

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Alena Kučerová

Úloha nádorového supresoru PML v jadérových funkcích

Role of tumour suppressor PML in nucleolar functions

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Zdeněk Hodný, CSc.

Praha 2014

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří mě podporovali a pomáhali, jak při psaní bakalářské práce, tak i při celém studiu. Největší dík patří mé rodině, příteli a kamarádům, dále mému školiteli MUDr. Zdeňkovi Hodnému, CSc. a RNDr. Soně Hubáčkové, Ph.D.

Prohlášení:

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

V Praze 4. 5. 2014

Podpis:

Abstrakt

Buněčné jádro je složitá struktura složená z jednotlivých částí, mezi důležité jaderné kompartmenty patří jadérko a jaderná tělíska PML. Jadérko je místem, kde dochází k transkripci ribozomální DNA a k tvorbě ribozomů. Skrz regulaci množství ribozomů může jadérko regulovat expresi proteinů a tím i následný buněčný růst. Jadérko je také místem, které působí jako stresový senzor. Jaderná tělíska PML hrají důležitou roli v řadě buněčných procesů – reakce na stres, virovou infekci či poškození DNA. Jaderná tělíska PML jsou tvořena celou řadou proteinů, hlavním proteinem je protein PML (Promyelotic leukemia protein). Protein PML je kódovaný genem PML, postranskripčním sestřihem vzniká několik jeho izoform. Protein PML je významným buněčným regulátorem a také nádorovým supresorem. Jadérko a protein PML spolu kooperují a mají mezi sebou funkční vztah, který ale není doposud zcela jasný. Bylo prokázáno, že po působení některých stresových faktorů mění protein PML svoji lokalizaci a přechází k jadérku či do jadérka a to zejména u primárních buněk (to souvisí pravděpodobně s tím, že v nádorových buňkách je snížená hladina PML). Vztah jadérka a proteinu PML je důležitý při odpovědi buněk na stres.

Klíčová slova: jadérko, ribozomální biosyntéza, jadérko jako stresový senzor, jaderná tělíska PML, protein PML, genotoxický stres

Abstract

The cell nucleus is a complex structure composed of different parts, the nucleolus and PML nuclear bodies are important compartments of the nucleus. In the nucleolus, transcription of ribosomal DNA and biogenesis of ribosomes take place. The nucleolus may regulate the expression of proteins and thus the subsequent cell growth through regulating the amount of ribosomes. The nucleolus is also a sensor of stress. PML nuclear bodies play an important role in many cellular process – response to stress, virus infection or DNA damage. PML nuclear bodies consist of many proteins, the major protein is PML protein (Promyelotic leukemia protein). PML protein is coded by PML gene, it is spliced postranscriptionally and it has several isoforms. PML protein is an important cellular regulator and also a tumor suppressor. The nucleolus and PML protein cooperate together and have a functional relationship, which is not entirely clear. It was shown that PML protein changes its localization after exposure to stress and it goes near the nucleolus or into the nucleolus and this happens mainly in primary cells (the reason can be that the level of PML protein downregulates in tumour cells). The relationship between the nucleolus and PML nuclear bodies is important for cell response to stress.

Keywords: nucleolus, ribosomal biosynthesis, nucleolus as a sensor of stress, PML nuclear bodies, PML protein, genotoxic stress

Seznam použitých zkratek

AKT - Protein kinase B

APL - Acute promyelocytic leukemia

ARF - Alternate reading frame of the INK4a/ARF locus

ATM - Ataxia telangiectasia mutated

ATR - Ataxia telangiectasia and Rad3 related

B23 - Protein B23

BRCA1- Breast cancer type 1 susceptibility protein

BrdU/DMA - Bromodeoxyuridine / distamycin A

CK2 - Casein kinase 2

CML - Chronic myelogenous leukemia

DAPI - 4,6-diamidino-2-phenylindole

DAXX - Death-associated protein 6

DFC - Dense fibrillar components

DMSO - Dimethylsulfoxid

DNA - Deoxyribonucleic acid

ERK - Extracellular-signal-regulated-kinase

FC - Fibrillar centers

GAS - Gamma activated site

GC - Granular component

H2AX - H2A histone family, member X

HDM2 - Human double minute 2

CHK2 - Checkpoint kinase 2

IFN - Interferon

IRF (8,9) - Interferon regulatory factor (8,9)

ISRE - Interferon-stimulated response element

JAK - Janus kinase

MDM2 - Mouse double minute 2

mRNA - Messenger ribonucleic acid

mTOR - Mammalian target of rapamycin

NBS1 - Nijmegen breakage syndrome protein 1

NLS - Nuclear localization signal

NOR - Nucleolus organizer region

p53 - Protein 53
PML - Promyelocytic leukemia protein
PNB - Pre-nucleolar bodies
pRb - Phospho retinoic acid receptor alpha
preRNA - Pre ribonucleic acid
RAR α - Retinoic acid receptor alpha
Ras - Rat sarcoma
rDNA - Ribosomal deoxyribonucleic acid
rRNA - Ribosomal ribonucleic acid
SIM - SUMO-interacting motif
siRNA - Small interfering RNA
SL1 - TAF1C - TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit C
snoRNA - Small nucleolar RNA
snoRNP - Small nucleolar ribonucleoprotein
SP100 - Speckled protein of 100 kDa
SRP - Signal recognition particle
STAT - Signal transducer and activator of transcription
SUMO - Small ubiquitin-like modifier
TIF-IA - Transcription initiation factor IA
TNF α - Tumour necrosis factor alpha
TTRAP - TRAF and TNF receptor-associated protein
UBF - Upstream binding factor
UV - Ultraviolet
WRN - Werner RecQ DNA helicase

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Jadérko	2
2.1. Struktura jadérka a její změny během života buňky	2
2.2. Jadérko jako továrna na ribozomy - transkripce rRNA a její regulace	4
2.3. Jadérko a stres	7
2.4. Úloha jadérka u nádorových, neurodegenerativních a kardiovaskulárních onemocnění a virových infekcí	11
2.5. Další funkce jadérka – částice SRP, telomeráza	13
3. Promyelocytic Leukemia Protein – PML.....	14
3.1. Struktura genu a proteinu PML a jeho lokalizace	14
3.2. Regulace transkripce PML	17
3.3. Postranlační modifikace PML	17
3.4. Funkce proteinu PML.....	19
3.5. PML protein a nemoci (virové infekce a nádorová onemocnění).....	22
4. Protein PML a jadérko	25
5. Závěr.....	32
6. Bibliografie	34

1. Úvod

Buněčné jádro je organela řídící fungování eukaryotické buňky, jelikož je místem, kde je uložena dědičná informace. Jedná se o složitou strukturu složenou z jednotlivých částí, které navzájem komunikují a společnou souhrou zajišťují správný chod buňky. Mezi jaderné kompartmenty patří vnější a vnitřní jaderná membrána, jaderné póry, chromozómy, jadérko, Cajalova tělíska, jaderná tělíska PML a další.

Jedním z nejvýznamnějších jaderných kompartmentů je jadérko. Jadérko je místem, kde dochází k transkripci ribozomální DNA a k následné tvorbě ribozomů. Ribozomy jsou dále transportovány do cytoplasmy, kde slouží jako továrny na výrobu proteinů. Jedná se o organely zodpovědné za překládání mRNA do sekvence aminokyselin. Ribozomy jsou tvořeny převážně ribosomální RNA vznikající v jadérku a ribozomálními proteiny tvořenými v cytoplasmě. Skutečnost, že vznik ribozomů je soustředěn do jadérka, z něj činí důležité místo, které je klíčové při regulaci exprese proteinů a následného buněčného růstu. Při nádorových onemocněních dochází k masivní proliferaci buněk, ke které je zapotřebí velké množství proteinů a tudíž i ribozomů. Kromě toho je jadérko také místem, které působí jako stresový senzor. Tyto vlastnosti činí z jadérka potenciální místo zásahu léčiv bojujících s nádorovými onemocněními.

Dalším důležitým jaderným kompartmentem jsou jaderná tělíska PML. Jaderná tělíska PML jsou jaderné struktury hrající důležitou roli v celé řadě buněčných procesů – jako je například reakce na stres, virovou infekci či poškození DNA. Jaderná tělíska PML jsou tvořena celou řadou proteinů, jejichž obsah se mění během různých buněčných procesů včetně buněčného cyklu. Základním stavebním kamenem je protein PML (Promyelotic leukemia protein). Protein PML je kódovaný genem PML, postranskripčním sestřihem vzniká několik izoform proteinu PML lišících se svými vlastnostmi. Vlastnosti proteinu PML také mění jeho postranlační modifikace (např. fosforylace či sumoylace). Protein PML je významným buněčným regulátorem a také nádorovým supresorem. V celé řadě nádorů byla popsána jeho snížená exprese. Jeho role při nádorových onemocněních je cílem výzkumu celé řady vědeckých skupin a je jedním z proteinů, na které by mohla být zacílená nádorová terapie.

Ve své bakalářské práci se zaměřuji na strukturní a funkční vztah kompartmentu jadérka a proteinu PML. Specifickým cílem bakalářské práce je shrnout známé údaje o významu jadérka pro fungování eukaryotické buňky, dále se zaměřit na to, jakou roli v životě buňky hraje protein PML a popsat, jaký vliv má protein PML na jadérko a jeho funkce. Dále se

zaměřím na vztah jadérka a proteinu PML k nemocem (nádorová onemocnění, virové infekce apod.) a na možnou funkční koordinaci těchto dvou struktur při odpovědi buňky na různé druhy stresu.

2. Jadérko

Jadérko je jedna z nejvýznamnějších podstruktur jádra. Hlavní funkcí jadérka je produkce ribozomů. V poslední době se ale ukazuje, že neméně důležité jsou i funkce netýkající se tvorby ribozomů, především funkce regulační, kdy jadérko funguje jako regulační centrum při odpovědi na stres. Jadérko hraje důležitou roli také při rozvoji nejrůznějších patogenních stavů – nádorových, neurodegenerativních či virových onemocnění (1).

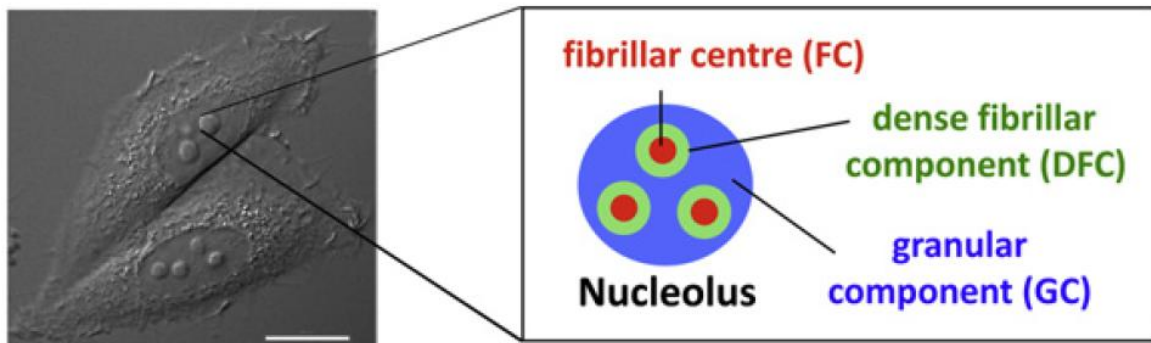
Poprvé bylo jadérko pozorováno už v 19. století nezávisle na sobě Wagnerem (1835) a Valentinem (1836). V následujícím století bylo jadérko předmětem výzkumu celé řady vědeckých skupin a postupně byla odhalována jeho struktura a funkce. Se stoupající mírou poznání došlo k pozměnění hypotézy, která chápala jadérko pouze jako továrnu na ribozomy. Nyní je všeobecně uznáváno, že jadérko je plurifunkční kompartment. Největší rozvoj výzkumu jadérka přišel s rozvojem mikroskopických technik na konci 20. století a ve 21. století (2).

2.1. Struktura jadérka a její změny během života buňky

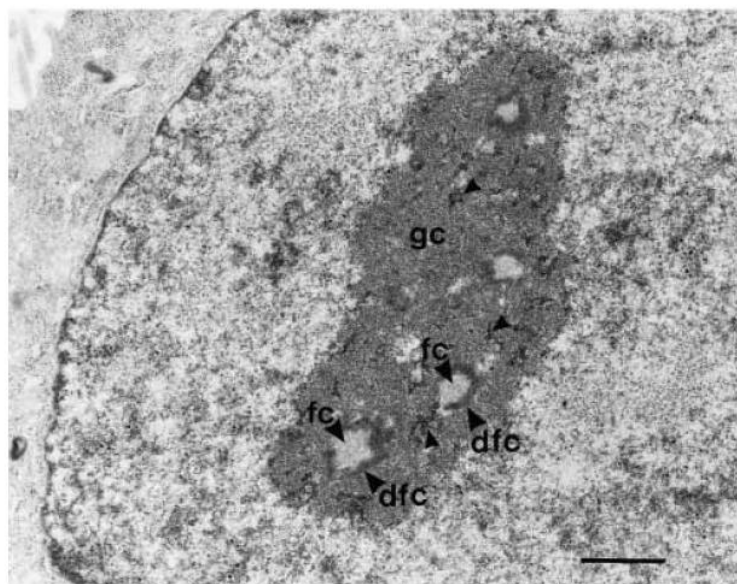
Jadérko se vytváří kolem tzv. NOR (z angl. Nucleolar organizing region - jadérkové organizační regiony). Jedná se o klastry ribozomálních genů (rDNA) – cca 400 genů, které se nacházejí na chromozomech 13, 14, 15, 21, 22. Přičemž repetitivní sekvence v ribozomálních genech jsou vysoce konzervované pro všechny tyto chromozomy a hrají podstatnou roli v sestavování jadérka (3).

Samotné jadérko je tvořeno třemi základními částmi – fibrilárním centrem (FC), denzní fibrilární komponentou (DFC) a granulární komponentou (GC) (viz Obrázek 1 a 2). Jednotlivé části se liší jednak obsahem molekul, jednak svými funkcemi při úpravách rRNA a tvorbě ribozomů. Fibrilární centrum je uloženo nejvíce ve středu (typickým proteinem je RNA polymeráza I a UBF-‘Upstream Binding Factor’), na něj navazuje denzní fibrilární komponenta (typickým proteinem je fibrilarin) a nejbliže povrchu jadérka je granulární komponenta (typický protein je B23 - nukleofosmin). Výše popsané rozložení jednotlivých kompartmentů jadérka koresponduje i s jejich funkcemi. FC je místem, kde je koncentrovaná RNA polymeráza I, nejspíše v inaktivním stavu. Rozhraní mezi FC a DFC je místo se

specifickými vlastnostmi, kde dochází k vlastní transkripci rDNA. Toto rozhraní bývá označováno jako tzv. nukleolonema. DFC je místem, kde dochází k časným úpravám rRNA za účasti snoRNP (small nucleolar ribonucleoprotein – malé jadéřkové ribonukleoproteiny). V kompartmentu GC dochází následně ke sbalení a maturaci podjednotek ribozomů (1,4,5).



Obrázek 1: Schematické znázornění jadérka u buněk HeLa. Tři základní části jadérka – fibrilární centrum, denzní fibrilární komponenta a granulární komponenta. Převzato z Boulon et al., 2010 (1).



Obrázek 2: Snímek jádra HeLa buňky se zaměřením na jadérko a jeho jednotlivé kompartmenty. Snímek je pořízen transmisí elektronovou mikroskopií. Převzato z Hozák et al., 1994 (6).

S rozvojem molekulárních a mikroskopických technik se ukazuje, že rozdělení jadérka na 3 kompartmenty není konečné a že jednotlivé části obsahují ještě dílčí struktury. Zajímavá je skutečnost, že jadérko neobsahuje RNA v celém objemu. Některá místa RNA neobsahují a

budou sloužit pravděpodobně jako místa, kde se nacházejí proteiny, které mají odlišné funkce než je syntéza ribozomů (7).

Struktura jadérka není neměnná, ale jedná se o dynamickou strukturu, která se mění například během buněčného cyklu. Důvodem je různá potřeba ribozomů během buněčného cyklu a také nutnost rozdělení buňky na dvě mitózy. Produkce ribozomů začíná na konci mitózy, roste během fáze G1 a maximální je ve fázi G2, naopak během profáze dochází opět k poklesu (8). K začátku rozpadu jadérka dochází v časně profázi a následně se stává jadérko po dobu mitózy neviditelné. Rozpad jadérka je řízen spolu s rozpadem jaderného obalu fosforylací pomocí kinázy cyklinB1-CDK1 (9). K znovuvytvoření jadérka dochází na začátku interfáze. Při procesu znovuvytvoření jadérka dochází prostřednictvím fosfatáz k inhibici kinázy cyklinB1-CDK1 (10) a k translokaci materiálu z tzv. prenukleolárních tělísek (PNBs) na NOR. PNBs jsou útvary vznikající z jadérka během mitózy, ve kterých jsou koncentrovány r-proteiny, snoRNA, neupravená 45S rRNA a další složky nezbytné pro funkci jadérka (11). Ke změně struktury jadérka a ke změně poměru základních 3 kompartmentů dochází také při stresu (více viz kapitola Jadérko a stres).

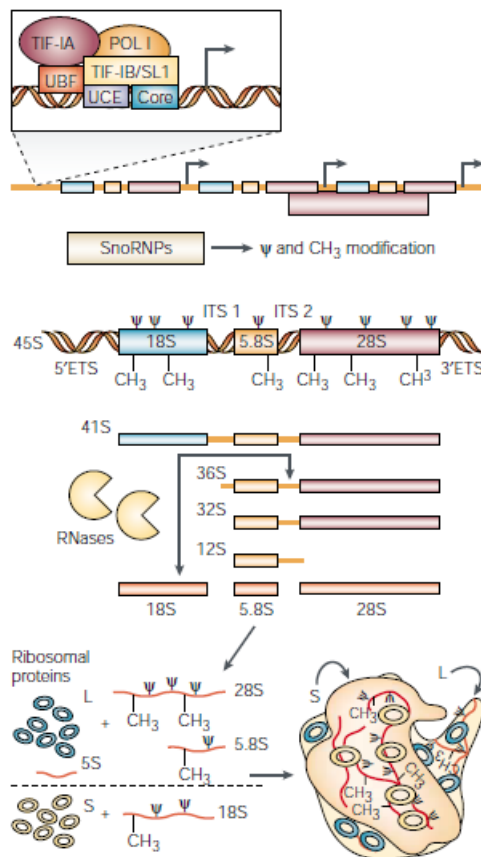
2.2. Jadérko jako továrna na ribozomy - transkripce rRNA a její regulace

Transkripce genů rDNA představuje více než 50% veškeré buněčné transkripce, procento se liší v závislosti na buněčném typu a stavu buňky. Transkripce genů rDNA probíhá v jadérku a provádí ji RNA polymeráza I (viz Obrázek 3). RNA polymeráza I přepisuje geny pro 18S, 5,8S a 28S rRNA, ty jsou uspořádány v jedné polycistronní jednotce jako 47S rRNA. Tyto polycistronní jednotky se nacházejí v genomu ve stovkách kopií. Prekurzor 47S rRNA je kotranskripčně a postranskripčně štěpený na 18S, 5,8S a 28S rRNA. Poslední rRNA, 5S rRNA, je transkribována pomocí RNA polymerázy III v nukleoplasmě a následně je transportována do jadérka. Z transkribovaných rRNA jsou sestavovány preribozomální komplexy – z 5,8S, 5S a 28S rRNA vzniká budoucí velká podjednotka ribozomů (60S) a 18S rRNA dává vzniknout malé podjednotce ribozomů (40S). Preribozomální komplexy jsou dále asociované s ribozomálními proteiny (12).

Před štěpením prekurzoru 47S dochází ještě k postranskripčním (kotranskripčním) modifikacím rRNA. Mezi nejdůležitější modifikace patří 2'-O-metylace ribózy a konverze uridinu na pseudouridin. Modifikace provádí více než 150 různých snoRNA (RNA dlouhé 60-150 nukleotidů). snoRNA jsou tzv. malé jadéřkové RNA, v jadérku se nacházejí v komplexu s proteiny ve formě snoRNP. snoRNA můžeme rozdělit do dvou skupin podle toho, zda rozlišují doménu C/D anebo H/ACA na rRNA. snoRNA obsahují podle typu skupiny, do

kteří patří, buď konzervovanou antisense sekvenci k C/D doméně anebo k H/ACA doméně. Postranskripční modifikace rRNA jsou nezbytné pro správnou funkci ribozomů a zdárný průběh translace (13,14).

Transkripce rDNA se skládá ze stejných kroků jako transkripce mRNA - iniciace, elongace a terminace. Transkripce rDNA začíná navázáním komplexu transkripčních faktorů SL1 a UBF na promotor rDNA ('upstream control element' a 'core element' – viz Obrázek 3). SL1 a UBF dále interagují mezi sebou a s dalšími proteiny a vytvářejí tzv. preiniciační komplex. Pre-iniciační komplex váže RNA polymerázu I, tato interakce je zprostředkována vazbou mezi UBF a podjednotkou PAF53 polymerázy. Dalším transkripčním faktorem, který je klíčový pro zahájení transkripce, je TIF-IA. TIF-IA se váže na komplex SL1-UBF a mění pre-iniciační komplex v plně funkční iniciační komplex. TIF-IA se po zahájení transkripce uvolňuje z komplexu a váže se na další preiniciační komplex. Transkripce dále pokračuje procesem elongace, kdy jsou přidávány jednotlivé ribonukleotidy. Transkripční faktor UBF se podílí také na kontrole elongace. Transkripce je ukončena disociací RNA polymerázy I a hotového transkriptu od templátu. Transkripční terminační elementy jsou lokalizovány na 3'konci transkribovaného regionu. Při terminaci transkripce dochází ke zrušení interakce mezi RNA polymerázou I a rDNA za pomoci transkripčního faktoru PTRF (15-18).



Obrázek 3: Schéma znázorňující transkripci rDNA (včetně iniciačního komplexu na promotoru), následné modifikace rRNA pomocí snoRNP (pseudouridinylace, metylace) a štěpení polycistronní jednotky na jednotlivé rRNA (18S, 5,8S, 28S). Převzato z Ruggero, Pandolfi, 2003 (19).

Během života buňky je produkce ribozomů dynamicky regulována. Hlavním mechanismem regulace počtu ribozomů je kontrola produkce rRNA. Produkce ribozomů (resp. transkripce rRNA) odráží reakci buňky na okolní vlivy a na signály zevnitř buňky. Buňky ve stresu snižují produkci ribozomů, naopak nádorové buňky tvoří více ribozomů než buňky v normálním stavu. Množství rRNA je regulováno na úrovni transkripce rDNA. Regulace může probíhat dvěma základními mechanismy - buď dochází ke zvýšení (snížení) počtu aktivních genů anebo ke zvýšení (snížení) účinnosti iniciace transkripce (20).

Regulace transkripce rDNA probíhá během celé transkripce (iniciace, elongace, terminace), ale i na úrovni remodelace chromatinu. Jedná se o výsledek souhry celé řady signálních kaskád. K nejdůležitějším místům regulace patří iniciace transkripce a změny na úrovni transkripčních faktorů (postranlační modifikace, změny jejich hladiny). Jak bylo uvedeno, mezi nejdůležitější transkripční faktory patří UBF, SL1 (TIF-IB) a TIF-IA.

Transkripce rDNA je pozitivně regulována fosforylací transkripčního faktoru UBF. Na fosforylaci se mohou podílet různé kinázy, např. CKII, Cdk2 či ERK1/2. Je známo, že v nádorových buňkách bývají právě tyto kinázy konstitutivně aktivní, naopak v buňkách nedělicích je fosforylace UBF snížena (21).

Aktivita transkripčního faktoru SL1 je kontrolována pomocí acetylace, kdy acetylace zvyšuje schopnost vázat SL1 vázat se k promotoru a tím zahájit iniciaci transkripce (22).

Činnost TIF-IA je regulována hlavně pomocí signalizační dráhy mTOR/S6K1. Kináza mTOR fosforyluje TIF-IA na serinu 144, čímž ho aktivuje pro iniciaci transkripce rDNA. Inhibice rapamycinem (inhibitor kinázy mTOR) vyvolává u TIF-IA změny jeho postranlačních modifikací – dochází ke snížení fosforylace na serinu 144 (aktivační fosforylace) a naopak zvýšení fosforylace na serinu 199 (inhibiční fosforylace). Kromě změny v postranlačních modifikacích dochází také ke změně lokalizace TIF-IA, část TIF-IA se stává cytoplasmickou a zabraňuje tak její funkci jako transkripčního faktoru (23). Kromě regulace signalizační dráhou mTOR/S6K1 je TIF-IA také regulováno pomocí fosforylace jinými kinázami, např. ERK a RSK (18).

Transkripce rRNA je velice složitý, nicméně klíčový proces, jehož pochopení je nezbytné pro pochopení tvorby ribozomů jakožto továren pro translaci proteinů. Výše popsané regulace byly příkladem hlavních regulačních drah, nikoliv však vyčerpávající souhrn. Dodnes není přesně známo, pod jakou taktovkou signálních drah jadérko přesně funguje a jaký je přesný princip transkripce rRNA. Odpovědi na tyto otázky jsou v současné době intenzivně zkoumané. Plné pochopení procesu tvorby ribozomů může mít velký význam i pro pochopení celé řady onemocnění.

2.3. Jadérko a stres

Na buňky během života organismů působí nejrůznější stresové vlivy. Stres působící na buňku vyvolává nejrůznější změny na všech úrovních buňky. Dochází ke změnám metabolismu, ke změnám organizace chromatinu, tvorbě jaderných tělísek různých druhů, k poškození DNA (např. tvorba jednovláknových a dvojitých zlomů), změně v produkci proteinů a v jejich degradaci, apod. K důležitým změnám dochází také v jadérku – dochází ke změně jeho struktury, k snížení transkripce rRNA a produkce ribozomů a také k sekvestraci některých nukleoplasmických proteinů do jadérka.

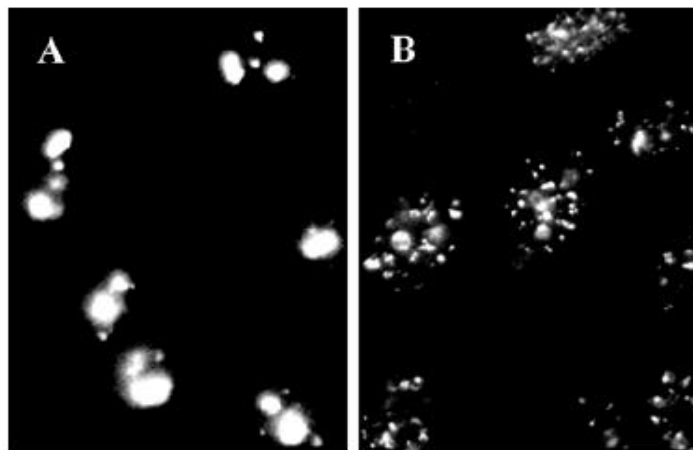
Stres působící na buňku může být původu endogenního či exogenního. Důležitým typem stresu je stres genotoxický, který způsobuje poškození DNA. Jako genotoxický stres působí např. iradiace ionizujícím či UV zářením nebo podání látek způsobujících zlomy DNA (např.

kamptothecin). Dalším důležitým stresem je inhibice polymeráz RNA (RNA polymerázy I a II). Inhibici polymeráz RNA způsobuje například aktinomycin D nebo alfa-amanitin. Jako stres může působit i změna podmínek kultivace in vitro – změna teploty, přísunu živin, osmotického tlaku či hladiny kyslíku. Významný je také onkogenní stres a stres způsobený virovou infekcí (viz dále kapitola Jadérko a nemoci).

Všechny výše popsané stresy vedou k dramatickým změnám struktury a složení jadérka, nicméně se liší v závislosti na typu stresu a poškození (24-26).

Tvorba ribozomálních podjednotek je energeticky náročná a snížení jejich tvorby za stresu může být cesta, jak udržet energetickou homeostázi. Snížení produkce ribozomálních podjednotek může být na úrovni snížení transkripce RNA polymerázy I anebo inhibicí úprav rRNA. Klíčovým regulátorem ribozomální syntézy po působení stresu je kináza mTOR, která ovlivňuje aktivitu a lokalizaci důležitých transkripčních faktorů – TIF-1A, SL1 či UBF a také kontroluje translaci ribozomálních proteinů (23).

Po poškození DNA a také při inhibici transkripce (např. pomocí aktinomycinu D) dochází k segregaci jadérka (viz Obrázek 4). Při segregaci dochází k oddělení kompartmentů jadérka FC a GC a k tvorbě tzv. jadérkových čepiček ('nucleolar caps'). V závislosti na typu poškození DNA vznikají dynamickým procesem různé jadérkové čepičky, které obsahují nejružnější jaderné a jadérkové proteiny a také rRNA a malé jadérkové RNA (25,27).



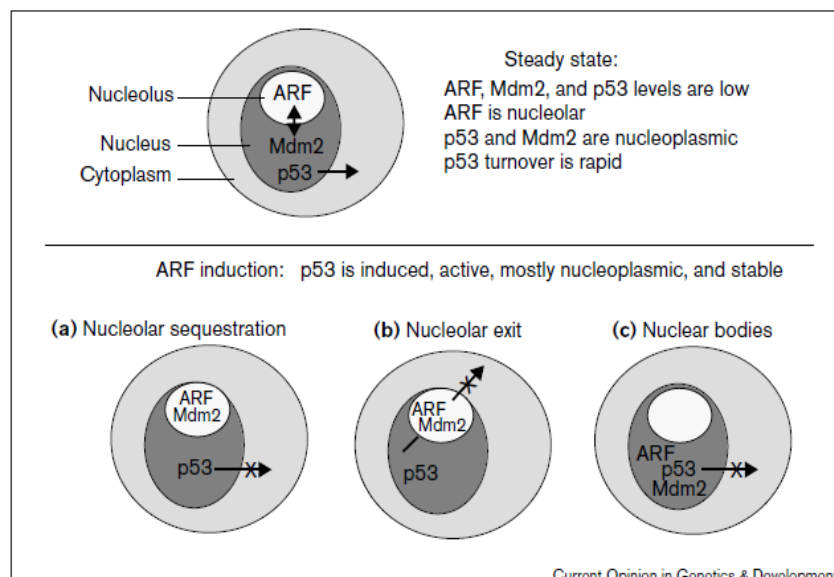
Obrázek 4: Imunofluorescenční značení fibrilarinu v buňkách HEp-2. Fibrilarin je protein typický pro jadérko, konkrétně pro komponentu DFC. Na obrázku A jsou buňky normální, na obrázku B jsou buňky po aplikaci 0,05 mg/L aktinomycinu D (látky způsobující zablokování transkripce rDNA) na 4 hodiny. Patrná je segregace jadérka po působení aktinomycinu D (stresového stimulu). Převzato z Chen et al., 2004 (28).

Pojítko mezi stresem, který na buňku působí, a mezi jadérkem, které funguje jako druh senzoru, je protein p53 a vazba mezi stavem jadérka, produkcí ribozomů a kontrolou

buněčného cyklu. Protein p53 je známý nádorový supresor, jehož hladina je u nádorových onemocnění často snižena anebo dochází k jeho mutaci. Charakteristickým znakem proteinu p53 je také fakt, že jeho funkce je regulována mnoha postranslačními modifikacemi, které se mění právě s působícím stresem (např. acetylace, fosforylace) (24).

Regulace p53 může probíhat na úrovni stabilizace proteinu tím, že dojde k zrušení interakce p53 s MDM2. MDM2 působí jako ubiquitinligáza, která navádí p53 k degradaci proteazomem a udržuje jeho hladinu v buňkách bez poškození. Po poškození DNA či jiném stresu je tato interakce zrušena (29).

K zrušení interakce může dojít například tím, že se na MDM2 váže protein p14ARF a zabraňuje ubiquitylaci a degradaci p53 (viz Obrázek 5). Protein p14ARF je nádorový supresorový protein nacházející se primárně v jadérku. Není ovšem zcela jasné, zda pro vazbu p14ARF a MDM2 je nutné prostředí jadérka anebo k ní může docházet i v nukleoplasmě za vytvoření jaderných tělísek ARF-MDM2-p53 (30). Nicméně jedna z hypotéz je, že dochází k přímé sekvestraci MDM2 do jadérka pomocí ARF a tím k zamezení interakce MDM2 a p53 (31); druhá hypotéza týkající se jadérka říká, že ARF částečně blokuje jadérkový (a jaderný) export a že nedochází k uvolnění MDM2 do nukleoplazmy resp. cytoplazmy (32). Ať už platí kterákoliv z hypotéz anebo jejich kombinace, nejdůležitější zůstává fakt, že p14ARF je nádorový supresorový protein, který bývá často mutovaný či zcela umlčený v nádorových buňkách.



Obrázek 5: Model lokalizace a funkce ARF proteinu v buňce. V nestresované buňce se nachází ARF v jadérku a p53 a MDM2 v nukleoplasmě. Ve stresovaných buňkách dochází ke změně lokalizace těchto proteinů. Znázorněné jsou tři hypotézy, jak může docházet k jejich změnám. Výsledkem všech je stabilizace p53 (zabránění jeho degradace pomocí MDM2). Převzato z Sherr et al., 2000 (33).

Podobně může při stresu docházet k interakci MDM2 s ribozomálními proteiny (např. RPL11). Ty jsou při působení stresu specificky modifikovány (např. deneddylace) a následně uvolňovány do nukleoplasmu, což vede ke stabilizaci p53 (34).

Dále pod vlivem stresu dochází také k zvýšení vlastní translace ribozomálních proteinů, např. RPL11 nebo RPL26. Ribozomální proteiny mohou kromě stabilizace p53 také zvyšovat translaci p53 mRNA vazbou na jeho 5' netranslatovaný konec (26,35).

Jadérko při odpovědi na stres (ale i za standardních podmínek) komunikuje také s dalšími jadernými tělisky a dochází k výměně proteinů a RNA mezi těmito kompartmenty. Nejlépe popsána je komunikace a spolupráce jadérka a Cajalových tělísek¹. Stejně jako pro jadérko i pro Cajalova tělíska platí, že mění svoji strukturu a počet v závislosti na typu stresu. Např. při inhibici transkripce pomocí aktinomycinu D dochází k přesunu coilinu z Cajalových tělísek na povrch jadérka (37).

Mezi Cajalovými tělisky a jadérkem může docházet k výměně coilinu samotného, což vede při transportu ve směru do jadérka k zániku Cajalových tělísek. Tento děj je spojen s hypometylací coilinu. Coilin je za normálních podmínek metylován a je přítomný v Cajalových tělískách, za určitých okolností může dojít k snížení aktivity metyltransferáz a tím k přesměrování toku coilinu do jadérka (38).

Na otázku, proč se coilin po působení stresu přesouvá do jadérka a jakou zde má funkci, není stále známá přesná odpověď. Možným důvodem je schopnost coilinu interagovat s RNA polymerázou I (konkrétně s RPA-194), což vede ke snížení schopnosti RNA polymerázy I vázat se na rDNA a zahájit transkripci (39).

Hlavní funkce spojující Cajalova tělíska a jadérko je maturace malých jaderných a jadérkových RNA (snoRNP, snRNP). Malé jaderné a jadérkové RNA hrají klíčovou roli při úpravách preRNA (snoRNP modifikující rRNA a snRNP se podílejí na sestřihu mRNA) a tudíž regulují celkovou funkci buněk (produkce ribozomů, mRNA připravená k translaci, atd.) (36). Mezi Cajalovými tělisky a jadérkem dochází také k výměně proteinů účastnících se maturace snoRNP a snRNP a regulace transkripce rDNA, např. Nopp140 (40).

Interakce coilinu a jadérka, stejně tak jako interakce MDM2 a ARF jsou příklady toho, že jadérko hraje klíčovou roli při odpovědi buňky na stres a působí jako jakýsi senzor. Jadérko

¹ Cajalova tělíska jsou útvary nacházející se v nukleoplasmě buněk, jejich hlavní strukturální protein je coilin. Hlavní funkcí Cajalových tělísek je maturace snRNP a snoRNP, což jsou komplexy RNA a proteinů, které dále zajišťují úpravy RNA (sestřih mRNA, modifikace rRNA). Co se týče lokalizace, tak se Cajalova tělíska nacházejí hlavně v metabolicky a transkripčně aktivních buňkách. 36. Ogg, S. C., and Lamond, A. I. (2002) Cajal bodies and coilin--moving towards function. *J Cell Biol* **159**, 17-21.

na působení stresu reaguje na více úrovních, a jelikož se jedná o složité mechanismy, dodnes nejsou zcela popsány. Základní odpovědí není totiž pouze snížení tvorby ribozomů, ale aktivace či inhibice celé řady signálních kaskád ovlivňujících život buňky.

2.4. Úloha jadérka u nádorových, neurodegenerativních a kardiovaskulárních onemocnění a virových infekcí

Jadérko má klíčové postavení v buňce, a když dojde k jeho poškození (viz kapitola Jadérko a stres), může to vést ke změnám na úrovni celého organismu. V současné době se začíná výzkum nemocí obracet právě na jadérko a hledání souvislostí mezi jadérkem a nemocemi, protože změny na úrovni jadérka můžeme vidět u celé řady nemocí, ať už jako příčinu či následek poškození buněk. V budoucnosti by se funkce jadérka mohly stát cílem nových léčebných postupů a účinných látek.

V současné době je nejvíce zkoumané jadérko ve vztahu k nádorovým onemocněním. Dlouhou dobu byl právě tento vztah opomíjený, i přes to, že zvětšené jadérko u nádorových buněk bylo pozorováno už téměř před stoletím. V poslední době bylo popsáno, že celá řada nádorových supresorů a protoonkogenů má přímý vliv na maturaci ribozomů a ovlivňuje také transkripční faktory účastníci se transkripce rDNA (41). V nádorech jsou často zvýšené kinázy jako např. kaseinkináza II nebo kináza ERK a ty fosforylují transkripční faktory, které následně mění své vlastnosti (viz kapitola Jadérko jako továrna na ribozomy - rRNA transkripce a její regulace) a mohou odstartovat proces kancerogeneze. Otázkou ale zůstává, zda se jedná o přímý či nepřímý efekt. Studie ukazují, že pravděpodobně platí obě hypotézy. Přímý efekt v procesu změny normální buňky v buňku nádorově transformovanou má například fosforylace UBF, jehož zvýšená aktivita (a zároveň fosforylace) byla pozorována u celé řady nádorů (42) (21).

Kromě p53 se regulace jadérkových funkcí účastní další nádorový supresor - retinoblastomový protein (pRb). Fosforylace proteinu pRb vede ke zpomalení transkripce rDNA skrz zabránění interakce UBF s komplexem SL1 a zabránění nasednutí RNA polymerázy I na promotor rDNA. Je známé, že právě hladina proteinu pRb je často snížena u nádorových onemocnění anebo dochází k jeho mutacím. Jedním z důsledků je téměř neomezená tvorba ribozomů (43). Důležitou roli v regulaci jadérkových funkcí hrají také ribozomální proteiny (cca 70 proteinů se podílí na tvorbě ribozomů). Vztah jadérka a nádorově transformovaných buněk je velice složitý a jedná se o souhru celé řady signálních kaskád, o souhru mezi buněčným cyklem a tvorbou ribozomů. Cílem současných výzkumů je pochopit tento složitý vztah a do budoucna může být právě na jadérko zaměřená nádorová

terapie. Už nyní se jako chemoterapeutikum zkouší v klinických testech specifické inhibitory RNA polymerázy I (CX-3543, CX-5461). Jejich výhodou oproti ozařování či klasické chemoterapii by měla být menší genotoxicita pro zdravé buňky (44,45).

Změny struktury jadérka jsou pozorovány také u kardiovaskulárních onemocnění. Buď dochází k zvětšení jadérka anebo naopak k jeho zmenšení v závislosti na typu onemocnění. Ke zvětšování jadérka dochází při srdeční hypertrofii a právě zvětšená jadérka mohou být časným markerem patologických změn u srdeční svaloviny. Při hypertrofii dochází také ke změnám struktury jadérka, zvyšuje se zastoupení fibrilárního centra a denzní fibrilární komponenty, naopak ubývá granulární komponenty. Dále je patrná zvýšená ribozomální aktivita (a zvýšená aktivita NOR). Naopak při ischemii a selhání srdce dochází k snížení syntézy rRNA. Výše zmíněné změny jsou pravděpodobně pod kontrolou jadérkových proteinů (např. nukleolin, nukleofosmin), ale není známo do jaké míry (46,47).

Dalším onemocněním, jehož rozvoj souvisí se změnami v jadérku, jsou neurodegenerativní onemocnění. Neurodegenerativní onemocnění jsou onemocnění nervového systému, pro které je charakteristický úbytek neuronů v centrálním či periferním nervstvu. Mezi nejrozšířenější a nejstudovanější neurodegenerativní onemocnění patří Alzheimerova a Parkinsonova nemoc. V rozvoji neurodegenerativních onemocnění hrají velkou roli kromě genetických faktorů i faktory vnější. Z toho vyplývá, že důležitým faktorem je také věk. S věkem přibývá stresových impulzů působících na buňku a to může vést k celé řadě změn, včetně změn v jadérku (48). U celé řady neurodegenerativních onemocnění byla pozorována snížená hladina syntézy rRNA a segregace jadérka. Jadérkové proteiny regulující syntézu rRNA a tvorbu ribozomů jsou zřejmě zahrnuté v patofyziologických mechanismech těchto onemocnění – např. protein nukleofosmin, který se běžně nachází v jadérku, je při probíhajícím neurodegenerativním onemocnění u neuronů translokován do nukleoplazmy (49). I u neurodegenerativních onemocnění je narušení jadérkových funkcí spojené se signální dráhou p53 a mTOR (viz kapitola Jadérko a stres). Jadérkový stres může na buňky působit dvojnásobně – při akutním stresu působí neuroprotektivně tím, že indukuje autofágii a pomáhá tak odstranit stresem poškozené buňky, naopak při chronickém stresu je jeho vliv negativní a vede k pomalému rozvoji buněčné smrti u neuronálních buněk (50).

Morfologie jadérka a aktivita transkripce rRNA může být také změněna působením virových infekcí. Viry využívají různé strategie působení – např. poliovirus inhibuje aktivitu RNA polymerázy I jednak tím, že indukuje štěpení SL1 a jednak tím, že indukuje postranlační modifikace UBF, virus hepatitidy C naopak stimuluje aktivitu RNA polymerázy I (51,52).

2.5. Další funkce jadérka – částice SRP, telomeráza

Jadérko hraje důležitou roli i v dalších buněčných mechanismech. Celá řada funkcí jadérka nebyla dodnes popsána či detailně analyzována a je pravděpodobné, že v budoucnu o nich budeme vědět více. Jako příklad dvou méně známých funkcí jadérka jsem vybrala vztah jadérka a částice SRP a vztah jadérka a telomerázy (53).

Jadérko je místem, kde dochází k částečnému sbalení částice² SRP, které je následně dokončeno v cytoplasmě, kde i částice SRP funguje (55).

Jadérko hraje také roli v regulaci aktivity telomerázy (reverzní transkriptáza schopná dokončit replikaci konců lineárních chromozomů – tzv. telomery a zabránit tak zkracování konců chromozomů). Ve většině somatických buněk není telomeráza aktivní, což znamená, že buňky mají k dispozici jen omezený počet dělení (56). Telomeráza je v těchto buňkách lokalizována v jadérku a tím inaktivována. Naopak u některých nádorových buněk je telomeráza konstantně přítomná v nukleoplasmě a zajišťuje neomezené dělení buněk. Sekvestrace telomerázy do jadérka probíhá díky společnému motivu se snoRNP (tzv. doména H/ACA) (57-59).

² Částice SRP je komplex RNA a proteinů, který váže preprotein, jehož syntéza byla zahájena v cytoplasmě, ale je určen do endoplasmatického retikula. Částice SRP svoji vazbou pozastaví syntézu proteinu a protein nasměruje do endoplasmatického retikula, kde může být syntéza dokončena. 54. Saraogi, I., and Shan, S. O. (2011) Molecular mechanism of co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *Traffic* **12**, 535-542.

3. Promyelocytic Leukemia Protein – PML

Protein PML (Promyelocytic Leukemia Protein) je významný jaderný protein hrající roli v celé řadě buněčných procesů. Podílí se na regulaci buněčného růstu a jeho zástavě, virové obraně, apoptóze, buněčné senescenci či opravách poškození DNA. V nukleoplasmě se protein PML nachází hlavně ve formě jaderných tělísek PML, ve kterých je přítomna celá řada dalších proteinů a společně se podílejí na řízení řady buněčných funkcí. Tělíška PML a protein PML se obecně nachází více v buňkách méně se dělících a naopak v rychle se dělících buňkách, jako jsou například epitel (střevní či plicní), se téměř nenachází (60). Protein PML byl objevený v devadesátých letech u pacientů trpících akutní promyelocytární leukémií. U buněk pacientů s akutní promyelocytární leukémií dochází k fúzi genu PML s jaderným receptorem RARalfa, což vede k nefunkčnosti proteinu PML (61). To, že protein PML hraje důležitou roli v celé řadě buněčných procesů (včetně toho, že se jedná o nádorový supresor, viz dále) z něj činí zajímavý cíl pro výzkum a pochopení celé řady nemocí (nádorová onemocnění, virové infekce, apod.).

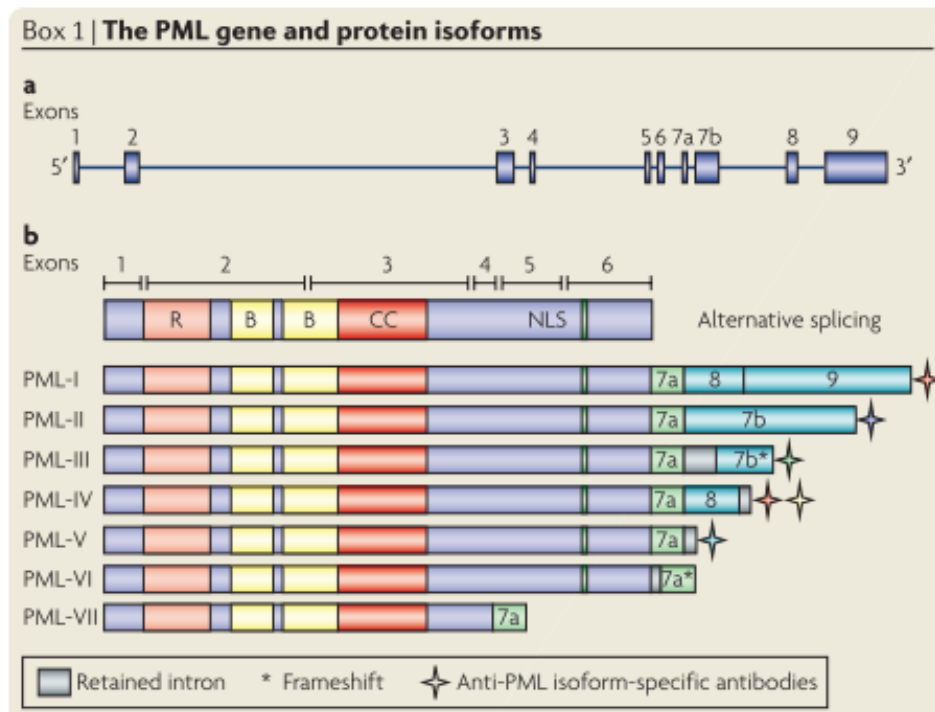
3.1. Struktura genu a proteinu PML a jeho lokalizace

Gen pro PML se nachází na chromozomu 15 (konkrétně pozice 15q22). Gen PML není konzervovaný v rámci eukaryot a nalezneme ho typicky jen u savců. Velikost genu je přes 53 kb. Sekvence genu PML obsahuje celkem 9 exonů. Alternativním sestřihem na C-konci dochází ke vzniku různých izoform proteinu PML, nejznámější jsou izoformy I až VII (viz Obrázek 6). Na rozdíl od C-konce u N-konce nedochází k alternativnímu sestřihu, což naznačuje jeho důležitost pro vlastní fungování všech izoform proteinu. Na C-konci se kromě jiného nachází jaderná lokalizační sekvence (tzv. NLS). Izoformy I až VI mají jadernou lokalizační sekvenci – nacházejí se v jádře, izoforma VII ji nemá, což ji předurčuje k lokalizaci v cytoplasmě (62). Alternativním sestřihem generované mRNA dávají vzniknout proteinu PML v rozmezí hmotnosti od 48 do 97 kDa. Velikost vlastního proteinu značně ovlivňují také postranlační modifikace a dochází tak ke změnám mobility při elektroforetickém dělení proteinů (63).

Jednotlivé izoformy se liší i funkčně (a vazebnou specifiitou) – např. izoforma IV je důležitá v indukci senescence (64) a izoforma I zajišťuje interakci proteinu PML s jadérkem (65).

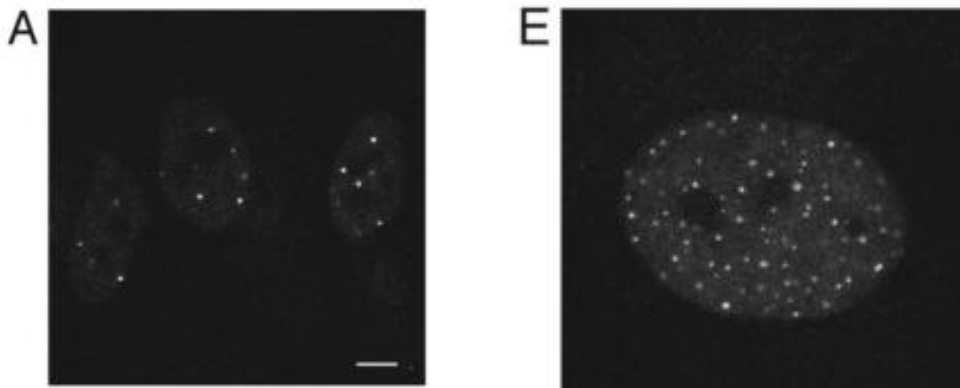
Jak již bylo zmíněno výše, všechny izoformy proteinu PML obsahují společný N-konec, konkrétně se jedná o první tři exony. Tato oblast kóduje tzv. RBCC/TRIM motiv. Tento motiv se skládá ze tří částí: motivu zinkových prstů nazývaného RING motiv, ze dvou dalších

motivů zinkových prstů nazývaných B-box a z 'coiled-coil' domény (viz Obrázek 6). Motiv RBCC/TRIM zajišťuje proteinu PML schopnost vytvářet komplexy s jinými proteiny a tvořit jaderná tělíska PML (62).

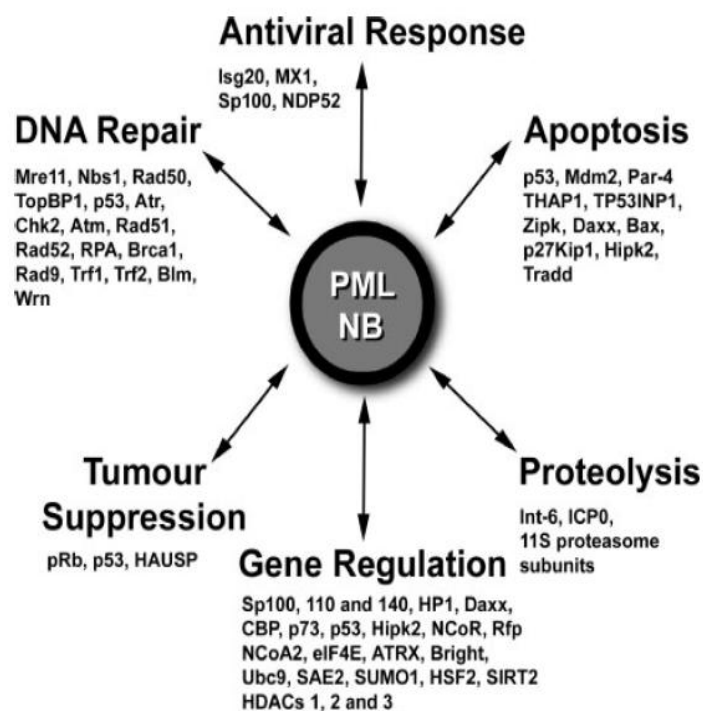


Obrázek 6: Schematické znázornění genetické sekvence PML (a), sekvence se skládá z 9 exonů a z intronů nacházejících se mezi nimi. Schematické znázornění jednotlivých izoforem proteinu PML vznikajících alternativním sestřihem (b), doména označená R je RBCC/TRIM motiv, domény označené B jsou tzv. B-boxy, doména označená CC je tzv. 'coiled-coil' doména a NLS je doména zajišťující jadernou lokalizaci proteinu (vidíme, že chybí u izofomy VII, která je v důsledku toho lokalizovaná v cytoplasmě). Převzato z Bernardi, Pandolfi, 2007 (60).

Tělíska PML jsou struktury nacházející se v nukleoplasmě, ve kterých jsou koncentrovány kromě proteinu PML i další proteiny (Daxx, Sp100, Sumo-1, p53, atd., celkem byla zjištěna interakce s více než 100 proteiny) a fungují společně jako celek (viz Obrázek 7 a 8). Jedná se o dynamické struktury proměnlivého tvaru, velikosti (velikost tělísek PML kolísá v rozmezí od 0,2 do 1,0 μm), i počtu, dynamicky dochází i ke změně obsažených proteinů. Tělíska PML se nacházejí ve většině savčích buněk, ale jejich množství se liší podle buněčného typu a podle stavu buněk (počet kolísá od 1 do 30 tělísek). V buňkách s vyšší mírou dělení, jako jsou například epitelu, se tělísek PML nachází minimum. Množství tělísek PML také ovlivňují signály přicházející zvenčí buňky zprostředkované cytokiny či hormony. Dále se množství tělísek PML mění během buněčného cyklu a při reakci na stres (DNA poškození, virová infekce, atd.) (66-68).



Obrázek 7: Tělíska PML u buněk HeLa. Na obrázku A jsou buňky kontrolní bez vystavení stresu, na obrázku E pak buňky, u nichž je indukovaná tvorba tělísek PML stresem (aplikace BrdU/DMA 10 μ M po dobu 6 dní). Převzato z Hubáčková et al., 2010 (69).



Obrázek 8: Tělíska PML a protein PML hrají důležitou roli v celé řadě procesů. Důvodem je interakce PML s velkým množstvím proteinů. Obrázek ukazuje funkce tělísek PML a proteiny, které jsou v nich zapojeny. Převzato z Dellaire, Jones, 2004 (67).

3.2. Regulace transkripce PML

Transkripce genu PML se liší v závislosti na typu tkáně a jejich stavu. Jiná je u zdravé tkáně a jiná např. při vznikajícím nádorovém onemocnění. Právě regulace transkripce může být klíčovým bodem, kde se rozhoduje o tom, zdali v tkáni budou přítomny tělíška PML a budou plnit svou roli regulátoru buněčného dělení či nikoliv.

Protein PML hraje důležitou roli při obraně proti virovým infekcím. Bylo prokázáno, že právě látky, které se produkují při virové infekci, ovlivňují transkripci PML. Jedná se konkrétně o interferony (IFN). Interferony můžeme rozdělit do dvou skupin – interferony I. typu, kam patří IFN α a IFN β a interferony II. typu, kam patří IFN γ . Bylo popsáno, že obě skupiny ovlivňují pozitivně transkripci PML a následné zvýšení počtu tělíšek PML. Konkrétně interferony aktivují proteiny STAT a tím signální dráhu JAK/STAT. Promotor genu PML má vazebné místo pro transkripční faktory z rodiny STAT, které mohou aktivovat transkripci PML, konkrétně se jedná o dvě vazebná místa v promotoru genu PML – tzv. vazebný element ISRE (IFN-Stimulated Response Element) a GAS (IFN γ -Activated Site). Na vazebný element ISRE se po působení interferonů skupiny I váže trimer proteinů STAT1, STAT2 a IRF9. Na vazebný element GAS se váže po působení interferonu gama homodimer proteinu STAT1 (70).

Protein PML hraje důležitou roli také při odpovědi na poškození DNA. S tím souvisí i fakt, že transkripce PML je pozitivně regulována transkripčním faktorem p53, který se váže do promotoru genu PML a to na několika místech. Mezi proteinem PML a proteinem p53 funguje pozitivní zpětná vazba, protože transkripci genu PML může zahájit pouze aktivní protein p53, přičemž aktivním ho dělá jeho acetylace, která probíhá na tělíškách PML (71).

Transkripce PML je regulována i dalšími proteiny (např. IRF8, β -katenin) (72,73). Nicméně regulace pomocí proteinů rodiny STAT a pomocí proteinu p53 patří k důležitým a doposud nejvíce prozkoumaným drahám.

3.3. Postranslační modifikace PML

Protein PML je známý celou řadou postranslačních modifikací, které ovlivňují jeho hladinu, vlastnosti a lokalizaci. Mezi nejznámější postranslační modifikace patří fosforylace, sumoylace, ubikvitinylace a acetylace (viz Obrázek 9). Více se zaměřím na fosforylaci a sumoylaci proteinu PML a jejich vliv na funkci PML (74).

Fosforylace je klíčový mechanismus, který reguluje množství proteinu PML a tělíšek PML.

Protein PML je fosforylovaný na serinových a tyrosinových zbytcích a to několika kinázami (75). Kináza ERK1/2 fosforyluje protein PML na místech T28, S36, S38, S40, S527 a S530.

Fosforylace T28, S36, S38, a S40 indukují sumoylaci proteinu PML, naproti tomu fosforylace S527 a S530 indukují apoptózu buněk při podání oxidu arsenitého jako léku podávaného při akutní promyelocytární leukémii (76).

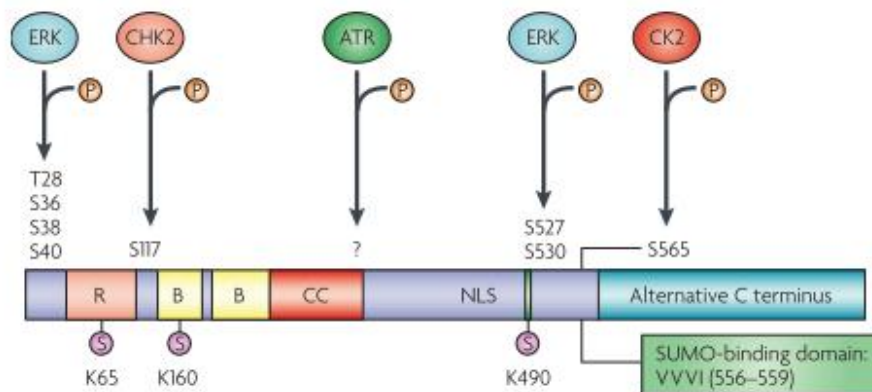
Mnoho míst na proteinu PML je fosforylováno jako odpověď na poškození DNA. Konkrétně po ozáření ionizačním zářením fosforyluje kináza Chk2 protein PML na pozici S117, přičemž bylo prokázáno, že tato fosforylace ovlivňuje apoptózu (77). Dále je po poškození DNA protein PML fosforylován kinázou ATR (přesné místo není známo), tato fosforylace navádí protein PML do jadérka (78).

Jako poslední bych zmínila fosforylaci proteinu PML pomocí kaseinkinázy 2 (CK2). Ta fosforyluje protein PML na místě S565 (ale pravděpodobně i na dalších serinech) a navádí protein PML k degradaci. To potvrzuje skutečnost, že v nádorech je právě hladina kinázy CK2 zvýšená a naopak hladina PML snížena. Léky fungující na bázi inhibice kinázy CK2 by mohly být do budoucna užitečnými prostředky v boji s nádorovými onemocněními, nyní už jsou látky na této bázi v klinických testech. Při použití těchto látek bylo prokázáno, že se navrácí nádorově-supresivní účinek proteinu PML (79).

Sumoylace je zásadní modifikací proteinu PML, protože zajišťuje schopnost proteinu PML tvořit tělíška PML. Bylo popsáno, že nukleoplazmatická frakce proteinu PML není sumoylována. Protein PML může být sumoylován proteiny SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 na třech lysinech a to konkrétně na K65, K160 a K490 (80).

Také proteiny nacházející se v tělíškách PML jsou sumoylovány. To souvisí s tím, že protein PML a řada proteinů interagujících s PML obsahují SUMO-interakční doménu a vzájemná interakce skrz tuto doménu zajistí kompaktnost a vlastní fungování tělísek PML. Bylo ukázáno, že tato doména zajišťující proteinu PML interakci se sumoylovanými proteiny (včetně sebe sama) je stejně jako vlastní sumoylace nezbytná při tvorbě tělísek PML (81).

Jak bylo zmíněno výše, množství tělísek PML se mění během buněčného cyklu. To může souviset právě se sumoylací a desumoylací proteinu PML. Při mitóze dochází k desumoylaci proteinu PML a můžeme pozorovat i rozpad tělísek PML, kdy se oddělí protein PML a další proteiny. V interfázi opět dojde k sumoylaci proteinu PML a tělíška se mohou znovu vytvořit (82).



Obrázek 9: Schematické znázornění proteinu PML a oblastí, kde dochází k jeho postranslačním modifikacím, konkrétně fosforylaci (P) a sumoylaci (S). Převzato z Bernardi, Pandolfi, 2007 (60).

3.4. Funkce proteinu PML

Protein PML, jak již bylo zmíněno výše, má celou řadu funkcí a zasahuje do celé řady buněčných procesů (postranslační modifikace proteinů, oprava poškození DNA, buněčná senescence, apoptóza, angiogeneze, odpověď na virovou infekci, apod.). Důvodem je fakt, že protein PML interaguje s velkým množstvím jiných proteinů a ovlivňuje jejich funkci. Právě tato skutečnost, že interaguje s takovým množstvím proteinů, činí výzkum jeho funkcí komplikovaným. Výzkumy na konci 20. století a na začátku 21. století se zabývaly hlavně tím, jaké jsou v tělískách PML obsažené proteiny, až v poslední době se začíná do hloubky studovat mechanismus působení proteinu PML a jeho interakčních partnerů na různé buněčné děje (60).

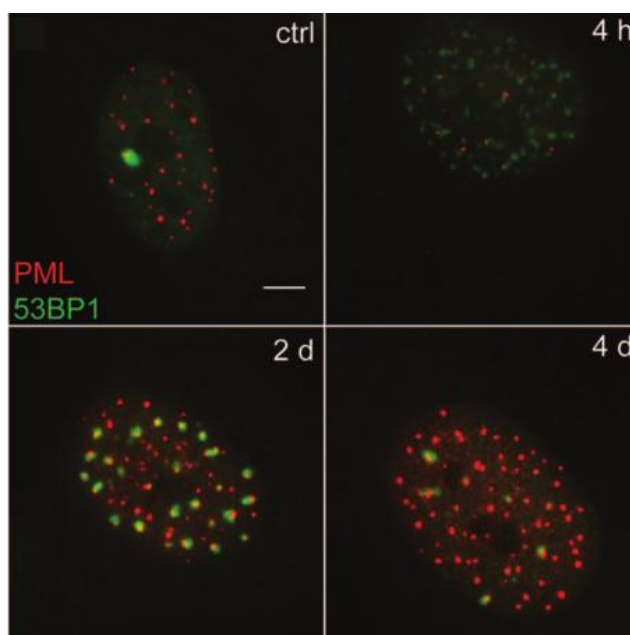
Odpověď na poškození DNA

Během života buňky dochází k poškození DNA, jednak při vlastním fungování buňky (buněčná transkripce, replikace) a jednak při působení vnějších stresů. Role proteinu PML v opravě poškození DNA je zcela nejasná.

Bylo prokázáno, že po poškození DNA způsobeném genotoxickým stresem dochází k fosforylaci proteinu PML a také k nárůstu počtu a velikosti tělísek PML a to prostřednictvím kináz ATM a ATR a také signalizace JAK/STAT (viz Obrázek 10) (69). Po vzniku poškození DNA se mění spektrum proteinů, které kolokalizují s proteinem PML. Například proteiny ATR, CHK2 či RAD51 účastníci se opravy DNA kolokalizují u nestresovaných buněk s tělísky PML, avšak během poškození DNA dochází k jejich disociaci

z tělísek a v pozdějších časových bodech dochází opět ke kolokalizaci s tělísky. Naproti tomu některé další proteiny spojené s odpovědí na poškození DNA kolokalizují s tělísky PML pouze po poškození DNA, jedná se například o kinázu ATM, WRN helikázu, fosforylovaný histon H2AX či protein BRCA1 (67).

Otázkou zůstává, zda protein PML hraje přímou roli v mechanismech oprav DNA. Jelikož ke kolokalizaci s proteiny spojenými s poškozením DNA (např. 53BP1 a fosforylovaným histonem H2AX) dochází až v pozdějších fázích a jelikož i za přítomnosti mutovaného PML (či úplně deletovaného) dochází k nenarušené časné odpovědi na poškození DNA, nebude vliv proteinu PML pravděpodobně přímý (83) či se bude uplatňovat v sekundárních funkcích navázaných na odpověď na poškození DNA, například na regulaci buněčného cyklu. Bylo popsáno, že protein PML se nachází trvale v tzv. stálých lezích, což jsou místa DNA, která signalizují jako by nebyla opravena. To potvrzuje i studie zabývající se kolokalizací proteinu PML s komplexem RAD51/RPA u primárních fibroblastů po ozáření ionizačním zářením. Pokud došlo u těchto buněk k delecí PML, neprojevovalo se to na průběhu časné fáze odpovědi na poškození DNA (84).



Obrázek 10: Tělíska PML (červeně) kolokalizují s místy poškození DNA (zeleně) po 4 h po aplikaci 0,5 μ M kamptotecinu na primární fibroblasty BJ. Výraznější kolokalizace je patrná v den 2. V den 4 je většina míst s poškozením DNA opravena, léze, které přetrvávají, kolokalizují s tělísky PML. Převzato z Hubáčková et al., 2010 (69).

Buněčná senescence

Buněčná senescence je proces, kdy dochází k setrvalé zástavě dělení buněk vyvolané nejrůznějšími stresovými podněty. Senescentní buňky mají typický fenotyp (přítomnost

tělísek PML, zvýšenou aktivitu beta-galaktosidázy či roztaženou cytoplasmu a zvětšené jádro). Jedná se o mechanismus, který pravděpodobně slouží i jako záchranná brzda před rozvojem nádorového onemocnění, nicméně setrvání senescentních buněk v tkáních může naopak podpořit rozvoj nádoru a to sekrecí specifických prozánětlivých cytokinů do okolí (85).

Hladina proteinu PML je zvýšená u všech typů senescence (chemicky indukovaná senescence, replikační senescence, onkogenem indukovaná senescence) a právě přítomnost tělísek PML ve zvýšené míře bývá jedním ze znaků senescentního fenotypu. Jako klíčová se pro senescenci ukázala být izoforma IV proteinu PML (64).

Bylo prokázáno, že při zvýšené produkci izoformy IV proteinu PML dochází jak u lidských, tak i u myších primárních fibroblastů k navození buněčné senescence. V mechanismu rozvoje senescence jsou zahrnuté významné regulátory buněčného cyklu proteiny p53 a pRb. Společnou souhrou dochází k inhibici transkripčního faktoru E2F, který se podílí na řízení genové exprese a tudíž i proliferaci buněk (86).

Naopak při snížení hladiny proteinu PML nedochází ke vzniku senescence indukované onkogenním proteinem Ras (mutace valinu 12) (87). Rozdílná situace je u senescence indukované poškozením DNA, k té dochází i po delecí proteinu PML a to jak u lidských tak myších primárních fibroblastů (84).

PML se také účastní procesu vzniku tzv. heterochromatinových domén asociovaných se senescencí ('senescence associated heterochromatin foci', SAHF). Podle původní představy se jedná o heterochromatinizaci genů regulujících buněčný cyklus (88). Tato představa ale nebyla potvrzena dalšími studiemi (89).

Apoptóza

Apoptóza je programovaná buněčná smrt. Jedná se o proces důležitý při vývoji organismu i při jeho fungování během života. Bylo prokázáno, že protein PML ovlivňuje jak p53-závislou apoptózu, tak p53-nezávislou apoptózu (90). U myši s delecí PML (PML^{-/-}) bylo ukázáno, že mají defekt v apoptóze indukované TNF α i v apoptóze indukované pomocí ligandu FAS. Protein PML hraje roli také v apoptóze indukované interferonem a ceramidem. Ve všech zmíněných případech snížení schopnosti indukovat apoptózu souviselo se sníženou aktivací kaspáz (91). Nebylo však ukázáno úplné zastavení apoptózy, to ukazuje, že protein PML funguje pravděpodobně jako její modulátor.

Protein PML má vliv na apoptózu hlavně díky své interakci s proteinem p53, jedním z důležitých induktorů apoptózy. PML interaguje s ubikvitinligázou MDM2, MDM2 je následně navedena do jadérka (více viz kapitola PML protein a jadérko) a zamezuje se tak

ubikvitinylaci a následné degradaci proteinu p53 (78). Podobnou funkci má pravděpodobně i protein DAXX, který interaguje s proteinem PML. Nicméně role proteinu Daxx v indukci apoptózy není ještě zcela objasněna, protože může působit jak pro-apoptoticky, tak anti-apoptoticky (92,93).

V apoptóze nezávislé na p53 vyvolává protein PML autofosforylaci kinázy CHK2, což vede následně k indukci apoptózy (94).

Neoangiogeneze

Neoangiogeneze je novotvorba krevního řečiště, tento proces je často spojený s růstem nádorů. Protein PML reguluje proces neoangiogeneze skrz regulaci signalizační dráhy AKT-mTOR. mTOR je hlavní regulátor neoangiogeneze, kdy reguluje pro-angiogenní faktory HIF1 α a VEGF. Bylo prokázáno, že kináza AKT může být defosforylována fosfatázou 2A, která je soustředěná právě v tělískách PML, což následně vede k snížení aktivity pro-angiogenních faktorů. Dále bylo ukázáno, že absence proteinu PML u lidských i myších nádorů vede ke zvýšené neoangiogenezi (95,96).

3.5. PML protein a nemoci (virové infekce a nádorová onemocnění)

Z výše popsaných funkcí proteinu PML vyplývá jeho velká důležitost pro správné fungování buněk a celého organismu. Porušení jeho správného fungování vede k rozvoji nejrůznějších patologických stavů. Ráda bych se více věnovala vztahu proteinu PML k virovým infekcím a také vztahu proteinu PML k nádorovým onemocněním. U nádorových onemocnění bych se chtěla hlavně zaměřit na akutní promyelocytární leukémii.

Protein PML hraje aktivní roli v protivirové obraně. Tomu nasvědčuje i fakt, že jeho exprese se zvyšuje po působení interferonů jakožto látek účastnících se protivirové obrany. Viry se snaží nejrůznějšími způsoby přizpůsobit inhibičnímu působení proteinu PML (např. virus Herpes simplex 1 kóduje protein ICP0, který působí jako E3 ubikvitinligáza a navádí PML k degradaci proteazomem). Dalším důvodem interakce je fakt, že v tělískách PML je soustředěna celá řada proteinů působících jako transkripční faktory, které viry využívají pro vlastní transkripci (97,98). Na myších PML(-/-) a derivovaných buňkách bylo ukázáno, že jejich senzitivita k virovým infekcím byla značně zvýšená (99). Naopak nadprodukce proteinu PML vede ke snížení aktivity virů a jejich schopnosti vyvolat infekci (100). Interakce proteinu PML s viry může být různá, některé viry způsobují zvýšení počtu a velikosti tělísek PML, jiné naopak jejich snížení, dále může být také ovlivněný jejich tvar anebo může dojít k úplné disperzi tělísek PML (98).

Bylo popsáno, že adenoviry interagují s tělísky PML. Interakce adenovirů s tělísky PML mění jejich tvar, ze sférických tělísek se stávají fibrilární struktury. To je způsobeno interakcí proteinu PML s virovým proteinem E4 ORF3. Dále interaguje PML s onkoproteinem E1A, tato interakce může být důvodem toho, že některé adenoviry způsobují nádorová onemocnění (101). Také lidské papilomaviry interagují s tělísky PML, konkrétně se v nich odehrává replikační cyklus viru (102). Dále bylo popsáno, že herpesviry interagují s tělísky PML a to hlavně v časných fázích infekce, kdy dochází k transkripci virové DNA. I RNA viry interagují s tělísky PML. RNA viry vyvolávají obzvláště silnou interferonovou odpověď, což vede k zvýšení počtu tělísek PML (98).

Znalost přesné interakce mezi viry a tělísky PML a proteinu PML vůbec by do budoucna mohla přinést přesnější pochopení virových infekcí a jejich průběhu. Zajímavá je interakce u virů způsobujících nádorová onemocnění, neboť protein PML je nádorový supresor.

Funkce proteinu PML jako nádorového supresoru z něj činí protein zájmu mnoha laboratoří. Jeho role v nádorových onemocněních není stále zcela objasněná, protože je vysoce závislá na typu tkáně a také na podmínkách vzniku nádoru. Regulace buněčného cyklu pomocí proteinu PML probíhá na více úrovních – jednak přes regulaci proteinu pRb, jednak regulací proteinu p53.

Na několika nádorových buněčných liniích různého původu bylo ukázáno, že nadprodukce proteinu PML působí jako růstový supresor. Nadprodukce proteinu PML u buněk HeLa inhibuje jejich růst a zastavuje je v G1-fázi (103). Stejná situace nastává i u buněk z nádoru prsu (104). Naopak u buněk PML(-/-) dochází k zrychlení jejich růstu. U myši PML(-/-) nebyla během života pozorována zvýšená tvorba spontánních nádorů, ale myši byly náchylnější k propuknutí infekcí, které výrazně zkracovaly jejich průměrnou délku života a tím i incidenci nádorů, ke kterým dochází až v pozdějších fázích. Nicméně myši s delecí PML byly citlivější k chemickým karcinogenům. Je známo, že infekce a zánět v organismu může následně vést k vyvolání nádorové transformace (105). U více než dvou třetin různých typů lidských nádorů bylo prokázáno snížení exprese proteinu PML (především u nádorů prsou, zažívacího traktu, plic, mozku atd.) (104).

Nyní bych se chtěla blíže věnovat akutní promyelocytární leukémii (APL), u které byl protein PML prvně popsán. APL je nádorové onemocnění kostní dřeně, jedná se o subtyp akutní myeloidní leukémie (tvoří asi 10% všech případů). Příčinou naprosté většiny případů (95%) tohoto onemocnění je translokace mezi genem PML (chromozom 15) a genem pro receptor kyseliny retinové RAR α ('retinoic acid receptor α ') (chromozom 17). Jedná se o reciprokou

balancovanou translokací, kdy vznikají dva fúzní geny – PML-RAR α a RAR α -PML. PML-RAR α působí následně jako hlavní onkogen. PML-RAR α blokuje vyžívání buněk kostní dřeně a vede také k neschopnosti tvořit tělíska PML, protože dochází k vytváření heterodimeru PML-RAR α /PML, který ztratil schopnost vytvářet normální tělíska PML. Tato skutečnost vede k porušení kontroly buněčného cyklu a k rozvoji nádorového onemocnění (90).

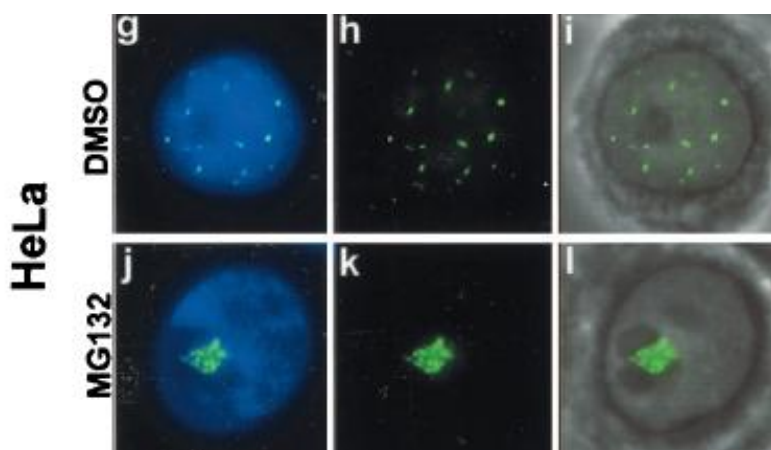
U většiny nádorových onemocnění funguje protein PML jako jejich negativní regulátor. Jiná situace je u chronické myeloidní leukémie (CML), tam naopak PML podporuje její rozvoj a je zvýšená jeho genová exprese. PML v tomto případě podporuje vyžívání skupiny hematopoetických kmenových buněk zvaných LIC ('Leukaemia Initiating Cells'), které jsou díky tomu odolné proti běžné chemoterapii a mohou způsobovat návrat onemocnění (106).

4. Protein PML a jadérko

Jadérko je místem tvorby ribozomů i místem s regulačními funkcemi, kdy působí jako senzor stresu. Jedná se o vysoce dynamickou strukturu, která se mění v závislosti na vnějších i vnitřních podmínkách buněk (2). PML protein je důležitý nádorový supresor, který hraje roli při odpovědi na stres a DNA poškození, ale i v celé řadě dalších procesů (viz kapitola Promyelocytic Leukemia Protein – PML), nejčastějším místem jeho výskytu v buňce jsou jaderná tělíska PML (60).

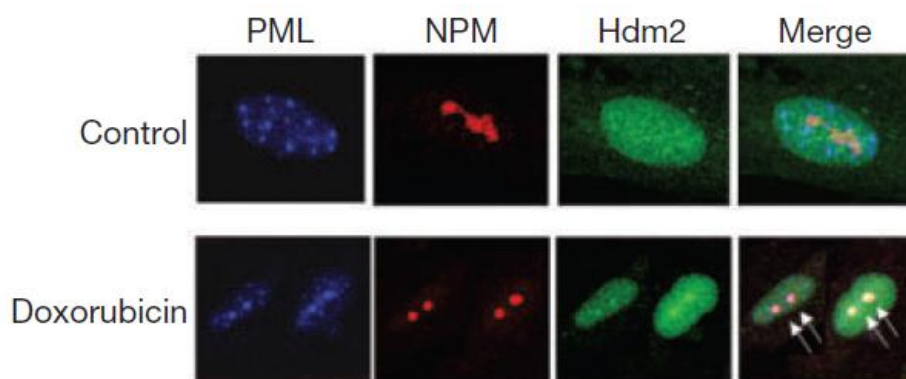
Za normálních podmínek jsou jadérko a jaderná tělíska PML dva oddělené kompartmenty. Nicméně za určitých stresových podmínek může docházet k přesunu proteinu PML k jadérku. Jakým přesným způsobem protein PML ovlivňuje jadérko a jak vzájemná interakce probíhá, není doposud přesně popsáno (107).

Prvně byla popsána interakce mezi jadérkem a proteinem PML v roce 2001 Mattssonem et al. Mattsson et al. ukazuje, že po aplikaci inhibitoru proteasomu MG132 dochází k přesunu proteinu PML do jadérka (viz Obrázek 11). Spolu s proteinem PML jsou do jadérka transportovány i proteiny s ním spojené (Sp100, SUMO-1). Tyto experimenty byly provedeny na nádorových liniích (HeLa, MCF7, IB4) (108), nicméně stejnou situaci pozoroval Condemine et al. u primárních fibroblastů MRC5, můžeme tedy usuzovat, že se jedná o obecnou skutečnost (65).



Obrázek 11: Změna lokalizace proteinu PML (zelená barva) po aplikaci inhibitoru MG132 (HeLa, 6 h, 5 μ M), který inhibuje proteasom. Jako kontroly slouží buňky po aplikaci DMSO. Modrá barva DAPI, obrázky i a l jsou zobrazeny pomocí fázového kontrastu. Převzato z Mattsson et al., 2001 (108).

V roce 2004 Bernardi et al. popsal, že existuje další mechanismus, jímž PML protein ovlivňuje stabilitu proteinu p53 (kromě fosforylace a acetylace p53) po poškození DNA, jedná se konkrétně o sekvestraci ubiquitinligázy MDM2 do jádérka. U myších fibroblastů PML (-/-) po aplikaci doxorubicinu byla pozorována snížená stabilizace proteinu p53 a jeho zvýšená ubiquitinylace, což svědčí o aktivitě MDM2, která je regulována právě proteinem PML. Po aplikaci doxorubicinu u lidských fibroblastů WI38 a u myších fibroblastů bylo ukázáno, že dochází k přesunu proteinu PML na periferii jádérka, kde kolokalizuje s MDM2 (viz Obrázek 12). Naproti tomu p53 se po aplikaci doxorubicinu v jádérku nenachází. Bernardi et al. dále ukázal, že přesun PML do jádérka je řízen kinázou ATR a také prokázal, že interakce mezi PML a MDM2 je přímá a že v přesunu PML na jádérko hraje určitou roli také ribozomální protein L11 (při snížení jeho hladiny byl přesun PML na jádérko zpomalen) (78).

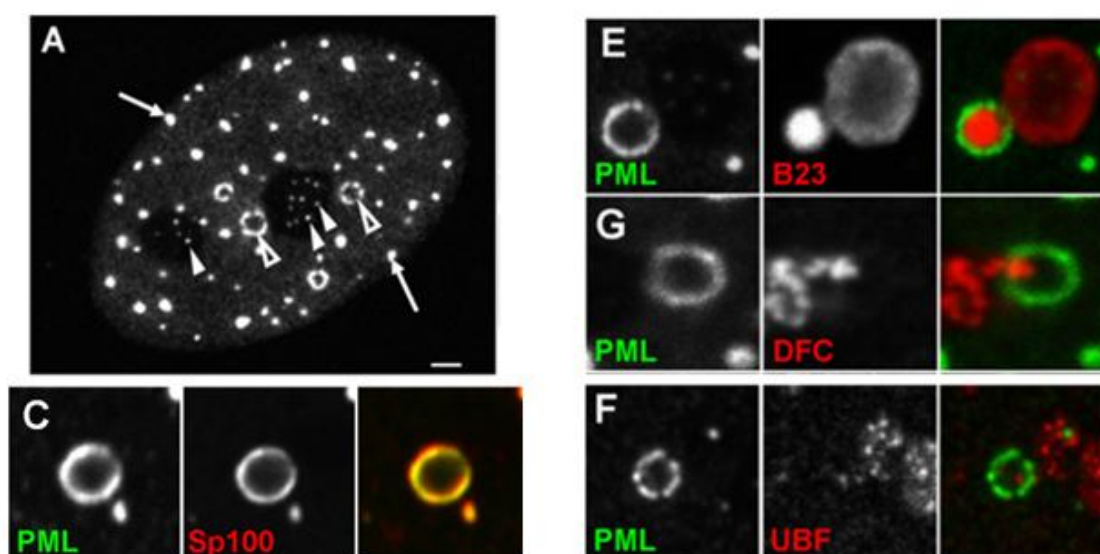


Obrázek 12: PML a MDM2 (Hdm2) kolokalizují v jádérku po poškození DNA (šipkami označená místa) v buňkách WI-38 36 hod po aplikaci doxorubicinu. Na obrázku vidíme trojitě barvení proteinů PML, nukleofosminu a Hdm2. Převzato z Bernardi et al. 2004 (78).

V roce 2007 vyšly dvě studie zabývající se interakcí mezi proteinem PML a jádérkem (Janderová et al. a Condemine et al.). Těmto studiím předcházela studie Jianga et al. z roku 1997, která se zabývá změnou struktury tělísek PML (PML vytváří struktury připomínající donuty) u senescentních buněk (IMR9) (109).

Janderová et al. se ve své práci zabývá strukturami PML derivovanými z jádérka při běžné replikační senescenci a po aplikaci aktinomycinu D a jejich rozdílným výskytem u normálních a nádorových buněk. Janderová et al. popsala, že u hMSC buněk (lidské mezenchymální kmenové buňky) a u kožních fibroblastů dochází s přibývajícím věkem ke zvyšování přesunu proteinu PML k periferii jádérka a k následné tvorbě struktur PML

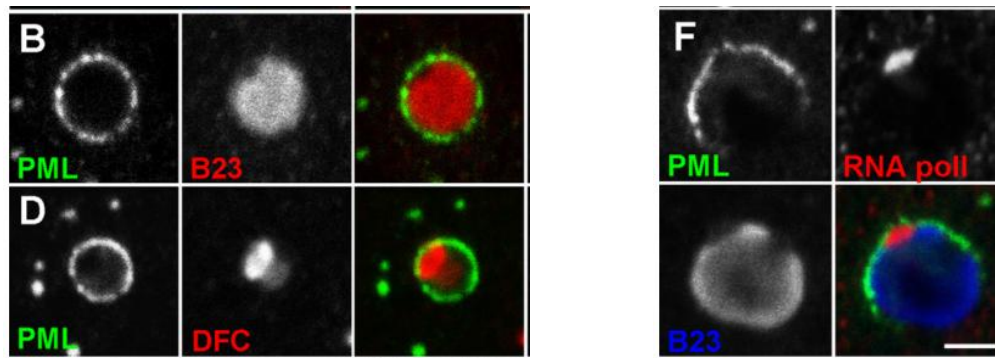
odvozených od jádérka a to i bez dalšího stresu (viz Obrázek 13). Jako stresový impulz zde působí vlastní stárnutí buněčné kultury a hromadění poškození DNA (replikační senescence). U časných populačních zdvojení (P5) byla přítomnost PML u jádérka detekována u 0,79% buněk, u středních (P12) u 15,9% buněk a u senescentních buněk (P18) u 36,48% buněk. Tyto struktury obsahují jednak proteiny charakteristické pro tělíska PML (protein Sp100, SUMO-1) a jednak typické pro jádérko (protein B23 či proteiny kompartmentu DFC), překvapivě neobsahují UBF jakožto marker fibrilárního centra a důležitý transkripční faktor pro iniciaci transkripce rDNA. To může souviset s tím, že fibrilární centrum je uloženo až v samém centru jádérka a k rozpadu dochází od jeho povrchu (107).



Obrázek 13: Protein PML - jeho výskyt v jádérku a jádérkové periferii a tvorba struktur PML s materiálem "odštěpeným" z jádérka. Jedná se o buňky hMSC pěstované za standardních podmínek (replikační senescence). Struktury na obr. A označené šipkou jsou klasická tělíska PML, struktury označené plným trojúhelníčkem jsou tělíska PML uvnitř jádérka. Struktury PML na periferii jádérka označené prázdným trojúhelníčkem jsou struktury tzv. odvozené od jádérka, ty jsou dále zobrazené na obr. C, E, F, G. Struktury PML odvozené od jádérka obsahují jádérkový materiál B23, DFC, ale neobsahují UBF, protein charakteristický pro fibrilární centrum. Převzato a upraveno z Janderova et al., 2007 (107).

Podobné struktury PML byly pozorovány při působení aktinomycinu D (v koncentracích, které specificky blokují RNA polymerázu I) na buňky hMSC (viz Obrázek 14). Protein PML se po aplikaci aktinomycinu D akumuluje okolo jádérka a následně dochází k procesu připomínající odškrcování. Vzniklé struktury obsahují jak jádérkový, tak nukleoplasmový materiál. Z jádérkového materiálu bych zmínila RNA polymerázu I (pro replikační senescenci u hMSC nebylo provedené barvení na RNA polymerázu I). Přítomnost RNA polymerázu I by

mohla souviset se zástavou buněčného dělení a přechodem buněk do senescence po působení stresu (107).



Obrázek 14: Struktury PML vzniklé na jadérku po působení aktinomycinu D (v koncentraci, která inhibuje transkripci rDNA). Struktury PML obsahují jadérový materiál – protein B23 (obr. B), DFC (obr. D) a RNA polymerázu I (obr. F). Převzato a upraveno z Janderova et al., 2007 (107).

Janderová et al. dále ukazuje, že v buněčné populaci nedochází k tvorbě jadérových struktur PML u všech buněk, ale pouze u části populace (cca 40%). Tvorba jadérových struktur PML je také závislá na buněčném typu. Tvorba těchto struktur byla pozorována u normálních nepoškozených buněk (hMSC, kožní fibroblasty), naopak u nádorových buněk tyto struktury nebyly pozorovány vůbec (HeLa, U2OS, A549) nebo jen výjimečně (H1299 u 0,2% buněk, SaOS-2 u 0,4% buněk). Přičemž protein PML je často snížený právě v nádorových buňkách. Naopak u senescentních buněk (hMSC, kožní fibroblasty), které mají zvýšenou hladinu PML, jsou jadérové struktury PML pozorovány ve vyšší míře. Dokonce Janderová et al. ukazuje, že když se u nádorových buněk (HeLa či H1299) aktivuje pRB a p53 pomocí bromodeoxyuridinu a distamycinu A a navodíme tak senescentní fenotyp, buňkám se obnoví schopnost přesunu PML z nukleoplasmu k jadérku (107).

Condemine et al. se ve své práci také zabývá formováním struktur PML odvozených od jadérka, ale v závislosti na různých typech stresu, dále se zabývá jednotlivými izoformami proteinu PML ve vztahu k těmto strukturám. Ukazuje, že k tvorbě jadérových struktur PML dochází u lidských fibroblastů MRC5 po aplikaci doxorubicinu, aktinomycinu D i po ozáření ionizačním zářením. Tvorbu těchto struktur pozoroval ve zvýšené míře také u senescentních buněk (WI-38). Dále ukazuje, že jadérové struktury PML neobsahují proteiny spojené s opravami DNA (NBS1, BRCA1), kterých by se protein PML mohl účastnit. Studie také popisuje, že k jadérku se přesouvají pouze dvě izoformy proteinu PML – PML I a PML IV, přičemž pro transport proteinu PML a dalších proteinů s ním spojených je klíčová izoforma I.

Při delecii izoformy I nedochází ani k transportu proteinů asociovaných s PML do jádérka. Transport izoformy I proteinu PML je závislý na intaktním C-konci, na kterém se nachází jádérková lokalizační sekvence (65).

V roce 2011 Liu et al. ukázal na několika buněčných liniích (MCF7, A549 a primární plicní fibroblasty), že se z jádérka po působení stresu (ionizační záření) uvolňuje protein WRN (protein fungující jako DNA helikáza důležitá při opravě poškození DNA, jeho mutace způsobuje Wernerův syndrom - syndrom předčasného stárnutí). Protein WRN vytváří kulovité struktury odvozené z jádérka, které se po působení ionizačního záření nacházejí v nukleoplasmě. Na povrch těchto struktur je lokalizován protein PML. Význam tvorby těchto struktur a interakce PML a WRN proteinu není známý. Je možné, že transport proteinu WRN z jádérka je spojen s aktivací WRN a protein PML navádí helikázu WRN k místu poškození DNA způsobené stresem (110-112).

V roce 2012 vyšly další tři studie zabývající se interakcí jádérka a proteinu PML (Audas et al., Bursac et al. a Vilotti et al.).

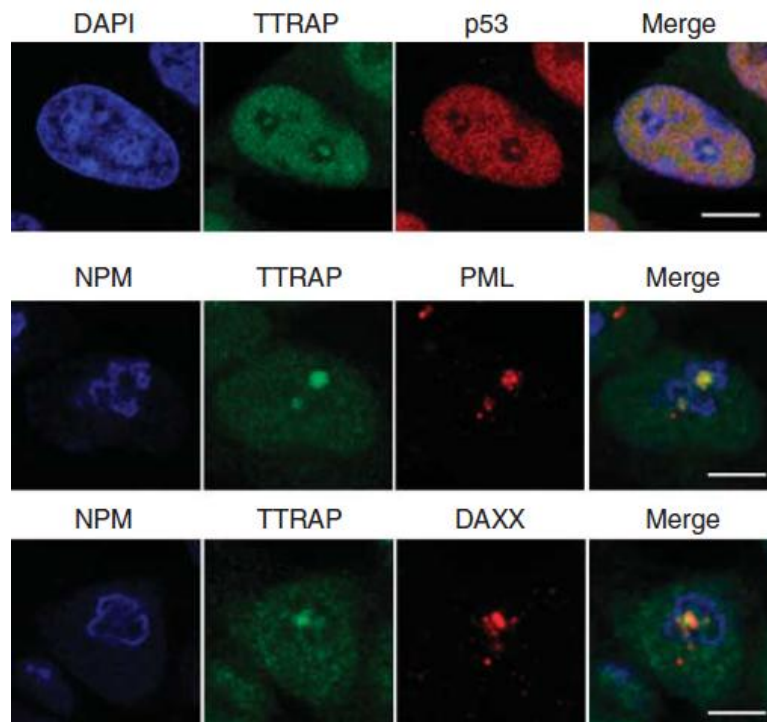
Audas et al. ve své studii popisuje způsob, jakým mohou proteiny (včetně proteinu PML) interagovat s jádérkem. Říká, že je to dáno obsahem tzv. jádérkové lokalizační sekvence ('nucleolar detention sequence'), která se váže na nekódující jádérkové RNA, a ty následně pomáhají v transportu proteinů do jádérka (113).

Bursac et al. ukazuje, že protein p53 může být aktivovaný i nezávisle na poškození DNA a to konkrétně skrz narušení biogeneze ribozomů a že určitou roli v tom hraje i protein PML (studie byla provedena s buňkami A549 a U2OS). Při ošetření buněk aktinomycinem D (v koncentraci, která specificky inhibuje RNA polymerázu I) se zvyšuje hladina ribozomálních proteinů L11 a L5, naopak produkce ostatních ribozomálních proteinů klesá. To je dáno tím, že proteiny L11 a L5 nejsou po působení aktinomycinem D degradovány proteasomem. Snížení hladiny proteinů L11 a L5 a následné působení aktinomycinu D vede k narušení aktivace proteinu p53. Důvodem je interakce proteinů L5 a L11 s ubikvitinligázou MDM2 a následný přesun tohoto komplexu z nukleoplazmy do jádérka. Součástí komplexu je také protein PML, který interaguje s MDM2 i s ribozomálními proteiny. Komplex ribozomálních proteinů L5 a L11 a proteinu PML tedy sekvstruje do jádérka ubikvitinligázu MDM2 a tím zajišťuje stabilizaci p53, přičemž p53 protein je také transportován do jádérka. Následné úpravy proteinu p53 v jádérku (například modifikace indukované pomocí proteinu PML)

nejsou zatím dostatečně popsány. V sekvestraci proteinu MDM2 do jádérka a v regulaci jeho funkce hraje určitou roli také protein ARF, i když jeho role není úplně jasná a liší se v závislosti na typu stresu (viz kapitola Jadérko a stres) (114).

Vilotti et al. se ve své studii zabývá sekvestrací proteinu TTRAP (protein asociovaný s TRAF a TNF receptorem) do jádérka a to konkrétně u buněčných linií SH-SY5Y a HEK-293. Protein TTRAP se běžně nachází v tělískách PML a do jádérka je transportován po zablokování proteazomu (pomocí MG132). TTRAP je 5'-tyrosyl-DNA fosfodiesteráza účastnící se oprav po poškození DNA. Další funkcí tohoto proteinu je regulace biogeneze ribozomů při působení stresu. Při nízkých koncentracích MG132 je protein TTRAP transportován z nukleoplasmu do cytoplasmu, naopak při vyšších koncentracích dochází k transportu do jádérka. V jádru ale nekolokalizuje se základními proteiny jádérka (nukleofosmin, nukleolin a UBF), nachází se v tzv. jádřkových kavitách, což jsou oblasti jádérka, pro které je typické, že neobsahují tyto proteiny. V těchto místech kolokalizuje TTRAP s proteiny tělísek PML – s proteinem PML či proteinem Daxx (viz Obrázek 15). Bylo ukázáno, že pokud byla snížena hladina proteinu PML, TTRAP se neakumuloval v jádru. Interakce mezi proteinem TTRAP a PML je umožněna přítomností motivu SIM (SUMO-interacting motif) u proteinu TTRAP. Tento motiv umožňuje vazbu proteinu TTRAP na sumoylovaný protein PML. Když byl u proteinu TTRAP tento motiv modifikován, nedocházelo k interakci s proteinem PML a k transportu proteinu TTRAP do jádérka.

Zajímavým faktem je, že při inhibici transkripce rRNA pomocí aktinomycinu D (v kombinaci s MG132) dochází k zrušení transportu TTRAP do jádérka. Pro svůj transport TTRAP tedy potřebuje aktivní transkripci a nepoškozené jádřko (115). Kromě proteinů spojených přímo s tělísky PML je do jádérka spolu s proteinem TTRAP transportován také protein p53. I protein p53 se nachází v jádřkových kavitách. Právě spolupráce proteinu TTRAP s proteinem p53 může být klíčová při jeho schopnosti regulovat biogenezi ribozomů (115,116).



Obrázek 13: Kolokalizace proteinu TTRAP s proteiny p53, PML a DAXX v jadérku, konkrétně v jadérových kavitách. Jedná se o buňky SH-SY5Y po aplikaci inhibitoru proteasomu MG132 (16 h, 5 μ M). Převzato z Vilotti et al. 2012 (115).

Důležitost interakce mezi jadérkem a proteinem PML potvrzuje i fakt, že některá chemoterapeutika indukují přesun proteinu PML do jadérka. Konkrétně chemoterapeutikum Prima1-MET reaktivuje mutovaný protein p53 a tím obnovuje jeho schopnost navodit apoptózu. Tyto vlastnosti jsou zajištěny transportem proteinu p53 spolu s proteinem PML do jadérka. V jadérku následně dochází pravděpodobně k interakci p53 s polymerázou I a k zástavě transkripce a tedy i tvorby ribozomů (117).

Výše popsané případy interakce jadérka a proteinu PML naznačují na jeho důležitost pro správné fungování buněk i celého organismu. Pochopení této interakce může být klíčem k pochopení celé řady nemocí.

5. Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo shrnout dosavadní poznatky o dvou důležitých kompartmentech buněčného jádra – o jadérku a jaderných tělíscích PML a jejich vzájemném vztahu.

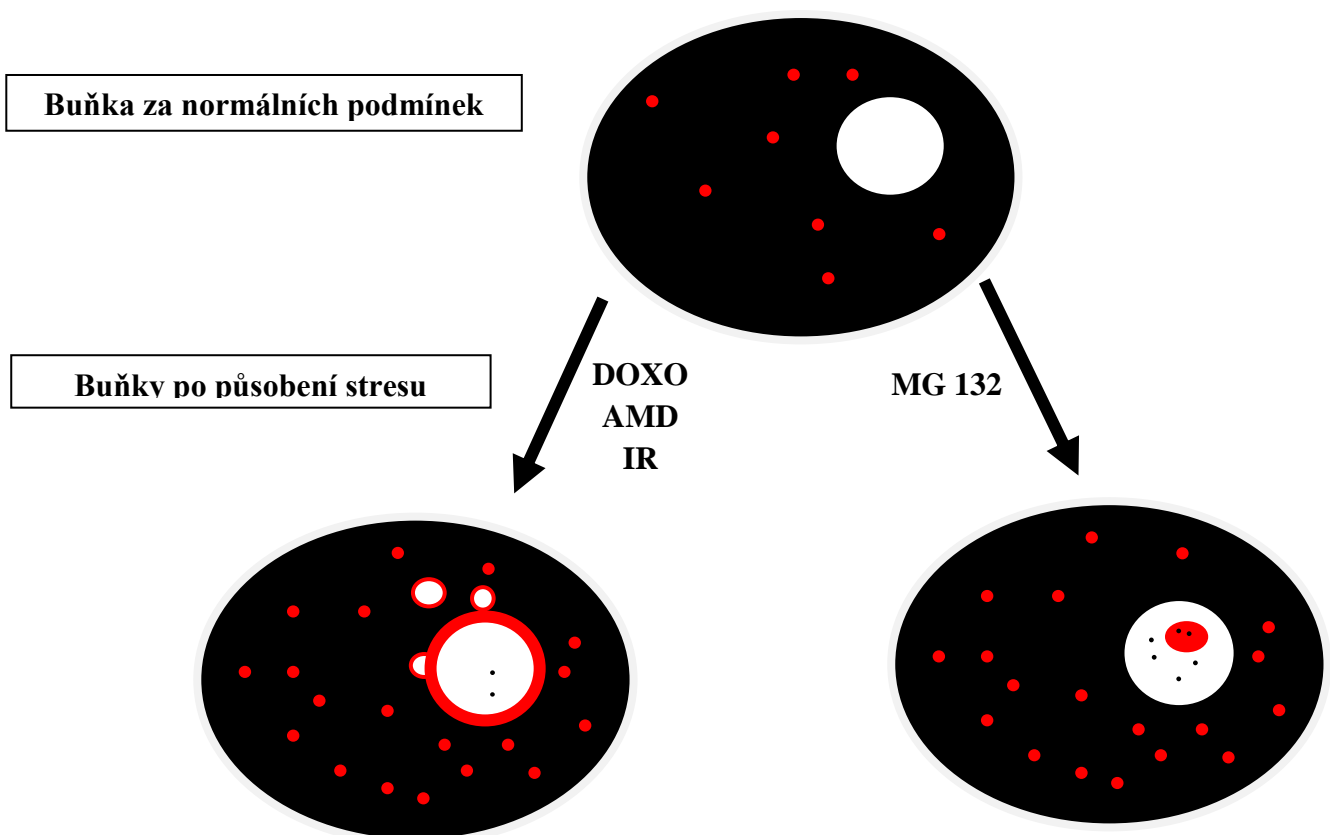
Jadérko je místem, kde dochází k transkripci rDNA (ta představuje více než 50% veškeré transkripce). rRNA je následně postranskripčně modifikována, štěpena a dává vzniknout (spolu s ribozomálními proteiny) ribozomům, které jsou transportovány do cytoplasmy, kde fungují jako továrny na výrobu proteinů. Jadérko může regulovat průběh tvorby ribozomů a tím i obrat proteinů v buňce, což je klíčové pro správné fungování buňky. Kromě této funkce byly v posledních letech objeveny i další funkce jadérka, které se jeví jako zásadní pro celkové fungování organismu. Nejvýznamnější je role jadérka při odpovědi na stres, kdy jadérko slouží jako stresový senzor. Z výše zmíněných vlastností jadérka vyplývá jeho klíčový vliv při rozvoji různých onemocnění. Jadérko hraje důležitou roli u nádorových onemocnění, neurodegenerativních a srdečních onemocnění a také při virových infekcích.

Podobně protein PML hraje roli při odpovědi buněk na stres, protein PML je zapojený v odpovědi na poškození DNA, v regulaci senescence či apoptózy. V buňkách nalezneme protein PML hlavně v jaderných tělíscích PML, kde interaguje s velkým množstvím proteinů. Skutečnost, že protein PML interaguje s velkým množstvím proteinů a také že mění své vlastnosti díky četným postranlačním modifikacím, naznačuje široké spektrum funkcí tohoto proteinu. Jeho úloha v buňce a v organismu je také závislá na stavu buněk a na typu tkáně. Protein PML je nádorový supresor a jeho sníženou hladinu pozorujeme u nádorů různého typu. Jaderná tělíska PML hrají důležitou roli také při rozvoji virových infekcí, kdy protein PML také působí jako supresor replikace a transkripce některých virů. Některé viry dokážou tuto bariéru obejít a naopak využít tělíska PML pro svůj vlastní životní cyklus.

Skutečnost, že jadérko působí jako senzor stresu a reguluje odpověď buněk na stres a stejně tak i protein PML reguluje odpověď buněk na stres, naznačuje možnost vzájemného funkčního vztahu, který ale není doposud jasný. Bylo prokázáno, že po působení některých stresových faktorů mění protein PML svoji lokalizaci a přechází k jadérku či do jadérka (viz Obrázek 16) a to zejména u primárních buněk (to souvisí pravděpodobně s tím, že v nádorových buňkách je snížená hladina PML). Některé studie naznačují, že u určitých buněk dochází za asistence PML k „odškrcování“ struktur s jadérkovým materiálem (B23, RNA polymeráza I, WRN) a jejich odnos do nukleoplasmy. Je otázkou, jaký je význam

tvorby těchto struktur, jednou z hypotéz je souvislost se změnou jadérové transkripce a vytvoření nové rovnováhy v syntéze ribosomálních komponent. Osud těchto struktur nebyl zatím více studován – je možné, že dochází k přenosu materiálu z jádérka do nukleoplazmy a následně k jeho degradaci. U helikázy WRN se naopak uvažuje o tom, že je přenesena z jádérka do místa poškození DNA, kde plní svoji funkci v opravě DNA. Tyto procesy by mohly jednak zajistit opravu poškození DNA v jádérku a jednak zastavit ribosomální biogenezi v souladu s aktivací zástavy buněčného cyklu, kdy se nároky na proteosyntézu snižují. Další způsob, jak protein PML interaguje s jádérkem, je ten, že protein PML je sekvestrován do jádérka spolu s některými dalšími jadernými proteiny (MDM2, TTRAP) (viz Obrázek 16). V jádérku proteiny setrvávají a nabízí se dvě varianty jejich dalšího působení – buď v jádérku pouze setrvávají a je tak zajištěna jejich neschopnost interagovat s partnery z nukleoplazmy (MDM2 a p53) anebo v jádérku mění průběh transkripce rDNA a následné tvorby ribozomů (TTRAP).

Tyto nálezy naznačují doposud neobjasněný vztah PML k jadérovým funkcím především při odpovědi buněk na stres. Pochopení interakce jádérka a proteinu PML může být klíčem k pochopení celé řady nemocí, včetně nádorových onemocnění.



Obrázek 14: Schéma popisující působení stresu na buněčné jádro, konkrétně na jaderná tělíska PML a na jádérko. Červeně jsou znázorněná tělíska PML a protein PML, bíle jádérko, černě potom nukleoplazma.

6. Bibliografie

1. Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M., and Lamond, A. I. (2010) The nucleolus under stress. *Mol Cell* **40**, 216-227
2. Pederson, T. (2011) The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**
3. Floutsakou, I., Agrawal, S., Nguyen, T. T., Seoighe, C., Ganley, A. R., and McStay, B. (2013) The shared genomic architecture of human nucleolar organizer regions. *Genome Res* **23**, 2003-2012
4. Hernandez-Verdun, D. (2011) Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus* **2**, 189-194
5. Sato, S., Yano, H., Makimoto, Y., Kaneta, T., and Sato, Y. (2005) Nucleolonema as a fundamental substructure of the nucleolus. *Journal of plant research* **118**, 71-81
6. Hozak, P., Cook, P. R., Schofer, C., Mosgoller, W., and Wachtler, F. (1994) Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J Cell Sci* **107** (Pt 2), 639-648
7. Politz, J. C., Polena, I., Trask, I., Bazett-Jones, D. P., and Pederson, T. (2005) A nonribosomal landscape in the nucleolus revealed by the stem cell protein nucleostemin. *Mol Biol Cell* **16**, 3401-3410
8. Sirri, V., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. (2000) The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron* **31**, 121-126
9. Gavet, O., and Pines, J. (2010) Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell* **18**, 533-543
10. Sirri, V., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. (2000) In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *J Cell Biol* **148**, 259-270
11. Savino, T. M., Gebrane-Younes, J., De Mey, J., Sibarita, J. B., and Hernandez-Verdun, D. (2001) Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol* **153**, 1097-1110
12. Russell, J., and Zomerdijk, J. C. (2005) RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem Sci* **30**, 87-96
13. Jack, K., Bellodi, C., Landry, D. M., Niederer, R. O., Meskauskas, A., Musalgaonkar, S., Kopmar, N., Krasnykh, O., Dean, A. M., Thompson, S. R., Ruggero, D., and Dinman, J. D. (2011) rRNA pseudouridylation defects affect ribosomal ligand binding and translational fidelity from yeast to human cells. *Mol Cell* **44**, 660-666
14. van Nues, R. W., Granneman, S., Kudla, G., Sloan, K. E., Chicken, M., Tollervey, D., and Watkins, N. J. (2011) Box C/D snoRNP catalysed methylation is aided by additional pre-rRNA base-pairing. *EMBO J* **30**, 2420-2430
15. Gorski, J. J., Pathak, S., Panov, K., Kasciukovic, T., Panova, T., Russell, J., and Zomerdijk, J. C. (2007) A novel TBP-associated factor of SL1 functions in RNA polymerase I transcription. *EMBO J* **26**, 1560-1568
16. Jansa, P., Burek, C., Sander, E. E., and Grummt, I. (2001) The transcript release factor PTRF augments ribosomal gene transcription by facilitating reinitiation of RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* **29**, 423-429
17. Stefanovsky, V., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L. I., and Moss, T. (2006) Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol Cell* **21**, 629-639
18. Zhao, J., Yuan, X., Frodin, M., and Grummt, I. (2003) ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. *Mol Cell* **11**, 405-413
19. Ruggero, D., and Pandolfi, P. P. (2003) Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* **3**, 179-192
20. French, S. L., Osheim, Y. N., Cioci, F., Nomura, M., and Beyer, A. L. (2003) In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA

- polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol Cell Biol* **23**, 1558-1568
21. Stefanovsky, V. Y., Pelletier, G., Hannan, R., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L. I., and Moss, T. (2001) An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* **8**, 1063-1073
 22. Muth, V., Nadaud, S., Grummt, I., and Voit, R. (2001) Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription. *EMBO J* **20**, 1353-1362
 23. Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., and Grummt, I. (2004) mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev* **18**, 423-434
 24. Rubbi, C. P., and Milner, J. (2003) Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *Embo J* **22**, 6068-6077
 25. Shav-Tal, Y., Blechman, J., Darzacq, X., Montagna, C., Dye, B. T., Patton, J. G., Singer, R. H., and Zipori, D. (2005) Dynamic Sorting of Nuclear Components into Distinct Nucleolar Caps during Transcriptional Inhibition. *Mol Biol Cell* **16**, 2395-2413
 26. Fumagalli, S., Di Cara, A., Neb-Gulati, A., Natt, F., Schwemberger, S., Hall, J., Babcock, G. F., Bernardi, R., Pandolfi, P. P., and Thomas, G. (2009) Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat Cell Biol* **11**, 501-508
 27. Govoni, M., Farabegoli, F., Pession, A., and Novello, F. (1994) Inhibition of topoisomerase II activity and its effect on nucleolar structure and function. *Exp Cell Res* **211**, 36-41
 28. Chen, M., and Jiang, P. (2004) Altered subcellular distribution of nucleolar protein fibrillar in by actinomycin D in HEp-2 cells. *Acta Pharmacol Sin* **25**, 902-906
 29. Kubbutat, M. H., Jones, S. N., and Vousden, K. H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303
 30. Zhang, Y., and Xiong, Y. (1999) Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Mol Cell* **3**, 579-591
 31. Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Bar-Sagi, D. (1999) Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* **1**, 20-26
 32. Tao, W., and Levine, A. J. (1999) P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6937-6941
 33. Sherr, C. J., and Weber, J. D. (2000) The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 94-99
 34. Sundqvist, A., Liu, G., Mirsaliotis, A., and Xirodimas, D. P. (2009) Regulation of nucleolar signalling to p53 through NEDDylation of L11. *EMBO Rep* **10**, 1132-1139
 35. Ofir-Rosenfeld, Y., Boggs, K., Michael, D., Kastan, M. B., and Oren, M. (2008) Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26. *Mol Cell* **32**, 180-189
 36. Ogg, S. C., and Lamond, A. I. (2002) Cajal bodies and coilin--moving towards function. *J Cell Biol* **159**, 17-21
 37. Raska, I., Ochs, R. L., Andrade, L. E., Chan, E. K., Burlingame, R., Peebles, C., Gruol, D., and Tan, E. M. (1990) Association between the nucleolus and the coiled body. *J Struct Biol* **104**, 120-127
 38. Tapia, O., Bengoechea, R., Berciano, M. T., and Lafarga, M. (2010) Nucleolar targeting of coilin is regulated by its hypomethylation state. *Chromosoma* **119**, 527-540
 39. Gilder, A. S., Do, P. M., Carrero, Z. I., Cosman, A. M., Broome, H. J., Velma, V., Martinez, L. A., and Hebert, M. D. (2011) Coilin participates in the suppression of RNA polymerase I in response to cisplatin-induced DNA damage. *Mol Biol Cell* **22**, 1070-1079
 40. Isaac, C., Yang, Y., and Meier, U. T. (1998) Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies. *J Cell Biol* **142**, 319-329
 41. Hein, N., Hannan, K. M., George, A. J., Sanij, E., and Hannan, R. D. (2013) The nucleolus: an emerging target for cancer therapy. *Trends Mol Med* **19**, 643-654
 42. Voit, R., Schnapp, A., Kuhn, A., Rosenbauer, H., Hirschmann, P., Stunnenberg, H. G., and Grummt, I. (1992) The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein

- kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *EMBO J* **11**, 2211-2218
43. Hannan, K. M., Hannan, R. D., Smith, S. D., Jefferson, L. S., Lun, M., and Rothblum, L. I. (2000) Rb and p130 regulate RNA polymerase I transcription: Rb disrupts the interaction between UBF and SL-1. *Oncogene* **19**, 4988-4999
 44. Bywater, M. J., Poortinga, G., Sanij, E., Hein, N., Peck, A., Cullinane, C., Wall, M., Cluse, L., Drygin, D., Anderes, K., Huser, N., Proffitt, C., Bliesath, J., Haddach, M., Schwaebe, M. K., Ryckman, D. M., Rice, W. G., Schmitt, C., Lowe, S. W., Johnstone, R. W., Pearson, R. B., McArthur, G. A., and Hannan, R. D. (2012) Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell* **22**, 51-65
 45. Drygin, D., Siddiqui-Jain, A., O'Brien, S., Schwaebe, M., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C. B., Proffitt, C., Trent, K., Whitten, J. P., Lim, J. K., Von Hoff, D., Anderes, K., and Rice, W. G. (2009) Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res* **69**, 7653-7661
 46. Mamaev, N. N., Gudkova, A. Y., and Amineva, K. K. (1998) AgNORs in the myocardium in ischaemic heart disease complicated by heart failure: a postmortem study. *Mol Pathol* **51**, 102-104
 47. Rosello-Lleti, E., Rivera, M., Cortes, R., Azorin, I., Sirera, R., Martinez-Dolz, L., Hove, L., Cinca, J., Lago, F., Gonzalez-Juanatey, J. R., Salvador, A., and Portoles, M. (2012) Influence of heart failure on nucleolar organization and protein expression in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun* **418**, 222-228
 48. Parlato, R., and Liss, B. (2014) How Parkinson's disease meets nucleolar stress. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 791-797
 49. Kalita, K., Makonchuk, D., Gomes, C., Zheng, J. J., and Hetman, M. (2008) Inhibition of nucleolar transcription as a trigger for neuronal apoptosis. *J Neurochem* **105**, 2286-2299
 50. Kreiner, G., Bierhoff, H., Armentano, M., Rodriguez-Parkitna, J., Sowodniok, K., Naranjo, J. R., Bonfanti, L., Liss, B., Schutz, G., Grummt, I., and Parlato, R. (2013) A neuroprotective phase precedes striatal degeneration upon nucleolar stress. *Cell Death Differ* **20**, 1455-1464
 51. Kao, C. F., Chen, S. Y., and Lee, Y. H. (2004) Activation of RNA polymerase I transcription by hepatitis C virus core protein. *J Biomed Sci* **11**, 72-94
 52. Banerjee, R., Weidman, M. K., Navarro, S., Comai, L., and Dasgupta, A. (2005) Modifications of both selectivity factor and upstream binding factor contribute to poliovirus-mediated inhibition of RNA polymerase I transcription. *J Gen Virol* **86**, 2315-2322
 53. Raska, I., Shaw, P. J., and Cmarko, D. (2006) New insights into nucleolar architecture and activity. *Int Rev Cytol* **255**, 177-235
 54. Saraogi, I., and Shan, S. O. (2011) Molecular mechanism of co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *Traffic* **12**, 535-542
 55. Politz, J. C., Yarovoi, S., Kilroy, S. M., Gowda, K., Zwieb, C., and Pederson, T. (2000) Signal recognition particle components in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 55-60
 56. Cech, T. R. (2004) Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell* **116**, 273-279
 57. Teixeira, M. T., Forstemann, K., Gasser, S. M., and Lingner, J. (2002) Intracellular trafficking of yeast telomerase components. *EMBO Rep* **3**, 652-659
 58. Lukowiak, A. A., Narayanan, A., Li, Z. H., Terns, R. M., and Terns, M. P. (2001) The snoRNA domain of vertebrate telomerase RNA functions to localize the RNA within the nucleus. *RNA* **7**, 1833-1844
 59. Wong, J. M., Kusdra, L., and Collins, K. (2002) Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol* **4**, 731-736
 60. Bernardi, R., and Pandolfi, P. P. (2007) Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 1006-1016
 61. de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991) The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* **66**, 675-684
 62. Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P. S. (2001) PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* **20**, 7223-7233

63. Condemine, W., Takahashi, Y., Zhu, J., Puvion-Dutilleul, F., Guegan, S., Janin, A., and de The, H. (2006) Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms. *Cancer Res* **66**, 6192-6198
64. Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P. G., and Dejean, A. (2002) Deconstructing PML-induced premature senescence. *Embo J* **21**, 3358-3369
65. Condemine, W., Takahashi, Y., Le Bras, M., and de The, H. (2007) A nucleolar targeting signal in PML-I addresses PML to nucleolar caps in stressed or senescent cells. *J Cell Sci* **120**, 3219-3227
66. Eskiw, C. H., Dellaire, G., Mymryk, J. S., and Bazett-Jones, D. P. (2003) Size, position and dynamic behavior of PML nuclear bodies following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly. *J Cell Sci* **116**, 4455-4466
67. Dellaire, G., and Bazett-Jones, D. P. (2004) PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* **26**, 963-977
68. Dellaire, G., Ching, R. W., Dehghani, H., Ren, Y., and Bazett-Jones, D. P. (2006) The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. *J Cell Sci* **119**, 1026-1033
69. Hubackova, S., Novakova, Z., Krejcikova, K., Kosar, M., Dobrovolna, J., Duskova, P., Hanzlikova, H., Vancurova, M., Barath, P., Bartek, J., and Hodny, Z. (2010) Regulation of the PML tumor suppressor in drug-induced senescence of human normal and cancer cells by JAK/STAT-mediated signaling. *Cell Cycle* **9**, 3085-3099
70. Stadler, M., Chelbi-Alix, M. K., Koken, M. H., Venturini, L., Lee, C., Saib, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemin, M. C., Schindler, C., and et al. (1995) Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* **11**, 2565-2573
71. de Stanchina, E., Querido, E., Narita, M., Davuluri, R. V., Pandolfi, P. P., Ferbeyre, G., and Lowe, S. W. (2004) PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* **13**, 523-535
72. Shtutman, M., Zhurinsky, J., Oren, M., Levina, E., and Ben-Ze'ev, A. (2002) PML is a target gene of beta-catenin and plakoglobin, and coactivates beta-catenin-mediated transcription. *Cancer Res* **62**, 5947-5954
73. Dror, N., Rave-Harel, N., Burchert, A., Azriel, A., Tamura, T., Tailor, P., Neubauer, A., Ozato, K., and Levi, B. Z. (2007) Interferon regulatory factor-8 is indispensable for the expression of promyelocytic leukemia and the formation of nuclear bodies in myeloid cells. *J Biol Chem* **282**, 5633-5640
74. Cheng, X., and Kao, H. Y. (2012) Post-translational modifications of PML: consequences and implications. *Frontiers in oncology* **2**, 210
75. Chang, K. S., Fan, Y. H., Andreeff, M., Liu, J., and Mu, Z. M. (1995) The PML gene encodes a phosphoprotein associated with the nuclear matrix. *Blood* **85**, 3646-3653
76. Hayakawa, F., and Privalsky, M. L. (2004) Phosphorylation of PML by mitogen-activated protein kinases plays a key role in arsenic trioxide-mediated apoptosis. *Cancer Cell* **5**, 389-401
77. Yang, S., Kuo, C., Bisi, J. E., and Kim, M. K. (2002) PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat Cell Biol* **4**, 865-870
78. Bernardi, R., Scaglioni, P. P., Bergmann, S., Horn, H. F., Vousden, K. H., and Pandolfi, P. P. (2004) PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* **6**, 665-672
79. Scaglioni, P. P., Yung, T. M., Cai, L. F., Erdjument-Bromage, H., Kaufman, A. J., Singh, B., Teruya-Feldstein, J., Tempst, P., and Pandolfi, P. P. (2006) A CK2-Dependent Mechanism for Degradation of the PML Tumor Suppressor. *Cell* **126**, 269-283
80. Duprez, E., Saurin, A. J., Desterro, J. M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M. N., Solomon, E., de The, H., Hay, R. T., and Freemont, P. S. (1999) SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* **112 (Pt 3)**, 381-393
81. Shen, T. H., Lin, H. K., Scaglioni, P. P., Yung, T. M., and Pandolfi, P. P. (2006) The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell* **24**, 331-339

82. Everett, R. D., Lomonte, P., Sternsdorf, T., van Driel, R., and Orr, A. (1999) Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition. *J Cell Sci* **112** (Pt 24), 4581-4588
83. Dellaire, G., Ching, R. W., Ahmed, K., Jalali, F., Tse, K. C., Bristow, R. G., and 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. *J Cell Biol* **175**, 55-66
84. Munch, S., Weidtkamp-Peters, S., Klement, K., Grigaravicius, P., Monajembashi, S., Salomoni, P., Pandolfi, P. P., Weisshart, K., and Hemmerich, P. (2014) The tumor suppressor PML specifically accumulates at RPA/Rad51 containing DNA damage repair foci but is non-essential for DNA damage-induced fibroblast senescence. *Mol Cell Biol*
85. Hubackova, S., Krejcikova, K., Bartek, J., and Hodny, Z. (2012) IL1- and TGFbeta-Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'bystander senescence'. *Ageing (Albany NY)* **4**, 932-951
86. Vernier, M., Bourdeau, V., Gaumont-Leclerc, M. F., Moiseeva, O., Begin, V., Saad, F., Mes-Masson, A. M., and Ferbeyre, G. (2011) Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev* **25**, 41-50
87. Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P., and Pelicci, P. G. (2000) PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* **406**, 207-210
88. Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703-716
89. Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., and Bartek, J. (2011) Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16(ink4a). *Cell Cycle* **10**, 457-468
90. Salomoni, P., Dvorkina, M., and Michod, D. (2012) Role of the promyelocytic leukaemia protein in cell death regulation. *Cell death & disease* **3**, e247
91. Wang, Z. G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R., and Pandolfi, P. P. (1998) PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet* **20**, 266-272
92. Khelifi, A. F., D'Alcontres, M. S., and Salomoni, P. (2005) Daxx is required for stress-induced cell death and JNK activation. *Cell Death Differ* **12**, 724-733
93. Zhao, L. Y., Liu, J., Sidhu, G. S., Niu, Y., Liu, Y., Wang, R., and Liao, D. (2004) Negative regulation of p53 functions by Daxx and the involvement of MDM2. *J Biol Chem* **279**, 50566-50579
94. Yang, S., Jeong, J. H., Brown, A. L., Lee, C. H., Pandolfi, P. P., Chung, J. H., and Kim, M. K. (2006) Promyelocytic leukemia activates Chk2 by mediating Chk2 autophosphorylation. *J Biol Chem* **281**, 26645-26654
95. Bernardi, R., Guernah, I., Jin, D., Grisendi, S., Alimonti, A., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Simon, M. C., Rafii, S., and Pandolfi, P. P. (2006) PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* **442**, 779-785
96. Trotman, L. C., Alimonti, A., Scaglioni, P. P., Koutcher, J. A., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P. P. (2006) Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature* **441**, 523-527
97. Tavalai, N., and Stamminger, T. (2009) Interplay between Herpesvirus Infection and Host Defense by PML Nuclear Bodies. *Viruses* **1**, 1240-1264
98. Rivera-Molina, Y. A., Martinez, F. P., and Tang, Q. (2013) Nuclear domain 10 of the viral aspect. *World journal of virology* **2**, 110-122
99. Bonilla, W. V., Pinschewer, D. D., Klenerman, P., Rousson, V., Gaboli, M., Pandolfi, P. P., Zinkernagel, R. M., Salvato, M. S., and Hengartner, H. (2002) Effects of promyelocytic leukemia protein on virus-host balance. *J Virol* **76**, 3810-3818
100. Chelbi-Alix, M. K., Quignon, F., Pelicano, L., Koken, M. H., and de The, H. (1998) Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. *J Virol* **72**, 1043-1051

101. Carvalho, T., Seeler, J. S., Ohman, K., Jordan, P., Pettersson, U., Akusjarvi, G., Carmo-Fonseca, M., and Dejean, A. (1995) Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Biol* **131**, 45-56
102. Swindle, C. S., Zou, N., Van Tine, B. A., Shaw, G. M., Engler, J. A., and Chow, L. T. (1999) Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J Virol* **73**, 1001-1009
103. Mu, Z. M., Le, X. F., Vallian, S., Glassman, A. B., and Chang, K. S. (1997) Stable overexpression of PML alters regulation of cell cycle progression in HeLa cells. *Carcinogenesis* **18**, 2063-2069
104. 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., and Falini, B. (1996) Heterogeneous nuclear expression of the promyelocytic leukemia (PML) protein in normal and neoplastic human tissues. *Am J Pathol* **149**, 2023-2035
105. Wang, Z. G., Delva, L., Gaboli, M., Rivi, R., Giorgio, M., Cordon-Cardo, C., Grosveld, F., and Pandolfi, P. P. (1998) Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science* **279**, 1547-1551
106. Ito, K., Bernardi, R., Morotti, A., Matsuoka, S., Saglio, G., Ikeda, Y., Rosenblatt, J., Avigan, D. E., Teruya-Feldstein, J., and Pandolfi, P. P. (2008) PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature* **453**, 1072-1078
107. Janderova-Rossmeislova, L., Novakova, Z., Vlasakova, J., Philimonenko, V., Hozak, P., and Hodny, Z. (2007) PML protein association with specific nucleolar structures differs in normal, tumor and senescent human cells. *J Struct Biol* **159**, 56-70
108. Mattsson, K., Pokrovskaja, K., Kiss, C., Klein, G., and Szekely, L. (2001) Proteins associated with the promyelocytic leukemia gene product (PML)-containing nuclear body move to the nucleolus upon inhibition of proteasome-dependent protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1012-1017
109. Jiang, W. Q., and Ringertz, N. (1997) Altered distribution of the promyelocytic leukemia-associated protein is associated with cellular senescence. *Cell Growth Differ* **8**, 513-522
110. Liu, J., Song, Y., Qian, J., Liu, B., Dong, Y., Tian, B., and Sun, Z. (2011) Promyelocytic leukemia protein interacts with werner syndrome helicase and regulates double-strand break repair in gamma-irradiation-induced DNA damage responses. *Biochemistry. Biokhimiia* **76**, 550-554
111. Lan, L., Nakajima, S., Komatsu, K., Nussenzweig, A., Shimamoto, A., Oshima, J., and Yasui, A. (2005) Accumulation of Werner protein at DNA double-strand breaks in human cells. *J Cell Sci* **118**, 4153-4162
112. Vaitiekunaite, R., Butkiewicz, D., Krzesniak, M., Przybylek, M., Gryc, A., Snietura, M., Benedyk, M., Harris, C. C., and Rusin, M. (2007) Expression and localization of Werner syndrome protein is modulated by SIRT1 and PML. *Mech Ageing Dev* **128**, 650-661
113. Audas, T. E., Jacob, M. D., and Lee, S. (2012) Immobilization of proteins in the nucleolus by ribosomal intergenic spacer noncoding RNA. *Mol Cell* **45**, 147-157
114. Bursac, S., Brdovcak, M. C., Pfannkuchen, M., Orsolich, I., Golomb, L., Zhu, Y., Katz, C., Daftuar, L., Grabusic, K., Vukelic, I., Filic, V., Oren, M., Prives, C., and Volarevic, S. (2012) Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 20467-20472
115. Vilotti, S., Biagioli, M., Foti, R., Dal Ferro, M., Lavina, Z. S., Collavin, L., Del Sal, G., Zucchelli, S., and Gustincich, S. (2012) The PML nuclear bodies-associated protein TTRAP regulates ribosome biogenesis in nucleolar cavities upon proteasome inhibition. *Cell Death Differ* **19**, 488-500
116. Kruger, T., and Scheer, U. (2010) p53 localizes to intranucleolar regions distinct from the ribosome production compartments. *J Cell Sci* **123**, 1203-1208
117. Rokaeus, N., Klein, G., Wiman, K. G., Szekely, L., and Mattsson, K. (2007) PRIMA-1(MET) induces nucleolar accumulation of mutant p53 and PML nuclear body-associated proteins. *Oncogene* **26**, 982-992