

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Martina Kindlová

Role promyelocytárního leukemického proteinu v udržování stability genomu

The role of promyelocytic leukemia protein in genome maintenance

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:
Ing. Pavla Vašicová, Ph.D.

Praha, 2022

Charles University
Faculty of Science

Study programme: Special chemical-biological fields
Branch of study: Molecular biology and biochemistry of organisms



Martina Kindlová

The role of promyelocytic leukemia protein in genome maintenance
Role promyelocytárního leukemického proteinu v udržování stability genomu

Type of thesis

Bachelor's thesis

Supervisor:
Ing. Pavla Vašicová, Ph.D.

Prague, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 4.5. 2022

Martina Kindlová

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce Ing. Pavle Vašicové, Ph.D. za věnování nemalého množství času a za odborné vedení a poskytnutí cenných rad a informací při zpracování bakalářské práce.

Abstrakt

Promyelocytární leukemický protein (PML) je klíčovým komponentem pro formaci jaderných tělísek PML (PML nuclear bodies, PML-NBs), ve kterých PML vytváří ohraničení obklopující vnitřní jádro těchto dynamických multiproteinových komplexů. PML je multifunkční protein, mimo jiné se účastní regulace transkripce, antivirové odpovědi a nádorové suprese. PML-NBs hrají roli v udržování stability genomu. Podílejí se na opravách DNA včetně telomer, regulaci buněčného cyklu a buněčné smrti a ochraně genomu před cizorodou DNA. Cílem této rešerše je podat informace o tom, jak se promyelocytární leukemický protein podílí na mechanismech udržování stability genomu a o možných důsledcích selhání těchto mechanismů.

Klíčová slova: promyelocytární leukemický protein, opravné mechanismy DNA, komplexní poškození DNA, repetitivní sekvence, fragilní místa, nemoci stáří.

Abstract

Promyelocytic leukemia protein (PML) is a key component for a formation of the PML nuclear bodies (PML-NBs) in which PML forms a shell surrounding an inner core of this dynamic multiprotein complex. PML may act as a tumor suppressor or a regulator of transcription factors. PML-NBs plays a role in the genome stability maintenance by participating in DNA repair including the alternative lengthening of telomere, regulation of the cell cycle and antiviral protection. The purpose of this section is to provide information about how PML participate in the genome stability maintenance and about possible consequences of failure of these mechanisms.

Key words: promyelocytic leukemia protein, mechanisms of DNA repair, complex DNA damage, repetitive sequences, fragile sites, aging-associated diseases.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Stabilita genomu.....	2
2.1. Příčiny nestability genomu.....	2
2.1.1. Opravné mechanismy DNA a jejich poruchy.....	3
2.1.2. Nestabilní oblasti genomu.....	4
3. Promyelocytární leukemický protein (PML).....	6
3.1. Struktura a formace PML jaderných útvarů (PML-NBs).....	7
3.2. Funkce PML.....	8
4. Úloha PML ve stabilitě genomu.....	9
4.1. Role PML v regulaci buněčného cyklu.....	10
4.1.1. Role PML při senescenci.....	10
4.1.2. Role PML při apoptóze.....	12
4.2. Role PML v reparaci DNA.....	14
4.2.1. Asociace PML s reparačními faktory.....	14
4.2.2. Role PML při opravě dvouvláknových zlomů.....	14
4.3. Role PML při alternativním prodlužování telomer (ALT).....	15
4.3.1. Formace ALT asociovaných PML útvarů (APBs).....	15
4.3.2. Mechanismus alternativního prodlužování telomer.....	16
4.4. Interakce PML s centromerami a rDNA.....	18
4.5. Role PML při antivirové ochraně.....	19
5. Závěr.....	21
6. Seznam použité literatury.....	23

1. Úvod

Udržování genomové stability je vlastnost živých organismů umožňující chránit integritu genetické informace a přenášet ji nezměněnou na další generaci. Její důležitost podtrhuje skutečnost, že kdyby organismy neměly mechanismy určené k udržování stability genomu, tak by se velmi rychle zásadně narušily fyziologické děje odehrávající se v buňkách. Tyto mechanismy nejsou stoprocentně efektivní, což vede k mnoha patologickým stavům, především k nemocem spojeným se stárnutím. Za nejdůležitější příčiny genomové nestability jsou považovány poruchy při reparaci DNA a chyby při replikaci DNA a určitou měrou mohou k nestabilitě genomu přispívat také jeho nestabilní oblasti.

Promyelocytární leukemický protein (PML) je protein, který se podílí na utváření jaderných tělísek PML (PML nuclear bodies PML-NBs), nemembránových organel, které mají schopnost koncentrovat určité proteiny ve vnitřním prostoru své struktury. PML-NBs se nacházejí v buněčných jádrech, kde jsou obklopeny chromatinem, se kterým jsou schopné interagovat. Bylo nalezeno více než 170 proteinů, které mohou být ve struktuře PML-NBs trvale či přechodně uchovávány. PML je multivalenční protein, o kterém se v rámci formování PML-NBs hovoří jako o *scaffold* proteinu, tedy proteinu, který slouží jako lešení pro klientské proteiny, které se váží na PML. Vazba mezi PML a klientskými proteiny je zajištěna pomocí interakce mezi SUMO-interagujícími motivy (SIM) skládajících se z krátké sekvence aminokyselin, a řetězci SUMO vzniklých sumoylací v rámci postranslačních modifikací proteinů. Přestože SUMO-SIM interakce převládá, byly popsány i další motivy PML, které mohou zprostředkovat interakci klienty a navádět je do PML-NBs. Předpokládá se, že se PML-NBs formují v procesu fázové separace, během které vznikají jaderné útvary s rozdílným vnitřním složením, než je složení okolního prostředí.

PML hraje důležitou roli v udržování stability genomu a mezi hlavní procesy, pro které je nezbytný, patří oprava DNA včetně udržování stability telomer, regulace buněčného cyklu a antivirová ochrana.

Cílem této rešerše je objasnit jakými mechanismy se podílí PML na udržování genomové stability.

2. Stabilita genomu

Všechny žijící organismy mají schopnost chránit a přenášet svou genetickou informaci z generace na generaci (**shrnutí v Pelczar a kol., 2003**). Schopnost udržovat stabilitu genomu je stěžejní pro zachování buněčných funkcí a snižuje riziko vzniku různých onemocnění spojených se stářím a jinými patologiemi (**Ouyang a kol., 2008**). Kvůli neustálému poškozování DNA vnitřními i vnějšími vlivy se vyvinuly systémy opravných mechanismů, které DNA neustále kontrolují a opravují. Tyto systémy jsou často evolučně konzervovány (**shrnutí v Pelczar a kol., 2003**).

Existuje mnoho typů poškození DNA včetně genových lézí (**Natarajan a kol., 1993**), chyb v důsledku špatného zařazení bází (**Weinblum a kol., 1974**), vnitřetězcových a meziřetězcových křížových vazeb (*crosslink*) (**Gantt a kol., 1979**), nebo jednovláknových (**Fornace a kol., 1976**) a dvouvláknových zlomů (**Bonura a kol., 1975**). Právě dvouvláknové zlomy jsou pro buňku nejrizikovější a jsou považovány za hlavní zdroj nestability genomu (**Morgan a kol., 1998**). Aby buňky udržely genom stabilní, využívají také kontrolní body (*checkpoints*) v rámci buněčného cyklu (**Gartner a kol., 2000**). Tyto kontrolní body vyskytující se v různých fázích buněčného cyklu mimo jiné reagují na replikační stres, zastavení replikační vidlice nebo léze v DNA (**Jimenez a kol., 1992**). Poruchy v udržování genomové stability mohou vést ke vzniku zhoubných onemocnění a jsou důležitým faktorem přispívajícím k neurodegenerativním onemocněním (**Ruzo a kol., 2018**), stárnutí (**Ouyang a kol., 2008**) nebo imunodeficienci (**von Bernuth a kol., 2014**).

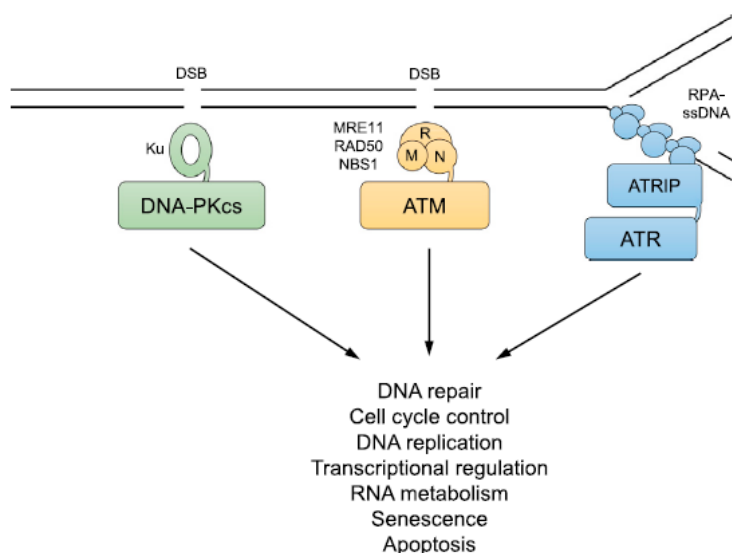
2.1. Příčiny nestability genomu

DNA je poškozována exogenními a endogenními zdroji (**shrnutí v Morley & Turner, 1999**). Mezi exogenní zdroje patří ultrafialové (UV) záření (**Seker a kol., 2003**), ionizující záření (**Vens a kol., 2007**) nebo genotoxické chemické látky (**Nefkens a kol., 2003**). Hlavními zdroji endogenního poškození jsou mutace v důsledku metabolických procesů (**Lindahl, 1993**), chybné replikace a replikačního stresu (**Maya-Mendoza a kol., 2018**), kolize mezi replikací a transkripcí (**Olavarrieta a kol., 2002**) a inhibice topoizomeráz (**Markovits a kol., 1994**). Především jsou to ale defekty v opravných mechanismech, které vedou k akumulaci mutací a genomové nestabilitě (**Mohindra a kol., 2002**). K nestabilitě genomu přispívá i přítomnost takzvaných fragilních míst (**Hecht a kol., 1984**). Stabilitu genomu mohou narušovat také virové infekce (**Darbinyan a kol., 2007**).

2.1.1. Opravné mechanismy DNA a jejich poruchy

Správné fungování reparačních mechanismů DNA je stěžejní pro udržování buněčné fyziologie. Chyby při opravě DNA představují hlavní příčinu genomové nestability a vedou k mnoha patologiím (**shrnutí v Carolina a kol., 2012**). Všechny eukaryotní buňky mají vysoce konzervované signální dráhy pro rozpoznání poškozené DNA a její opravu (**shrnutí v O'Neil & Rose, 2006**).

Poškozená DNA je v buňce rozpoznávána senzory proteiny, které se v případě detekce zlomů DNA nebo modifikací bází vážou na místa poškození a mobilizují další molekuly, které mají specifické úlohy v regulaci buněčného cyklu a opravách DNA (**shrnutí Jackson a Bartek, 2009 a Blackford a Jackson, 2017b**). Centrálními regulátory odpovědi na poškození DNA (*DNA-damage response*, DDR) jsou kinázy ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*, ATM), ATR (*ataxia-telangiectasia related*, ATR) a DNA PK (*DNA-dependent protein kinase*, DNA PK), jejichž model aktivace a působení je znázorněn na Obrázku 1. Tyto kinázy fosforylují překrývající se spektrum substrátů, které regulují buněčný cyklus či se účastní oprav DNA. Nedojde-li k opravě, přetrvávající poškození indukuje apoptózu či buněčnou senescenci. DNA PK je aktivována dvouvláknovým zlomem, který je rozeznán komplexem Ku70/Ku80 (**Gottlieb a ko., 1993**). ATM je plně aktivována dvouvláknovým zlomem, na který je navázán komplex tří proteinů, Mre11, Rad50 a Nbs1 (MRN) (**Falck a kol., 2005**). ATR je aktivována jednovláknovou DNA (*single strand DNA*, ssDNA), na kterou je vázán protein RPA (**Zou a kol., 2003**).



Obrázek 1: Model aktivace a působení kináz ATM, ATR a DNA-PKs v důsledku poškození DNA. DNA-PKs je aktivována a dopravena na dvouvláknové zlomy navázáním Ku na místo dvouvláknového zlomu. ATM je aktivována a lokalizována na dvouvláknové zlomy pomocí komplexu MRN. ATR je lokalizována na jednovláknovou DNA, na které je vázán RPA, pomocí svého vazebného partnera **ATRIP** (**Blackford & Jackson, 2017b**).

K opravě chyb v DNA má buňka účinné mechanismy oprav (**Sharova, 2005**). Dvouvláknové zlomy jsou opravovány homologní rekombinací (*homologous recombination repair*, HRR) (**Trenz a kol., 2006, Hanada a kol., 2007**) a nehomologním spojováním konců (*non-homologous end joining*, NHEJ) (**Nussenzweig a kol., 2007**), zatímco opravy jednovláknových zlomů zajišťují nukleotidové excizní opravy (*nucleotide excision repair*, NER) (**Courcelle a kol., 2005**), opravy neshod bází (*mismatch repair*, MMR) (**Glazer a kol., 1987**) a excizní opravy bází (*base excision repair*, BER) (**Vodenicharov a kol., 2000**).

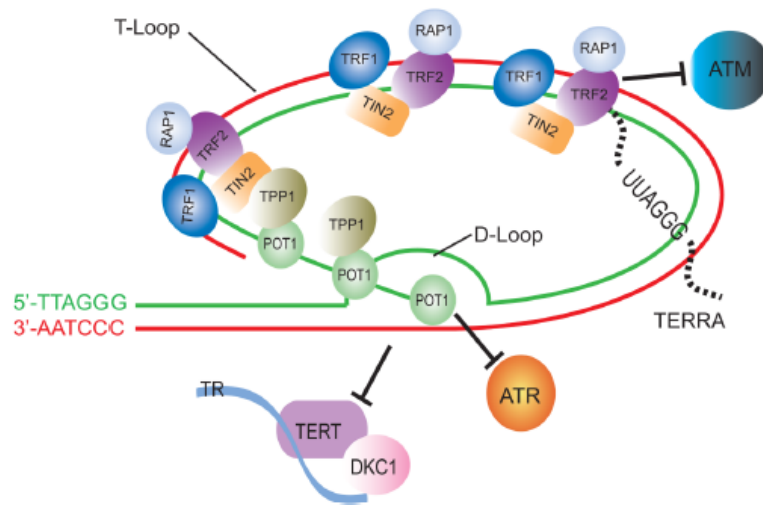
2.1.2. Nestabilní místa genomu

Fragilní oblasti genomu – fragilní místa (*fragile sites*, FS) – jsou nestabilní oblasti DNA, které vykazují zvýšenou frekvenci zlomů. FS obsahují repetitivní sekvence, mají zpožděnou replikaci a často podléhají replikačnímu stresu (**Glover a kol., 1988**). Mezi tyto oblasti se řadí běžná a vzácná fragilní místa, telomery, centromery a rDNA (**Zlotorynski a kol., 2003, Shay a Wright, 2002, Singer, 1982, Stultsa kol., 2009**).

Chromosomální fragilní místa (*chromosomal fragile sites*, CFSs) jsou oblasti chromozomu, kde se zvýšenou frekvencí dochází ke vzniku zlomů a lézí v důsledku replikačního stresu, který může být způsoben například expozicí buněk inhibitorům syntézy DNA. CFSs se dělí na běžná a vzácná podle frekvence výskytu v lidské populaci (**Zlotorynski a kol., 2003**). Běžná fragilní místa aktivuje nejčastěji afidikolin (**Rassool a kol., 1991**), zatímco vznik vzácných fragilních míst indukuje výhradně bromodeoxyuridin či distamycin A (**Hewett a kol., 1998**). Běžná fragilní místa jsou tvořena repeticemi bohatými na AT páry bází (**Shiraishi a kol., 2001**) a jsou považována za jednu z příčin vzniku rakoviny (**Hecht a kol., 1984**). Na rozdíl od běžných fragilních míst nejsou vzácná fragilní místa spojována s rakovinou, jsou tvořena repetitivními motivy, jako jsou CGG, a jsou děděna v rámci Mendelovské dědičnosti (**Jones a kol., 1995**).

Mezi nestabilní oblastí genomu patří koncové úseky chromozomů, telomery. Tyto úseky jsou náchylné ke zkracování v důsledku ne schopnosti replikačního komplexu syntetizovat jejich konce (**Watson, 1972, Shay a kol., 2002**). Telomery se skládají z repetice TTAGGG (**Moyzis a kol., 1988**). Na tyto repetice se váží proteiny tvořící komplex nazývaný se *shelterin*, který přispívá k ochraně telomer (**Bandaria a kol., 2016**). Komplexnější struktura telomer, je znázorněna na Obrázku 2. Existují dva způsoby, kterými buňky zabraňují zkracování telomer. Prvním z nich je udržování délky telomer pomocí telomerázy. Mechanismus udržování telomer pomocí telomerázy spočívá v přidávání telomerických opakování na 3' konec s využitím RNA templátu (**Greider a kol., 1985**). Druhým mechanismem popsaným v některých nádorových buňkách je alternativní prodlužování telomer (*alternative lengthening of telomere*, ALT), který

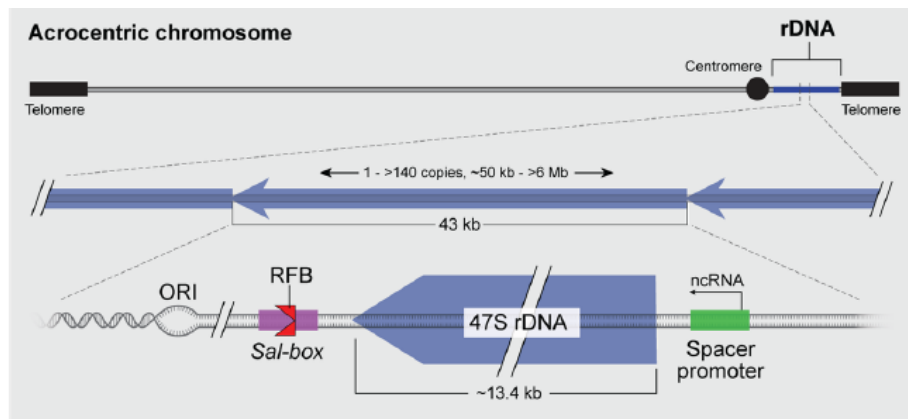
je založen na výměně nebo syntéze telomerické DNA závislých na homologní rekombinaci **(Bryan a kol., 1997)**.



Obrázek 2: Struktura lidských telomer. Lidské telomery se skládají z repetice TTAGGG. Hlavní vlákno bohaté na G báze se prodlužuje ve směru k 3' konci a vytváří G-ocásek. Na telomerách se nachází komplex shelterin, který se skládá z faktorů vážících se na telomerickou DNA nebo na ostatní faktory. Komponentami shelterinu jsou TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 a ochranný faktor POT1. Telomerické faktory pomáhají vytvářet strukturu chránící telomerické konce zvanou telomerická smyčka neboli T-smyčka **(O'Sullivan a Karlseder, 2010)**.

Dalším nestabilním místem genomu jsou centromery, jež jsou nezbytné pro rovnoměrné rozdělení genetického materiálu při každém buněčném dělení **(shrnutí v Kalitsis a kol., 2012)**. Centromery představují chromosomální lokusy tvořené dlouhými tandemovými řadami repetitivních AT úseků bohatých alfa-satelitních DNA **(Singer, 1982, Ting a kol., 2011)**.

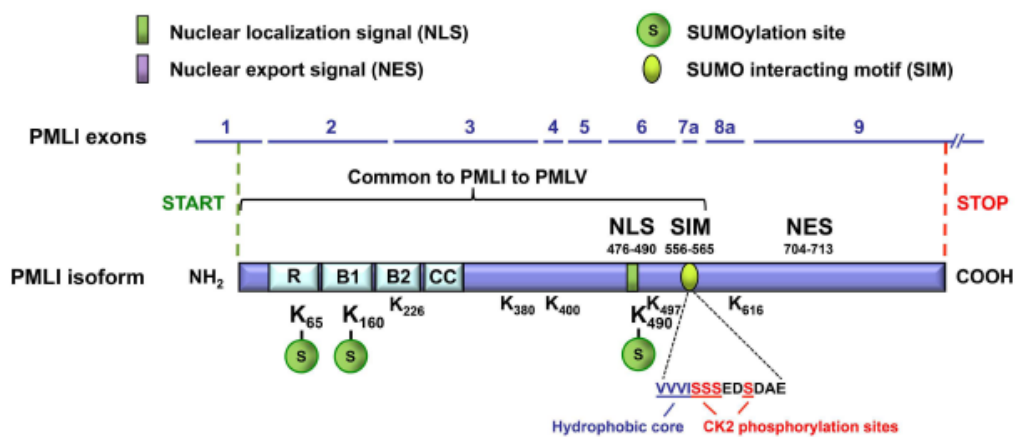
Lokusy rDNA jsou další fragilní oblastí genomu skládající se z tandemových repetitivních úseků, jak je ukázáno na Obrázku 3. Nachází se mezi centromerami a telomerami a jedná se o nejvíce přepisované lokusy v genomu, což má spolu s repetitivním charakterem jejich sekvencí za následek vysokou náchylnost rDNA k rekombinaci **(Stultsa kol., 2009, Ide a kol., 2010)**. V důsledku toho je rDNA považována za jednu z nejvíce nestabilních a hypervariabilních genomových oblastí **(Stultsa a kol., 2009)**.



Obrázek 3: Struktura lidského lokusu rDNA. Lokus se nachází mezi centromerou a telomerou a skládá z 1 – 140 opakujících se jednotek uspořádaných do tandemu na krátkých ramenech akrocentrických chromozomů. Přilehlé geny 47S rDNA jsou od sebe odděleny mezigenovými mezeríky (**Salim & Gerton, 2019**).

3. Promyelocytární leukemický protein (PML)

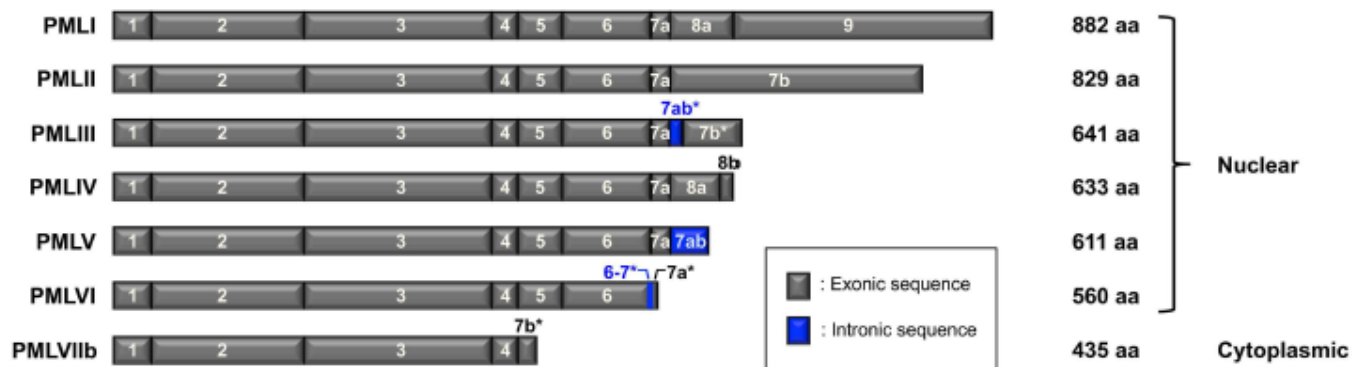
PML je členem proteinové rodiny TRIM vyznačující se přítomností konzervovaného motivu RBCC (**Jensen a kol., 2001**). Může tvořit sedm isoform: PML I – PML VII (**Hands a kol., 2014**). Všechny isoformy PML mají na svém N-konci již zmiňovaný RBCC motiv, který je tvořen doménou *RING finger*, dvěma B-boxy bohatými na cystein a histidin (**Huang a kol., 2014**) a alfa-helikální *coil-coiled* doménou, jak je znázorněno na Obrázku 4 (**Kastner a kol., 1992**).



Obrázek 4: Znázornění organizace domén PML. Součástí PML je RBCC motiv, NLS, NES, SIM motiv, sekvence obsahující CK2 fosforylační místa a sumoylační místa označena písmenem K (**Nisole a kol., 2013**).

Jednotlivé isoformy se od sebe odlišují složením C-koncové části, což je schematicky znázorněno na Obrázku 5. Tato odlišnost je dána alternativním sestřihem a určuje vazebnou

specifitu isoformem PML (**Jensen a kol., 2001, Condemine a kol., 2007**). Všechny isoformy, kromě v cytosolu se nacházející PML VII, mají jaderný lokalizační signál (NLS). Isoforma PML I má kromě NLS ještě jaderný exportní signál (NES), což jí umožňuje přemísťování mezi jádrem a cytoplazmou (**Beech a kol., 2005**). PML je posttranslačně modifikován a mezi hlavní modifikace patří sumoylace. PML je nezbytný pro tvorbu PML-NBs – útvarů majících průměr 0,1 – 1,0 μm (**Ishov a kol., 1999, Hayakawa a kol., 2004**).

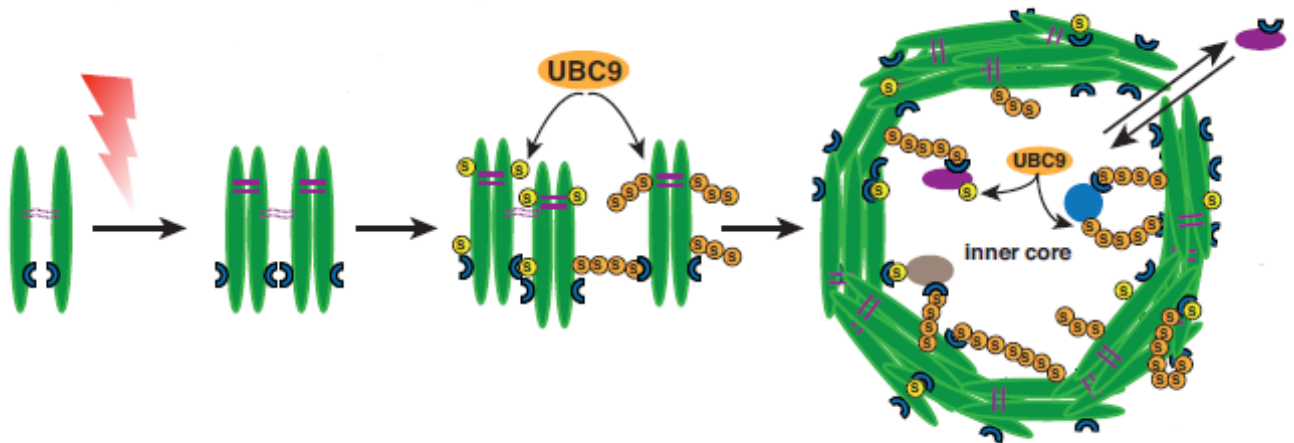


Obrázek 5: Schématické znázornění isoformem PML I – PML VII (**Nisole a kol., 2013**).

3.1. Struktura a formace PML jaderných útvarů (PML-NBs)

PML-NBs jsou dynamické útvary, které ve své struktuře uchovávají celou řadu proteinů v závislosti na podmínkách v buňce (**Scherer a kol., 2016**). Kromě přechodně asociovaných proteinů jsou v PML-NBs permanentně uchovány další proteiny, např.– Sp100 (*SP100 nuclear antigen*) a DAXX (*death domain associated protein*). Skoro všechny proteiny sídlící ve struktuře PML-NBs jsou modifikovány malými modifikátory podobným ubiquitinu (*small ubiquitin-like modifier*, SUMO) nebo obsahují SUMO interakční motiv (*SUMO interacting motif*, SIM) či mají SUMO i SIM zároveň (**Lång a kol., 2019**). Bylo zjištěno, že právě interakce mezi SUMO na jednom proteinu a SIM na druhém proteinu zajišťuje asociaci proteinů s PML-NBs (**Brown a kol., 2016**). Samotný PML obsahuje SIM a tři sumoylační místa (**Shen a kol., 2006**). Sumoylace se tvoří kovalentní vazbou mezi SUMO a lysinovým zbytkem příslušného proteinu na specifické konsensus sekvenci. Tato vazba je zajištěna enzymatickou kaskádou. Nejdříve je SUMO monomer aktivován E1-aktivujícím enzymem Sae1/2. Potom E2 konjugující enzym, UBC9, který rozpozná konsensus sekvenci na substrátu a zprostředkuje navázání molekuly SUMO na lysinový zbytek (**Tatham a kol., 2005**). SUMO-E3 ligázy tvoří komplex se substráty UBC9-SUMO či UBC9-SUMO, a tím zajišťují vyšší specifitu během sumoylace

(Hendriks a kol., 2016). PML je na specifických lysinech vysoce sumoylován třemi paralogy SUMO – SUMO 1, 2 a 3 (Niwa-Kawakita a kol., 2017).

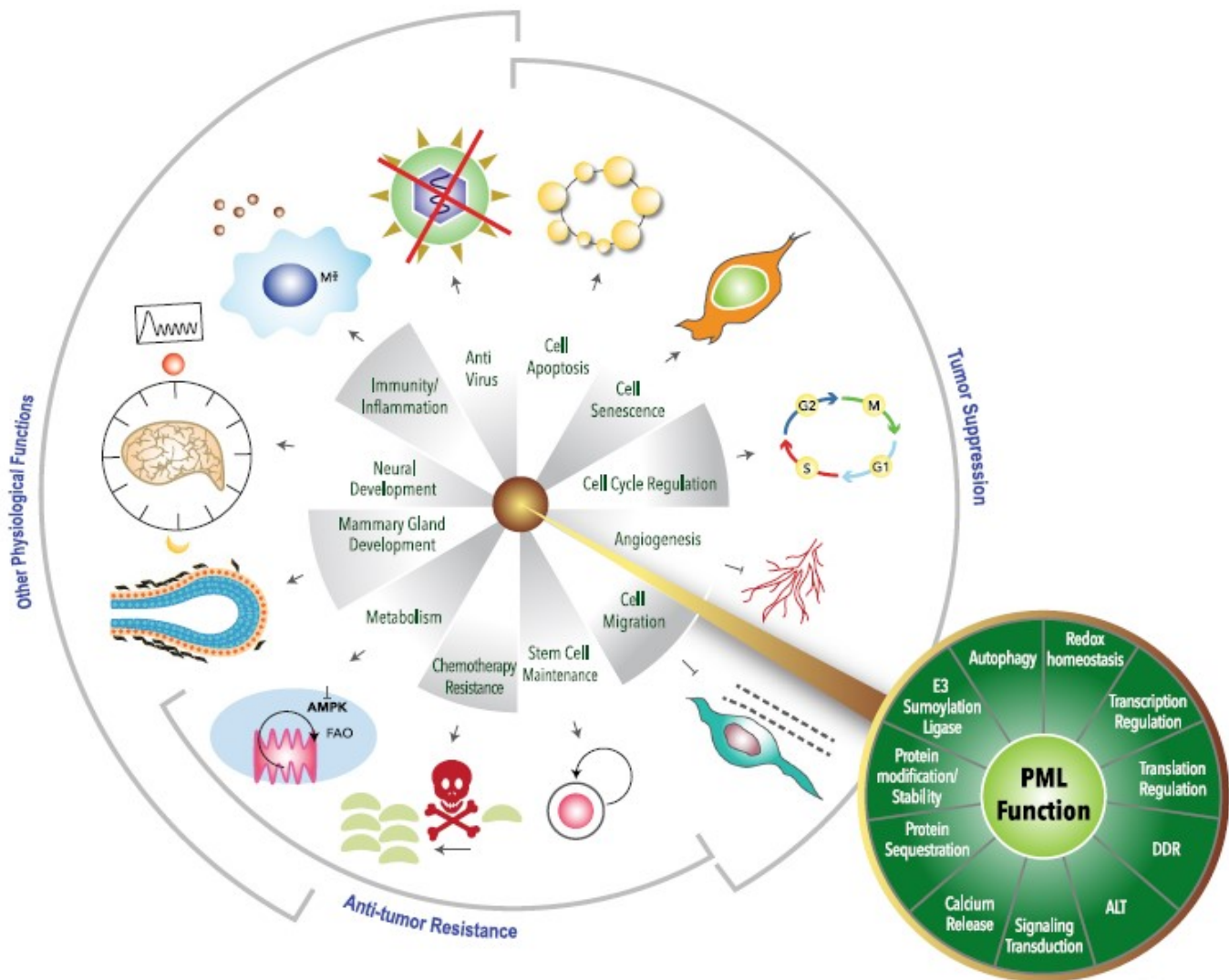


Obrázek 7: Schématické znázornění formace PML-NBs. PML nejprve dimerizují pomocí RBCC domén a poté nukleují do struktury PML-NBs. Po sumoylaci jednotlivých PML, PML vytvářejí sférickou strukturu zralých PML-NBs. Partnerské proteiny obsahující SUMO nebo SIM či obojí jsou poté pomocí interakcí SUMO-SIM s PML rekrutovány dovnitř struktury PML-NBs (Corpet a kol., 2020).

V reakci na stres jednotlivé monomery PML v buňce dimerizují pomocí kovalentních disulfidických vazeb a nekovalentních interakcí mezi jednotlivými doménami RBCC (Sahin a kol., 2014, Lallemand-Breitenbach a kol., 2001). Poté na základě stejných interakcí dimery vytvářejí oligomerní strukturu nematurovaných PML-NBs. PML jsou následně sumoylovány UBC9 E2. Interakce SUMO a SIM na jednotlivých PML indukuje vznik slupky a formaci maturovaných PML-NBs (Zhong a kol., 2000, Lallemand-Breitenbach a kol., 2001). PML fungují jako lešení (*scaffold*) pro partnerské proteiny, jsou sumoylovány a zároveň obsahují SIM, stejně jako partnerské (*client*) proteiny a na základě SUMO-SIM interakcí PML rekrutuje partnerské proteiny dovnitř své struktury (Banani a kol., 2016, Marcello a kol., 2003).

3.2. Funkce PML

PML interaguje s velkým množstvím proteinů a ovlivňuje tím mnoho procesů uvedených v Obrázku 6 (Hsu a kol., 2018). V další části je podrobněji zmíněna úloha PML v regulaci buněčného cyklu, v DDR a v ochraně proti virovým infekcím.



Obrázek 6: Přehled buněčných a fyziologických funkcí PML. PML se podílí na regulaci buněčného cyklu, buněčné senescence, apoptózy či ochrany proti virům. PML pomocí interakcí s mnoha proteiny může regulovat genovou expresi, translaci či hladinu proteinů. cPML může regulovat vápníkovou signalizaci, signální transdukcí či autofágií. PML může také přispívat k rezistenci vůči léčbě rakoviny a hraje také roli v imunitě a metabolismu. V zeleném kruhu jsou shrnuty molekulární funkce PML (Hsu a kol., 2018).

4. Úloha PML ve stabilitě genomu

To, že PML ovlivňuje stabilitu genomu, naznačuje myší model s úplnou deficiencí PML. Pokud byly tyto myši vystaveny látkám vyvolávajícím nádorová onemocnění nebo byly zkříženy s myšími modely nesoucími benigní léze, tak u nich docházelo k vyššímu výskytu nádorových onemocnění (Wang a kol., 1998, Mazza a kol., 2013).

4.1. Role PML v regulaci buněčného cyklu

Regulaci buněčného cyklu v reakci na poškození DNA zajišťuje, že buňky s poškozenou DNA zůstávají zastavené a vracejí se do buněčného cyklu pouze v případě úspěšné opravy. Buňky s neopraveným/neopravitelným poškozením buď spustí apoptotický program nebo vyvinou buněčnou senescenci. Proliferace buněk s poškozenou DNA vede k akumulacím chyb a nestabilitě genomu (**Jackson a Bartek, 2009**). Těchto procesů se účastní i PML, především regulací buněčného cyklu, navozením buněčné senescence a apoptózy (**de Stanchina a kol., 2004**). V mnoha nádorech je hladina PML snížena (**Zhang a kol., 2000, Gambacorta a kol., 1996, Gurrieri a kol., 2004**), naopak nadprodukce PML v rakovinných liniích způsobuje zástavu buněčného cyklu a následnou apoptózu či buněčnou senescenci (**Chin a kol., 1994, Mu a kol., 1997**).

PML může přispívat k senescenci interakcí s transkripčním faktorem retinoblastomovým proteinem (*retinoblastoma protein*, pRb) (**Vernier a kol., 2011**) či stabilizací p53 (**Ferbeyre et al., 2000, Pearson a kol., 2000**). Apoptózu může PML indukovat interakcí s proteinem DAXX (**Li a kol., 2000**) a také stabilizací p53 (**Guo a kol., 2000, D’Orazi a kol., 2002, Bernardi a kol., 2004**). Je důležité zmínit, že některé mechanismy interakcí PML a p53 jsou společné pro oba tyto děje (**Bernardi a kol., 2004**).

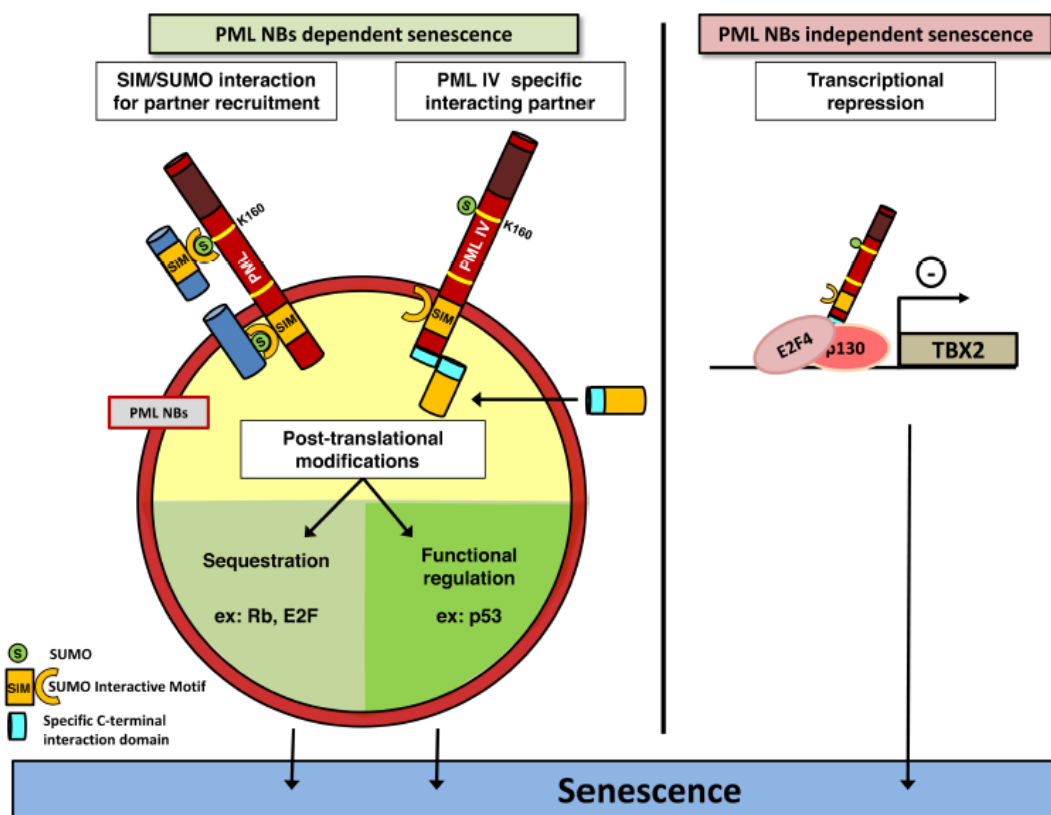
4.1.1. Role PML při buněčné senescenci

Buněčná senescence označuje stav, kdy buňky permanentně zastaví svůj buněčný cyklus, ale neumírají (**shrnuto v Herranz a kol., 2018**).

PML může interagovat s transkripčním faktorem p53, který podporuje buněčnou senescenci v odpovědi na různé podněty, kterými mohou být poškození DNA nebo působení onkogenu (**de Stanchina a kol., 2004**). Bylo zjištěno, že buňky, které postrádají PML, vykazují sníženou ochotu indukovat buněčnou senescenci v odpovědi na aktivaci p53 (**de Stanchina a kol., 2004**). PML váže p53 a mnoho jeho regulátorů a směřuje je do PML-NBs, a tím umožňuje posttranslační modifikace, které stabilizují a aktivují p53 (**de Stanchina a kol., 2004, Ferbeyre et al., 2000, Ivanschitz a kol., 2015**).

Bylo dokázáno, že exprese PML se zvyšuje během buněčné senescence indukované onkogenem Ras a během replikační senescence (**Ferbeyre et al., 2000**). Zvýšená produkce PML indukuje buněčnou senescenci a lokalizuje p53 do PML-NBs, a tím zvyšuje jeho fosforylaci (**Ferbeyre et al., 2000**). Práce od de Stanchina a kol. ukazuje, že p53 aktivuje transkripci PML a také, že PML stabilizuje p53 lokalizaci do PML-NBs a tím potencuje jeho

antiproliferační funkce. Především bylo ale dokázáno, že PML deficientní myší embryonální fibroblasty MEF vykazují sníženou schopnost podstoupit buněčnou senescenci indukovanou onkogenem Ras (**de Stanchina a kol., 2004**). Dalším způsobem, jak PML reguluje stabilitu p53, je interakce s nádorovým supresorem p14ARF (*alternative reading frame*, ARF). ARF se specificky váže na C-konec PML a tím se relokalizuje do PML-NBs. Tato interakce poté způsobí stabilizaci SUMO-ligázy UBC9, a tím dojde k sumoylaci a stabilizaci p53 (**Ivanschitz a kol., 2015**). PML-NBs tudíž fungují jako platforma pro interakce mezi ARF, UBC9 a dalšími regulátory p53 a podporují sumoylaci a následnou aktivaci signální dráhy p53 (**Ivanschitz a kol., 2015**). Schématické znázornění toho, jak může PML ovlivňovat senescenci je zobrazeno níže na Obrázku 7.



Obrázek 7: Schéma mechanismů indukce senescence pomocí PML. PML indukuje senescenci na PML-NBs závislou nebo nezávislou. PML přenáší partnerské proteiny do PML-NBs pomocí sumoylace na zbytku K160. PML IV interaguje s partnerskými proteiny pomocí specifické interakční domény na C-konci. Tyto interakce podporují posttranslační modifikace proteinů, které kontrolují senescenci – p53 a E2F. PML může také fungovat nezávisle na struktuře PML-NBs, například jako transkripční modulátor cílových genů (**Ivanschitz a kol., 2013**).

PML může také ovlivňovat buněčnou senescenci závislou na pRb (**Vernier a kol., 2011**). Signální dráha pRb kontroluje buněčný cyklus na transkripční úrovni skrze potlačení cílových genů pro E2F, které podporují proliferaci (**Vernier a kol., 2011, Chicas a kol., 2010, Müller**

a kol., 2001). PML indukuje buněčnou senescenci blokováním aktivity E2F v asociaci s pRb. Komplexy pRb/E2F se váží na PML a jsou vnášeny do struktury PML-NBs, což vede k inhibici exprese cílových genů pro E2F, blokaci buněčné proliferace s rozvojem buněčné senescence (**Vernier a kol., 2011**). Vazba PML a pRb pomocí interakčního motivu LXCXE na pRb je důležitá pro reorganizaci chromatinu na promotorech genů buněčného cyklu, což vede k permanentnímu zastavení buněčného cyklu (**Talluri a Dick, 2014**). Mnoho proteinů nutných pro remodelaci je přechodně lokalizováno v PML-NBs před tím, než se integrují do míst heterochromatinu na cílových genech buněčného cyklu (**Vernier a kol., 2011**).

PML může také navodit buněčnou senescenci tím, že potlačuje transkripci genu TBX2 v senescentních buňkách. Naopak, pokud je TBX2 exprimován ve vyšší míře, tak je schopen blokovat buněčnou senescenci indukovanou PML IV. Tato funkce PML je nezávislá na PML-NBs (**Martin a kol., 2012**).

4.1.2. Role PML při apoptóze

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je kontrolovaný mechanismus, který nastane, pokud je DNA buňky poškozena ve velkém rozsahu (**shrnuto v Harmon a kol., 1997**).

PML je důležitý jak pro p53-závislou apoptózu, která je spouštěna na základě odpovědi na genotoxický stres (**Wang a kol., 1998**), tak i pro p53-nezávislou, která je indukována pomocí ligandu Fas (**Zhong a kol., 2000, Wang a kol., 1998**).

Bylo zjištěno, že PML se chová jako transkripční ko-aktivátor p53 a má schopnost interagovat s p53 a tím ho lokalizovat do PML-NBs (**Guo a kol., 2000**). Autoři dále ukázali, že PML deficientní buňky mají pozměněnou expresi cílových genů p53 a hůře indukují apoptózu po genotoxickém stresu. Tyto výsledky potvrzují roli PML při apoptóze indukované p53 (**Guo a kol., 2000**).

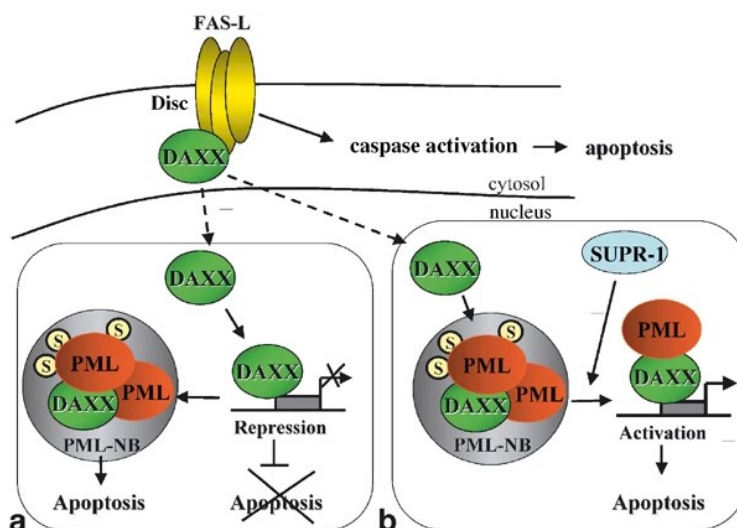
Vztah mezi PML, p53 a apoptózou byl popsán ve studii od Louria Hayon a kol. (**Louria-Hayon a kol., 2003**). Autoři ukázali, že PML hraje klíčovou roli pro stabilizaci p53 v odpovědi na poškození DNA. PML chrání p53 před ubiquitinací zprostředkovanou Mdm2 a tím zamezuje jeho degradaci, která by vedla k inhibici apoptózy. Autoři dále ukazují, že PML zmírňuje destabilizaci p53 způsobenou Mdm2 tím, že prodlužuje stresem indukovanou fosforylaci p53 na serinu 20 (**Louria-Hayon a kol., 2003**).

Další práce, která ukazuje na schopnost PML stabilizovat p53 a tím indukovat apoptózu je práce Bernardi a kol. (**Bernardi a kol., 2004**). Autoři ukazují, že PML po genotoxickém stresu

interaguje s ubiquitin ligázou Mdm2 a sekvstruje tento protein do jádérka. Tím dochází k stabilizaci p53 a aktivaci apoptózy (**Bernardi a kol., 2004**).

Kanonickou součástí PML-NBs je transkripční faktor DAXX, protein, jenž byl původně spojován s buněčnou smrtí zprostředkovanou pomocí FAS (**Li a kol., 2000**).

Apoptotické signály indukované FAS jsou iniciovány na plazmatické membráně signálním komplexem indukujícím smrt (*death-induced signal complex*, DISC) (**Morgan a kol., 2009**). DAXX má schopnost potlačovat transkripci antiapoptotických genů, což má za následek, že apoptóza běží. V případě lokalizace DAXX do PML-NBs jsou antiapoptotické geny transkribované a apoptóza neběží (**Li a kol., 2000**). Model kooperace PML s DAXX je znázorněn níže na Obrázku 8.



Obrázek 8: Schéma kooperace PML a DAXX při indukci apoptózy. DAXX interaguje s FAS na membráně. Když se FAS ligand naváže na FAS receptor, tak mohou být aktivovány dvě apoptotické dráhy. **(a)** DAXX je translokován do jádra a společně s PML indukuje apoptózu. DAXX je transkripční represor a PML potlačuje jeho funkci. PML potlačuje represi transkripce anti-apoptotických genů zprostředkovanou DAXX tím, že sekvstruje DAXX do PML-NBs. **(b)** Vazba PML s DAXX může vést také k aktivaci apoptózy. Komplex PML/DAXX může být totiž transportován ven z PML-NBs pomocí PML desumoylázy SUPR-1 (**Bernardi a Pandolfi, 2003**).

Apoptózu může regulovat také cytoplazmatická isoforma PML (cPML, PML VII) (**Lin a kol., 2004**), která je klíčovým modulátorem signalizace růstového faktoru β (*transforming growth factor beta*, TGF β). TGF β je cytokin, který je schopen indukovat apoptózu přes signální dráhy SMAD nebo DAXX (**Lin a kol., 2004**). Signální transdukce TGF β je umožněna přesunutím povrchového receptorového komplexu s navázaným TGF β do časného endosomu a následným šířením signálu do jádra přes aktivaci transkripčních faktorů SMAD. cPML je klíčový k vytvoření receptorového komplexu a přesunu komplexu do časného endosomu (**Lin a kol., 2004**). Bylo dokázáno, že PML deficientní primární myšiční buňky mají defektní TGF β

signální dráhu a tento defekt je překonán ektopickou expresí cPML (**Lin a kol., 2004**). PML má také funkci při indukci apoptózy pomocí vápníkové signalizace (**Giorgi a kol., 2010**). PML je v důsledku stresu endoplazmatického retikula lokalizován v membránách asociovaných s mitochondriemi (*mitochondria associated membranes*, MAMs), které se podílejí na navození apoptózy pomocí regulace transportu vápenatých iontů. Přítomnost cPML v MAMs reguluje utvoření komplexu, který usnadňuje vylití vápenatých iontů z endoplazmatického retikula do mitochondrií, a tím indukuje apoptózu (**Giorgi a kol., 2010**).

4.2. Role PML v opravě DNA

Lokalizace PML do lézí DNA naznačuje možnost jeho zapojení v opravných mechanismech DNA (**shrnuto v Deliaire a Bazett-Jones, 2004**).

4.2.1. Asociace PML s reparačními faktory

V odpovědi na poškození DNA se koncentrace PML v jádře zvyšuje a dochází k asociaci s DNA zlomy (**shrnuto v Deliaire a Bazett-Jones, 2004, Carbone a kol., 2002, Vancurova a kol., 2019**). Bylo dokázáno, že PML-NBs se nachází v místech reparační DNA a v reakci na různé typy poškození DNA interaguje s mnoha opravnými proteiny (**shrnuto v Chang a kol., 2018**). Těmito proteiny jsou kinázy regulující buněčný cyklus – ATM, ATR a Chk2 (**Deliaire a kol., 2006**), proteiny MRN komplexu – NBS1, Mre11 a Rad50 (**Carbone a kol., 2002**), helicázy z rodiny RecQ – BLM a WRN (**Vaitiekunaite a kol., 2007**) nebo také reparační faktory Rad51, RPA a BRCA1 (**Attwood a kol., 2020**). Okraje PML-NBs asociují s chromatinem a tvorba PML-NBs může tudíž ovlivnit opravy DNA (**Deliaire a kol., 2006**).

4.2.2. Úloha PML při opravách dvouvláknových zlomů

V nedávné době byly publikovány tři studie, které dokazují, že PML ovlivňuje úspěšnost DNA (**Vancurova et al., 2019, Voisset a kol., 2018, Attwood a kol., 2020**).

Výsledky studie od Voisset a kol. ukazují, že PML NBs jsou determinanty kvality oprav DNA pomocí mechanismů HRR a NHEJ. V této studii byly použity MEF nesoucí bodovou mutaci (C6A2/C65A) v RING doméně PML, která způsobuje rozpad PML-NBs (**Voisset a kol., 2018**). Tento experimentální přístup ukázal, že přesnost HRR a NHEJ byla výrazně nižší v Pml^{C6A2/C65A} MEFs v porovnání s Pml^{WT}, což dokazuje vliv PML (PML-NBs) na efektivitu oprav DNA (**Voisset a kol., 2018**). V roce 2019 studie od Vančurové a kol. poukázala na roli

PML při opravě přetrvávajících, těžce opravitelných lézí vzniklých působením ionizujícího záření (*persisting IR-induced foci*, pIRIF) (Vancurova et al., 2019). V experimentu byly použity lidské primární PML-deficientní buňky, jejichž pomocí se prokázalo, že PML-deficience vede k vyšší citlivosti k poškození DNA, které způsobuje léze DNA dominantně opravované pomocí mechanismu HRR. Vliv jednotlivých isoform PML, ale také PML deficience na úspěšnost oprav DNA pomocí HRR byl popsán v práci Atwoodové a kol. (Attwood a kol., 2020). Autoři sledovali úspěšnost oprav DNA pomocí HRR v buňkách osteosarkomu (U2OS), přičemž DNA byla poškozena buď endonukleázou I-SceI nebo systémem CRISPR/Cas9. Autoři zjistili, že deficience v PML, ale i jeho nadprodukce způsobují inhibici HRR. Dále ukázali, že průběh HRR je ovlivněn typem exprimované isoformy PML (Attwood a kol., 2020).

4.3. Role PML při alternativním prodlužování telomer (ALT)

V důsledku mnohokrát opakované replikace DNA se eukaryotní buňky potýkají se zkracováním telomer. Pokaždé, když se somatická buňka dělí, tak pravděpodobně dochází ke zkrácení telomer z důvodu neschopnosti DNA polymerázy zcela replikovat lineární konce chromozomů. Když telomery dosáhnou kritické délky nebo poškození, tak dochází k senescenci nebo apoptóze buňky. Především u nádorových buněk jsou přítomny různé mechanismy pro jejich udržování (*telomere DNA maintenance mechanism*, TMM) (shrnuto ve de Vitis a kol., 2018).

Jedním z typů TMM je již zmíněné alternativní prodlužování telomer ALT u nádorových buněk (Chung a kol., 2011). ALT se vyznačuje heterogenní délkou telomer, vysokým výskytem výměn telomerických sesterských chromatid a specializovanými strukturami vyskytujícími se na telomerách nazvanými PML tělíška asociované s ALT (*ALT-associated PML bodies*, APBs) (Vernier a kol., 2011). Tento mechanismus byl popsán u nádorových buněk a vyskytuje se u asi 15 % nádorů (Henson a kol., 2010).

4.3.1. Formace ALT asociovaných PML útvarů (APBs)

APBs jsou komplexy PML-NBs s telomerickou DNA vyskytující se u buněk využívajících ALT (Yeager a kol., 1999, Henson a kol., 2005, Osterwald a kol., 2015). APBs jsou složeny z některých kanonických komponent PML-NBs a vedle PML, obsahují i SP100 a SUMO. Další základní komponentou jsou proteiny asociované s telomerickými repeticemi TRF1, TRF2, POT1 a RAP1 (Yeager a kol., 1999). Do APBs mohou být lokalizovány faktory účastníci se opravy DNA nebo homologní rekombinace, kterými jsou RPA, RAD51, RAD52, RAD9, RAD17

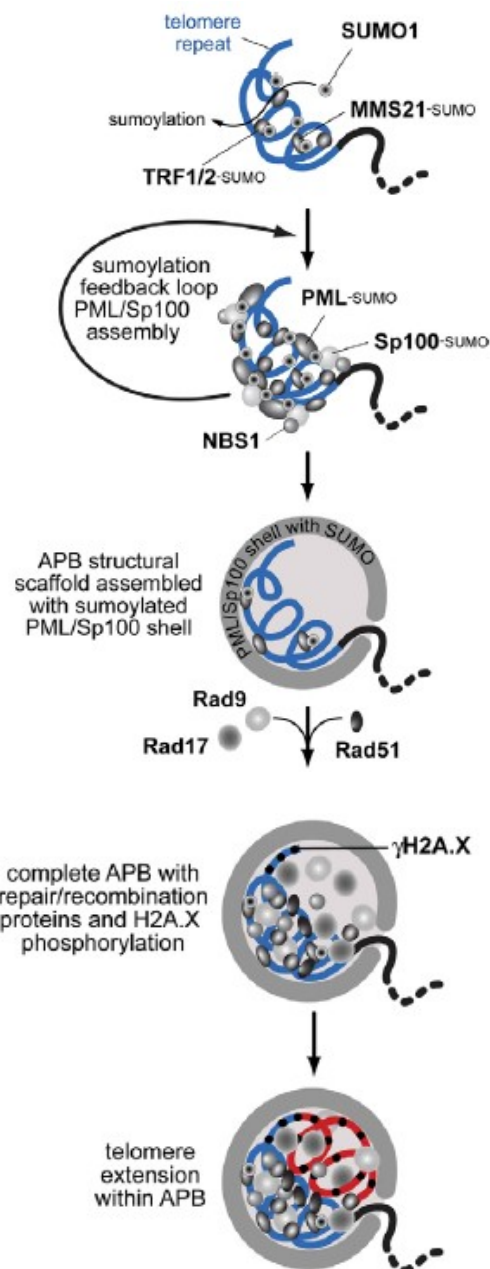
(Chung a kol., 2011, Yeager a kol., 1999) nebo komponenty komplexu MRN (Chung a kol., 2011). Dalšími proteiny, které mohou být dopravovány do APBs jsou HP1 (Jiang a kol., 2005), RAD1, HUS1 (Nabetani a kol., 2004), BLM (Stavropoulos a kol., 2002), komplex SMC5/6 (Potts a kol., 2007) a MUS81 (Zeng a kol., 2009).

Sumoylace na telomerách je nezbytná pro tvorbu APBs a následné udržování telomer (Potts a kol., 2007). Nekovalentní vazba mezi SUMO1 a SIM představuje hlavní interakci, pomocí které jsou sestavovány APBs, zatímco SUMO2/3-SIM interakce hrají při formaci APBs méně významnou roli a jsou důležité spíše pro lokalizaci jiných proteinů do APBs (Chung a kol., 2011). Bylo pozorováno, že modifikace SUMO1 se preferenčně nacházejí v rámci sférické slupky vytvářené PML a proteinem SP100, zatímco modifikace SUMO2/3 se nacházejí uvnitř struktury PML-NBs (Chung a kol., 2011, Lang a kol., 2010). Kombinace interakcí SUMO-SIM a dodatečné sumoylace vytváří strukturu lešení skládající se z PML a SP100, na které se váží reparační faktory DNA a rekombinační faktory (Chung a kol., 2011).

4.3.2. Mechanismus alternativního prodlužování telomer

Základním předpokladem pro ALT je akumulace PML na telomerách, což bylo to prokázáno pomocí „*life-time microscopy*“ (Chung a kol., 2011), ale především díky PML deficientních modelů. To je důkaz toho, že pokud se na telomerách nenachází APBs, jejichž tvorba je závislá na PML, tak dochází k erozi telomer a buněčné senescenci (Zhang a kol., 2021, Osterwald a kol., 2015). Z toho vyplývá, že základním předpokladem pro ALT je tvorba APBs. Bylo pozorováno, že mnoho sumoylovatelných proteinů indukuje akumulaci PML, pokud se na telomerách nacházejí ve zvýšené koncentraci (Chung a kol., 2011). Jedním z těchto proteinů je rekombinační faktor NSB1, který je centrálním komponentem komplexu MRN. Komponenty schelterinového komplexu TRF1 nebo TRF2 a jejich sumoylace jsou také schopné indukovat zvýšení koncentrace PML na telomerách (Chung a kol., 2011), jak je vidět na Obrázku 9. Sumoylace těchto proteinů je zprostředkována SUMO E3 ligázou MMS21 (Chung a kol., 2011).

Detailní mechanismus ALT byl popsán teprve nedávno. Proces ALT se skládá z několika kroků. Nejprve se na telomery lokalizuje PML, který indukuje kompaktaci telomerického chromatinu a shlukování telomerických repetit (Osterwald a kol., 2015, Cho a kol., 2014, Zhang a kol., 2021). V důsledku formace APBs, klesne hladina TRF2 na telomerách. Snížená hustota TRF2 indukuje aktivaci kinázy ATM v APBs, která podněcuje opravu poškození DNA (Osterwald a kol., 2015, Denchi a de Lange, 2007).



Obrázek 9: Model seskupování APBs. Formace APBs může být iniciována pomocí domény SUMO1 nebo pomocí SUMO E3 ligázy MMS21, stejně tak pomocí telomerických proteinů TRF1 a TRF2. Sestavení APBs je iniciováno sumoylací TRF1/2. Tato iniciace spustí zpětnovazebný mechanismus, který vede k asociaci PML a SP100. Iniciací formace APBs může zajišťovat také NBS1. Poté dojde k auto-sumoylaci dalších MMS21, které jsou pomocí interakce se SIM motivem na PML lokalizovány na telomery. Poté co se vytvoří pomocí sumoylovaných PML a SP100 struktura slupky APBs, tak se rekombinační a reparační faktory DNA, kterými mohou být Rad9, Rad17 nebo Rad51, lokalizují do APBs a naváží se na telomery. To vede ke vzniku kompletní struktury APBs, která má funkci při prodlužování telomer pomocí mechanismu opravy DNA, zahrnujícího nereplikativní syntézu DNA, což je znázorněno fosforylovaným histonem H2A.X (Chung a kol., 2011).

K opravám telomerické DNA dochází pomocí replikace indukované zlomy (*break-induced replication*, BIR). Mechanismus BIR zahrnuje reparační faktory RAD52, RAD51 a podjednotky

DNA polymerázy δ POLD3 a POLD4 (**Zhang a kol., 2019, Zhang a kol., 2021**). Základním předpokladem pro spuštění ALT je RAD52, který indukuje formaci telomerické D-smyčky a je důležitý pro syntézu telomerické DNA. BIR může být RAD52-závislá či nezávislá (**Zhang a kol., 2021**). Pro opravy telomer je důležitá také helikáza BLM, která podporuje ALT tím, že zpracovává meziprodukty BIR. Pro akumulaci reparačních faktorů do míst syntézy DNA je nezbytná SUMO ligáza PIAS4 (**Zhang a kol., 2021**).

4.4. Interakce PML s centromerami a rDNA

Jak již bylo výše zmíněno, centromery a rDNA patří mezi repetitivní oblasti přispívající k nestabilitě genomu. Je zajímavé, že byla popsána interakce PML i s těmito úseky DNA, ačkoliv přesný důvod interakce a případná funkce PML nebyli zatím popsány (**Hornofova a kol., 2022**).

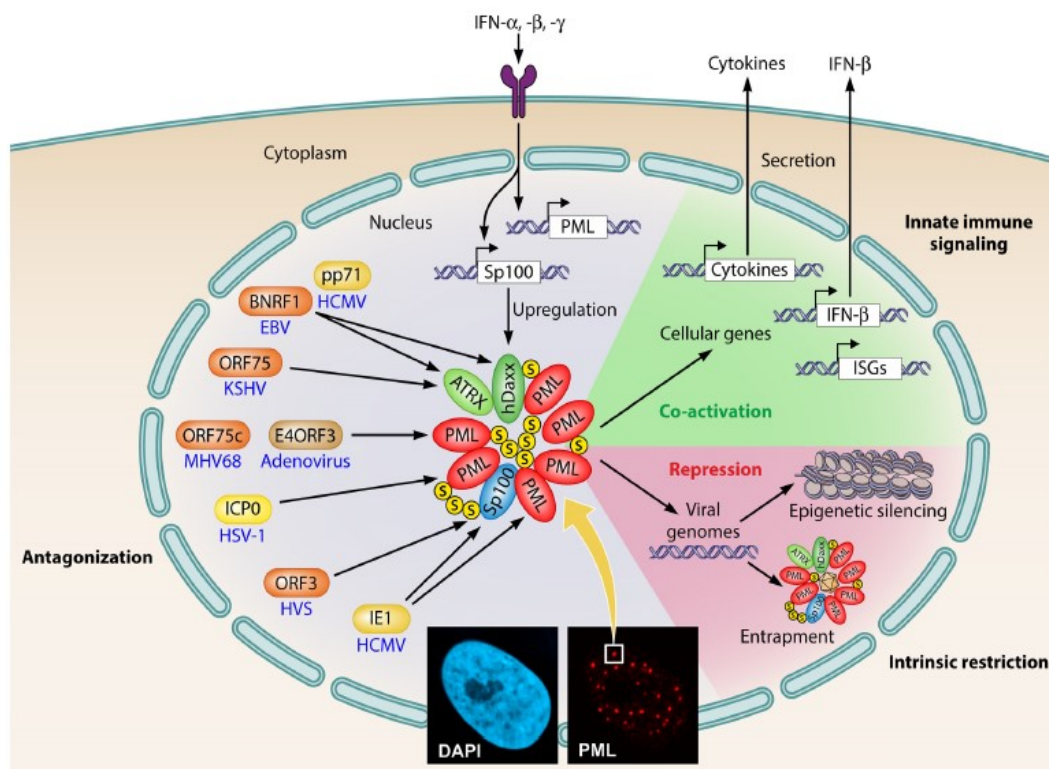
V práci od Luciani a kol. bylo ukázáno, že PML společně s proteinem HP1 vytváří tzv. giant PML bodies v blízkosti centromer a bylo zjištěno, že tyto specifické PML NBs obsahují ve svém centru hypometylovanou DNA. Studie byla prováděna na buněčném modelu tzv. ICF syndromu, pro který je charakteristická nestabilita centromer. Funkce těchto struktur zatím nebyla plně objasněna (**Luciani a kol., 2006**). Nové výsledky od Spirkoski a kol. však podporují možnou roli PML v udržování chromatinu centromer. Autoři v této práci ukazují, že v myších PML-deficientních fibroblastech dochází ke změně lokalizaci histonu H3.3, a tím ke změně heterochromatizace v oblasti centromer. Přímá interakce PML s centromerami či pericentromerickými úseky ale nebyla v této práci analyzována (**Spirkoski a kol., 2019**).

V několika publikacích byla prokázána interakce PML se segregovaným jadérkem, přesněji jadéřkovou čepičkou, která obsahuje segregovanou rDNA a proteiny vázající rDNA (**Janderová-Rossmeislová a kol., 2007, Condemine a kol., 2007, Bernardi a kol., 2004**). Avšak důkaz přímé interakce PML s rDNA byl publikován teprve nedávno (**Hornofova a kol., 2022**). V této práci autoři dokázali, že PML je schopen akumulovat rDNA do tzv. PML-jadéřkového kompartmentu. Tento jev byl indukován doxorubicinem, který je inhibitorem topoisomerázy 2 a způsobuje masivní poškození DNA, inhibici transkripce pre-rRNA a segregaci jadérka (**Hornofova a kol., 2022**). Tento PML-jadéřkový kompartment obsahuje i fosforylovaný histon H2A.X, který je znakem poškození DNA (**Imrichova a kol., 2019**). Tudiž, se předpokládá, že by PML mohl být zapojen i v opravách genů kódující rDNA (**Hornofova a kol., 2022**).

4.5. Role PML při antivirové ochraně

Pro úspěšnou infekci, potřebují viry překonat bariéry obranného systému hostitelské buňky včetně vnitřní obrany a vrozené a získané imunity. Bylo dokázáno, že PML hraje důležitou roli ve vnitřní obraně buňky tím, že se chová jako jaderný restriční faktor potlačující viry, které se dostávají do buňky (Kim a Ahn, 2015).

PML se může v důsledku vniknutí viru do buňky podílet na signalizaci vrozené imunity hostitele a může aktivovat geny pro cytokiny (Lin a kol., 2004) zahrnující interferony (Bougrini a kol., 2011) a následně geny stimulované interferony (*interferon-stimulated genes*, ISGs) (Kim a Ahn, 2015). Interferony mohou navíc zvyšovat expresi PML a Sp100 (Grotzinger a kol., 1996). Další strategií, kterou PML využívá v boji proti virové infekci, je pohlcení virového genomu do PML-NBs (Reichelt a kol., 2011) nebo jeho epigenetické umlčení (Sanyal a kol., 2018), což je znázorněno níže na Obrázku 10.



Obrázek 10: Role PML-NBs při obranných mechanismech vnitřní a vrozené imunity a jejich interakce s virovými efektorovými proteiny. PML-NBs jsou schopné zprostředkovat represi virové replikace tím, že indukují umlčení virového genomu nebo mohou virový genom pohltit. PML-NBs také fungují zároveň jako koaktivátory buněčných genů, které mají antivirovou aktivitu, jimiž jsou geny kódující cytokiny nebo ISGs. PML-NBs jsou v pozitivní zpětné vazbě regulovány působením interferonů. Mnoho virů disponuje proteiny, které negativně působí na strukturu PML-NBs (Scherer a Stamminger, 2016).

Určité virové infekce mají za následek narušení strukturní stability PML-NBs vedoucí k rozpadu této struktury a re-lokalizaci PML do cytoplazmy. Toto narušení stability PML-NBs

je považováno za virovou strategii, pomocí které se viry vyhýbají mechanismům buněčné rezistence **(McNally a kol., 2008)**. Jaderný PML se může buď lokalizovat do cytoplazmy v důsledku interakce s proteiny virové infekce nebo může být cPML přímo exprimován během virové infekce **(McNally a kol., 2008, Jensen a kol., 2001)**.

Mnoho virů kóduje proteiny, které zasahují do antivirové aktivity PML **(Kim a Ahn, 2015)**. Těmito proteiny jsou multifunkční protein herpes viru simplex typu 1 ICP0 **(McNally a kol., 2008)**, proteiny lidského cytomegaloviru E1 **(Ahn a kol., 2000)** a pp71 **(Hofmann a kol., 2002)**, protein adenoviru E4-ORF3 **(Hoppe a kol., 2006)**, protein viru Epstein Barrové BZLF **(Bell a kol., 2000)**, protein herpesviru asociovaného s Kaposiho sarkomem ORF75 **(Full a kol., 2014)**, protein myšího gamaherpesviru ORF75c **(Sewatanon a Ling, 2014)** a protein herpesviru saimiri ORF3 **(Leppard a kol., 2009)**.

5. Závěr

Cílem práce bylo objasnit roli promyelocytárního proteinu (PML) v udržování stability genomu. PML je nejlépe znám jako supresorový protein. PML je schopen přes SUMO-SIM interakci schopný koncentrovat velké množství proteinů do určité oblasti jádra, a tím vytvořit nemembránové útvary, PML-NBs. Složení PML-NBs je variabilní a pravděpodobně se liší nejenom mezi experimentálními podmínkami a buněčnými modely, ale i v jednotlivých jádrech. A právě tato kompozitní variabilita naznačuje možnou funkční odlišnost. Tato práce shrnuje, že PML má kapacitu ovlivňovat stabilitu genomu zapojením do různých buněčných procesů včetně regulace buněčného cyklu, opravy DNA či antivirové ochrany. Bylo také ukázáno, že PML má afinitu k některým repetitivním oblastem genomu, které mohou být zdrojem genomové nestability.

Jak bylo napsáno výše, PML hraje důležitou roli při regulaci buněčného cyklu, neboť indukuje senescenci a apoptózu v odpovědi na genotoxický stres nebo na působení onkogenu. K navození senescence PML přispívá interakcí s p53, retinoblastovým proteinem, p14ARF či E2F. Apoptózu může PML navozovat rovněž interakcí s p53 či proteinem DAXX. Tyto aktivity PML poukazují na jeho roli v nádorové supresi, neboť přispívá k zástavě buněčného cyklu buněk s poškozenou DNA.

V reakci na poškození DNA má PML schopnost asociovat s místy zlomů DNA. Poslední dobou přibývá důkazů, že se PML-NBs přímo podílí na opravách komplikovaných lézí mechanismem HDR. Tyto výsledky naznačují, že aberantní lokalizace či hladina PML může vést k přetrvávajícímu poškození DNA, a tím i zvýšené genomové nestabilitě, což může způsobit různé patologické jevy.

PML má klíčovou roli při alternativním udržování telomer (ALT), ke kterému dochází u některých nádorových buněk. PML tvoří s telomerickou DNA speciální struktury zvané ALT asociované PML útvary (APBs). Akumulace PML na telomerách je navíc základním předpokladem pro ALT, neboť PML indukuje v raných fázích ALT shlukování telomer. Tato schopnost ukazuje na onkogenní potenciál PML, neboť jeho exprese umožňuje skoro neomezenou proliferaci některých nádorů.

PML také představuje bariéru, která chrání buňky před virovými infekcemi. PML se podílí na signalizaci vrozené imunity hostitele a rovněž využívá strategie, kterými jsou epigenetické potlačení virového genomu nebo pohlcení a uchování virového genomu v PML-NBs.

Ačkoliv zůstává stále mnoho otázek ohledně funkce PML nezodpovězeno, PML má vzhledem k prokázaným informacím důležitou úlohu při udržování stability genomu. Jelikož PML může

zároveň podporovat vznik nádorů i potlačovat jejich vznik, vyplatí se o PML provádět další studie.

6. Seznam použité literatury

- A Guo (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol.*
- Ahn, J. H., & Hayward, G. S. (2000). Disruption of PML-associated nuclear bodies by IE1 correlates with efficient early stages of viral gene expression and DNA replication in human cytomegalovirus infection. *Virology*, 274(1), 39–55. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0448>
- Attwood, K. M., Salsman, J., Chung, D., Mathavarajah, S., van Iderstine, C., & Dellaire, G. (2020). PML isoform expression and DNA break location relative to PML nuclear bodies impacts the efficiency of homologous recombination. *Biochemistry and Cell Biology*, 98(3), 314–326. <https://doi.org/10.1139/bcb-2019-0115>
- Alessandro Marcello (2003). Recruitment of human cyclin T1 to nuclear bodies through direct interaction with the PML protein. *EMBO J.* <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg205>
- B V Harmon (1997). Apoptosis. *Adv Genet.* [https://doi.org/10.1016/s0065-2660\(08\)60447-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2660(08)60447-2)
- Banani, S. F., Rice, A. M., Peeples, W. B., Lin, Y., Jain, S., Parker, R., & Rosen, M. K. (2016). Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies. *Cell*, 166(3), 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.010>
- Bandaria, J. N., Qin, P., Berk, V., Chu, S., & Yildiz, A. (2016). Shelterin protects chromosome ends by compacting telomeric chromatin. *Cell*, 164(4), 735–746. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.036>
- Beech, S. J., Lethbridge, K. J., Killick, N., McGlincy, N., & Leppard, K. N. (2005). Isoforms of the promyelocytic leukemia protein differ in their effects on ND10 organization. *Experimental Cell Research*, 307(1), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.03.012>
- Bell, P., Lieberman, P. M., & Maul, G. G. (2000). Lytic but Not Latent Replication of Epstein-Barr Virus Is Associated with PML and Induces Sequential Release of Nuclear Domain 10 Proteins. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 74, Issue 24).
- Blackford, A. N., & Jackson, S. P. (2017a). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. In *Molecular Cell* (Vol. 66, Issue 6, pp. 801–817). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>
- Blackford, A. N., & Jackson, S. P. (2017b). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. In *Molecular Cell* (Vol. 66, Issue 6, pp. 801–817). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>
- Bonura, T., Smith, K. C., & Kaplan, H. S. (1975). *Enzymatic induction of DNA double-strand breaks in γ -irradiated Escherichia coli K-12 (polL41 mutant/repair/excision/degradation)* (Vol. 72, Issue 11).
- Brown, J. R., Conn, K. L., Wasson, P., Charman, M., Tong, L., Grant, K., McFarlane, S., & Boutell, C. (2016). SUMO Ligase Protein Inhibitor of Activated STAT1 (PIAS1) Is a Constituent Promyelocytic Leukemia Nuclear Body Protein That Contributes to the Intrinsic Antiviral Immune Response to

- Herpes Simplex Virus 1. *Journal of Virology*, 90(13), 5939–5952. <https://doi.org/10.1128/jvi.00426-16>
- Bryan, T. M., Marusic, L., Bacchetti, S., Namba, M., & Reddel, R. R. (1997). The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 6, Issue 6). Oxford University Press.
- C Jones (1995). *Association of a chromosome deletion syndrome with a fragile site within the proto-oncogene CBL2*. <https://doi.org/10.1038/376145a0>
- Carolina, M., Moraes, S., Bispo, J., Neto, C., Frederico, C., & Menck, M. (2012). DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 17).
- Chang, H. R., Munkhjargal, A., Kim, M. J., Park, S. Y., Jung, E., Ryu, J. H., Yang, Y., Lim, J. S., & Kim, Y. (2018). The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. In *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (Vol. 809, pp. 99–107). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.05.002>
- Chicas, A., Wang, X., Zhang, C., McCurrach, M., Zhao, Z., Mert, O., Dickins, R. A., Narita, M., Zhang, M., & Lowe, S. W. (2010). Dissecting the Unique Role of the Retinoblastoma Tumor Suppressor during Cellular Senescence. *Cancer Cell*, 17(4), 376–387. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.01.023>
- Chin, K., Liu, J., Lozano, G., & Chang, K. (1994). PML, a Growth Suppressor Disrupted in Acute Promyelocytic Leukemia The importance of the PML-RAR α fusion protein in the. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 14, Issue 10).
- Cho, N. W., Dilley, R. L., Lampson, M. A., & Greenberg, R. A. (2014). Interchromosomal homology searches drive directional ALT telomere movement and synapsis. *Cell*, 159(1), 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.030>
- Chung, I., Leonhardt, H., & Rippe, K. (2011). De novo assembly of a PML nuclear subcompartment occurs through multiple pathways and induces telomere elongation. *Journal of Cell Science*, 124(21), 3603–3618. <https://doi.org/10.1242/jcs.084681>
- Corpet, A., Kleijwegt, C., Roubille, S., Juillard, F., Jacquet, K., Texier, P., & Lomonte, P. (2020). Survey and summary PML nuclear bodies and chromatin dynamics: Catch me if you can! *Nucleic Acids Research*, 48(21), 11890–11912. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa828>
- Courcelle, C. T., Belle, J. J., & Courcelle, J. (2005). Nucleotide excision repair or polymerase V-mediated lesion bypass can act to restore UV-arrested replication forks in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 187(20), 6953–6961. <https://doi.org/10.1128/JB.187.20.6953-6961.2005>
- Darbinyan, A., White, M. K., Akan, S., Radhakrishnan, S., del Valle, L., Amini, S., & Khalili, K. (2007). Alterations of DNA damage repair pathways resulting from JCV infection. *Virology*, 364(1), 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.02.015>
- de Stanchina, E., Querido, E., Narita, M., Davuluri, R. v, Pandolfi, P. P., & Ferbeyre, G. (2004). PML Is a Direct p53 Target that Modulates p53 Effector Functions the importance of the p53 network in

- human cancer, it seems likely that key p53 target genes will also be linked to cancer development. In *Molecular Cell* (Vol. 13). <http://bioinformatics>.
- de Vitis, M., Berardinelli, F., & Sgura, A. (2018). Telomere length maintenance in cancer: At the crossroad between telomerase and alternative lengthening of telomeres (ALT). In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19020606>
- Dellaire, G., & Bazett-Jones, D. P. (2004). PML nuclear bodies: Dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. In *BioEssays* (Vol. 26, Issue 9, pp. 963–977). <https://doi.org/10.1002/bies.20089>
- Dellaire, G., Ching, R. W., Ahmed, K., Jalali, F., Tse, K. C. K., Bristow, R. G., & Bazett-Jones, D. P. (2006). Promyelocytic leukemia nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2, and ATR. *Journal of Cell Biology*, 175(1), 55–66. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604009>
- Denchi, E. L., & de Lange, T. (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*, 448(7157), 1068–1071. <https://doi.org/10.1038/nature06065>
- el Bougrini, J., Dianoux, L., & Chelbi-Alix, M. K. (2011). PML positively regulates interferon gamma signaling. *Biochimie*, 93(3), 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.11.005>
- Falck, J., Coates, J., & Jackson, S. P. (2005). *Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage*. www.nature.com/nature
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., & Lowe, S. W. (2000). *PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence*. www.genomesystems.com
- Fornace, A. J., Kohnt, K. W., & Kann, H. E. (1976). DNA single-strand breaks during repair of UV damage in human fibroblasts and abnormalities of repair in xeroderma pigmentosum (alkaline elution of DNA/DNA crosslinking/x-ray sensitivity/excision repair). In *Biochemistry* (Vol. 73, Issue 1).
- Full, F., Jungnickl, D., Reuter, N., Bogner, E., Brulois, K., Scholz, B., Stürzl, M., Myoung, J., Jung, J. U., Stamminger, T., & Ensser, A. (2014). Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus Tegument Protein ORF75 Is Essential for Viral Lytic Replication and Plays a Critical Role in the Antagonization of ND10-Instituted Intrinsic Immunity. *PLoS Pathogens*, 10(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003863>
- Fumihiko Hayakawa 1, M. L. P. (2004). *Phosphorylation of PML by mitogen-activated protein kinases plays a key role in arsenic trioxide-mediated apoptosis*. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00082-0](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00082-0)
- Gabriella D'Orazi (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/ncb714>
- Gambacorta, M., Flenghi, L., Fagioli, M., Pileri, S., Leoncini, L., Bigerna, B., Pacini, R., Tanci, L. N., Pasqualucci, L., Ascani, S., Mencarelli, A., Liso, A., Pelicci, P.-G., & Falinit, B. (1996). Heterogeneous Nuclear Expression of the Promyelocytic Leukemia (PML) Protein in Normal and Neoplastic Human Tissues. In *American journal of Pathology* (Vol. 149, Issue 6).

- Gantt, R., Jones, G. M., Stephens, E. v, Baeck, A. E., & Sanford, K. K. (1979). VISIBLE LIGHT-INDUCED DNA CROSSLINKS IN CULTURED MOUSE AND HUMAN CELLS. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 565).
- Gartner, A., Milstein, S., Ahmed, S., Hodgkin, J., & Hengartner, M. O. (2000). Weinert, 1998; Caspari and Carr. In *Lydall and Weinert* (Vol. 5).
- Giorgi, C., Ito, K., Lin, H. K., Santangelo, C., Wieckowski, M. R., Lebiedzinska, M., Bononi, A., Bonora, M., Duszynski, J., Bernardi, R., Rizzuto, R., Tacchetti, C., Pinton, P., & Pandolfi, P. P. (2010). PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release. *Science*, *330*(6008), 1247–1251. <https://doi.org/10.1126/science.1189157>
- Glazer, P. M., Sarkar, S. N., Chisholm, G. E., & Summers, W. C. (1987). DNA Mismatch Repair Detected in Human Cell Extracts. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 7, Issue 1).
- Glover, T. W., & Stein, C. K. (1988). Chromosome Breakage and Recombination at Fragile Sites. In *Am. J. Hum. Genet* (Vol. 43).
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase Activity in Tetrahymena Extracts. In *Cell* (Vol. 43).
- Grotzinger, T., Sternsdorf, T., Jensen, K., & Will, H. (1996). Interferon-modulated expression of genes encoding the nuclear-dot-associated proteins SplOO and promyelocytic leukemia protein (PML). In *Eur. J. Biochem* (Vol. 238).
- Gurrieri, C., Nafa, K., Merghoub, T., Bernardi, R., Capodiecici, P., Biondi, A., Nimer, S., Douer, D., Cordon-Cardo, C., Gallagher, R., & Pandolfi, P. P. (2004). Mutations of the PML tumor suppressor gene in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, *103*(6), 2358–2362. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2200>
- Hands, K. J., Cuchet-Lourenco, D., Everett, R. D., & Hay, R. T. (2014). PML isoforms in response to arsenic: High-resolution analysis of PML body structure and degradation. *Journal of Cell Science*, *127*(2), 365–375. <https://doi.org/10.1242/jcs.132290>
- Hecht and Sutherland. (1984). *Fragile sites and cancer breakpoints*. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(84\)90132-8](https://doi.org/10.1016/0165-4608(84)90132-8)
- Hecht F, G. T. (1984). *Cancer chromosome breakpoints and common fragile sites induced by aphidicolin*. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(84\)90060-8](https://doi.org/10.1016/0165-4608(84)90060-8)
- Henson, J. D., & Reddel, R. R. (2010). Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers. In *FEBS Letters* (Vol. 584, Issue 17, pp. 3800–3811). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.009>
- Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 128, Issue 4, pp. 1238–1246). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI95148>
- Hewett DR (1998). *FRA10B Structure Reveals Common Elements in Repeat Expansion and Chromosomal Fragile Site Genesis*. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80077-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80077-5)

- Hofmann, H., Sindre, H., & Stamminger, T. (2002). Functional Interaction between the pp71 Protein of Human Cytomegalovirus and the PML-Interacting Protein Human Daxx. *Journal of Virology*, 76(11), 5769–5783. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5769-5783.2002>
- Hoppe, A., Beech, S. J., Dimmock, J., & Leppard, K. N. (2006). Interaction of the Adenovirus Type 5 E4 Orf3 Protein with Promyelocytic Leukemia Protein Isoform II Is Required for ND10 Disruption. *Journal of Virology*, 80(6), 3042–3049. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.6.3042-3049.2006>
- Hornofova, T., Pokorna, B., Hubackova, S. S., Uvizl, A., Kosla, J., Bartek, J., Hodny, Z., & Vasicova, P. (2022). Phospho-SIM and exon8b of PML protein regulate formation of doxorubicin-induced rDNA-PML compartment. *DNA Repair*, 114. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2022.103319>
- Hsu, K. S., & Kao, H. Y. (2018). PML: Regulation and multifaceted function beyond tumor suppression. In *Cell and Bioscience* (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0204-8>
- Huang, S. Y., Naik, M. T., Chang, C. F., Fang, P. J., Wang, Y. H., Shih, H. M., & Huang, T. H. (2014). The B-box 1 dimer of human promyelocytic leukemia protein. *Journal of Biomolecular NMR*, 60(4), 275–281. <https://doi.org/10.1007/s10858-014-9869-4>
- Hui-Kuan Lin (2004). *Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling*. <https://doi.org/10.1038/nature02783>
- Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. v, Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T. H., Strauss, J. F., & Maul, G. G. (1999). PML Is Critical for ND10 Formation and Recruits the PML-interacting Protein Daxx to this Nuclear Structure When Modified by SUMO-1. In *The Journal of Cell Biology* (Vol. 147, Issue 2). <http://www.jcb.org>
- Ivanschitz, L., de Thé, H., & le Bras, M. (2013). PML, SUMOylation, and senescence. In *Frontiers in Oncology: Vol. 3 JUL*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00171>
- Ivanschitz, L., Takahashi, Y., Jollivet, F., Ayrault, O., Bras, M. le, & de Thé, H. (2015). PML IV/ARF interaction enhances p53 SUMO-1 conjugation, activation, and senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(46), 14278–14283. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507540112>
- Ivo A Hendriks (2016). A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.81>
- J D Watson. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*. <https://doi.org/10.1038/newbio239197a0>
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. In *Nature* (Vol. 461, Issue 7267, pp. 1071–1078). <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Janderová-Rossmeslová, L., Nováková, Z., Vlasáková, J., Philimonenko, V., Hozák, P., & Hodný, Z. (2007). PML protein association with specific nucleolar structures differs in normal, tumor and senescent human cells. *Journal of Structural Biology*, 159(1), 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.02.008>

- Jensen, K., Shiels, C., & Freemont, P. S. (n.d.). *PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif*. www.nature.com/onc
- Jeremy D Henson (2005). A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. *Clin Cancer Res.*
- Jiang, H., Wang, Y., Gu, Y., Guo, X., Zou, Z., Scholz, F., Trenczek, T. E., & Kanost, M. R. (n.d.). *Molecular identification of a bevy of serine proteinases in Manduca sexta hemolymph*.
- Jimenez, G., Yucel, J., Rowley, R., & Subramani, S. (1992). The rad3+ gene of Schizosaccharomyces pombe is involved in multiple checkpoint functions and in DNA repair (G2 arrest/COUPu of mitosis to DNA synthesis/molecular checkpoints). In *Genetics* (Vol. 89).
- Kalitsis, P., & Choo, K. H. A. (2012). The evolutionary life cycle of the resilient centromere. In *Chromosoma* (Vol. 121, Issue 4, pp. 327–340). <https://doi.org/10.1007/s00412-012-0369-6>
- Kastner, P., Perez, A., Lutz, Y., Rochette-Egly, C., Gaub, M.-P., Durand, B., Lanotte, M., Berger, R., & Chambon, P. (1992). Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. In *The EMBO Journal* (Vol. 11, Issue 2).
- Katsuhiko Hanada (2007). *The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks*. <https://doi.org/10.1038/nsmb1313>
- Kim, Y. E., & Ahn, J. H. (2015). Positive Role of Promyelocytic Leukemia Protein in Type I Interferon Response and Its Regulation by Human Cytomegalovirus. *PLoS Pathogens*, 11(3), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004785>
- Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honoré, N., Doubeikovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P. P., Puvion, E., Freemont, P., & de Thé, H. (2001). Role of Promyelocytic Leukemia (PML) Sumoylation in Nuclear Body Formation, 11S Proteasome Recruitment, and As2O3-induced PML or PML/Retinoic Acid Receptor Degradation. In *J. Exp. Med.* (Vol. 193). Rockefeller University Press. <http://www.jem.org/cgi/content/full/193/12/1361>
- Lång, A., Lång, E., & Bøe, S. O. (2019). PML Bodies in Mitosis. *Cells*, 8(8), 893. <https://doi.org/10.3390/cells8080893>
- Lang, M., Jegou, T., Chung, I., Richter, K., Münch, S., Udvarhelyi, A., Cremer, C., Hemmerich, P., Engelhardt, J., Hell, S. W., & Rippe, K. (2010). Three-dimensional organization of promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Journal of Cell Science*, 123(3), 392–400. <https://doi.org/10.1242/jcs.053496>
- LEE ZOU AND STEPHEN J. ELLEDGE. (2003). *Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes*. <https://doi.org/10.1126/science.1083430>
- Leppard, K. N., Emmott, E., Cortese, M. S., & Rich, T. (2009). Adenovirus type 5 E4 Orf3 protein targets promyelocytic leukaemia (PML) protein nuclear domains for disruption via a sequence in PML

- isoform II that is predicted as a protein interaction site by bioinformatic analysis. *Journal of General Virology*, 90(1), 95–104. <https://doi.org/10.1099/vir.0.005512-0>
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'neil, J., Park, E.-J., & Chen, J. D. (2000). Sequestration and Inhibition of Daxx-Mediated Transcriptional Repression by PML. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 20, Issue 5).
- Louria-Hayon, I., Grossman, T., Sionov, R. V., Alsheich, O., Pandolfi, P. P., & Haupt, Y. (2003). The promyelocytic leukemia protein protects p53 from Mdm2-mediated inhibition and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 33134–33141. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301264200>
- Luciani, J. J., Depetris, D., Usson, Y., Metzler-Guillemain, C., Mignon-Ravix, C., Mitchell, M. J., Megarbane, A., Sarda, P., Sirma, H., Moncla, A., Feunteun, J., & Mattei, M. G. (2006). PML nuclear bodies are highly organised DNA-protein structures with a function in heterochromatin remodelling at the G2 phase. *Journal of Cell Science*, 119(12), 2518–2531. <https://doi.org/10.1242/jcs.02965>
- M Pearson (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35018127>
- Markovits, J., Larsen, A. K., Sigal-Bendirdjian, E., Foss, P., Saucier, J.-M., Gazit, A., Levitzki, A, Umezawa, K, & Jacquemin-Sablon, A. (1994). INHIBITION OF DNA TOPOISOMERASES I AND II AND INDUCTION OF APOPTOSIS BY ERBSTATIN AND TYRPHOSTIN DERIVATIVES. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 48, Issue 3).
- Martin, N., Benhamed, M., Nacerddine, K., Demarque, M. D., van Lohuizen, M., Dejean, A., & Bischof, O. (2012). Physical and functional interaction between PML and TBX2 in the establishment of cellular senescence. *EMBO Journal*, 31(1), 95–109. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.370>
- Maxine F.Singer. (1982). Highly Repeated Sequences in Mammalian Genomes. *International Review of Cytology*. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61789-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61789-1)
- Maya-Mendoza, A., Moudry, P., Merchut-Maya, J. M., Lee, M., Strauss, R., & Bartek, J. (2018). High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. *Nature*, 559(7713), 279–284. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0261-5>
- Mazza, M., & Pelicci, P. G. (2013). Is PML a tumor suppressor? In *Frontiers in Oncology: Vol. 3 JUL*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00174>
- McNally, B. A., Trgovcich, J., Maul, G. G., Liu, Y., & Zheng, P. (2008). A role for cytoplasmic PML in cellular resistance to viral infection. *PLoS ONE*, 3(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002277>
- Michael H Tatham (2005). *Unique binding interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 reveal a mechanism for SUMO paralog selection*. <https://doi.org/10.1038/nsmb878>

- Mohindra, A., Hays, L. E., Phillips, E. N., Preston, B. D., Helleday, T., & Meuth, M. (n.d.). *Defects in homologous recombination repair in mismatch-repair-deficient tumour cell lines*. <https://academic.oup.com/hmg/article/11/18/2189/676573>
- Morgan, M. J., Kim, Y.-S., & Liu, Z. (2009). Membrane-Bound Fas Ligand Requires RIP1 for Efficient Activation of Caspase-8 within the Death-Inducing Signaling Complex. *The Journal of Immunology*, 183(5), 3278–3284. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803428>
- Morgan, W. F., Corcoran, J., Hartmann, A., Kaplan, M. I., Limoli, C. L., & Ponnaiya, B. (1998). DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability. In *Mutation Research* (Vol. 404).
- Morley, A. A., & Turner, D. R. (1999). The contribution of exogenous and endogenous mutagens to in vivo mutations. In *Mutation Research* (Vol. 428). www.elsevier.com/locate/molmut Community address: www.elsevier.com/locate/mutres
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Crams, L. S., Dani, M., Deavent, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., & Wu, J.-R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes (human repetitive DNA/in situ hybridization/trypanosome telomeres/BAL-31 nuclease/flow cytometry). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 85).
- Mu, Z.-M., Le, X.-F., Vallian, S., Glassman, A. B., & Chang, K.-S. (1997). Stable overexpression of PML alters regulation of cell cycle progression in HeLa cells. In *Carcinogenesis* (Vol. 18, Issue 11).
- Müller, H., Bracken, A. P., Vernell, R., Moroni, M. C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J. D., & Helin, K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes and Development*, 15(3), 267–285. <https://doi.org/10.1101/gad.864201>
- Nabetani, A., Yokoyama, O., & Ishikawa, F. (2004). Localization of hRad9, hHus1, hRad1, and hRad17 and caffeine-sensitive DNA replication at the alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia body. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25849–25857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312652200>
- Natarajan, A. T., Darroudi, F., Jha, A. N., Meijers, M., & Zdzienicka, M. Z. (1993). Ionizing radiation induced DNA lesions which lead to chromosomal aberrations. In *Mutation Research* (Vol. 299).
- Nefkens, I., Negorev, D. G., Ishov, A. M., Michaelson, J. S., Yeh, E. T. H., Tanguay, R. M., Müller, W. E. G., & Maul, G. G. (2003). Heat shock and Cd²⁺ exposure regulate PML and Daxx release from ND10 by independent mechanisms that modify the induction of heat-shock proteins 70 and 25 differently. In *Journal of Cell Science* (Vol. 116, Issue 3, pp. 513–524). <https://doi.org/10.1242/jcs.00253>
- Nisole, S., Maroui, M. A., Mascle, X. H., Aubry, M., & Chelbi-Alix, M. K. (2013). Differential roles of PML isoforms. In *Frontiers in Oncology: Vol. 3 MAY*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00125>
- Niwa-Kawakita, M., Ferhi, O., Soilihi, H., le Bras, M., Lallemand-Breitenbach, V., & de Thé, H. (2017). PML is a ROS sensor activating p53 upon oxidative stress. *Journal of Experimental Medicine*, 214(11), 3197–3206. <https://doi.org/10.1084/jem.20160301>

- Nussenzweig, A., & Nussenzweig, M. C. (2007). A Backup DNA Repair Pathway Moves to the Forefront. In *Cell* (Vol. 131, Issue 2, pp. 223–225). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.005>
- Olavarrieta, L., Hernández, P., Krimer, D. B., & Schwartzman, J. B. (2002). DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication. *Journal of Molecular Biology*, 322(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00740-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00740-4)
- O’Neil, N., & Rose, A. (2006). DNA repair. In *WormBook : the online review of C. elegans biology* (pp. 1–12). <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.54.1>
- Osterwald, S., Deeg, K. I., Chung, I., Parisotto, D., Wörz, S., Rohr, K., Erfle, H., & Rippe, K. (2015). PML induces compaction, TRF2 depletion and DNA damage signaling at telomeres and promotes their alternative lengthening. *Journal of Cell Science*, 128(10), 1887–1900. <https://doi.org/10.1242/jcs.148296>
- O’Sullivan, R. J., & Karlseder, J. (2010). Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 3, pp. 171–181). <https://doi.org/10.1038/nrm2848>
- Ouyang, K. J., Woo, L. L., & Ellis, N. A. (2008). Homologous recombination and maintenance of genome integrity: Cancer and aging through the prism of human RecQ helicases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(7–8), 425–440. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.03.003>
- Patrick Ryan Potts 1, H. Y. (2007). *The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins*. <https://doi.org/10.1038/nsmb1259>
- Pelczar, P., Kalck, V., & Kovalchuk, I. (2003). Different genome maintenance strategies in human and tobacco cells. *Journal of Molecular Biology*, 331(4), 771–779. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00839-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00839-8)
- Rassool, F. v, Mckeithan, T. W., Neilly, M. E., van Melle, E., Espinosa Iii, R., & le Beau, M. M. (1991). Preferential integration of marker DNA into the chromosomal fragile site at 3p14: An approach to cloning fragile sites (fluorescence in situ hybridization/DNA transfection/pSV2Neo/chromosome aberrations). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 88).
- Reichelt, M., Wang, L., Sommer, M., Perrino, J., Nour, A. M., Sen, N., Baiker, A., Zerboni, L., & Arvin, A. M. (2011). Entrapment of viral capsids in nuclear PML cages is an intrinsic antiviral host defense against Varicella-zoster virus. *PLoS Pathogens*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001266>
- Roberta Carbone (2002). *PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205227>
- Rosa Bernardi & Pier Paolo Pandolfi. (2003). Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207106>
- Rosa Bernardi (2004). *PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus*. <https://doi.org/10.1038/ncb1147>

- Ruzo, A., Croft, G. F., Metzger, J. J., Galgoczi, S., Gerber, L. J., Pellegrini, C., Wang, H., Fenner, M., Tse, S., Marks, A., Nchako, C., & Brivanlou, A. H. (2018). Chromosomal instability during neurogenesis in huntington's disease. *Development (Cambridge)*, *145*(2). <https://doi.org/10.1242/dev.156844>
- Sahin Umut, U., Ferhi, O., Jeanne, M., Benhenda, S., Berthier, C., Jollivet, F., Niwa-Kawakita, M., Faklaris, O., Setterblad, N., de Thé, H., & Lallemand-Breitenbach, V. (2014). Oxidative stress-induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. *Journal of Cell Biology*, *204*(6), 931–945. <https://doi.org/10.1083/jcb.201305148>
- Salim, D., & Gerton, J. L. (2019). Ribosomal DNA instability and genome adaptability. In *Chromosome Research* (Vol. 27, Issues 1–2, pp. 73–87). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10577-018-9599-7>
- Sanyal, A., Wallaschek, N., Glass, M., Flamand, L., Wight, D. J., & Kaufer, B. B. (2018). The ND10 complex represses lytic human herpesvirus 6A replication and promotes silencing of the viral genome. *Viruses*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/v10080401>
- Scherer, M., & Stamminger, T. (2016). Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. *Journal of Virology*, *90*(13), 5850–5854. <https://doi.org/10.1128/jvi.01979-15>
- Seker. (2003). *UV-C-induced DNA damage leads to p53-dependent nuclear trafficking of PML.* <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206140>
- Sewatanon, J., & Ling, P. D. (2014). Murine Gammaherpesvirus 68 Encodes a Second PML-Modifying Protein. *Journal of Virology*, *88*(6), 3591–3597. <https://doi.org/10.1128/jvi.03081-13>
- Sharova. (2005). *How does a cell repair damaged DNA?* <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0113-4>
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2002). *R E V I E W Telomerase: A target for cancer therapeutics.*
- Shen, T. H., Lin, H.-K., Scaglioni, P. P., Yung, T. M., & Pandolfi, P. P. (2006). *The Mechanisms of PML-Nuclear Body Formation.*
- Shiraishi, T., Druck, T., Mimori, K., Flomenberg, J., Berk, L., Alder, H., Miller, W., Huebner, K., & Croce, C. M. (2001). Sequence conservation at human and mouse orthologous common fragile regions, FRA3BFHIT and Fra14A2Fhit. In *PNAS May* (Vol. 8, Issue 10). www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.091095898
- Spirkoski, J., Shah, A., Reiner, A. H., Collas, P., & Delbarre, E. (2019). PML modulates H3.3 targeting to telomeric and centromeric repeats in mouse fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *511*(4), 882–888. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.087>
- Stavropoulos, D. J., Bradshaw, P. S., Li, X., Pasic, I., Truong, K., Ikura, M., Ungrin, M., & Meyn, M. S. (n.d.). *The Bloom syndrome helicase BLM interacts with TRF2 in ALT cells and promotes telomeric DNA synthesis.* <https://academic.oup.com/hmg/article/11/25/3135/578795>
- Stults, D. M., Killen, M. W., Williamson, E. P., Hourigan, J. S., Vargas, H. D., Arnold, S. M., Moscow, J. A., & Pierce, A. J. (2009). Human rRNA gene clusters are recombinational hotspots in cancer. *Cancer Research*, *69*(23), 9096–9104. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2680>

- T M Gottlieb 1, S. P. J. (1993). *The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90057-w](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90057-w)
- T R Yeager (1999). Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res*.
- Talluri, S., & Dick, F. A. (2014). The retinoblastoma protein and PML collaborate to organize heterochromatin and silence E2F-responsive genes during senescence. *Cell Cycle*, 13(4), 641–651. <https://doi.org/10.4161/cc.27527>
- Terezie Imrichova (2019). Dynamic PML protein nucleolar associations with persistent DNA damage lesions in response to nucleolar stress and senescence-inducing stimuli. *Aging (Albany NY)*. <https://doi.org/10.18632/aging.102248>
- Ting, D. T., Lipson, D., Paul, S., Brannigan, B. W., Akhavanfard, S., Coffman, E. J., Contino, G., Deshpande, V., Iafrate, A. J., Letovsky, S., Rivera, M. N., Bardeesy, N., Maheswaran, S., & Haber, D. A. (2011). Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science*, 331(6017), 593–596. <https://doi.org/10.1126/science.1200801>
- Tomas Lindahl. (1993). *Instability and decay of the primary structure of DNA*. <https://doi.org/10.1038/362709a0>
- Trenz, K., Smith, E., Smith, S., & Costanzo, V. (2006). ATM and ATR promote Mre11 dependent restart of collapsed replication forks and prevent accumulation of DNA breaks. *EMBO Journal*, 25(8), 1764–1774. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601045>
- Vaitiekunaite, R., Butkiewicz, D., Krześniak, M., Przybyłek, M., Gryc, A., Śnietura, M., Benedyk, M., Harris, C. C., & Rusin, M. (2007). Expression and localization of Werner syndrome protein is modulated by SIRT1 and PML. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(11–12), 650–661. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.09.004>
- Vancurova, M., Hanzlikova, H., Knoblochova, L., Kosla, J., Majera, D., Mistrik, M., Burdova, K., Hodny, Z., & Bartek, J. (2019). PML nuclear bodies are recruited to persistent DNA damage lesions in an RNF168-53BP1 dependent manner and contribute to DNA repair. *DNA Repair*, 78, 114–127. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.04.001>
- Vens, C., Hofland, I., & Begg, A. C. (2007). Involvement of DNA polymerase beta in repair of ionizing radiation damage as measured by in vitro plasmid assays. *Radiation Research*, 168(3), 281–291. <https://doi.org/10.1667/RR0750.1>
- Vernier, M., Bourdeau, V., Gaumont-Leclerc, M. F., Moiseeva, O., Bégin, V., Saad, F., Mes-Masson, A. M., & Ferbeyre, G. (2011). Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes and Development*, 25(1), 41–50. <https://doi.org/10.1101/gad.1975111>
- Vodenicharov, M. D., Sallmann, F. R., Satoh, M. S., & Poirier, G. G. (2000). Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase 1. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 28).
- Voisset, E., Moravcsik, E., Stratford, E. W., Jaye, A., Palgrave, C. J., Hills, R. K., Salomoni, P., Kogan, S. C., Solomon, E., & Grimwade, D. (2018). *Pml nuclear body disruption cooperates in APL pathogenesis*

and impairs DNA damage repair pathways in mice. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/131/6/636/1466576/blood794784.pdf>

- von Bernuth, H., Ravindran, E., Du, H., Fröhler, S., Strehl, K., Krämer, N., Issa-Jahns, L., Amulic, B., Ninnemann, O., Xiao, M. S., Eirich, K., Kölsch, U., Hauptmann, K., John, R., Schindler, D., Wahn, V., Chen, W., & Kaindl, A. M. (2014). Combined immunodeficiency develops with age in Immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome 2 (ICF2). *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *9*, 116. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0116-6>
- Wang, Z.-G., Rivi, R., Delva, L., Kö, A., Scheinberg, D. A., Gambacorti-Passerini, C., Gabilove, J. L., Warrell, R. P., & Pandolfi, P. P. (n.d.). *Arsenic Trioxide and Melarsoprol Induce Programmed Cell Death in Myeloid Leukemia Cell Lines and Function in a PML and PML-RAR Independent Manner.*
- Weinblum, D., Breter, H. J., Zahn, R. K., & Berger, J. (1974). ALTERATION OF DNA REASSOCIATION KINETICS DUE TO BASE MISMATCH CAUSED BY THYMINE DIMERISATION. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 374).
- Zeng, S., Xiang, T., Pandita, T. K., Gonzalez-Suarez, I., Gonzalo, S., Harris, C. C., & Yang, Q. (2009). Telomere recombination requires the MUS81 endonuclease. *Nature Cell Biology*, *11*(5), 616–623. <https://doi.org/10.1038/ncb1867>
- Zhang, J. M., Genois, M. M., Ouyang, J., Lan, L., & Zou, L. (2021). Alternative lengthening of telomeres is a self-perpetuating process in ALT-associated PML bodies. *Molecular Cell*, *81*(5), 1027-1042.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.030>
- Zhang, J. M., Yadav, T., Ouyang, J., Lan, L., & Zou, L. (2019). Alternative Lengthening of Telomeres through Two Distinct Break-Induced Replication Pathways. *Cell Reports*, *26*(4), 955-968.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.102>
- Zhang, P., Chin, W., Chow, L. T. C., Chan, A. S. K., Yim, A. P. C., Leung, S.-F., Mok, T. S. K., Chang, K.-S., Johnson, P. J., & Chan, J. Y. H. (2000). LACK OF EXPRESSION FOR THE SUPPRESSOR PML IN HUMAN SMALL CELL LUNG CARCINOMA. In *J. Cancer* (Vol. 85).
- Zhong, S., Mü, S., Ronchetti, S., Freemont, P. S., Dejean, A., & Pandolfi, P. P. (n.d.). *Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation.*
- Zlotorynski, E., Rahat, A., Skaug, J., Ben-Porat, N., Ozeri, E., Hershberg, R., Levi, A., Scherer, S. W., Margalit, H., & Kerem, B. (2003). Molecular Basis for Expression of Common and Rare Fragile Sites. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(20), 7143–7151. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.20.7143-7151.2003>