Následně byla membrána skalpelem rozřezána na části dle potřeby (podle molekulových hmotností zkoumaných proteinů) a 3× po dobu pěti minut promyta v 1× TBS + 0,1% Tween 20 na orbitální třepače pro odbarvení od Ponceau S. Po odbarvení byla membrána blokována v blokačním činidle, kterým byl 5% roztok sušeného mléka v TBS. Tím bylo zabráněno tvorbě nespecifických vazeb v místech,

kde nebyly přeblokovány žádné proteiny. Blokování trvalo 45 minut na orbitální třepačce.

Po blokování byly na membránu nanесeny primární protilátky ředěné v blokačním činidle. Inkubace probíhala v uzavřené krabici přes noc při teplotě 4 °C v lednici. Aby se předešlo vyschnutí membrány, byl do krabičky vložen ubrousek navlhčený destilovanou vodou.

Následující den byla membrána promyta od primárních protilátek 3× po dobu pěti minut v 1× TBS + 0,1% Tween 20 na orbitální třepačce a dále inkubována se sekundárními protilátkami konjugovanými křenovou peroxidasou. Ředění sekundárních protilátek bylo také v blokačním činidle a inkubace trvala jednu hodinu při pokojové teplotě. Po inkubaci se sekundárními protilátkami byla membrána opět 3× promyta v 1× TBS + 0,1% Tween 20.

3.2.4.4 Detekce proteinů

Pro detekci proteinů bylo využito chemiluminiscenčního činidla SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate a SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, které bylo smícháno poměru 1 : 3. Jedná se o substrát pro enzym, kterým je konjugovaná sekundární protilátka. Přeměňuje chemiluminiscenční substrát na nestabilní produkt. Stabilizací produktu dochází k vyzáření kvanta světla. Jeho množství je přímo úměrné množství vizualizovaného proteinu. Roztok chemiluminiscenčního činidla byl rovnoměrně nanесen na membránu před snímáním. Množství vyzářeného světla bylo měřeno laboratorním přístrojem Bio-RAD ChemiDoc™ MP Imaging System při expozičních 10–60 s.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Veškerá laboratorní práce byla prováděna v Laboratoři integrity genomu na Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého. Experimentální část byla poznamenána pandemií Covid-19, a tudíž byly experimenty provedeny pouze v jednom opakování.

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, jestli se protein MTBP podílí na aktivaci kinasy ATR pozorováním hladiny fosforylace jejího substrátu u rakovinné buněčné linie U-2 OS.

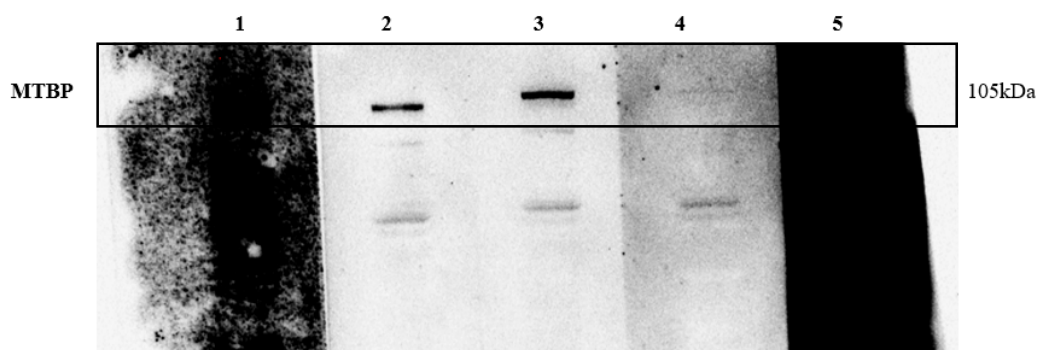
4.1 Testování specifity protilátek proti lidské MTBP

Nejprve bylo třeba vybrat vhodnou protilátku proti proteinu MTBP. Bylo nutné otestovat specifitu více protilátek vůči MTBP a zjistit optimální ředění pro využití v následujícím experimentu.

Testování specifity a optimálního ředění bylo pomocí Western blotu. Jako vzorky sloužily lyzáty připravené z buněčné linie U-2 OS. K imunodetekci byly použity tři primární protilátky anti-MTBP uvedené v Tab. 3 včetně ředění. Výsledek lze vidět na Obr. 8. Protilátky použité v první a páté dráze nebyly vhodné, jelikož vysoký signál pozadí znemožnil detekovat band proteinu MTBP. Vhodné bylo použití protilátky s označením sc137201. Její ředění bylo dostačující v poměru 1 : 300 (Obr. 8 dráha 2), lepší však v poměru 1 : 1000 (Obr. 8 dráha 3).

Tab. 3 Seznam využívaných protilátek k detekci proteinu MTBP a jejich ředění

| Číslo dráhy na WB | Protilátka detekující MTBP | Ředění protilátky |
|-------------------|----------------------------|-------------------|
| 1 | sc137201 | 1 : 100 |
| 2 | sc137201 | 1 : 300 |
| 3 | sc137201 | 1 : 1000 |
| 4 | 500-301-875 | 1 : 500 |
| 5 | ab115529 | 1 : 500 |

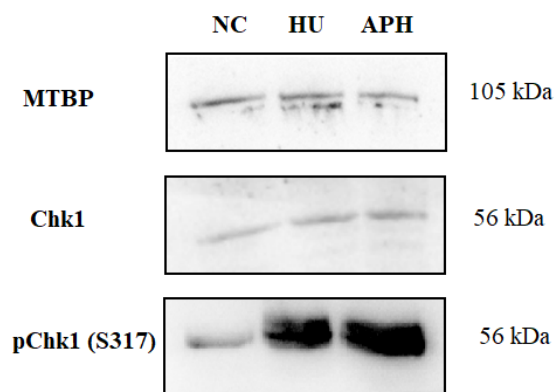


Obr. 8 Western blot analýza – testování specifity protilátek proti lidské MTBP v buněčné linii U-2 OS. Testování protilátky anti-MTBT sc137201 v drahách 1–3; Testování protilátky anti-MTBP 500-301-875 v dráze 4; Testování protilátky anti-MTBP ab115529 v dráze 5. Bandy detekující protein MTBP se nacházejí v černém rámečku.

4.2 Vyvolání replikačního stresu

Plně aktivovaná kinasa ATR je v buňkách přítomná při překonávání replikačního stresu, kdy je její funkcí lokální aktivace dormantních počátků replikace DNA (Toledo *et al.*, 2013). Z toho důvodu bylo v buňkách nutno navodit prostředí replikačního stresu chemickými činidly HU a APH. V této práci bylo pro vyvolání replikačního stresu využito dvou výše zmíněných chemických činidel, které nevyvolávají poškození DNA přímo (jako tomu je například při ovlivňování buněk UV nebo IR zářením), ale interagují s enzymy zapojenými do procesu replikace DNA. Dochází k hromadění dlouhých jednořetězcových vláken DNA jako důsledek narušeného fungování DNA polymeras (Vesela *et al.*, 2017).

Pro ověření vyvolání replikačního stresu v takové míře, kdy kinasa ATR fosforyluje své substráty, byla využita metoda Western blot. Vzorky použité pro Western blot byly z buněčné linie U-2 OS, která byla ovlivněna chemickými činidly HU a APH. Délka ovlivnění byla u HU 1 hodina a u APH 2 hodiny. Koncentrace HU byla 2 mM a koncentrace APH byla 10 μ M. Zda po této době a v uvedených koncentracích docházelo k vyvolání replikačního stresu, bylo vyhodnocováno z pozorování proteinu Chk1 a jeho fosforylované formy na serinu 317. Zároveň výsledek tohoto Western blotu sloužil také jako ověření specifity protilátek k detekci proteinů Chk1, pChk1 (S317) a MTBP. Protein MTBP sloužil jako kontrola, zda se ve vzorcích nachází stejné množství proteinů.



Obr. 9 Western blot analýza – ověření vzniku replikačního stresu po ovlivnění buněk HU a APH pozorováním fosforylace substrátu kinasy ATR u buněčné linie U-2 OS. Doba ovlivnění a koncentrace HU: 1 h, 2 mM; Doba ovlivnění a koncentrace APH: 2 h, 10 μ M. NC – negativní kontrola.

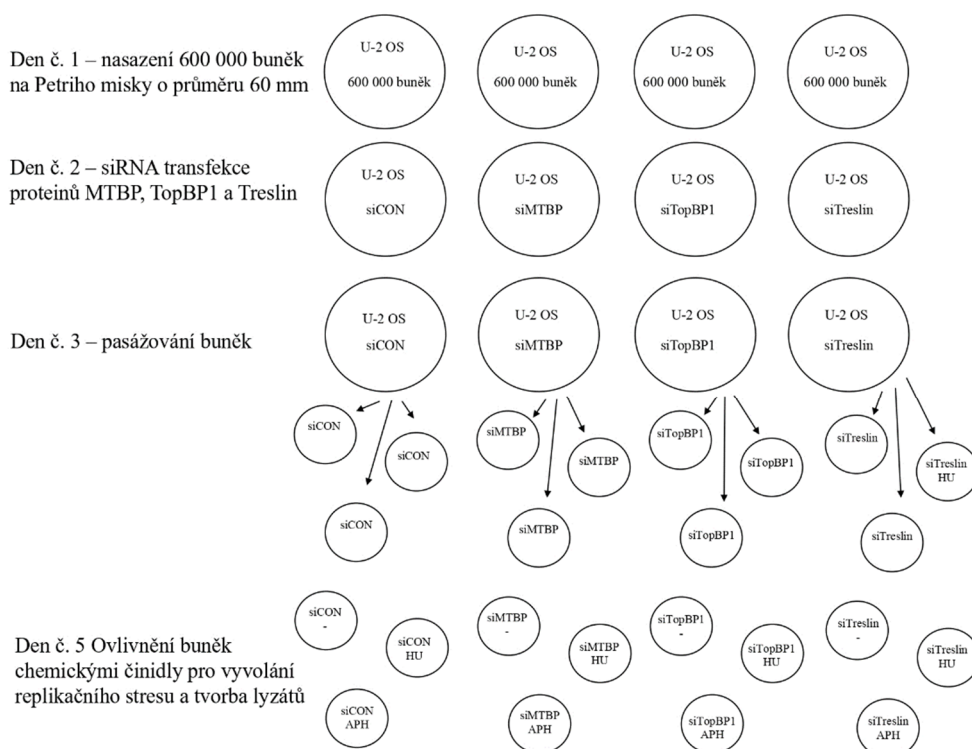
Po analýze výsledků se specifita protilátek jevila u všech využívaných jako dostačující (Obr. 9). Srovnáním celkové Chk1 s fosforylovanou formou Chk1 na serinu 317 se jeví po ovlivnění chemickými činidly jako dostačující, jelikož došlo k vyvolání replikačního stresu. Rozdíl ve fosforylaci po ovlivnění HU a APH ve srovnání s neovlivněnými buňkami nepřímo značí míru aktivity ATR.

Pokud bych chtěla ověřit přítomnost replikačního stresu alternativní metodou, mohla by být přítomnost replikačního stresu zjištěna například detekcí proteinů účastnících se signálních drah odpovídajících na poškození DNA (např.: BRCA1, MDC1). Při replikačním stresu dochází k jejich fosforylaci, která je pozorována. Dalšími metodami by mohlo být pozorování činnosti DNA polymeras. Jednou je například analýza vláken DNA. Využívá chemicky modifikovaných bází thymidinu (5-iodo-2'-deoxyuridinu a 5-chloro-2'-deoxyuridinu), které jsou značeny odlišnými barvami. V průběhu replikace DNA jsou zabudovávány do tvořících se vláken DNA. Výsledek je následně vyhodnocován pozorováním fluorescenčního signálu, kde podle barev dochází k vyhodnocení, zda došlo k pozastavení replikačních vidlic (značeno pouze první barvou), k restartu pozastavených vidlic (značeno oběma barvami) nebo syntéze vláken z nově vytvořených replikačních vidlic (značeno pouze druhou barvou) (Quinet *et al.*, 2017).

4.3 Ověření úspěšnosti umlčení proteinů MTBP, TopBP1 a Treslin

Kinasa ATR pro svou plnou aktivaci vyžaduje přítomnost mnoha proteinů. Jako nebytný aktivátor byl popsán protein TopBP1 (Kumagai *et al.*, 2006). Do jisté míry byl ve studii autorů Hassan *et al.* (2013) popsán i Treslin jako protein přispívající k aktivaci ATR. Jelikož se oba zmíněné proteiny na aktivaci ATR podílejí a cílem této bakalářské práce je popsat vliv proteinu MTBP při aktivaci ATR, pro porovnání jsem provedla také umlčení proteinů TopBP1 a Treslin, jelikož spolu s proteinem MTBP tvoří komplex TMT.

Umlčení exprese MTBP, TopBP1 a Treslin bylo provedeno metodou siRNA interference. Experiment byl prováděn 5 po sobě následujících dní. Schéma experimentu lze vidět na Obr. 10. Ověření umlčení exprese těchto proteinů bylo provedeno metodou Western blot (Obr. 11).



Obr. 10 Schéma experimentu siRNA transfekce. Den č. 1: nasazení buněk linie U-2 OS na 4 Petriho misky o průměru 60 mm; Den č. 2: siRNA transfekce; Den č. 3: pážování buněk na 12 Petriho misek o průměru 60 mm; Den č. 5: ovlivnění buněk chemickými činidly, doba ovlivnění a koncentrace HU: 1 h, 2 mM; doba ovlivnění a koncentrace APH: 2 h, 10 μ M, následovala tvorba 12 lyzátů. Pozn.: Den č. 4 není ve schématu zahrnut, jelikož s buňkami nebylo manipulováno.

Expresse genů byla úspěšně potlačena u všech tří umlčovaných proteinů (Obr. 11). Expresse proteinu MTBP byla umlčena v drahách 2, 6 a 10, proteinu Treslin v drahách 3, 7, 11 a proteinu TopBP1 v drahách 4, 8 a 12. V drahách 1, 5 a 9 se nacházely vzorky obsahující všechny proteiny a sloužily jako kontrolní.

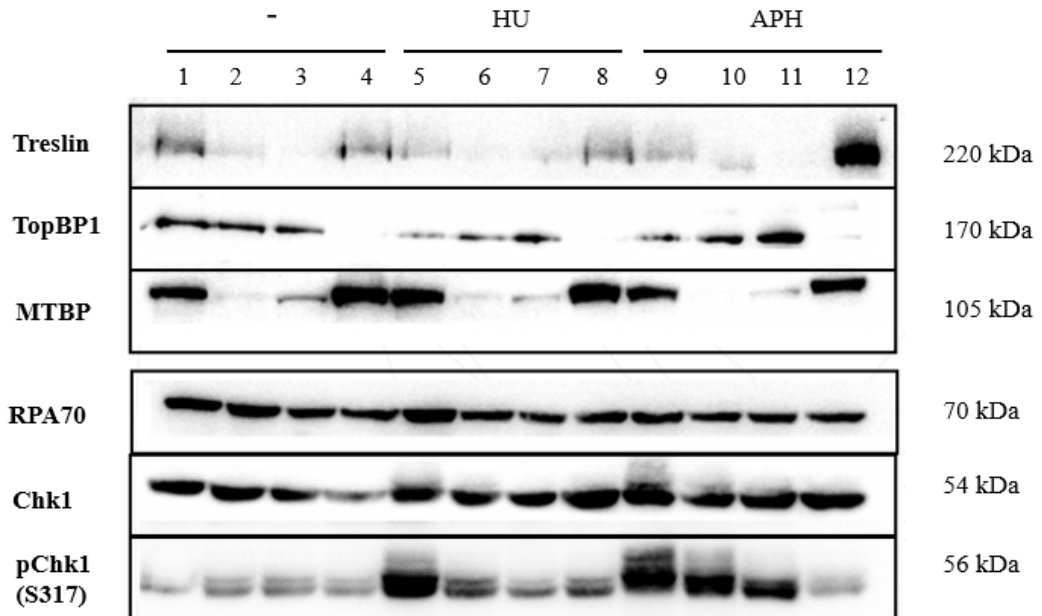
Míra exprese proteinu TopBP1 není podmíněna přítomností proteinů MTBP a Treslin i přesto, že jsou tyto proteiny součástí komplexu TMT, který je klíčový v iniciační fázi replikace DNA (Obr. 11). Důvodem by mohlo být, že komplex TMT vzniká vazbou proteinů MTBP a TopBP1 do odlišných míst proteinu Treslin (viz kapitola 2.4.1).

V případě umlčení MTBP a také proteinu Treslin docházelo k významným destabilizacím, které byly již dříve popsány (Boos *et al.*, 2013). Při umlčení MTBP došlo rapidnímu snížení také proteinu Treslin a naopak při umlčení Treslin bylo sníženo množství proteinu MTBP (Obr. 11). Důvodem je to, že proteiny Treslin a MTBP spolu tvoří heterotetramerní komplex a v případě odstranění jednoho ze členů dochází k destabilizaci druhého z nich (Kumagai a Dunphy, 2017; Volpi *et al.*, 2021).

4.4 Role MTBP při aktivaci kinasy ATR

Vliv proteinu MTBP při aktivaci kinasy ATR byl vyhodnocován pomocí Western blotu (Obr. 11). Míra, do jaké MTBP přispívá k aktivaci kinasy ATR, byla vyhodnocována prostřednictvím pozorování substrátu Chk1 a jeho fosforylované formy na serinu 317.

Vzorky použité pro Western blot byly z buněčné linie U-2 OS, která byla ovlivněna chemickými činidly HU (dráhy 5–8) a AHP (dráhy 9–12) a zároveň vzorky neovlivněné (1–4), které sloužily jako kontrola. Délka ovlivnění byla u HU 1 hodina a u APH 2 hodiny. Koncentrace HU byla 2 mM a koncentrace APH byla 10 μ M. Protein RPA70 sloužil jako kontrola, zda se ve vzorcích nachází stejné množství proteinů.



Obr. 11 Western blot analýza – ověření úspěšnosti umlčení proteinů MTBP, TopBP1 a Treslin a vliv proteinu MTBP v aktivaci kinasy ATR; Dráhy 1, 5, 9 kontrola bez umlčení proteinů, dráhy 2, 6, 10 umlčení MTBP, dráhy 3, 7, 11 umlčení Treslin, dráhy 4, 8, 12 umlčení TopBP1. Doba ovlivnění a koncentrace HU: 1 h, 2 mM; Doba ovlivnění a koncentrace APH: 2 h, 10 µM.

Ve vzorcích připravených z buněk neošetřených chemickými činidly pro vyvolání replikačního stresu nedocházelo k výrazně zvýšené fosforylaci Chk1 na serinu 317 (Obr. 11 dráhy 1–4). Důvodem je, že kinasa ATR nebyla plně aktivována, jelikož buňky nebyly vystavené působení stresových faktorů. Její míra aktivity je v nepřítomnosti replikačního stresu nízká, avšak není zcela neaktivní. Inhibuje spouštění těch počátků, které nejsou potřebné pro dokončení replikace DNA (Shechter *et al.*, 2004). Lze zaznamenat rozdíl mezi mírou fosforylace v dráze 1 ve srovnání s drahami 2, 3 a 4. Důvodem zvýšení může být, že odstranění MTBP i proteinu Treslin způsobuje zvýšení rychlosti replikace DNA, při kterém může docházet ke vzniku poškození DNA (Maya-Mendoza *et al.*, 2018). Zvýšení fosforylace ve čtvrté dráze může být z důvodu hromadění poškození DNA, které po umlčení proteinu TopBP1 nemůže být opravováno procesem homologní rekombinace (Moudry *et al.*, 2016).

Po vyvolání replikačního stresu pomocí HU (Obr. 11 dráhy 5–8) docházelo k aktivaci ATR. Také se projevilo umlčení výše zmíněných proteinů. Při porovnávání drah ovlivněných HU byla nejvyšší míra fosforylace v páté dráze, která sloužila jako kontrolní. Tento výsledek značí, že proteiny TopBP1, Treslin i MTBP ovlivňují míru aktivity ATR. V případě umlčení TopBP1 byla očekávána nejmenší míra fosforylace Chk1, jelikož tento protein byl autory Kumagai *et al.* (2006) popsán jako hlavní

nezbytný aktivátor kinasy ATR. Za mých podmínek však mělo největší vliv mělo umlčení proteinu Treslin v sedmé dráze. Příčinou mohla být efektivita siRNA transfekce, její načasování či jiné faktory. Míra fosforylace Chk1 po umlčení MTBP se zdá srovnatelná jako v případě umlčení TopBP1, tedy snížená. Umlčení Treslin vedlo také ke snížení aktivace ATR, které bylo ve srovnání s výsledky po umlčení MTBP a TopBP1 vyšší. Po ovlivnění HU mělo umlčení všech třech proteinů ve srovnání s pátou kontrolní dráhou fosforylací výrazně sníženou.

Rozdíl po umlčení proteinů lze vidět také po ovlivnění buněk APH (Obr. 11 dráhy 9–12). Po ovlivnění APH mělo největší vliv umlčení proteinu TopBP1. K fosforylaci po umlčení TopBP1 téměř nedocházelo. Množství fosforylované formy Chk1 bylo srovnatelné jako v případně drah 2–4 v podmínkách bez replikačního stresu. Důvodem, proč po ovlivnění APH byla nejvíce snížená fosforylace Chk1 u buněk s umlčenou expresí TopBP1, může být následující fakt. APH se využívá jako chemické činidlo, které vyvolává replikační stres přímou interakcí s polymerasou α . TopBP1 v buňkách se podílí právě spolu s polymerasou α na vazbě komplexu 9–1–1 do míst pozastavených replikačních vidlic. V případě, že byla umlčena exprese proteinu TopBP1 a zároveň blokována činnost polymerasy α po ovlivnění APH, pravděpodobně nemohlo docházet k lokalizaci komplexu 9–1–1, který plní funkci při aktivaci kinasy ATR (Yan a Michael, 2009; Vesela *et al.*, 2017).

Umlčení exprese proteinu TopBP1 mělo po ovlivnění APH vliv na protein Treslin. Ten byl stabilizován (Obr. 11 dráha 12). Zvýšení množství proteinu Treslin po ovlivnění APH v kombinaci s umlčením proteinu TopBP1 nebylo zatím žádnou publikací popsáno. Vzhledem k tomu, že experiment nebyl proveden ve více opakováních, je možné, že se jednalo o chybu, která vznikla během blotování.

Po umlčení proteinu Treslin došlo ke snížení fosforylace proteinu Chk1. Tyto výsledky experimentu jsou v souladu s již publikovanými daty autorů Hassan *et al.* (2013), kde se zabývali vlivem proteinu Treslin v checkpointové odpovědi. Tato studie popsala vliv proteinu Treslin v *in vitro* i *in vivo* podmínkách pozorováním míry fosforylace Chk1 na serinu 345. V závislosti na snižující se koncentraci proteinu Treslin docházelo ke snížení míry fosforylace proteinu Chk1. Zároveň byla schopnost fosforylace kinasou ATR v přítomnosti proteinu Treslin podmíněna interakcí Treslin s N-koncovou doménou proteinu TopBP1 (Hassan *et al.*, 2013).

V případě umlčení MTBP došlo ke snížení fosforylace Chk1 ve srovnání s kontrolní dráhou (Obr. 11 dráhy 9–10), ale zároveň byla míra aktivity ATR do jisté míry zachována. Porovnáním s umlčením proteinu Treslin v jedenácté dráze byla míra fosforylace srovnatelná, kdyžto ve srovnání s umlčením proteinu TopBP1 ve dvanácté byla výrazně vyšší.

Z výsledku vyplývá, že protein MTBP ovlivňuje míru aktivity ATR. Lze se domnívat, že protein MTBP se pravděpodobně zapojuje do checkpointové odpovědi aktivované replikačním stresem spolu s proteiny Treslin a TopBP1 (Garcia *et al.*, 2005; Hassan *et al.*, 2013). Zároveň je spolu s nimi v buňce potřebný jako regulátor spouštění počátků replikace DNA (Kumagai a Dunphy, 2017; Kumagai a Dunphy, 2020; Ferreira *et al.*, 2021).

V jedné z nejnovějších studií autorů Ferreira *et al.* (2021) byla popsána spojitost kinasy ATR s proteinem MTBP v regulaci spouštění počátků replikace DNA. Byl popsán vliv fosforylace proteinu MTBP na regulaci spouštění počátků. MTBP pro svou funkci při řízení spouštění počátků vyžaduje fosforylaci, která je vyvolána kinasami CDK, Cdk8/19–cyclin C a checkpointovými kinasami podílejícími se na opravách poškozené DNA. Jednou je právě kinasa ATR, která fosforylací proteinu MTBP dokáže inhibovat spouštění počátků v buňkách s nenarušeným buněčným cyklem. Byla diskutována funkce 14 fosforylačních míst na proteinu MTBP, které jejich fosforylací regulovaly rychlost spouštění počátků replikace DNA. V buňkách bez poškození DNA se tato regulace jevila jako nezbytná (Ferreira *et al.*, 2021). Jedním z možných vysvětlení, proč po umlčení exprese proteinu MTBP dochází ke zvýšené rychlosti replikace DNA (Maya-Mendoza *et al.*, 2018), by tak mohl být fakt, že k fosforylaci proteinu MTBP v jeho nepřítomnosti nemůže docházet, a tím buňka částečně ztrácí kontrolu nad regulací spouštění počátků. Nekontrolované spouštění počátků může v buňce vyvolávat replikační stres, a tak aktivovat kinasy podílející se na odpovědi na poškození DNA.

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala rolí proteinu MTBP v aktivaci kinasy ATR. V rámci teoretické části byl popsán mechanismus aktivace kinasy ATR, příčiny její aktivace, vliv na spouštění počátků replikace DNA a role replikačních proteinů MTBP, TopBP1 a Treslin. Experimentální část byla prováděna na rakovinné buněčné linii U-2 OS. Byla otestována aktivita kinasy ATR pomocí fosforylace substrátu Chk1 za podmínek replikačního stresu indukovaného hydroxyureou a aphidicolinem v buňkách s a bez proteinu MTBP. Mimo jiné byl také popsán vztah proteinů Treslin a MTBP v komplexu Treslin–MTBP.

Z výsledků této práce vyplývá, že protein MTBP má vliv na aktivaci kinasy ATR, jelikož při umlčení exprese metodou siRNA interference došlo ke snížení míry fosforylace Chk1 ve srovnání s buňkami obsahujícími MTBP. Míra kinasové aktivity ATR byla částečně zachována. Ke snížení fosforylace Chk1 docházelo jak po ovlivnění hydroxyureou, tak i po ovlivnění aphidicolinem. Míra fosforylace nebyla však zcela stejně snížena. To bylo odůvodněno rozdílným mechanismem působení těchto činidel vyvolávajících replikační stres. Dále byl popsán vliv umlčení proteinu MTBP na komplex Treslin–MTBP, kde v případě umlčení MTBP byl destabilizován protein Treslin. Stejný vliv mělo umlčení proteinu Treslin na stabilitu MTBP.

6 LITERATURA

- Agarwal N., Tochigi Y., Adhikari A. S., Cui S., Cui Y., Iwakuma T. (2011): MTBP plays a crucial role in mitotic progression and chromosome segregation. *Cell death and differentiation*, **18**, 1208–1219.
- Agarwal N., Adhikari A. S., Iyer S. V., Hekmatdoost K., Welch D. R., Iwakuma T. (2013): MTBP suppresses cell migration and filopodia formation by inhibiting ACTN4. *Oncogene*, **32**, 462–470.
- Anantha R. W., Vassin V. M., Borowiec J. A. (2007): Sequential and synergistic modification of human RPA stimulates chromosomal DNA repair. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 35910–35923.
- Anantha R. W., Sokolova E., Borowiec J. A. (2008): RPA phosphorylation facilitates mitotic exit in response to mitotic DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 12903–12908.
- Baretić D., Williams R. L. (2014): PIKKs--the solenoid nest where partners and kinases meet. *Current opinion in structural biology*, **29**, 134–142.
- Barlow C., Hirotsune S., Paylor R., Liyanage M., Eckhaus M., Collins F., Shiloh Y., Crawley J. N., Ried T., Tagle D., Wynshaw-Boris A. (1996): Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*, **86**, 159–171.
- Bass T. E., Luzwick J. W., Kavanaugh G., Carroll C., Dungrawala H., Glick G. G., Feldkamp M. D., Putney R., Chazin W. J., Cortez D. (2016): ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity. *Nature cell biology*, **18**, 1185–1195.
- Bass T. E., Cortez D. (2019): Quantitative phosphoproteomics reveals mitotic function of the ATR activator ETAA1. *The Journal of cell biology*, **218**, 1235–1249.
- Bell S. P., Dutta A. (2002): DNA replication in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry*, **71**, 333–374.
- Binz S. K., Sheehan A. M., Wold M. S. (2004): Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA repair*, **3**, 1015–1024.
- Block W. D., Yu Y., Lees-Miller S. P. (2004): Phosphatidyl inositol 3-kinase-like serine/threonine protein kinases (PIKKs) are required for DNA damage-induced phosphorylation of the 32 kDa subunit of replication protein A at threonine 21. *Nucleic acids research*, **32**, 997–1005.
- Bochkareva E., Korolev S., Lees-Miller S. P., Bochkarev A. (2002): Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA. *The EMBO journal*, **21**, 1855–1863.
- Boos D., Sanchez-Pulido L., Rappas M., Pearl L. H., Oliver A. W., Ponting C. P., Diffley J. F. (2011): Regulation of DNA replication through Sld3-Dpb11 interaction is conserved from yeast to humans. *Current biology*, **21**, 1152–1157.
- Boos D., Yekezare M., Diffley J. F. (2013): Identification of a heteromeric complex that promotes DNA replication origin firing in human cells. *Science*, **340**, 981–984.
- Boos D., Ferreira P. (2019): Origin Firing Regulations to Control Genome Replication Timing. *Genes*, **10**, 199.
- Boyd M. T., Vlatkovic N., Haines D. S. (2000): A novel cellular protein (MTBP) binds to MDM2 and induces a G1 arrest that is suppressed by MDM2. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 31883–31890.
- Brown E. J., Baltimore D. (2000): ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes & development*, **14**, 397–402.
- Brown E. J., Baltimore D. (2003): Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes & development*, **17**, 615–628.
- Cimprich K. A., Shin T. B., Keith C. T., Schreiber S. L. (1996): cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 2850–2855.
- Cimprich K. A., Cortez D. (2008): ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **9**, 616–627.

- Cortez D., Guntuku S., Qin J., Elledge S. J. (2001): ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*, **294**, 1713–1716.
- Cotta-Ramusino C., McDonald E. R. 3rd, Hurov K., Sowa M. E., Harper J. W., Elledge S. J. (2011): A DNA damage response screen identifies RHINO, a 9-1-1 and TopBP1 interacting protein required for ATR signaling. *Science*, **332**, 1313–1317.
- Delacroix S., Wagner J. M., Kobayashi M., Yamamoto K., Karnitz L. M. (2007): The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes & development*, **21**, 1472–1477.
- Diffley J. F. (2004): Regulation of early events in chromosome replication. *Current biology*, **14**, R778–R786.
- Duursma A. M., Driscoll R., Elias J. E., Cimprich K. A. (2013): A role for the MRN complex in ATR activation via TOPBP1 recruitment. *Molecular cell*, **50**, 116–122.
- Elledge S. J. (1996): Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, **274**, 1664–1672.
- Ellison V., Stillman B. (2003): Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA. *PLoS biology*, **1**, E33.
- Evrin C., Clarke P., Zech J., Lurz R., Sun J., Uhle S., Li H., Stillman B., Speck C. (2009): A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 20240–20245.
- Fanning E., Klimovich V., Nager A. R. (2006): A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic acids research*, **34**, 4126–4137.
- Feng J., Wakeman T., Yong S., Wu X., Kornbluth S., Wang X. F. (2009): Protein phosphatase 2A-dependent dephosphorylation of replication protein A is required for the repair of DNA breaks induced by replication stress. *Molecular and cellular biology*, **29**, 5696–5709.
- Feng S., Zhao Y., Xu Y., Ning S., Huo W., Hou M., Gao G., Ji J., Guo R., Xu D. (2016): Ewing Tumor-associated Antigen 1 Interacts with Replication Protein A to Promote Restart of Stalled Replication Forks. *The Journal of biological chemistry*, **291**, 21956–21962.
- Ferreira P., Höfer V., Kronshage N., Marko A., Reusswig K. U., Tetik B., Dießel C., Köhler K., Tschernoster N., Altmüller J., Schulze N., Pfander B., Boos D. (2021): MTBP phosphorylation controls DNA replication origin firing. *Scientific reports*, **11**, 4242.
- Flaggs G., Plug A. W., Dunks K. M., Mundt K. E., Ford J. C., Quiggle M. R., Taylor E. M., Westphal C. H., Ashley T., Hoekstra M. F., Carr A. M. (1997): Atm-dependent interactions of a mammalian chk1 homolog with meiotic chromosomes. *Current biology*, **7**, 977–986.
- Fragkos M., Ganier O., Coulombe P., Méchali M. (2015): DNA replication origin activation in space and time. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **16**, 360–374.
- Garcia V., Furuya K., Carr A. M. (2005): Identification and functional analysis of TopBP1 and its homologs. *DNA repair*, **4**, 1227–1239.
- Ge X. Q., Blow J. J. (2010): Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories. *The Journal of cell biology*, **191**, 1285–1297.
- Grieb B. C., Gramling M. W., Arrate M. P., Chen X., Beauparlant S. L., Haines D. S., Xiao H., Eischen C. M. (2014): Oncogenic protein MTBP interacts with MYC to promote tumorigenesis. *Cancer research*, **74**, 3591–3602.
- Haahr P., Hoffmann S., Tollenaere M. A., Ho T., Toledo L. I., Mann M., Bekker-Jensen S., Räschele M., Mailand N. (2016): Activation of the ATR kinase by the RPA-binding protein ETAA1. *Nature cell biology*, **18**, 1196–1207.
- Harper J. W., Elledge S. J. (2007): The DNA damage response: ten years after. *Molecular cell*, **28**, 739–745.
- Hassan B. H., Lindsey-Boltz L. A., Kemp M. G., Sancar A. (2013): Direct Role for the Replication Protein Treslin (Ticrr) in the ATR Kinase-mediated Checkpoint Response. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 18903–18910.
- Chen Y., Wang B. C., Xiao Y. (2012): PI3K: a potential therapeutic target for cancer. *Journal of cellular physiology*, **227**, 2818–2821.

- Ilves I., Petojevic T., Pesavento J. J., Botchan M. R. (2010): Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Molecular cell*, **37**, 247–258.
- Itou H., Shirakihara Y., Araki H. (2015): The quaternary structure of the eukaryotic DNA replication proteins Sld7 and Sld3. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **71**, 1649–1656.
- Jackson S. P., Bartek J. (2009): The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **461**, 1071–1078.
- Kanke M., Kodama Y., Takahashi T. S., Nakagawa T., Masukata H. (2012): Mcm10 plays an essential role in origin DNA unwinding after loading of the CMG components. *The EMBO journal*, **31**, 2182–2194.
- Keegan K. S., Holtzman D. A., Plug A. W., Christenson E. R., Brainerd E. E., Flaggs G., Bentley N. J., Taylor E. M., Meyn M. S., Moss S. B., Carr A. M., Ashley T., Hoekstra M. F. (1996): The Atr and Atm protein kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes. *Genes & development*, **10**, 2423–2437.
- Kim C., Snyder R. O., Wold M. S. (1992): Binding properties of replication protein A from human and yeast cells. *Molecular and cellular biology*, **12**, 3050–3059.
- Knowles M. A., Selby P. J. (2005): Chapter 9 The cancer cell cycle. In: *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. 4th edition, Oxford University Press, New York, U.S.A., 156-169.
- Köhler K., Sanchez-Pulido L., Höfer V., Marko A., Ponting C. P., Snijders A. P., Feederle R., Schepers A., Boos D. (2019): The Cdk8/19-cyclin C transcription regulator functions in genome replication through metazoan Sld7. *PLoS biology*, **17**, e2006767.
- Kumagai A., Dunphy W. G. (2000): Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Molecular cell*, **6**, 839–849.
- Kumagai A., Lee J., Yoo H. Y., Dunphy W. G. (2006): TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell*, **124**, 943–955.
- Kumagai A., Shevchenko A., Shevchenko A., Dunphy, W. G. (2010): Treslin collaborates with TopBP1 in triggering the initiation of DNA replication. *Cell*, **140**, 349–359.
- Kumagai A., Shevchenko A., Shevchenko A., Dunphy W. G. (2011): Direct regulation of Treslin by cyclin-dependent kinase is essential for the onset of DNA replication. *The Journal of cell biology*, **193**, 995–1007.
- Kumagai A., Dunphy W. G. (2017): MTBP, the partner of Treslin, contains a novel DNA-binding domain that is essential for proper initiation of DNA replication. *Molecular biology of the cell*, **28**, 2998–3012.
- Kumagai A., Dunphy W. G. (2020): Binding of the Treslin-MTBP Complex to Specific Regions of the Human Genome Promotes the Initiation of DNA Replication. *Cell reports*, **32**, 108178.
- Lao Y., Lee C. G., Wold M. S. (1999): Replication protein A interactions with DNA. 2. Characterization of double-stranded DNA-binding/helix-destabilization activities and the role of the zinc-finger domain in DNA interactions. *Biochemistry*, **38**, 3974–3984.
- Lee J., Kumagai A., Dunphy W. G. (2007): The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 28036–28044.
- Lee D. H., Pan Y., Kanner S., Sung P., Borowiec J. A., Chowdhury D. (2010): A PP4 phosphatase complex dephosphorylates RPA2 to facilitate DNA repair via homologous recombination. *Nature structural & molecular biology*, **17**, 365–372.
- Lee Y. C. Zhou Q., Chen J., Yuan J. (2016): RPA-Binding Protein ETAA1 Is an ATR Activator Involved in DNA Replication Stress Response. *Current biology*, **26**, 3257–3268.
- Leonard A. C., Mechali M. (2013): DNA Replication Origins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**, a010116.
- Lindahl T., Barnes D. E. (2000): Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, **65**, 127–133.
- Liu Q., Guntuku S., Cui X. S., Matsuoka S., Cortez D., Tamai K., Luo G., Carattini-Rivera S., DeMayo F., Bradley A., Donehower L. A., Elledge S. J. (2000): Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes & development*, **14**, 1448–1459.

- Liu S., Opiyo S. O., Manthey K., Glanzer J. G., Ashley A. K., Amerin C., Troksa K., Shrivastav M., Nickoloff J. A., Oakley G. G. (2012): Distinct roles for DNA-PK, ATM and ATR in RPA phosphorylation and checkpoint activation in response to replication stress. *Nucleic acids research*, **40**, 10780–10794.
- Lovejoy C. A., Cortez D. (2009): Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA repair*, **8**, 1004–1008.
- Mannino J. L., Kim W., Wernick M., Nguyen S. V., Braquet R., Adamson A. W., Den Z., Batzer M. A., Collins C. C., Brown K. D. (2001): Evidence for alternate splicing within the mRNA transcript encoding the DNA damage response kinase ATR. *Gene*, **272**, 35–43.
- Matsuoka S., Ballif B. A., Smogorzewska A., McDonald E. R. 3rd, Hurov K. E., Luo J., Bakalarski C. E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi S. P., Elledge S. J. (2007): ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, **316**, 1160–1166.
- Maya-Mendoza A., Moudry P., Merchut-Maya J. M., Lee M. H., Strauss R., Bartek J. (2018): High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. *Nature*, **559**, 279–284.
- McMahon S. B., Van Buskirk H. A., Dugan K. A., Copeland T. D., Cole M. D. (1998): The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell*, **94**, 363–74.
- Moudry P., Watanabe K., Wolanin K. M., Bartkova J., Wassing I. E., Watanabe S., Strauss R., Troelsgaard Pedersen R., Oestergaard V. H., Lisby M., Andújar-Sánchez M., Maya-Mendoza A., Esashi F., Lukas J., Bartek J. (2016): TOPBP1 regulates RAD51 phosphorylation and chromatin loading and determines PARP inhibitor sensitivity. *The Journal of cell biology*, **212**, 281–288.
- Murga M., Bunting S., Montaña M. F., Soria R., Mulero F., Cañamero M., Lee Y., McKinnon P. J., Nussenzweig A., Fernandez-Capetillo O. (2009): A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nature genetics*, **41**, 891–898.
- Niida H., Katsuno Y., Banerjee B., Hande M. P., Nakanishi M. (2007): Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation. *Molecular and cellular biology*, **27**, 2572–2581.
- Nyberg K. A., Michelson R. J., Putnam C. W., Weinert T. A. (2002): Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annual review of genetics*, **36**, 617–656.
- Oakley G. G., Patrick S. M. (2010): Replication protein A: directing traffic at the intersection of replication and repair. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, **15**, 883–900.
- O'Driscoll M., Ruiz-Perez V. L., Woods C. G., Jeggo P. A., Goodship J. A. (2003): A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nature genetics*, **33**, 497–501.
- Okita N., Minato S., Ohmi E., Tanuma S., Higami Y. (2012): DNA damage-induced CHK1 autophosphorylation at Ser296 is regulated by an intramolecular mechanism. *FEBS letters*, **586**, 3974–3979.
- Olson E., Nievera C. J., Klimovich V., Fanning E., Wu X. (2006): RPA2 is a direct downstream target for ATR to regulate the S-phase checkpoint. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 39517–39533.
- Parrilla-Castellar E. R., Arlander S. J., Karnitz L. (2004): Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA repair*, **3**, 1009–1014.
- Paulovich, A. G., Toczyski, D. P., Hartwell, L. H. (1997): When checkpoints fail. *Cell*, **88**, 315–321.
- Petersen P., Chou D. M., You Z., Hunter T., Walter J. C., Walter G. (2006): Protein phosphatase 2A antagonizes ATM and ATR in a Cdk2- and Cdc7-independent DNA damage checkpoint. *Molecular and cellular biology*, **26**, 1997–2011.
- Quinet A., Carvajal-Maldonado D., Lemacon D., Vindigni A. (2017): DNA Fiber Analysis: Mind the Gap!. *Methods in enzymology*, **591**, 55–82.
- Remus D., Beuron F., Tolun G., Griffith J. D., Morris E. P., Diffley J. F. (2009): Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell*, **139**, 719–730.

- Remus D., Diffley J. F. (2009): Eukaryotic DNA replication control: lock and load, then fire. *Current opinion in cell biology*, **21**, 771–777.
- Saldivar J. C., Hamperl S., Bocek M. J., Chung M., Bass T. E., Cisneros-Soberanis F., Samejima K., Xie L., Paulson J. R., Earnshaw W. C., Cortez D., Meyer T., Cimprich K. A. (2018): An intrinsic S/G2 checkpoint enforced by ATR. *Science*, **361**, 806–810.
- Sanchez Y., Wong C., Thoma R. S., Richman R., Wu Z., Piwnicka-Worms H., Elledge S. J. (1997): Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*, **277**, 1497–1501.
- Savitsky K., Bar-Shira A., Gilad S., Rotman G., Ziv Y., Vanagaite L., Tagle D. A., Smith S., Uziel T., Sfez S., Ashkenazi M., Pecker I., Frydman M., Harnik R., Patanjali S. R., Simmons A., Clines G. A., Sartiel A., Gatti R. A., Chessa L., Shiloh Y. (1995): A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, **268**, 1749–1753.
- Shechter D., Costanzo V., Gautier J. (2004): ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nature cell biology*, **6**, 648–655.
- Shieh S. Y., Ahn J., Tamai K., Taya Y., Prives C. (2000): The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes & development*, **14**, 289–300.
- Smits V., Cabrera E., Freire R., Gillespie D. A. (2019): Claspin - checkpoint adaptor and DNA replication factor. *The FEBS journal*, **286**, 441–455.
- Snustad P. D. a Simmons M. J. (2017): Kapitola 10 Replikace DNA a chromozomů. In: *Genetika*. 2. vydání (Relichová J.), Masarykova Univerzita, Brno, 220-254.
- Snustad P. D., Simmons M. J. (2017): Kapitola 23 Genetická podstata rakoviny. In: *Genetika*. 2. vydání (Relichová J.), Masarykova Univerzita, Brno, 613-637.
- Tanaka S., Nakato R., Katou Y., Shirahige K., Araki H. (2011): Origin association of Sld3, Sld7, and Cdc45 proteins is a key step for determination of origin-firing timing. *Current biology*, **21**, 2055–2063.
- Thada V., Cortez D. (2019): Common motifs in ETAA1 and TOPBP1 required for ATR kinase activation. *The Journal of biological chemistry*, **294**, 8395–8402.
- Thada V., Cortez D. (2021): ATR activation is regulated by dimerization of ATR activating proteins. *The Journal of biological chemistry*, **296**, 100455.
- Toledo L. I., Altmeyer M., Rask M. B., Lukas C., Larsen D. H., Povlsen L. K., Bekker-Jensen S., Mailand N., Bartek J., Lukas J. (2013): ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell*, **155**, 1088–1103.
- Unsal-Kaçmaz K., Sancar A. (2004): Quaternary structure of ATR and effects of ATRIP and replication protein A on its DNA binding and kinase activities. *Molecular and cellular biology*, **24**, 1292–1300.
- Vassin V. M., Anantha R. W., Sokolova E., Kanner S., Borowiec J. A. (2009): Human RPA phosphorylation by ATR stimulates DNA synthesis and prevents ssDNA accumulation during DNA-replication stress. *Journal of cell science*, **122**, 4070–4080.
- Venclovas C., Colvin M. E., Thelen M. P. (2002): Molecular modeling-based analysis of interactions in the RFC-dependent clamp-loading process. *Protein science*, **11**, 2403–2416.
- Vesela E., Chroma K., Turi Z., Mistrik M. (2017): Common Chemical Inductors of Replication Stress: Focus on Cell-Based Studies. *Biomolecules*, **7**, 19.
- Volpi I., Gillespie P. J., Chadha G. S., J. J. Blow J. J. (2021): The role of DDK and Treslin-MTBP in coordinating replication licensing and pre-Initiation Complex formation. *BioRxiv the preprint server for biology*.
- Woodward A. M., Göhler T., Luciani M. G., Oehlmann M., Ge X., Gartner A., Jackson D. A., Blow J. J. (2006): Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *The Journal of cell biology*, **173**, 673–683.
- Wu X., Shell S. M., Zou Y. (2005): Interaction and colocalization of Rad9/Rad1/Hus1 checkpoint complex with replication protein A in human cells. *Oncogene*, **24**, 4728–4735.
- Xu Y., Ashley T., Brainerd E. E., Bronson R. T., Meyn M. S., Baltimore D. (1996): Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes & development*, **10**, 2411–2422.

- Yamane K., Kawabata M., Tsuruo T. (1997): A DNA-topoisomerase-II-binding protein with eight repeating regions similar to DNA-repair enzymes and to a cell-cycle regulator. *European journal of biochemistry*, **250**, 794–799.
- Yan S., Michael W. M. (2009): TopBP1 and DNA polymerase alpha-mediated recruitment of the 9-1-1 complex to stalled replication forks: implications for a replication restart-based mechanism for ATR checkpoint activation. *Cell cycle*, **8**, 2877–2884.
- Yoo H. Y., Kumagai A., Shevchenko A., Shevchenko A., Dunphy W. G. (2007): Ataxia-telangiectasia mutated (ATM)-dependent activation of ATR occurs through phosphorylation of TopBP1 by ATM. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 17501–17506.
- Zhao H., Piwnicka-Worms H. (2001): ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Molecular and cellular biology*, **21**, 4129–4139.
- Zhong Y., Nellimoottil T., Peace J. M., Knott S. R., Villwock S. K., Yee J. M., Jancuska J. M., Rege S., Tecklenburg M., Sclafani R. A., Tavaré S., Aparicio O. M. (2013): The level of origin firing inversely affects the rate of replication fork progression. *The Journal of cell biology*, **201**, 373–383.
- Zou L., Elledge S. J. (2003): Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, **300**, 1542–1548.

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

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|--------------------|--|
| AAD | ATR aktivační doména |
| AP-1 | activator protein 1 |
| APH | aphidicolin |
| APS | peroxodisíran amonný |
| ATM | ataxia-telangiectasia mutated |
| ATR | ataxia telangiectasia and Rad3-related |
| ATRIP | ATR interacting protein |
| BRCA1 | breast cancer 1 |
| BRCT | BRCA1 C Terminus |
| Cdc25A | cell division cycle 45A |
| Cdc25C | cell division cycle 45C |
| CDC45 | cell division cycle 45 |
| CDC6 | cell division cycle 6 |
| CDK | cyklin dependentní kinasa |
| CDK2 | cyklin dependentní kinasa 2 |
| CDT1 | chromatin licensing and DNA replication factor 1 |
| CMG | CDC45–MCM2-7–GINS |
| CTCF | CCCTC-binding factor |
| CTM | C-terminal MTBP |
| DBD-D | DNA binding domain |
| ddH ₂ O | dvakrát destilovaná voda |
| DDK | Dbf4-dependent kinase |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DNA-PK | ataxia telangiectasia and Rad3-related |

| | |
|---------|--|
| Dpb11 | DNA polymerase B-associated protein 11 |
| DTT | dithiothreitol |
| ETAA1 | Ewing's tumor – associated antigen 1 |
| FBS | fetální bovinní sérum |
| G4 | G-quadruplex |
| GINS | go-ichi-ni-san z japonského překladu 5-1-2-3 označující čísla podjednotek komplexu (Sld5, Psf1, Psf2 Psf3) |
| H3K4me2 | histone H3 dimethylated at lysine 4 |
| HU | hydroxyurea |
| Chk1 | checkpoint kinase 1 |
| Chk2 | checkpoint kinase 2 |
| IR | infračervené záření z angl. InfraRed |
| LSB | Laemmli Sample Buffer |
| MCM | minichromosome maintenance |
| MDC1 | mediator of DNA damage checkpoint protein 1 |
| MDM2 | mouse double minute 2 homolog |
| MRN | MRE11–RAD50–NBS1 |
| mRNA | messenger RNA |
| MTBP | Mdm2-binding protein |
| mTOR | mammalian target of rapamycin |
| ORC | origin recognition complex |
| PBS | Posphate Buffered Saline |
| PCNA | proliferating cell nuclear antigen |
| PI3K | fosfatidylinositol-3-kinasy |
| PIKK | phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase |

| | |
|----------|---|
| PP2 | protein phosphatase 2 |
| PP4 | protein phosphatase |
| pre-IC | pre-initiation complex |
| pre-RC | pre-replication complex |
| RBM1 | RPA1-binding motif |
| RBM2 | RPA2-binding motif |
| RECQL4 | RecQ Like Helicase 4 |
| RFC | replication factor C |
| RHINO | RAD9–HUS1–RAD1 interacting nuclear orphan protein 1 |
| RPA | replication protein A |
| RPA14 | podjednotka RPA o velikosti 14 kDa |
| RPA32 | podjednotka RPA o velikosti 32 kDa |
| RPA70 | podjednotka RPA o velikosti 70 kDa |
| SDS | Sld3/7 – Dpb11 – Sld2 |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| siRNA | small interfering RNA |
| Sld2 | synthetic lethal with dpb11 |
| Sld3 | synthetic lethality with dpb11 |
| Sld7 | synthetic lethality with dpb11 |
| TBS | Tris Buffered Saline |
| TEMED | tetramethylethylenediamin |
| TMT | TopBP1–MTBP–Treslin |
| TopBP1 | DNA topoisomerase 2-binding protein 1 |
| Treslin | TopBP1-interacting and replication-stimulating protein |

| | |
|-------|--|
| TRIS | Tris (hydroxymethyl) aminomethane |
| TRRAP | transformation/transcription domain associated protein |
| TSS | transcriptional start site |
| UV | ultrafialové záření z angl. ultraviolet |