

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

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



**Martina Kindlová**

Role promyelocytárního leukemického proteinu v udržování stability genomu

The role of promyelocytic leukemia protein in genome maintenance

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

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

Praha, 2022

**Charles University**  
**Faculty of Science**

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



**Martina Kindlová**

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

Type of thesis

Bachelor's thesis

Supervisor:  
Ing. Pavla Vašicová, Ph.D.

Prague, 2022

## Prohlášení

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

V Praze, dne 2.8. 2022

Martina Kindlová

Podpis

## **Poděkování**

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

## Abstrakt

Promyelocytární leukemický protein (PML) představuje klíčový komponent pro formaci jaderných tělísek PML (*PML nuclear bodies*, PML-NBs), nemembránových organel, ve kterých PML vytváří ohraničení obklopující vnitřní jádro těchto dynamických multiproteinových komplexů. PML je multifunkční protein, který je schopen interagovat se sumoylovatelnými proteiny a vnášet je do PML-NBs, které mohou fungovat jako prostor pro přechodné či trvalé uchování těchto proteinů či platforma pro biochemické reakce. PML je znám pro svůj tumor-supresorový potenciál, avšak za určitých okolností může mít onkogenní charakter, což značí jeho protichůdnou funkci u rakovin. PML NBs jsou vysoce dynamické útvary, které prochází strukturními změnami v závislosti na fázi buněčného cyklu, mající schopnost fyzicky interagovat s chromatinem. PML-NBs se podílejí na udržování stability genomu tím, že hrají roli během důležitých buněčných procesů, kterými jsou regulace buněčného cyklu, opravné mechanismy DNA, alternativní prodlužování telomer u nádorových buněk či ochrana genomu před virovou DNA. Samotný PML se může také podílet na udržování stability genomu, a to konkrétně jeho cytosolická isoforma, která má funkci při navození apoptózy. Cílem této rešerše je podat informace o tom, jak se promyelocytární leukemický protein podílí na mechanismech udržování stability genomu a o možných důsledcích selhání těchto mechanismů.

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

## **Abstract**

Promyelocytic leukemia protein (PML) is a key component for the formation of the PML nuclear bodies (PML-NBs), nonmembrane organelles, in which PML forms a shell surrounding an inner core of this dynamic multiprotein complex. PML is a multifunctional protein that is able to interact with sumoylated proteins and sequester them to PML NBs which can work as storage for these proteins or as a platform for biochemical reactions. PML is known for its tumor-suppressive character. However, it can have oncogenic potential under certain conditions which suggests its contradictory role in cancer. PML NBs are highly dynamic structures that undergo structural changes due to the phase of the cell cycle which can physically interact with chromatin. PML NBs maintain genome stability by playing a role during important cellular processes which are regulation of the cell cycle, DNA repair mechanisms, alternative telomere lengthening in cancer cells, or protection of the genome against viral DNA. PML itself can also participate in genome maintenance. Concretely, its cytosolic isoform can have a role in inducing apoptosis. The purpose of this section is to provide information about how PML participates in genome stability maintenance and about the possible consequences of the failure of these mechanisms.

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

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Stabilita genomu.....	2
2.1. Příčiny nestability genomu.....	2
2.1.1. Opravné mechanismy DNA.....	3
2.1.2. Nestabilní oblasti genomu.....	5
3. Promyelocytární leukemický protein (PML).....	7
3.1. Struktura PML a jeho isoformy.....	7
3.2. Regulace transkripce PML.....	9
3.3. Struktura a formace PML jaderných tělísek (PML-NBs).....	9
3.3.1. Dynamika PML-NBs během fází buněčného cyklu.....	11
3.4. Interakce PML-NBs s chromatinem.....	12
4. Úloha PML a PML-NBs ve stabilitě genomu.....	15
4.1. Role PML jako nádorového supresoru.....	16
4.2. Role PML a PML-NBs v regulaci buněčného cyklu.....	17
4.2.1. Role PML a PML-NBs při senescenci.....	18
4.2.2. Role PML a PML-NBs při apoptóze.....	22
4.3. Role PML a PML-NBs v opravě DNA.....	25
4.3.1. Asociace PML s reparačními faktory.....	26
4.3.2. Role PML a PML-NBs při opravě dvouvláknových zlomů.....	27
4.4. Role PML při alternativním prodlužování telomer (ALT).....	29
4.4.1. Formace ALT asociovaných PML útvarů (APBs).....	29
4.4.2. Mechanismus alternativního prodlužování telomer.....	31
4.5. Role PML a PML-NBs při antivirové ochraně.....	33
5. Závěr.....	37
6. Seznam použité literatury.....	39

## 1. Úvod

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

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

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

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



## 2. Stabilita genomu

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

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

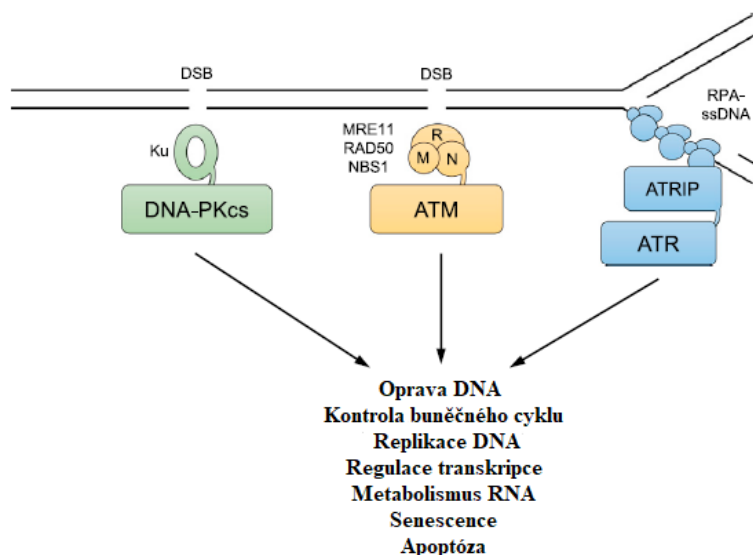
### 2.1. Příčiny nestability genomu

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

### 2.1.1. Opravné mechanismy DNA

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

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



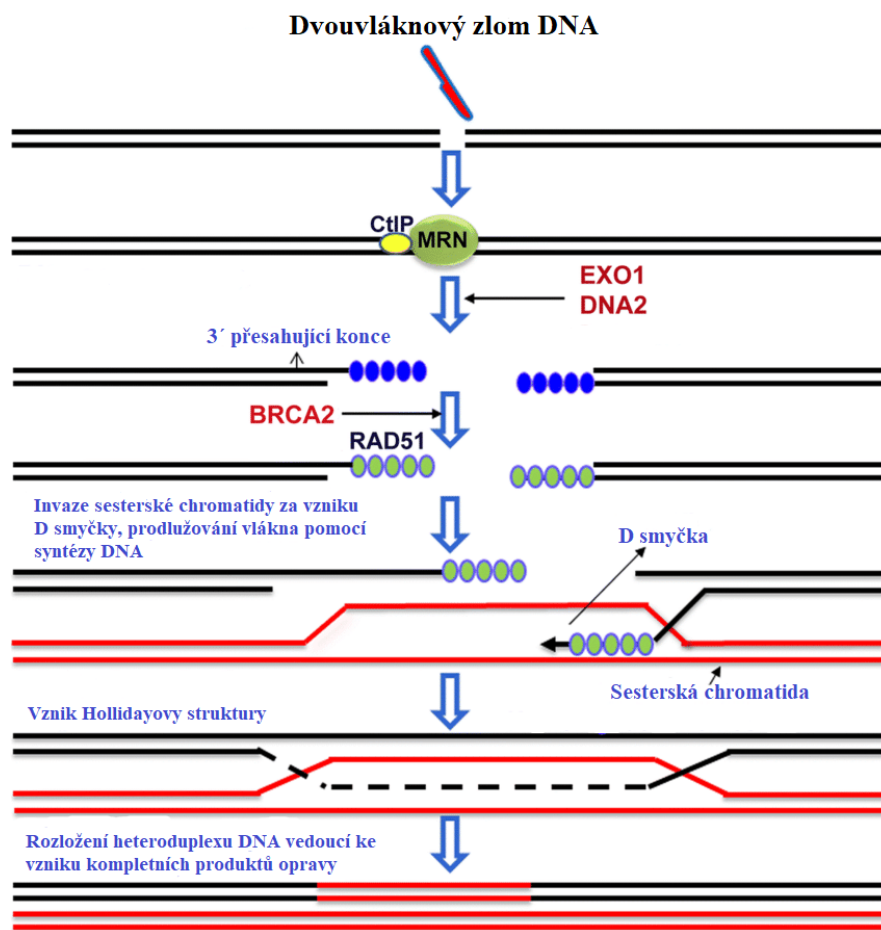
**Obrázek 1: Model aktivace a působení kináz ATM, ATR a DNA-PKs v důsledku poškození DNA.** DNA-PKs je aktivována a dopravena na dvouvláknové zlomy navázáním Ku na místo dvouvláknového zlomu. ATM je aktivována a lokalizována na dvouvláknové zlomy pomocí komplexu MRN. ATR je lokalizována na jednovláknovou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

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

Jelikož jsou dvouvláknové zlomy považovány za hlavní příčinu nestability genomu, budou v této kapitole rozebrány mechanismy oprav NHEJ a HRR (Trenz a kol., 2006, Nussenzweig a kol., 2007).

Převládajícím typem oprav dvouvláknových zlomů je mechanismus NHEJ. Jedná se o mechanismus, kterým jsou opravovány nekomplikované zlomy DNA během všech fází buněčného cyklu. Jelikož tento typ oprav nevyužívá homologii vláken, je náchylný k chybám (shrnuto v Chang a kol., 2018). Počátečním krokem NHEJ je nasednutí proteinového komplexu Ku70/80 na konce zlomů DNA z důvodu jejich ochrany. Tento komplex poté zprostředkuje vazbu dalších proteinů, kterými jsou katalytická podjednotka DNA PK a Artemis, které překlenují mezeru mezi volnými konci DNA (Yano a Chen, 2008, Douglas a kol., 2005). Následně jsou zlomené konce DNA pomocí těchto proteinů spojeny k sobě, přičemž během spojování konců může dojít k odstranění nebo přidání párů bází. Nakonec jsou konce kovalentně spojeny pomocí ligázy IV (Wilson a kol., 1997).

Dalším typem oprav je HRR, který na rozdíl od NHEJ, využívá homologii vláken. Pomocí mechanismu HRR jsou opravovány i komplikovanější zlomy a tento typ oprav je striktně vymezen na S nebo G2 fázi buněčného cyklu (shrnuto v Scully a kol., 2019). Opravný mechanismus pomocí HRR se skládá z několika kroků, které jsou znázorněny na **Obrázku 2**. Místo zlomy je rozeznáno proteiny komplexu MRN, následně se naváže exonukleasa CtIP, která je zapojena do vytváření převislých konců (Porter-Goff a kol., 2008, Yuan a kol., 2009). Na tvorbě převislých konců se také podílejí exonukleázy Exo1 a DNA2 a ATP-dependentní DNA helikáza BLM, která usnadňuje aktivitu těchto exonukleáz (Kikuchi a kol., 2009, Chen a kol., 2017). Vzniklé 3' přesahující konce jsou pokryty proteinem RPA a následně proteinem Rad51, který je důležitý pro hledání homologní DNA (Vispé a kol., 1998). Poté dojde k invazi sesterské chromatidy za vzniku D smyčky (Pomerantz a kol., 2013). Pak dochází k prodlužování 3' vlákna pomocí syntézy DNA za vzniku Hollidayovy křížové struktury (Haber a kol., 2004). Posledním krokem HRR je rozložení struktury heteroduplexu DNA, na kterém se podílejí helikázy BLM a WRN, vedoucí ke vzniku kompletních produktů opravy (Matos a kol., 2011).



**Obrázek 2: Schématické znázornění mechanismu HRR.** Protein CtIP a proteinový komplex MRN, který se skládá z proteinů Mre11, Rad50 a Nbs1 vytvoří 3' přesahující konce, na které nasedne protein Rad51. Následně dojde k invazi sesterské chromatidy za vzniku D smyčky. Pak dochází k prodlužování 3' vlákna pomocí syntézy DNA za vzniku Hollidayovy křížové struktury. Posledním krokem HRR je rozložení struktury heteroduplexu DNA vedoucí ke vzniku kompletních produktů opravy (Thadathil a kol., 2019).

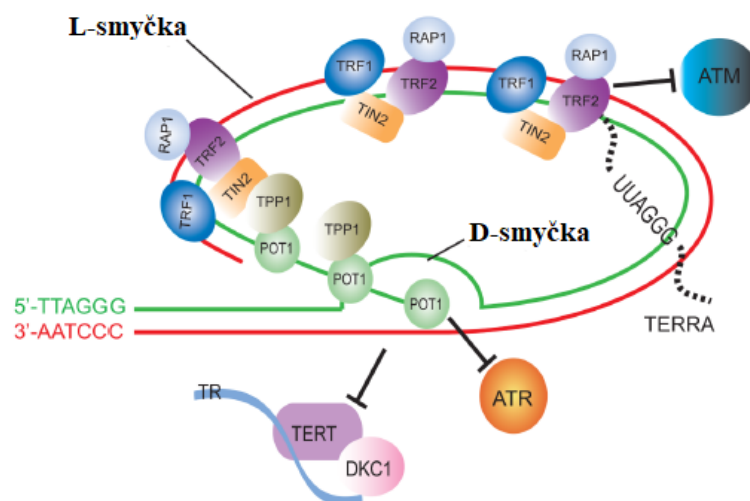
### 2.1.2. Nestabilní místa genomu

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

Chromosomální fragilní místa (*chromosomal fragile sites*, CFSs) jsou oblasti chromozomu, kde se zvýšenou frekvencí dochází ke vzniku zlomů a lézí v důsledku replikačního stresu, který může být způsoben například expozicí buněk inhibitorům syntézy DNA. CFSs se dělí na běžná a vzácná podle frekvence výskytu v lidské populaci (Zlotorynski a kol., 2003). Běžná fragilní místa aktivuje nejčastěji afidikolin (Rassool a kol., 1991), zatímco vznik vzácných fragilních

míst indukuje výhradně bromodeoxyuridin či distamycin A (Hewett a kol., 1998). Běžná fragilní místa jsou tvořena repeticemi bohatými na AT páry bází (Shiraishi a kol., 2001) a jsou považována za jednu z příčin vzniku rakoviny (Hecht a kol., 1984). Na rozdíl od běžných fragilních míst nejsou vzácná fragilní místa spojována s rakovinou, jsou tvořena repetitivními motivy, jako jsou CGG, a jsou děděna v rámci Mendelovské dědičnosti (Jones a kol., 1995).

Mezi nestabilní oblastí genomu patří koncové úseky chromozomů, telomery. Tyto úseky jsou náchylné ke zkracování v důsledku ne schopnosti replikačního komplexu syntetizovat jejich konce (Watson, 1972, Shay a kol., 2002). Telomery se skládají z repetice TTAGGG (Moyzis a kol., 1988). Na tyto repetice se váží proteiny tvořící komplex nazývaný se *shelterin*, který přispívá k ochraně telomer (Bandaria a kol., 2016). Komplexnější struktura telomer, je znázorněna na **Obrázku 3**. Existují dva způsoby, kterými buňky zabraňují zkracování telomer. Prvním z nich je udržování délky telomer pomocí telomerázy. Mechanismus udržování telomer pomocí telomerázy spočívá v přidávání telomerických opakování na 3' konec s využitím RNA templátu (Greider a kol., 1985). Druhým mechanismem popsaným v některých nádorových buňkách je alternativní prodlužování telomer (*alternative lengthening of telomere*, ALT), který je založen na výměně nebo syntéze telomerické DNA závislých na homologní rekombinaci (Bryan a kol., 1997).

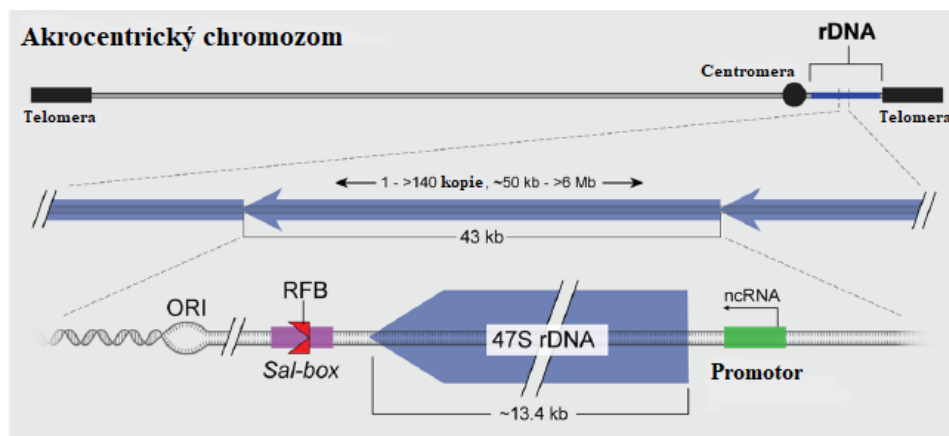


**Obrázek 3: Struktura lidských telomer.** Lidské telomery se skládají z repetice TTAGGG. Hlavní vlákno bohaté na G báze se prodlužuje ve směru k 3' konci a vytváří G-ocásek. Na telomerách se nachází komplex shelterin, který se skládá z faktorů vážících se na telomerickou DNA nebo na ostatní faktory.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

Dalším nestabilním místem genomu jsou centromery, jež jsou nezbytné pro rovnoměrné rozdělení genetického materiálu při každém buněčném dělení (shrnuto v Kalitsis a kol., 2012).

Centromery představují chromosomální lokusy tvořené dlouhými tandemovými řadami repetitivních AT úseků bohatých alfa-satelitních DNA (Singer, 1982, Ting a kol., 2011).

Lokusy rDNA jsou další nestabilní oblastí genomu skládající se z tandemových repetitiv, jak je ukázáno na **Obrázku 4**. Nachází se mezi centromerami a telomerami a jedná se o nejvíce přepisované lokusy v genomu, což má spolu s repetitivním charakterem jejich sekvencí za následek vysokou náchylnost rDNA k rekombinaci (Stultsa kol., 2009, Ide a kol., 2010). V důsledku toho je rDNA považována za jednu z nejvíce nestabilních a hypervariabilních genomových oblastí (Stultsa a kol., 2009).

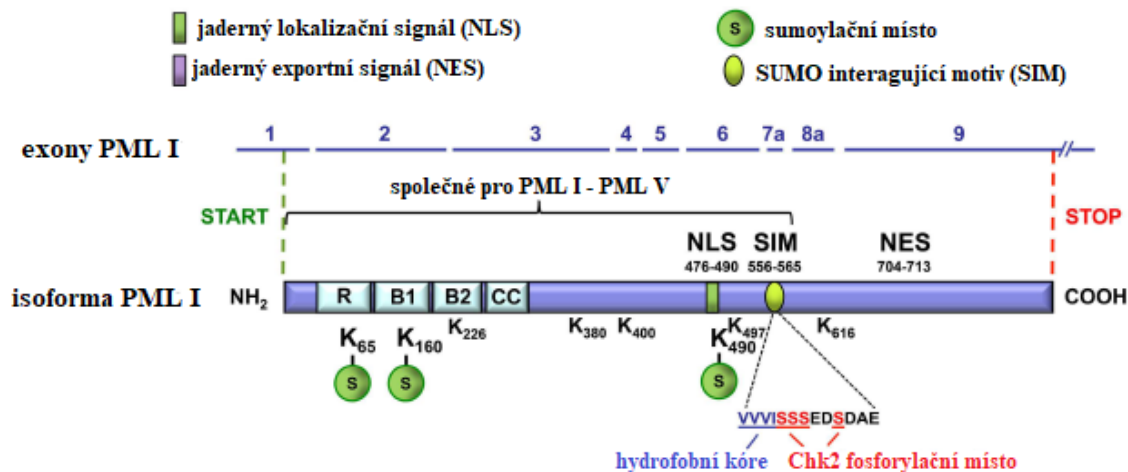


**Obrázek 4: Struktura lidského lokusu rDNA.** Lokus se nachází mezi centromerou a telomerou a skládá se z 1–140 opakujících se jednotek uspořádaných do tandemu na krátkých ramenech akrocentrických chromozomů. Přilehlé geny 47S rDNA jsou od sebe odděleny mezigenovými mezerami (Salim & Gerton, 2019).

### 3. Promyelocytární leukemický protein (PML)

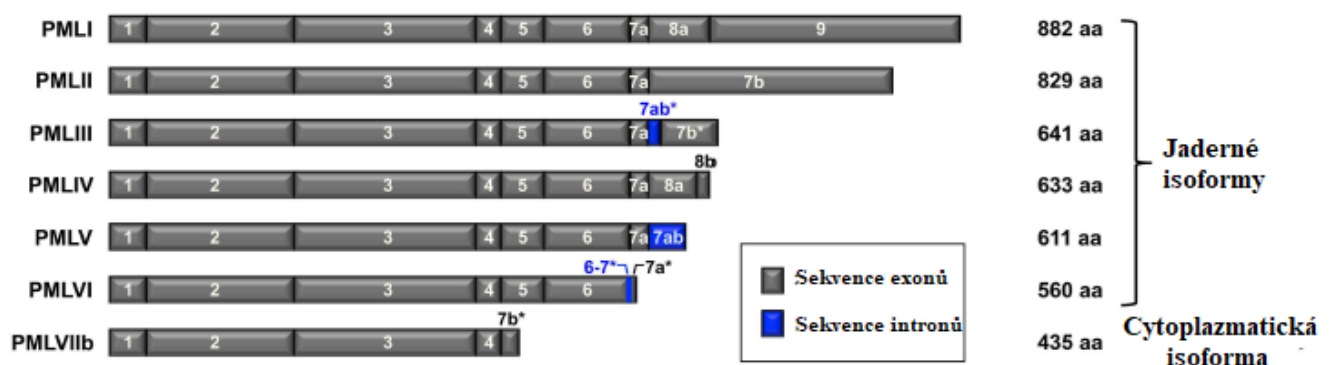
#### 3.1. Struktura PML a jeho isoformy

PML je členem proteinové rodiny TRIM vyznačující se přítomností konzervovaného motivu RBCC (Jensen a kol., 2001). Může tvořit sedm isoform: PML I – PML VII (Hands a kol., 2014). Všechny isoformy PML mají na svém N-konci již zmiňovaný RBCC motiv, který je tvořen doménou *RING finger*, dvěma B-boxy bohatými na cystein a histidin (Huang a kol., 2014) a alfa-helikální *coil-coiled* doménou, jak je znázorněno na **Obrázku 5** (Kastner a kol., 1992).



**Obrázek 5: Znázornění organizace domén PML.** Součástí PML je RBCC motiv, NLS, NES, SIM motiv, sekvence obsahující CK2 fosforylační místa a sumoylační místa označena písmenem K (Nisole a kol., 2013).

Jednotlivé isoformy se od sebe odlišují složením C-koncové části, což je schematicky znázorněno na **Obrázku 6**. Tato odlišnost je dána alternativním sestřihem a určuje vazebnou specifitu isoform PML (Jensen a kol., 2001, Condemine a kol., 2007). Všechny isoformy, kromě v cytosolu se nacházející PML VII, mají jaderný lokalizační signál (NLS). Isoforma PML I má kromě NLS ještě jaderný exportní signál (NES), což jí umožňuje přemísťování mezi jádrem a cytoplazmou (Beech a kol., 2005). PML je posttranslačně modifikován a mezi hlavní modifikace patří sumoylace. PML je nezbytný pro tvorbu PML-NBs – jaderných útvarů majících průměr 0,1 – 1,0  $\mu\text{m}$  (Ishov a kol., 1999, Hayakawa a kol., 2004).



**Obrázek 6: Schématické znázornění isoform PML I – PML VII** (Nisole a kol., 2013).



### 3.2. Regulace transkripce PML

PML je exprimován v celé řadě tkání. Nicméně, transkripce genu pro PML se u jednotlivých typů tkání a buněk liší v závislosti na stavu tkáně. Zatím nejvíce prozkoumané mechanismy regulace transkripce PML jsou regulace pomocí p53 (de Stanchina a kol., 2004) a signálních přenašečů a aktivátorů transkripce (*signal transducers and activators of transcription*, STAT) (Stadler a kol., 1995).

Bylo dokázáno, že interferony  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  pozitivně regulují transkripci PML. Je známo, že interferony aktivují proteiny z rodiny STAT, které se vážou na promotor genu PML a umožní tak aktivaci transkripce tohoto genu (Stadler a kol., 1995). Transkripce PML může být pozitivně regulována proteinem p53, který se přímo váže na promotor genu PML. Acetylace p53, která je nutná k jeho aktivaci, navíc probíhá uvnitř PML-NBs, tudíž je mezi PML a p53 pozitivní zpětná vazba (de Stanchina a kol., 2004).

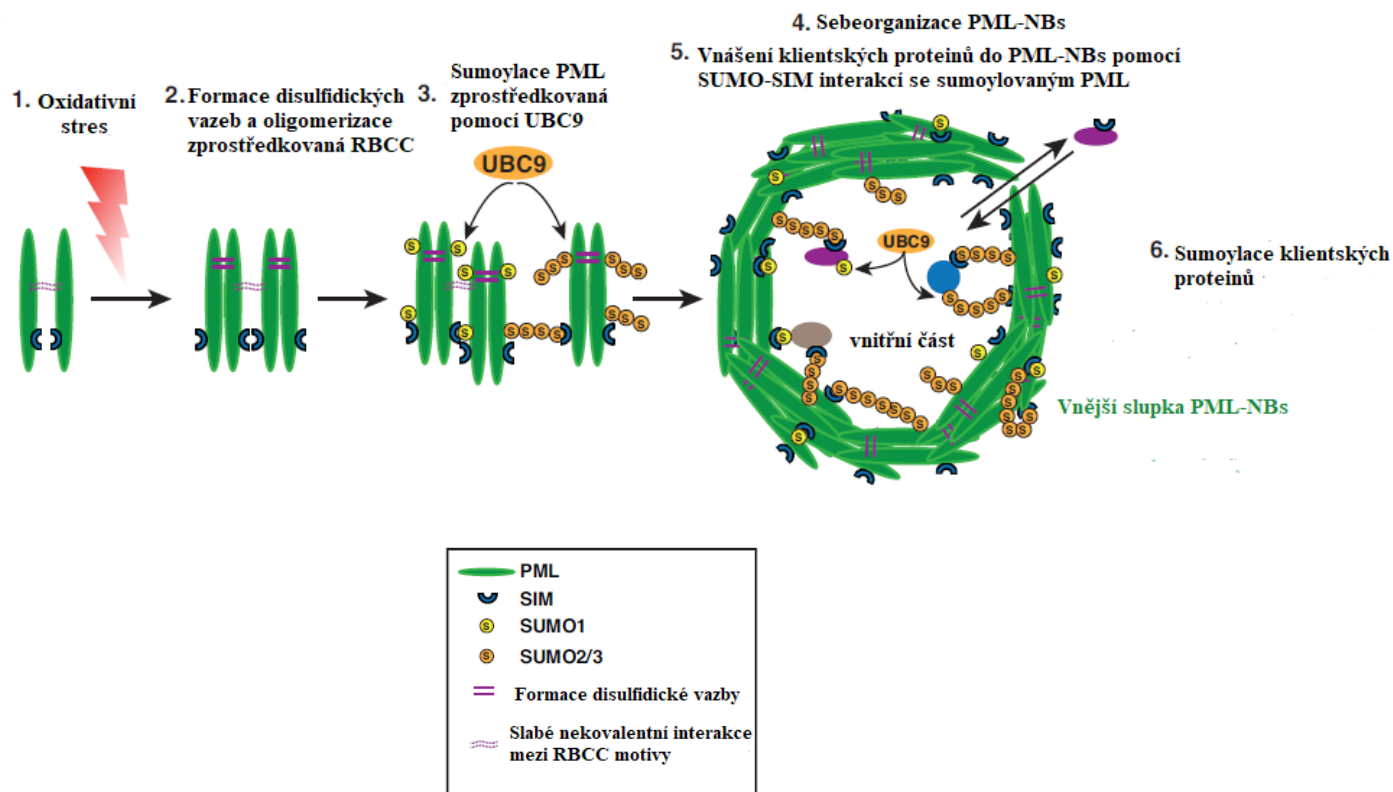
### 3.3. Struktura a formace PML jaderných tělísek (PML-NBs)

PML-NBs jsou dynamické útvary, které ve své struktuře uchovávají celou řadu proteinů v závislosti na podmínkách v buňce (Scherer a kol., 2016). Kromě přechodně asociovaných proteinů jsou v PML-NBs permanentně uchovány další proteiny, např. – Sp100 (*SP100 nuclear antigen*) a DAXX (*death domain associated protein*). Skoro všechny proteiny sídlící ve struktuře PML-NBs jsou modifikovány malými modifikátory podobným ubiquitinu (*small ubiquitin-like modifier*, SUMO) nebo obsahují SUMO interakční motiv (*SUMO interacting motif*, SIM) či mají SUMO i SIM zároveň (Lång a kol., 2019). Bylo zjištěno, že právě interakce mezi SUMO na jednom proteinu a SIM na druhém proteinu zajišťuje asociaci proteinů s PML-NBs (Brown a kol., 2016). Samotný PML obsahuje SIM a tři sumoylační místa (Shen a kol., 2006). Sumoylace se tvoří kovalentní vazbou mezi SUMO a lysinovým zbytkem příslušného proteinu na specifické konsensus sekvenci. Tato vazba je zajištěna enzymatickou kaskádou. Nejdříve je SUMO monomer aktivován E1-aktivujícím enzymem Sae1/2. Potom E2 konjugující enzym, UBC9, který rozpozná konsensus sekvenci na substrátu a zprostředkuje navázání molekuly SUMO na lysinový zbytek (Tatham a kol., 2005). SUMO-E3 ligázy tvoří komplex se substráty UBC9-SUMO či UBC9-SUMO, a tím zajišťují vyšší specifitu během sumoylace (Hendriks a kol., 2016). PML je na specifických lysinech vysoce sumoylován třemi paralogy SUMO – SUMO 1, 2 a 3 (Niwa-Kawakita a kol., 2017).

V reakci na stres jednotlivé monomery PML v buňce dimerizují pomocí kovalentních disulfidických vazeb a nekovalentních interakcí mezi jednotlivými doménami RBCC (Sahin a kol., 2014, Lallemand-Breitenbach a kol., 2001). Poté na základě stejných interakcí dimery



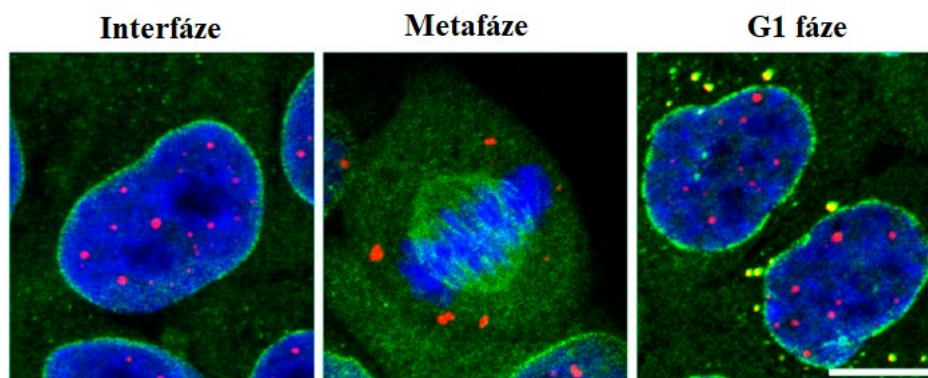
vytvářejí oligomerní strukturu nematurovaných PML-NBs. PML jsou následně sumoylovány UBC9 E2. Interakce SUMO a SIM na jednotlivých PML indukuje vznik slupky a formaci maturovaných PML-NBs, jak je znázorněno níže na **Obrázku 7** (Zhong a kol., 2000, Lallemand-Breitenbach a kol., 2001). PML fungují jako lešení (*scaffold*) pro partnerské proteiny, jsou sumoylovány a zároveň obsahují SIM, stejně jako partnerské (*client*) proteiny a na základě SUMO-SIM interakcí PML rekrutuje partnerské proteiny dovnitř své struktury (Banani a kol., 2016, Marcello a kol., 2003).



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

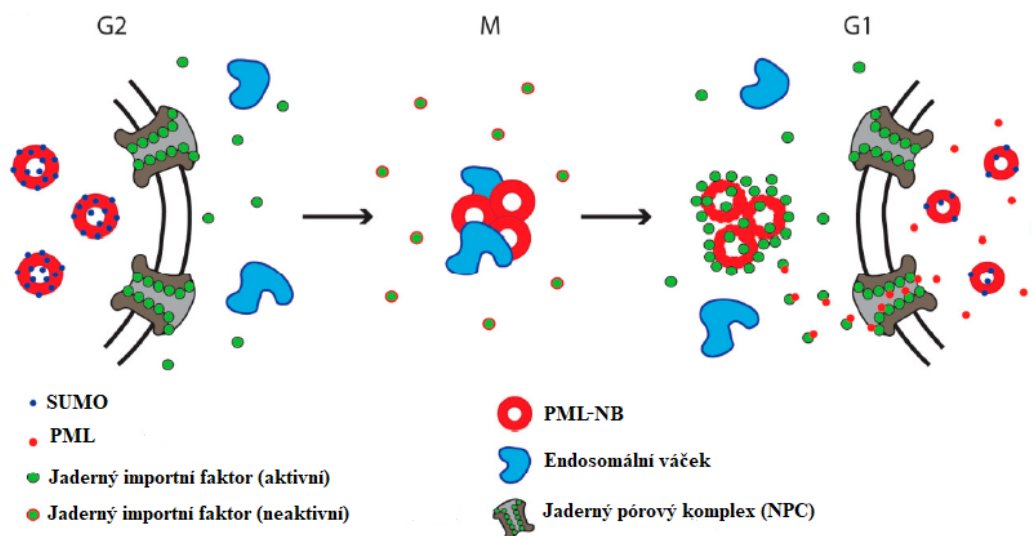
### 3.3.1. Dynamika PML-NBs během fází buněčného cyklu

PML-NBs jsou vysoce dynamické útvary u nichž dochází k biochemickým a strukturálním změnám během jednotlivých fází buněčného cyklu, jak dokazují fotografie z konfokálního mikroskopu na **Obrázku 8** (Dellaire a kol., 2006).



**Obrázek 8: Fotografie fixovaných HaCaT buněk z konfokálního mikroskopu během interfáze, metafáze a G1 fáze buněčného cyklu.** Bylo použito barvivo DAPI na obarvení jádra (modré). PML je zbarven červeně a jaderné importní faktory zeleně (Lång a kol., 2019).

Bylo zjištěno, že počet PML-NBs se zvyšuje, když buňka přechází z G1 do G2 fáze. Během těchto dvou fází jsou PML-NBs strukturálně stabilní (Dellaire a kol., 2006). Bylo pozorováno, že během S fáze dochází k mnoha rozpadům a následným fúzím v rámci PML-NBs, což vede k jejich nestabilitě (Dellaire a kol., 2006). Když je poté S fáze ukončena, tak dochází k vzrůstu počtu PML-NBs. Jelikož jsou PML-NBs schopné interagovat s chromatinem, tak se předpokládá, že se strukturální dynamika PML-NBs během S fáze odvíjí od změn topologie chromatinu během replikace DNA (Dellaire a kol., 2006). Je známo, že během M fáze jsou PML-NBs de-sumoylovány, přecházejí z jádra do cytoplazmy a společně s endosomálními váčky vytvářejí agregované struktury (Dellaire a kol., 2006). Těmito strukturám se říká mitotické akumulace proteinu PML (*mitotic accumulations of PML protein*, MAPPs), kterých je méně než klasických PML-NBs, jsou větší a liší se také tím, že neobsahují kanonické komponenty PML-NBs, kterými jsou SP100 a Daxx (Dellaire a kol., 2006). Během přechodu z M do G1 fáze dochází ke vzniku struktur zvaných cytoplazmatické akumulace PML a nukleoporinů (*cytoplasmatic nucleoporin and PML accumulations*, CyNPs), kterých jsou součástí jaderné importní faktory, které se podílí na přenosu PML z cytoplazmy do (Jul-Larsen a kol., 2009). Dynamika PML-NBs je znázorněna níže na **Obrázku 9**.



**Obrázek 9: Schématické znázornění dynamiky PML-NBs během buněčného cyklu.** Během G2 jsou PML-NBs lokalizovány v jádře. Při přechodu do M fáze jsou PML-NBs de-sumoylovány a transportovány do cytoplazmy, kde se nacházejí v podobě MAPPs. V G1 fázi dochází k přeměně MAPPs na CyNPs. Jaderný importní faktor se následně váže na PML a přes jaderný pórový komplex ho transportuje do jádra, kde se PML podílí opět na tvorbě PML-NBs (Lång a kol., 2019).

### 3.4. Interakce PML-NBs s chromatinem

V minulosti se předpokládalo, že dochází pouze k akumulaci chromatinu v okolí PML-NBs (Boisvert a kol., 2000). Později bylo však pozorováno, že některá PML-NBs mohou přímo interagovat s chromatinem (Eskiw a kol., 2004). Ukázalo se, že tyto interakce mohou hrát roli při regulaci genomu, jelikož bylo zjištěno že, PML-NBs jsou po celém genomu asociované s regulačními oblastmi aktivních genů (Kurihara a kol., 2020). Bylo demonstrováno, že PML-NBs mohou s určitými úseky genomu, kterými jsou telomery, centromery či rDNA, tvořit specifické struktury (Draskovic a kol., 2009, Luciani a kol., 2006, Hornofova a kol., 2022). Bylo také pozorováno, že uvnitř PML-NBs může být lokalizován i virový genom či faktory asociované s chromatinem, kterými mohou být histonové modifikátory či chaperony (Everett a kol., 2007).

Jak bylo zmíněno výše, PML-NBs se mohou pomocí interakce s chromatinem podílet na genové regulaci, a to konkrétně na regulaci transkripce (Kurihara a kol., 2020). Byla provedena pozorování, které dokazují, že se v PML-NBs mohou nacházet proteiny spojované s dynamikou chromatinu, které mají zároveň roli při regulaci transkripce. Těmito proteiny mohou být Daxx, HP1, CBP či ATRX (Seeler a kol., 1998, Lamorte a kol., 1998, Ishov a kol., 2004). Předpokládá se, že dochází k sekvestraci těchto faktorů do PML-NBs, kde může

docházet k jejich sumoylaci, což může potenciálně ovlivňovat aktivitu těchto faktorů (Lin a kol., 2006). Navíc bylo také ukázáno, že se v okolí PML-NBs může akumulovat nascentní RNA, což naznačuje asociaci mezi PML-NBs a transkripčně aktivním chromatinem (Boisvert a kol., 2000).

Jedním ze speciálních typů PML-NBs jsou ALT-asociovaná PML tělíska (*ALT-associated PML bodies*, APBs). Jedná se o PML-NBs obsahující telomerickou DNA, které se nacházejí pouze u rakovinných buněk, které neexprimují telomerázu (Draskovic a kol., 2009). Bylo prokázáno, že v APBs dochází k alternativnímu prodlužování telomer (*alternative telomere lengthening*, ALT) pomocí mechanismu rekombinace telemetrické DNA. Ve studii od Draskovic a kol. bylo ukázáno, že PML-NBs v ALT-pozitivních buňkách asociují s konci chromozomů a vytvářejí shluky v průměru dvou až pěti telomer (Draskovic a kol., 2009). Podstatně větší prostor je struktuře a formaci APBs a mechanismu ALT věnován v kapitole 4.3.1., respektive 4.3.2.

Jak již bylo výše zmíněno v kapitole 2.1.2., centromery a rDNA patří mezi repetitivní oblasti přispívající k nestabilitě genomu. Je zajímavé, že byla popsána interakce PML i s těmito úseky DNA, ačkoliv přesný důvod interakce a případná funkce PML nebyli zatím popsány (Hornofova a kol., 2022).

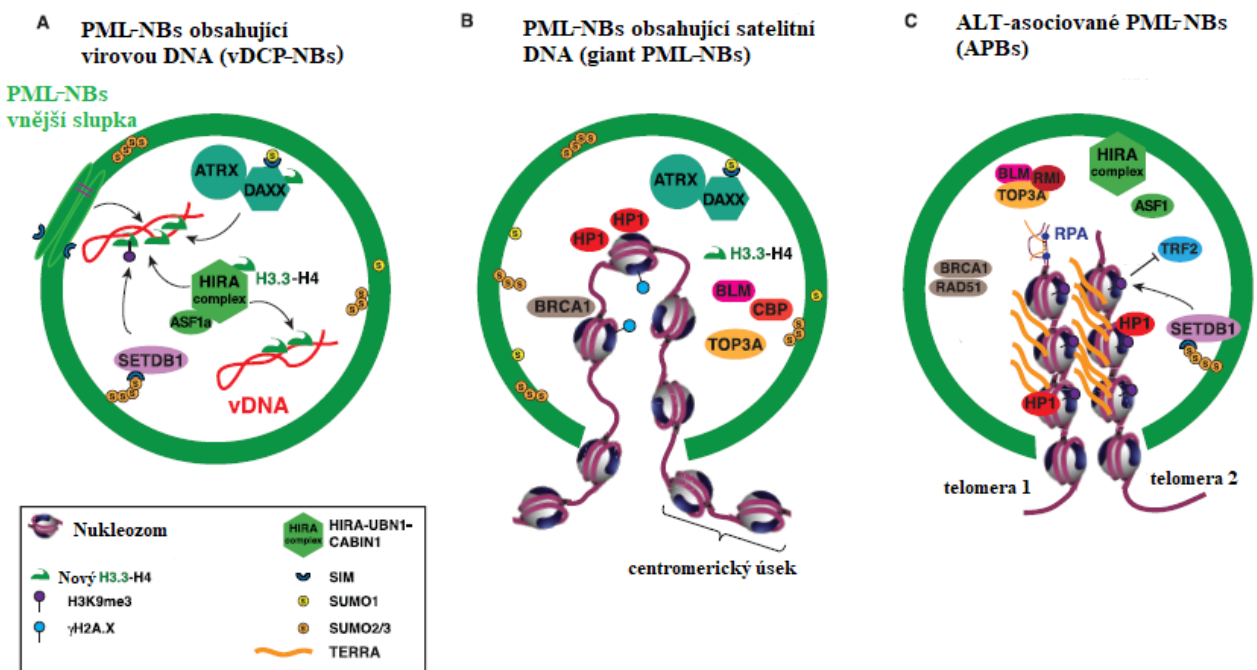
V práci od Luciani a kol. bylo ukázáno, že PML společně s proteinem HP1 vytváří tzv. giant PML bodies v blízkosti centromer a bylo zjištěno, že tyto specifické PML-NBs obsahují ve svém centru hypometylovanou DNA. Studie byla prováděna na buněčném modelu tzv. ICF syndromu, pro který je charakteristická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

V několika publikacích byla prokázána interakce PML se segregovaným jadérkem, přesněji jadéřkovou čepičkou, která obsahuje segregovanou rDNA a proteiny vázající rDNA (Janderová-Rossmeislová a kol., 2007, Condemine a kol., 2007, Bernardi a kol., 2004). Avšak důkaz přímé interakce PML s rDNA byl publikován teprve nedávno (Hornofova a kol., 2022). V této práci autoři dokázali, že PML je schopen akumulovat rDNA do tzv. PML-jadéřkového kompartmentu. Tento jev byl indukován doxorubicinem, který je inhibitoram topoizomerázy 2 a způsobuje masivní poškození DNA, inhibici transkripce pre-rRNA a segregaci jadérka (Hornofova a kol., 2022). Tento PML-jadéřkový kompartment obsahuje i fosforylovaný histon

H2A.X, který je znakem poškození DNA (Imrichova a kol., 2019). Tudiž, se předpokládá, že by PML mohl být zapojen i v opravách genů kódující rDNA (Hornofova a kol., 2022).

Ve studii od Everett a kol. byl zkoumán vztah mezi virovým genomem a PML-NBs na modelu lidských fibroblastů. Autoři pomocí fluorescenční in situ hybridizace pozorovali, že se v PML-NBs může nacházet genom Herpes simplex viru typu 1 a může docházet ke vzniku dalšího typu PML-NBs (Everett a kol., 2007). Tento další speciální typ PML-NBs se nazývá PML-NBs obsahující virovou DNA (*viral DNA-containing PML-NBs*, vDCP-PML-NBs), která obsahují většinu proteinů, se kterými PML interaguje, včetně Daxx, ATRX, HP1 či histonu H3 (Everett a kol., 2007, Cohen a kol., 2018).

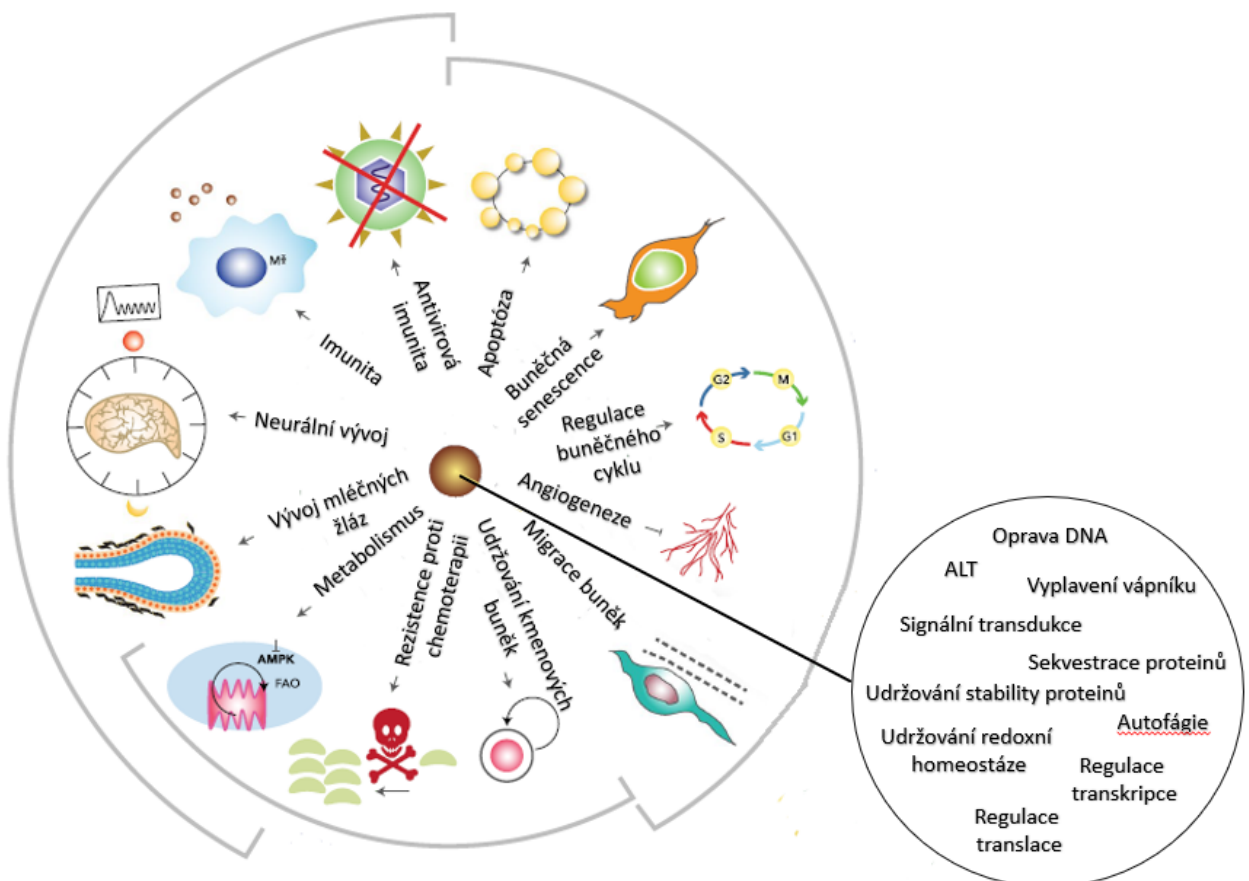
Schématické znázornění speciálních typů PML-NBs, které obsahují telomery, satelitní DNA či virovou DNA je vyobrazeno níže na **Obrázku 10**.



**Obrázek 10: Schématické znázornění speciálních struktur, které mohou PML-NBs tvořit s chromatinem. a)** Jedním ze specifických typů PML-NBs jsou vDCP-NBs obsahující virový genom. V těchto tělíčkách lze nalézt komplexy chaperonů DAXX-ATRX a HIRA. **b)** PML-NBs obsahující satelitní DNA tvoří další speciální typ zvaný giant PML-NBs, která obsahují protein HP1, komplex DAXX-ATRX, CBP, BLM či TOP3A. **c)** PML-NBs mohou s telomerickou DNA tvořit komplexy zvané APBs, které obsahují reparační faktory RAD51, BRCA1 či PRA, specifické faktory spojené s chromatinem SETDB1, ASF1 či HIRA nebo další proteiny, kterými mohou být komplex HIRA, HP1 či telomerický faktor TRF2 (Corpet a kol., 2020).

#### 4. Úloha PML v udržování stability genomu

PML je hlavním strukturálním komponentem PML-NBs hrajících roli při mnoha buněčných a fyziologických procesech, kterými mohou být potlačování nádorů, metabolismus, imunitní odpověď, neurální vývoj, angiogeneze či při migraci buněk, jak je schematicky znázorněno na **Obrázku 11** (shrnutí v Hsu a Kao, 2018). V této kapitole je rozebrána úloha PML a PML-NBs při udržování stability genomu. Na udržování genomové stability se PML a PML-NBs podílí svou účastí při regulaci buněčného cyklu (Ivanschitz a kol., 2015), opravě DNA (Dellaire, a kol., 2006), alternativním prodlužování telomer u nádorových buněk (Zhang a kol., 2019) a při ochraně proti virové infekci (Kim a Ahn, 2015). Při těchto procesech se PML uplatňuje jako stavební komponent PML-NBs, který má zároveň schopnost interagovat se sumoylovanými proteiny a vnášet je do PML-NBs. Nicméně, cytosolická isoforma PML je sama o sobě schopna indukovat apoptózu pomocí vápníkové signalizace či modulace signalizace růstového faktoru  $\beta$  (shrnutí v Hsu a Kao, 2018).



**Obrázek 11: Schématické znázornění funkcí PML-NBs.** PML-NBs může hrát roli v mnoha buněčných a fyziologických procesech včetně imunitní odpovědi, metabolismu, migraci buněk či angiogenezi. Na udržování genomové stability se PML-NBs konkrétně podílejí během regulace buněčného cyklu, buněčné senescence, apoptózy, opravy DNA, alternativním prodlužování telomer a antivirové imunitě (Hsu a Kao, 2018).



#### 4.1. Role PML jako nádorového supresoru

Jelikož PML hraje roli během indukce buněčné senescence či apoptózy, které jsou považovány za zásadní mechanismy, které předcházejí transformaci a nekontrolovatelnému růstu poškozených buněk, je PML přisuzován tumor-supresorový potenciál (shrnutí v Gamell a kol., 2014).

Konkrétní mechanismy, kterými PML přispívá k nádorové supresi, byly ukázány v průběhu minulých desetiletí (shrnutí v Hsu a Kao, 2018). Jedno z nejdůležitějších zjištění bylo, že PML je schopen stabilizovat tumor supresorový protein p53, což může vést k buněčné senescenci či apoptóze nádorových buněk (de Stanchina a kol., 2004). Dalším důležitým zjištěním bylo, že se PML může na indukci apoptózy podílet i jinak než pomocí interakcí s p53, a to konkrétně indukcí vylití vápenatých iontů z endoplazmatického retikula či indukcí exprese pro-apoptotických genů pomocí sekvestrace proteinu DAXX (Li a kol., 2000, Giorgi a kol., 2010). Dále bylo ukázáno, že PML může hrát roli při buněčné senescenci indukovanou pomocí onkogenního K-RAS, vzhledem k tomu, že PML může být K-RAS regulován (Ferbeyre a kol., 2000, Scaglioni a kol., 2012). Bylo také zjištěno, že PML je regulován kinázami ATR a Chk2, které se podílejí na odpovědi na poškození DNA, a tím pádem PML může hrát roli při apoptóze indukovanou poškozením DNA (Bernardi a kol., 2004).

To, že má PML schopnost ovlivňovat stabilitu genomu, bylo nejprve naznačeno na myším modelu s úplnou deficiencí PML (Wang a kol., 1998). Ve studii od Wang a kol. bylo dokázáno, že PML může negativně ovlivňovat buněčný růst a může fungovat jako nádorový supresor. Autoři této studie dokázali, že buňky myších embryonálních fibroblastů (*mouse embryonal fibroblasts*, MEFs), které byly deficientní v PML, rostly rychleji než MEFs, které PML měly (Wang a kol., 1998). Inaktivace PML navíc vedla ke schopnosti MEFs formovat kolonie. Deficience v PML neovlivnila životaschopnost myši. Tyto myši vykazovali stejné fenotypové znaky jako kontrolní myši, ale byly náchylné k různým infekcím, což znemožnilo anlyzu spontánního vývoje nádorů. Proto autoři provedli experiment, při kterém byl iniciátor nádorů vpraven do slinných žláz PML-deficientní myši a myši, která měla PML (Wang a kol., 1998) Výsledky prokázaly, že u PML-deficientní myši se vyvinulo více nádorů než u kontrolní myši. (Wang a kol., 1998).

Dále bylo zjištěno, že v mnoha nádorech je hladina PML snižena (Zhang a kol., 2000, Gambacorta a kol., 1996, Gurrieri a kol., 2004) a naopak nadprodukce PML v rakovinných liniích způsobuje zástavu buněčného cyklu a následnou apoptózu či buněčnou senescenci, což podporuje tvrzení, že PML může mít úlohu při potlačování nádorů (Chin a kol., 1994, Mu a kol., 1997).

Bylo však pozorováno, že za určitých okolností se PML nemusí chovat jako nádorový supresor a může naopak přispívat k rozvoji nádorů (Ito a kol., 2008, Carracedo a kol., 2012). Bylo totiž objeveno, že PML hraje roli při přežívání hematopoetických kmenových buněk (*hematopoietic stem cells*, HSCs) a buněk rakoviny prsu pomocí aktivace PPAR $\gamma$  signální dráhy a oxidace mastných kyselin (*fatty acid oxidation*, FAO) (Ito a kol., 2008, Carracedo a kol., 2012).

Autoři studie od Ito a kol. ukázali, že PML má schopnost podporovat asymetrické dělení HSCs, což vede k udržování populace těchto buněk (Ito a kol., 2008). Toto zjištění podnítilo studii nového způsobu léčby chronické myeloidní leukemie (*chronic myeloid leukemia*, CML), k jejíž rozvoji přispívají buňky iniciující leukemii (*leukemia-initiating cells*, LICs) — vzácný typ buněk podněcující rakovinu, které disponují podobnými vlastnostmi jako HSCs (Ito a kol., 2008). Předpokládá se, že ztráta PML by mohla vést k vystoupení LICs z klidového stavu a následnému vyčerpání buněk, což by mohlo vést k zamezení rozvoje CML (Ito a kol., 2008).

Jak už bylo zmíněno výše, PML podporuje také přežívání buněk rakoviny prsu (Carracedo a kol., 2012). PML rekrutuje do PML-NBs deacetylázu SIRT1, která acetyluje protein PGC1A, což vede k aktivaci PPAR $\gamma$  signální dráhy a FAO. FAO vede v mitochondriích ke zvyšování koncentrace ATP a podněcuje buněčnou proliferaci (Carracedo a kol., 2012).

Vzhledem k těmto výsledkům může cílená degradace PML představovat další způsob, jak léčit CML a rakovinu prsu (Ito a kol., 2008, Carracedo a kol., 2012).

#### **4.2. Role PML a PML-NBs v regulaci buněčného cyklu**

Regulace buněčného cyklu v reakci na poškození DNA zajišťuje, že buňky s poškozenou DNA zůstávají zastavené a vracejí se do buněčného cyklu pouze v případě úspěšné opravy. Buňky s neopraveným/neopravitelným poškozením buď spustí apoptotický program nebo vyvinou buněčnou senescenci. Proliferace buněk s poškozenou DNA vede k akumulacím chyb a nestabilitě genomu (shrnuto v Jackson a Bartek, 2009). Těchto procesů se účastní i PML, především regulací buněčného cyklu, navozením buněčné senescence a apoptózy (de Stanchina a kol., 2004).

Je známo, že PML je schopen interagovat s regulátory buněčného cyklu a vnášet je do PML-NBs, kde se odehrávají post-translační modifikace těchto regulátorů, které vedou k jejich aktivaci a stabilizaci. Tyto regulátory jsou poté schopny aktivovat transkripci genů iniciujících buněčnou senescenci či apoptózu (Ferbeyre a kol., 2000, Guo a kol., 2000, Vernier a kol., 2011).



Jeden z nejdůležitějších regulátorů buněčného cyklu, se kterým PML interaguje je p53. Jedná se o nádorový supresor, který je aktivován v důsledku poškození DNA a podílí se na buněčné odpovědi tím, že rozhoduje, zda dojde k opravám DNA nebo buňka podstoupí buněčnou smrt (shrnutí ve Vousden a kol., 2009). PML váže p53 a mnoho jeho regulátorů a směřuje je do PML-NBs, a tím umožňuje posttranslační modifikace, které stabilizují a aktivují p53 (de Stanchina a kol., 2004, Ferbeyre et al., 2000, Ivanschitz a kol., 2015). Těmito regulátory jsou protein kináza interagující s homeodoménou 2 (*homeodomain-interacting protein kinase 2*, HIPK2), acetyltransferáza CREB-vázajícím proteinem (*CREB-binding protein*, CBP) či acetyltransferáza monocytální leukemický zinc finger (*monocytic leukemia zinc finger*, MOZ) protein (Sung a kol., 2011, Rokudai a kol., 2013). Aktivovaný p53 je poté uvolněn z PML-NBs a aktivuje transkripci genů, které navozují buněčnou senescenci či apoptózu (Ferbeyre et al., 2000, Pearson a kol., 2000, Guo a kol., 2000, D'Orazi a kol., 2002, Bernardi a kol., 2004).

Kromě p53 a jeho regulátorů, je PML v jádře schopna interagovat s mnoha dalšími proteiny regulujícími buněčný cyklus a vnášet je do PML-NBs. Těmito proteiny mohou být ARF, pRb, TBX2, Mdm2 či Daxx. Cytoplazmatická isoforma PML VII může také indukovat apoptózu pomocí modulací signalizace růstového faktoru  $\beta$  či pomocí vylití vápenatých iontů z endoplazmatického retikula (Ivanschitz a kol., 2015, Vernier a kol., 2011, Martin a kol., 2012, Bernardi a kol., 2004, Li a kol., 2000, Lin a kol., 2004, Giorgi a kol., 2010).

V následujících dvou kapitolách bude popsána úloha PML při indukci buněčné senescence a apoptózy.

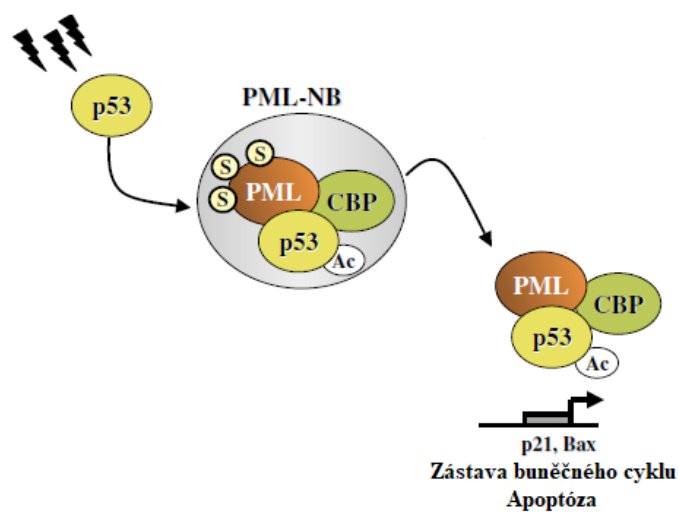
#### **4.2.1. Role PML a PML-NBs při buněčné senescenci**

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

V závislosti na různých formách buněčného stresu, kterým může být mimo jiné poškození DNA, je do PML-NBs přechodně lokalizována celá řada regulátorů buněčné senescence, kterými jsou p53, CBP, MOZ, ARF, pRb či TBX2 (de Stanchina a kol., 2004, Rokudai a kol., 2013, Ivanschitz a kol., 2015, Vernier a kol., 2011, Martin a kol., 2012).

Jak už bylo napsáno výše, PML může interagovat s transkripčním faktorem p53, který podporuje buněčnou senescenci v odpovědi na různé podněty, kterými mohou být poškození DNA nebo působení onkogenu (de Stanchina a kol., 2004). Důležitost vztahu mezi PML a p53 podporuje zjištění, že buňky, které postrádají PML, vykazují sníženou ochotu indukovat buněčnou senescenci v odpovědi na aktivaci p53 (de Stanchina a kol., 2004).

Jedním z regulátorů, které se mohou podílet na post-translační modifikaci p53, je acetyltransferáza CBP, která v PML-NBs zprostředkovává acetylaci p53 na lysinu 372 a 382 (Pearson a kol., 2000). Bylo dokázáno, že v důsledku působení onkogenu Ras se p53 a CBP lokalizuje do PML-NBs, kde dojde k vytvoření proteinového komplexu PML-p53-CBP, jak je vyobrazeno na **Obrázku 12**. Poté co dojde k modifikaci a aktivaci p53, je p53 de-lokalizován z PML-NBs a spouští transkripci genů, které se podílejí na zástavě buněčného cyklu, kterými mohou být p21 či Bax (Pearson a kol., 2000). Zástava buněčného cyklu umožní opravu poškození DNA. Pokud se poškození nepodaří opravit, tak dochází k buněčné senescenci (Pearson a kol., 2000). Je nutné poznamenat, že CBP se může podílet i na indukci apoptózy (Guo a kol., 2000).



**Obrázek 12: Schématické znázornění indukce zástavy buněčného cyklu pomocí p53.** Poté co je p53 lokalizován do PML-NBs, je post-translačně modifikován pomocí CBP, což vede k jeho aktivaci. P53 je poté de-lokalizován z PML-NBs a váže se do regulačních oblastí genů a spouští zástavu buněčného cyklu (Bernardi a Pandolfi, 2003).

Dalším regulátorem p53 je protein MOZ, který je schopen přímo interagovat s PML a díky této vazbě je vnášen do PML-NBs. V PML-NBs následně vznikne proteinový komplex MOZ-PML-p53, který umožňuje post-translační modifikaci p53 acetyltransferázou MOZ (Rokudai a kol., 2013). Touto modifikací je acetylace lysinu na pozici 120 a 382, která vede k aktivaci p53. Aktivovaný p53 je poté schopen indukovat expresi genu pro p21 a umožňovat předčasnou buněčnou senescenci (Rokudai a kol., 2013).

Vztah PML a MOZ byl zkoumán ve studii od Rodukai a kol. na MOZ-deficientních MEFs, které exprimovaly PML a bylo pozorováno, že došlo k potlačení buněčné senescence (Rokudai a kol., 2013). Tyto výsledky naznačují, že ztráta MOZ vede u buněk k rezistenci na PML-indukovanou buněčnou senescenci. Bylo také zjištěno, že aminokyselinová sekvence proteinu

MOZ obsahuje vazebný motiv pro kinázu Akt a že fosforylace proteinu MOZ kinázou Akt má negativní vliv na formaci komplexu MOZ-PML, jehož vznik je důležitý pro modifikaci a aktivaci p53, jak bylo popsáno výše. Tímto kináza Akt zabraňuje p53, aby aktivoval své cílové geny. Pro aktivaci p53 je tedy nutná inaktivace Akt a je předmětem dalšího studia, zda k potlačení Akt může docházet v PML-NBs (Rokudai a kol., 2013).

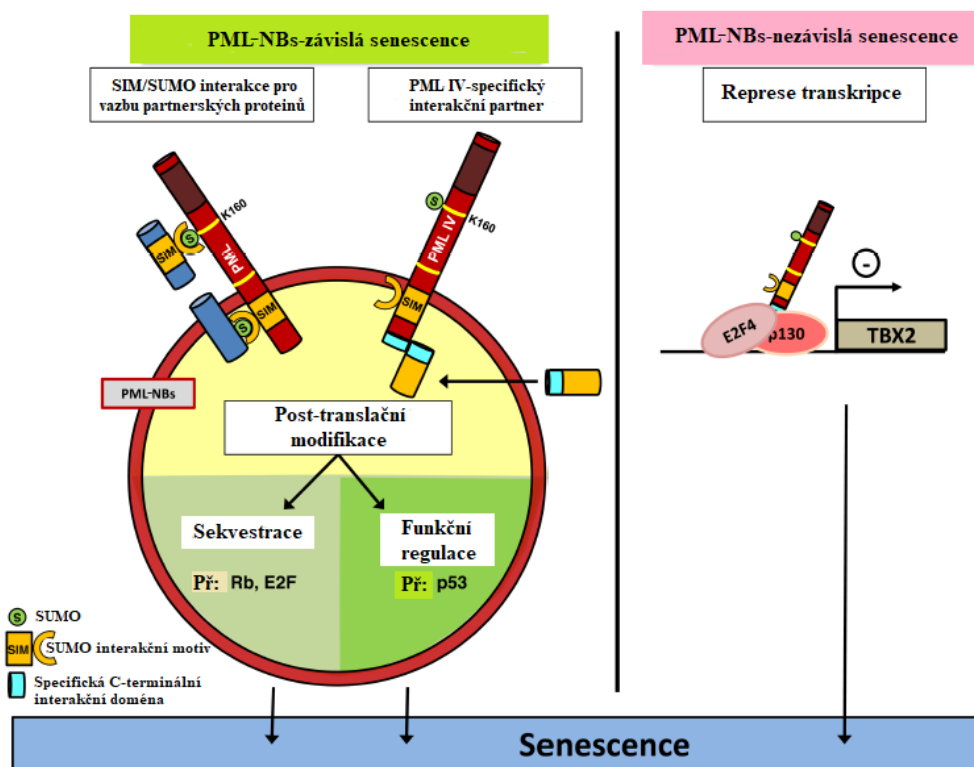
Dalším způsobem, jak PML reguluje stabilitu p53, je interakce s nádorovým supresorem p14ARF (*alternative reading frame*, ARF). ARF se specificky váže na C-konec PML a tím se relokalizuje do PML-NBs. Tato interakce poté způsobí stabilizaci SUMO-ligázy UBC9, a tím dojde k sumoylaci a stabilizaci p53 (Ivanschitz a kol., 2015). PML-NBs tudíž fungují jako platforma pro interakce mezi ARF, UBC9 a dalšími regulátory p53 a podporují sumoylaci a následnou aktivaci signální dráhy p53 (Ivanschitz a kol., 2015).

PML se podílí také na p53-nezávislé indukci senescence (Vernier a kol., 2011, Martin a kol., 2012).

PML může ovlivňovat buněčnou senescenci závislou na pRb (Vernier a kol., 2011). Signální dráha pRb kontroluje buněčný cyklus na transkripční úrovni skrze potlačení cílových genů pro E2F, které podporují proliferaci (Vernier a kol., 2011, Chicas a kol., 2010, Müller a kol., 2001). PML indukuje buněčnou senescenci blokováním aktivity E2F v asociaci s pRb. Komplexy pRb/E2F se váží na PML a jsou vnášeny do struktury PML-NBs, což vede k inhibici exprese cílových genů pro E2F, blokaci buněčné proliferace s rozvojem buněčné senescence (Vernier a kol., 2011). Vazba PML a pRb pomocí interakčního motivu LXCXE na pRb je důležitá pro reorganizaci chromatinu na promotorech genů buněčného cyklu, což vede k permanentnímu zastavení buněčného cyklu (Talluri a Dick, 2014). Mnoho proteinů nutných pro remodelaci je přechodně lokalizováno v PML-NBs před tím, než se integrují do míst heterochromatinu na cílových genech buněčného cyklu (Vernier a kol., 2011).

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

Schématické znázornění toho, jak může PML ovlivňovat senescenci je zobrazeno níže na **Obrázku 13**.



**Obrázek 13: Schéma mechanismů indukce senescence pomocí PML.** PML indukuje senescenci na PML-NBs závislou nebo nezávislou. PML přenáší partnerské proteiny do PML-NBs pomocí sumoylace na zbytku K160. PML IV interaguje s partnerskými proteiny pomocí specifické interakční domény na C-konci. Tyto interakce podporují posttranslační modifikace proteinů, které kontrolují senescenci – p53 a E2F. PML může také fungovat nezávisle na struktuře PML-NBs, například jako transkripční modulátor cílových genů (Ivanschitz a kol., 2013).

Bylo pozorováno, že PML může mít funkci při zprostředkování buněčné senescence indukované působením vlivu určitých látek, kterými mohou být onkogen Ras či interferony (Ferbeyre a kol., 2000, de Stanchina a kol., 2004, Fu a kol., 2015).

Bylo totiž dokázáno, že exprese PML se zvyšuje během buněčné senescence indukované onkogenem Ras a během replikační senescence (Ferbeyre a kol., 2000). Především bylo ale dokázáno, že PML deficientní MEFs vykazují sníženou schopnost podstoupit buněčnou senescenci indukovanou onkogenem Ras (de Stanchina a kol., 2004).

Kromě Ras-indukované senescence, se PML může také podílet na indukcii buněčné senescence v důsledku působení interferonu  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), což bylo demonstrováno ve studii od Fu a kol., ve které byly použity lidské mesenchymální stromální buňky (human mesenchymal stromal cells, hMSCs), ve kterých je PML stabilně exprimován a je důležitý pro zachování normální proliferativní funkce hMSCs (Sun a kol., 2013, Fu a kol., 2015). Autoři studie ukázali, že indukce buněčné senescence pomocí IFN- $\alpha$  byla v hMSCs doprovázena zvýšenou expresí

PML. Naopak potlačení exprese PML vedlo k utlumení IFN- $\alpha$ -indukované buněčné senescence (Fu a kol., 2015).

Jelikož existují studie, které dokazují, že se PML podílí na indukci senescence a má úlohu při opravách DNA, se předpokládalo, že PML může mít roli i v senescenci indukovanou poškozením DNA (Vernier a kol., 2011, Dellaire a kol., 2006).

Ve studii od Münch a kol. byl analyzován vztah mezi poškozením DNA vzniklém v důsledku ionizujícího záření a buněčnou senescencí v přítomnosti a absenci PML (Münch a kol., 2014). V této práci byly lidské fibroblasty a MEFs vystaveny ionizujícímu záření a bylo prokázáno, že PML-NBs asociují s přetrvávajícími místy poškození DNA v senescentních buňkách. Navzdory tomu, že PML hraje roli při buněčné senescenci, tak autoři studie na lidských fibroblastech a MEFs ukázali, že PML nemusí hrát významnou roli při senescenci indukovanou poškozením DNA. Bylo totiž pomocí super-rezoluční mikroskopie prokázáno, že faktory podílející se na odpovědi na poškození DNA – p53, p21, p16, fosfo-NBS1, MDC11 a 53BP1 se nenacházeli v PML NBs během odpovědi na poškození DNA ani v senescentních buňkách (Münch a kol., 2014). Navíc bylo pomocí knock-outu PML v MEFs, které byly vystaveny ionizujícímu záření pozorováno, že absence PML nenarušuje odpověď na poškození DNA a ani významně nenarušuje senescenci indukovanou poškozením DNA. Autoři studie nicméně poukazují na možnost, že asociace PML s přetrvávajícími poškozeními DNA může být buněčným signálem pro indukci buněčné senescence či apoptózy a PML může být jedním z mnoha faktorů, který se na této signalizaci podílí (Münch a kol., 2014).

#### **4.2.2. Role PML a PML-NBs při apoptóze**

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

V důsledku buněčného stresu, jehož příčinou může být mimo jiné poškození DNA, jsou do PML-NBs přechodně lokalizovány regulátory apoptózy, kterými mohou být p53, HIPK2, CBP, Mdm2 či Daxx (Guo a kol., 2000, Sung a kol., 2011, Bernardi a kol., 2004, Li a kol., 2000).

PML je důležitý jak pro p53-závislou apoptózu, která je spouštěna na základě odpovědi na genotoxický stres (Wang a kol., 1998), tak i pro p53-nezávislou, která je indukována pomocí ligandu Fas (Zhong a kol., 2000, Wang a kol., 1998). Bylo zjištěno, že PML deficientní buňky mají pozměněnou expresi cílových genů p53 a hůře indukují apoptózu po genotoxickém stresu. Tyto výsledky potvrzují roli PML při apoptóze indukované p53 (Guo a kol., 2000).

Jak už bylo poznamenáno v předešlé kapitole, acetyltransferáza CBP se mimo indukce předčasné buněčné senescence v důsledku působení onkogenu Ras může podílet také na indukci apoptózy v odpovědi na poškození DNA, a to podobným molekulárním mechanismem, který byl popsán v předchozí kapitole (Guo a kol., 2000). Poté co je však p53 aktivován pomocí CBP, tak aktivuje transkripci genů podněcujících apoptózu (Guo a kol., 2000).

Dalším post-translačním regulátorem p53, který se podílí na indukci apoptózy, je kináza HIPK2. V PML-NBs dochází pomocí HIPK2 k fosforylaci p53 na Ser46, což vede k aktivaci p53, který je následně de-lokalizován z PML-NBs a aktivuje transkripci pro-apoptotických genů (Sung a kol., 2011). Ve studii od Sung a kol. bylo pozorováno, že HIPK2 interaguje s PML I a PML IV pomocí interakčního motivu SIM, který se nachází jak na PML, tak i na HIPK2. Autoři studie toto pozorování podpořili experimentem, při kterém bylo dokázáno, že wild-type HIPK2 se vázala silněji na sumo-konjugovaný PML IV než s PML IV bez sumo modifikace, zatímco HIPK2 s mutací v SIM se nebyla schopna na sumo-modifikovaný PML IV vázat (Sung a kol., 2011). Navíc bylo objeveno, že u HIPK2 mutantní v SIM byla znemožněna fosforylace p53 na Ser46. Tyto výsledky naznačují, že sekvestrace HIPK2 pomocí motivu SIM do PML-NBs je důležitá pro aktivaci p53 a indukci apoptózy (Sung a kol., 2011).

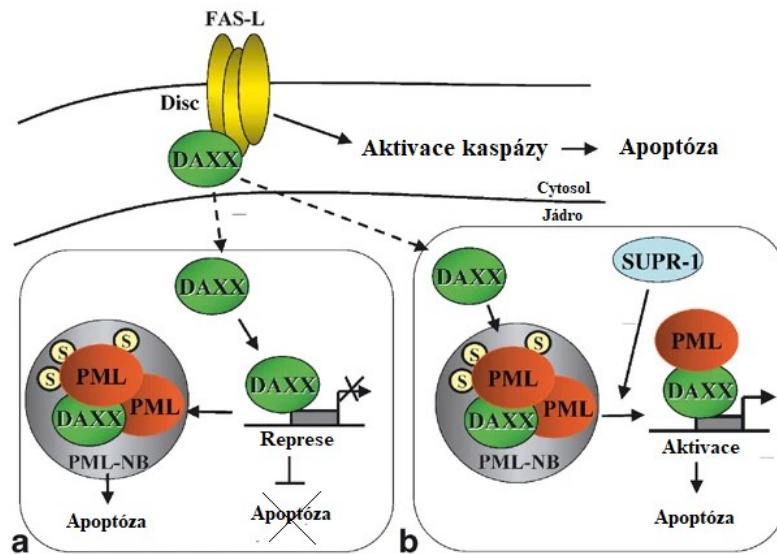
Vztah mezi PML, p53 a apoptózou byl popsán také ve studii od Louria Hayon a kol. (Louria-Hayon a kol., 2003). Autoři ukázali, že PML hraje klíčovou roli pro stabilizaci p53 v odpovědi na poškození DNA. PML chrání p53 před ubiquitinací zprostředkovanou Mdm2 a tím zamezuje jeho degradaci, která by vedla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

Další práce, která ukazuje na schopnost PML stabilizovat p53 a tím indukovat apoptózu je práce Bernardi a kol. (Bernardi a kol., 2004). Autoři ukazují, že PML po genotoxickém stresu interaguje s ubiquitin ligázou Mdm2 a sekvestruje tento protein do jádérka. Tím dochází k stabilizaci p53 a aktivaci apoptózy (Bernardi a kol., 2004).

PML může regulovat apoptózu také nezávisle na p53, a to lokalizací DAXX do PML-NBs, modulací signalizace růstového faktoru  $\beta$  či pomocí vápníkové signalizace (Li a kol., 2000, Lin a kol., 2004, Giorgi a kol., 2010).

Kanonickou součástí PML-NBs je transkripční faktor DAXX, protein, jenž byl původně spojován s buněčnou smrtí zprostředkovanou pomocí FAS (Li a kol., 2000). Apoptotické signály indukované FAS jsou iniciovány na plazmatické membráně signálním komplexem indukujícím smrt (*death-induced signal complex*, DISC) (Morgan a kol., 2009). DAXX má schopnost potlačovat transkripci antiapoptotických genů, což má za následek, že apoptóza

běží. V případě lokalizace DAXX do PML-NBs jsou antiapoptotické geny transkribované a apoptóza neběží (Li a kol., 2000). Model kooperace PML s DAXX je znázorněn níže na **Obrázku 14**.



**Obrázek 14: Schéma kooperace PML a DAXX při indukci apoptózy.** DAXX interaguje s FAS na membráně. Když se FAS ligand naváže na FAS receptor, tak mohou být aktivovány dvě apoptotické dráhy. **(a)** DAXX je translokován do jádra a společně s PML indukuje apoptózu. DAXX je transkripční represor a PML potlačuje jeho funkci. PML potlačuje represi transkripce anti-apoptotických genů zprostředkovanou DAXX tím, že sekvstruje DAXX do PML-NBs. **(b)** Vazba PML s DAXX může vést také k aktivaci apoptózy. Komplex PML/DAXX může být totiž transportován ven z PML-NBs pomocí PML desumoylázy SUPR-1 (Bernardi a Pandolfi, 2003).

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

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

## 4.2. Role PML a PML-NBs v opravě DNA

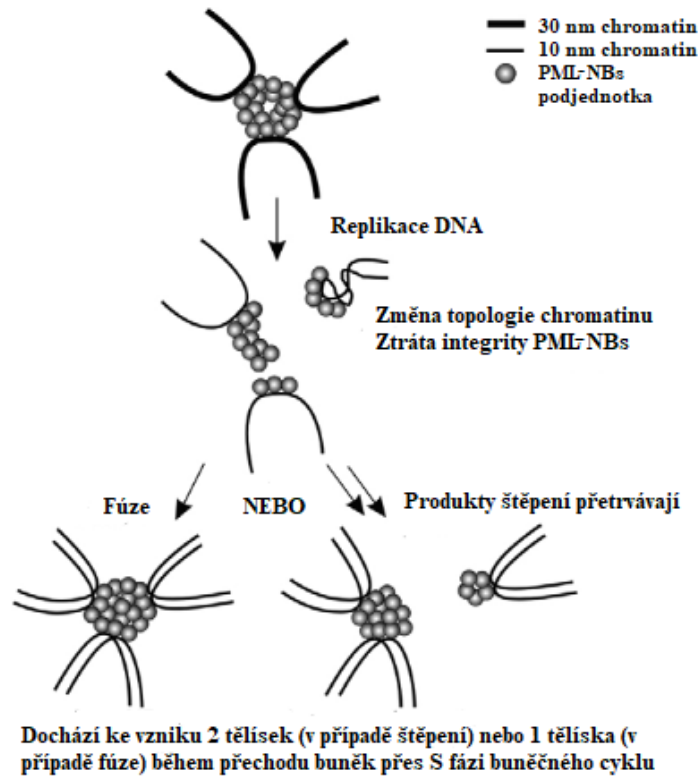
Od začátku nového tisíciletí až po současnost byly provedeny studie, které naznačují úlohu PML při opravách DNA (Dellaire a kol., 2006, Boichuk a kol., 2011, Yeung a kol., 2012, Voisset a kol., 2018, Vancurova et al., 2019, Attwood a kol., 2020).

V současné době je známo, že koncentrace PML-NBs se zvyšuje v důsledku poškození DNA (Dellaire a kol., 2006). Je také známo, že PML může interagovat s mnoha opravnými proteiny a sekvestrovat je do PML-NBs (Dellaire a kol., 2006, Carbone a kol., 2002, Vaitiekunaite a kol., 2007). Byly také provedeny studie, které dokazují schopnost PML asociovat s těžce opravitelnými lézemi DNA a úlohu PML při homologní rekombinaci (Vancurova et al., 2019, Boichuk a kol., 2011, Yeung a kol., 2012). Nedávné studie poukazují na to, že PML může ovlivňovat kvalitu oprav dvouvláknových zlomů DNA (Vancurova et al., 2019, Voisset a kol., 2018, Attwood a kol., 2020). Nicméně, přesná role PML při opravných mechanismech DNA je zatím předmětem dalších studií (shrnutí v Chang a kol., 2018).

Že by PML-NBs mohly hrát roli při opravách DNA se nejprve předpokládalo vzhledem k tomu, že PML-NBs mají schopnost interagovat s chromatinem a jejich dynamika se v S fázi buněčného cyklu mění v závislosti na topologických změnách chromatinu v důsledku replikace DNA (Dellaire a kol., 2006).

Ve studii od Dellaire a kol. bylo dokázáno, že PML-NBs mohou fungovat jako senzory poškození DNA (Dellaire a kol., 2006). V této studii byly buňky lidských diploidních fibroblastů vystaveny ionizujícímu záření a bylo ukázáno, že v odpovědi na poškození DNA se koncentrace PML-NBs v jádře zvyšuje (Dellaire a kol., 2006). Bylo také dokázáno, že nárůst počtu PML-NBs může být způsoben štěpením PML-NBs na mikrotělíška v důsledku vytahování chromatinu ze vnitřní struktury PML-NBs v reakci chromatinu na poškození DNA, jak je ukázáno níže na **Obrázku 15** (Dellaire a kol., 2006).





**Obrázek 15: Znázornění mechanismu rozpadu PML-NBs na mikrotělíska.** Během replikace DNA, ke které dochází v S fázi, se mění topologie chromatinu a chromatin od sebe odtrhne jednotlivé části PML-NBs za vzniku většího množství mikrotělísek. Poté se mikrotělíska mohou buď znovu spojit nebo od sebe zůstanou oddělena (Dellaire a kol., 2006)

V následujících dvou kapitolách je popsána asociace PML s reparačními faktory, a především role PML při opravách dvouvláknových zlomů.

#### 4.2.1. Asociace PML s reparačními faktory

Bylo dokázáno, že PML-NBs se nachází v místech reparace DNA a v reakci na různé typy poškození DNA interaguje s mnoha opravnými proteiny, které mohou být pomocí interakce s PML přechodně lokalizovány do PML-NBs (shrnuto v Chang a kol., 2018).

Těmito proteiny jsou kinázy regulující buněčný cyklus – ATM, ATR a Chk2 (Dellaire a kol., 2006), proteiny MRN komplexu – NBS1, Mre11 a Rad50 (Carbone a kol., 2002), helikázy z rodiny RecQ – BLM a WRN (Vaitiekunaite a kol., 2007) nebo také reparační faktory Rad51, RPA a BRCA1 (Attwood a kol., 2020).

#### 4.2.2. Úloha PML a PML-NBs při opravách dvouvláknových zlomů

Jak už bylo napsáno v kapitole 3.1.1., dvouvláknové zlomy jsou považovány za hlavní příčinu nestability genomu. Tudiž, PML se svou účastí na opravných mechanismech dvouvláknových zlomů podílí na udržování genomové stability (shrnutí v Chang a kol., 2018).

V minulém desetiletí byly provedeny studie, které prokazují úlohu PML-NBs při homologní rekombinaci (Boichuk a kol., 2011, Yeung a kol., 2012).

Ve studii od Boichuk a kol. byl na modelu simian viru 40 (SV40) demonstrován funkční vztah mezi PML a opravným proteinem Rad51 v rámci homologní rekombinace. Je známo, že SV40 iniciuje svou replikaci v blízkosti PML-NBs a také, že SV40 velký antigen T (*large T antigen*, LT) indukuje poškození DNA včetně dvouvláknových zlomů, na jejichž reparaci se podílí mimo jiné protein Rad51, který může být, ale také sekvestrován do PML-NBs (Boichuk a kol., 2011). Předpokládalo se tudíž, že by LT mohl faktory potřebné pro replikaci a reparaci virového genomu čerpat z PML-NBs. Tento předpoklad podpořil experiment, ve kterém bylo na opičích jaterních buňkách COS-1 a lidských buňkách U2OS exprimujících LT dokázáno, že knockdown v PML potlačuje virovou replikaci (Boichuk a kol., 2011). V dalším experimentu bylo na buňkách lidských fibroblastů exprimujících LT pomocí imunofluorescence analyzováno, zda je lokalizace ohniska proteinu Rad51 závislá na PML. Výsledek experimentu dokazuje, že ohnisko Rad51 je lokalizováno v blízkosti PML a že knockdown PML způsobil redukcí hladiny Rad51 (Boichuk a kol., 2011). Dále byly lidských fibroblastů buňky vystaveny ionizujícímu záření, které způsobuje dvouvláknové zlomy stejně jako LT a bylo demonstrováno, že knockdown v PML způsobil snížení množství Rad51 v místě poškození DNA. Tyto výsledky dokazují, že PML je nutný pro akumulaci Rad51 do míst dvouvláknových zlomů v důsledku exprese LT a působení ionizujícího záření (Boichuk a kol., 2011).

Studie od Yeung a kol. a Bischof a kol. se zabývaly tím, jaký krok PML v rámci HRR reguluje (Yeung a kol., 2012, Bischof a kol., 2001).

V této studii byl v buňkách lidského fibrosarkomu proveden knockdown genu pro PML pomocí RNA interference a tyto buňky byly následně vystaveny ionizujícímu záření (Yeung a kol., 2012). Deficience PML způsobila potlačení formace PML-NBs a redukcí oprav pomocí mechanismu HRR, nicméně buňky deficientní v PML vykazovaly normální indukci fosforylace histonu H2AX a lokalizaci Rad51 do míst poškození. Tyto pozorování naznačují, že se PML nepodílí na regulaci časných kroků HRR, nýbrž může ovlivňovat pozdní kroky HRR (Yeung a kol., 2012).

Mnoho výsledků naznačuje, že PML může regulovat poslední krok HRR, tedy rozložení struktury DNA heteroduplexu na výsledné produkty oprav. Tato regulace by se dala objasnit

tím, že helikázy BLM a WRN, mající roli při rozložení heteroduplexu DNA, jsou schopny interagovat s PML a být sekvestrovány do PML NBs (Bischof a kol., 2001). Studie od Zhong a kol. ukazuje, že v PML deficientních MEFs, které byly vystaveny ionizujícímu záření, došlo ke zvýšení frekvence výměn sesterských chromatid během metafáze oproti kontrolním MEFs, což může naznačovat defekty v rozložení heteroduplexu DNA (Zhong a kol., 1999).

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

Výsledky studie od Voisset a kol. ukazují, že PML-NBs jsou determinanty kvality oprav DNA pomocí mechanismů HRR a NHEJ. V této studii byly použity MEF nesoucí bodovou mutaci (C6A2/C65A) v RING doméně PML, která způsobuje rozpad PML-NBs (Voisset a kol., 2018). Tento experimentální přístup ukázal, že přesnost HRR a NHEJ byla výrazně nižší v Pml<sup>C6A2/C65A</sup> MEFs v porovnání s Pml<sup>WT</sup>, což dokazuje vliv PML (PML-NBs) na efektivitu oprav DNA (Voisset a kol., 2018). V roce 2019 studie od Vančurové a kol. poukázala na roli PML při opravě přetrvávajících, těžce opravitelných lézí vzniklých působením ionizujícího záření (*persisting IR-induced foci*, pIRIF) (Vancurova a kol., 2019). V experimentu byly použity lidské primární PML-deficientní buňky, jejichž pomocí se prokázalo, že PML-deficience vede k vyšší citlivosti k poškození DNA, které způsobuje léze DNA dominantně opravované pomocí mechanismu HRR. Vliv jednotlivých isoform PML, ale také deficience v PML na úspěšnost oprav DNA pomocí HRR byl popsán v práci Attwoodové a kol. (Attwood a kol., 2020). Autoři sledovali úspěšnost oprav DNA pomocí HRR v buňkách osteosarkomu (U2OS), přičemž DNA byla poškozena buď endonukleázou I-SceI nebo systémem CRISPR/Cas9. Autoři zjistili, že deficience v PML, ale i jeho nadprodukce způsobují inhibici HRR. Dále ukázali, že průběh HRR je ovlivněn typem exprimované isoformy PML (Attwood a kol., 2020).

Existuje hypotéza, že se PML podílí na opravách nestabilních repetitivní rDNA (Imrichova a kol., 2019, Hornofova a kol., 2022).

Ve studii od Imrichové a kol. bylo pozorováno, že PML v blízkosti jádérka tvoří takzvané PML jadéřkové asociace (*PML nucleolar associations*, PNAs). Pomocí vysoce rezoluční mikroskopie bylo na umrtvených lidských pigmentových epiteliálních buňkách sítnice zjištěno, že PNAs jsou dynamické struktury jejichž dynamika je úzce spjata s inaktivací nebo reaktivací RNA polymerázy I (Imrichova a kol., 2019). Pozdní strukturní fáze PNAs představuje dlouhotrvající PML multiproteinové jadéřkové struktury PML-NDs (*PML multiprotein nucleolar structures*, PML-NDs). Pomocí super-rezoluční mikroskopie bylo zjištěno, že všechny strukturní fáze PNAs včetně PML-NDs mohou asociovat s markery poškození DNA, což naznačuje roli těchto struktur v opravě rDNA (Imrichova a kol., 2019). Schopnost asociace

PML-NDs s místy přetrvávajícího poškození DNA rovněž naznačuje, že neopravená poškození rDNA mohou přispívat buněčné senescenci (Imrichova a kol., 2019).

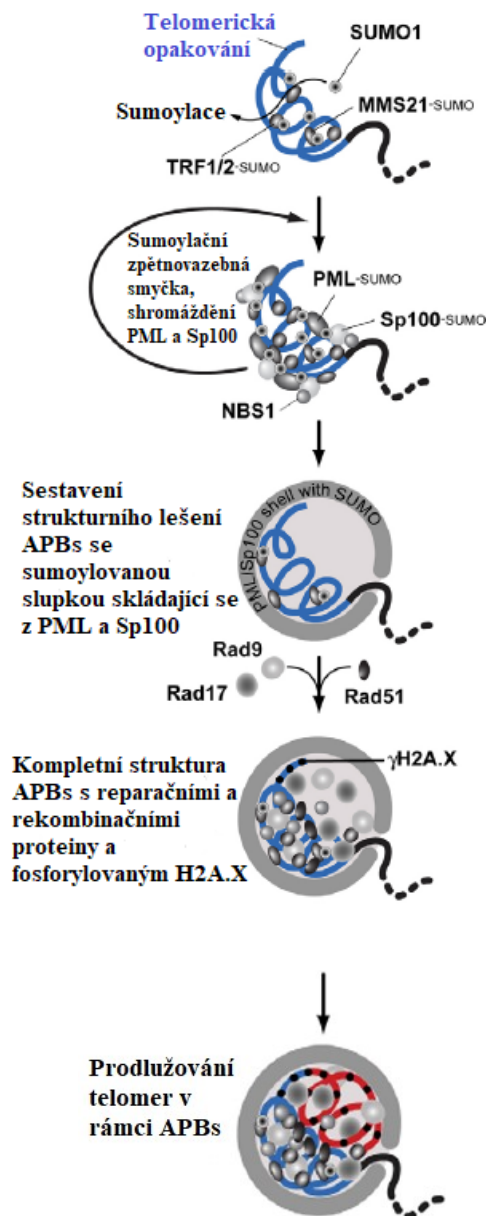
### **4.3. Role PML a PML-NBs při alternativním prodlužování telomer (ALT)**

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

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

#### **4.3.1. Formace ALT asociovaných PML útvarů (APBs)**

APBs jsou komplexy PML-NBs s telomerickou DNA vyskytující se u buněk využívajících ALT (Yeager a kol., 1999, Henson a kol., 2005, Osterwald a kol., 2015). APBs jsou složeny z některých kanonických komponent PML-NBs a vedle PML, obsahují i SP100 a SUMO. Další základní komponentou jsou proteiny asociované s telomerickými repeticemi TRF1, TRF2, POT1 a RAP1 (Yeager a kol., 1999). Do APBs mohou být lokalizovány faktory účastníci se opravy DNA nebo homologní rekombinace, kterými jsou RPA, RAD51, RAD52, RAD9, RAD17 (Chung a kol., 2011, Yeager a kol., 1999) nebo komponenty komplexu MRN (Chung a kol., 2011). Dalšími proteiny, které mohou být dopravovány do APBs jsou HP1 (Jiang a kol., 2005), RAD1, HUS1 (Nabetani a kol., 2004), BLM (Stavropoulos a kol., 2002), komplex SMC5/6 (Potts a kol., 2007) a MUS81 (Zeng a kol., 2009).



**Obrázek 16: Model seskupování APBs.** Formace APBs může být iniciována pomocí domény SUMO1 nebo pomocí SUMO E3 ligázy MMS21, stejně tak pomocí telomerických proteinů TRF1 a TRF2. Sestavení APBs je iniciováno sumoylací TRF1/2. Tato iniciace spustí zpětnovazebný mechanismus, který vede k asociaci PML a SP100. Iniciaci formace APBs může zajišťovat také NBS1. Poté dojde k auto-sumoylaci dalších MMS21, které jsou pomocí interakce se SIM motivem na PML lokalizovány na telomery. Poté co se vytvoří pomocí sumoylovaných PML a SP100 struktura slupky APBs, tak se rekombinační a reparační faktory DNA, kterými mohou být Rad9, Rad17 nebo Rad51, lokalizují do APBs a naváží se na telomery. To vede ke vzniku kompletní struktury APBs, která má funkci při prodlužování telomer pomocí mechanismu opravy DNA, zahrnujícího nereplikativní syntézu DNA, což je znázorněno fosforylovaným histonem H2A.X (Chung a kol., 2011).

Sumoylace na telomerech je nezbytná pro tvorbu APBs a následné udržování telomer (Potts a kol., 2007). Nekovalentní vazba mezi SUMO1 a SIM představuje hlavní interakci, pomocí které jsou sestavovány APBs, zatímco SUMO2/3-SIM interakce hrají při formaci APBs méně

významnou roli a jsou důležité spíše pro lokalizaci jiných proteinů do APBs (Chung a kol., 2011). Bylo pozorováno, že modifikace SUMO1 se preferenčně nacházejí v rámci sférické slupky vytvářené PML a proteinem SP100, zatímco modifikace SUMO2/3 se nacházejí uvnitř struktury PML-NBs (Chung a kol., 2011, Lang a kol., 2010). Kombinace interakcí SUMO-SIM a dodatečné sumoylace vytváří strukturu lešení skládající se z PML a SP100, na které se váží reparační faktory DNA a rekombinační faktory (Chung a kol., 2011). Proces formace APBs je znázorněn výše na **Obrázku 16**.

#### **4.3.2. Mechanismus alternativního prodlužování telomer (ALT)**

Mechanismus ALT je typ udržování délky telomer, který je využíván u nádorových buněk, které neexprimují telomerázu. Jedná se o mechanismus, který umožňuje skoro neomezenou proliferaci nádorových buněk (shrnutí ve de Vitis a kol., 2018). Z toho důvodu je mechanismus ALT a jeho regulace předmětem zájmu mnoha výzkumných laboratoří. Jak už bylo zmíněno, mechanismus ALT není využíván u mnoha typů nádorů (Henson a kol., 2010). Udržování délky telomer pomocí ALT je běžné pro nádory, kterými mohou být osteosarkom, liposarkom, glioblastom nebo nádor slinivky břišní (shrnutí ve de Vitis a kol., 2018).

Detailní mechanismus ALT byl popsán teprve nedávno (Zhang a kol., 2019).

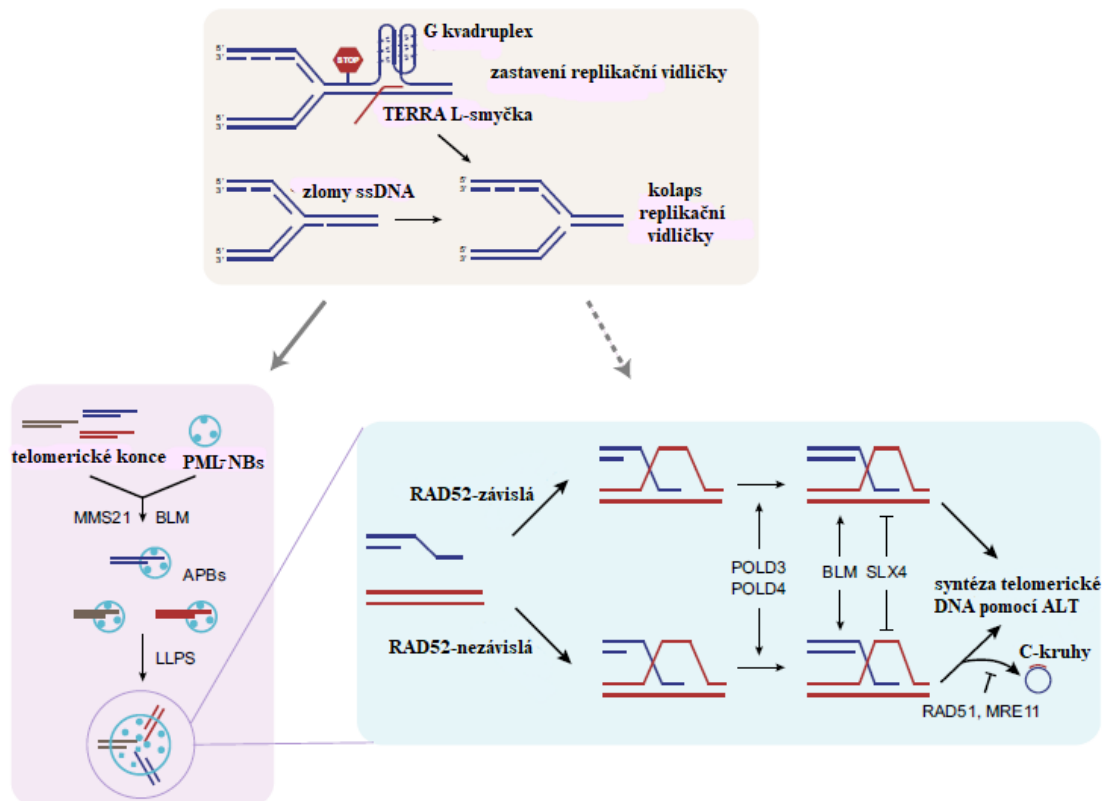
Bylo pozorováno, že telomery, jejichž délka je udržována pomocí mechanismu ALT, se potýkají s neustálým replikačním stresem a vykazují velké množství spontánních poškození telomerické DNA (Zhang a kol., 2019). Bylo zjištěno, že zdrojem tohoto stresu může být vytvoření sekundárních struktur zvaných G-kvadruplexů, systémů čtyř guaninových bází propojených mezi sebou vodíkovými můstky (Yang a kol., 2021). Bylo také objeveno, že na indukci replikačního stresu se mohou také podílet R-smyčky, což jsou hybridní struktury DNA a RNA vzniklé asociací s dlouhou telomerickou nekódující RNA TERRA (Yang a kol., 2021). Důsledkem vzniku těchto struktur na telomerách je zastavení replikační vidličky a následný vznik dvouvláknových zlomů, které iniciují replikaci indukovanou zlomy (*break-induced replication*, BIR) (Zhang a kol., 2019).

Poškození DNA poté navozuje sumoylaci telomerických proteinů. Bylo pozorováno, že mnoho sumoylovatelných proteinů indukuje akumulaci PML, pokud se na telomerách nacházejí ve zvýšené koncentraci (Chung a kol., 2011). Jedním z těchto proteinů je rekombinační faktor NSB1, který je centrálním komponentem komplexu MRN. Komponenty schelterinového komplexu TRF1 nebo TRF2 a jejich sumoylace jsou také schopné indukovat zvýšení koncentrace PML na telomerách (Chung a kol., 2011). Sumoylace těchto proteinů je zprostředkována SUMO E3 ligázou MMS21 (Chung a kol., 2011). Je známo, že základním

předpokladem pro ALT je akumulace PML na telomerách, což bylo to prokázáno pomocí „*lifetime microscopy*“ (Chung a kol., 2011), ale především díky PML deficientních modelů. To je důkaz toho, že pokud se na telomerách nenachází APBs, jejichž tvorba je závislá na PML, tak dochází k erozi telomer a buněčné senescenci (Zhang a kol., 2021, Osterwald a kol., 2015). Z toho vyplývá, že základním předpokladem pro ALT je tvorba APBs (Chung a kol., 2011).

Poté co se PML lokalizuje na telomery, tak dojde k indukci kompaktace telomerického chromatinu a shlukování telomerických repetitiv (Osterwald a kol., 2015, Cho a kol., 2014, Zhang a kol., 2021). Následně dochází ke vzniku APBs, jejichž formace byla popsána v předešlé kapitole. V důsledku formace APBs, klesne hladina TRF2 na telomerách. Snížená hustota TRF2 indukuje aktivaci kinázy ATM v APBs, která podněcuje opravu poškození DNA (Osterwald a kol., 2015, Denchi a de Lange, 2007).

K opravám telomerické DNA dochází pomocí BIR. Jedná se o mechanismus opravy pomocí homologní rekombinace, který byl popsán v kapitole 2.1.1., pomocí kterého dochází k prodlužování telomer (Zhang a kol., 2019). Pro syntézu telomerické DNA je stěžejní protein RAD52. BIR může být RAD52-závislá či nezávislá (Zhang a kol., 2021). RAD52 má schopnost zajišťovat invazi templátového vlákna telomerické DNA přepisem jednovláknové telomerické DNA za přítomnosti proteinu RPA (Zhang a kol., 2019). Bylo také ukázáno, že RAD52 může indukovat vznik D-smyčky (Zhang a kol., 2019). Jak je aktivována RAD52-nezávislá dráha je stále nejasné. Předpokládá se, že invazi templátového vlákna telomerické DNA může zajišťovat jiný protein než RAD52 (Zhang a kol., 2019). Po iniciaci syntézy DNA, podjednotky DNA polymerázy  $\delta$  POLD3 a POLD4 syntetizují telomerickou DNA a podporují elongaci telomer. Následně dochází ke rozložení intermediátů rekombinace na výsledné produkty reparace pomocí helikázy BLM či enzymu SLX4 (Sobinoff a kol., 2017). Shrnutí mechanismu ALT je schematicky znázorněno na **Obrázku 17**.



**Obrázek 17: Schématické shrnutí mechanismu ALT.** ALT je aktivováno replikačním stresem na telomerech. Tento replikační stres je způsoben přítomností struktur G-kvadruplexu či R smyčky nebo přítomností jednovláknového zlomu DNA, což může vést ke kolapsu replikační vidličky a následnému vzniku dvouvláknových zlomů. Poškození DNA následně indukuje sumoylaci telomerických proteinů, které na telomery rekrutují PML, který s telomery tvoří APBs. Do APBs jsou poté lokalizovány opravné, rekombinační a replikační proteiny. BIR je v APBs indukována dvouvláknovými zlomy a může být RAD52-závislá nebo -nezávislá. Replikace telomerické DNA pomocí BIR vyžaduje podjednotky DNA polymerázy  $\delta$  POLD3 a POLD4, helikázu BLM či enzym SLX4. RAD52-nezávislou BIR mohou být generovány C-kruhy (Zhang a Zou, 2020).

Bylo zjištěno, že pomocí RAD52-nezávislé dráhy mohou být formovány struktury zvané C-kruhy, nicméně, jak dochází k jejich vzniku není zatím jasné (Zhang a kol., 2019). Jedná se kruhovou jednovláknovou telomerickou DNA, jejichž tvorba je narušována proteiny RAD51 a MRE11 (Zhang a kol., 2019).

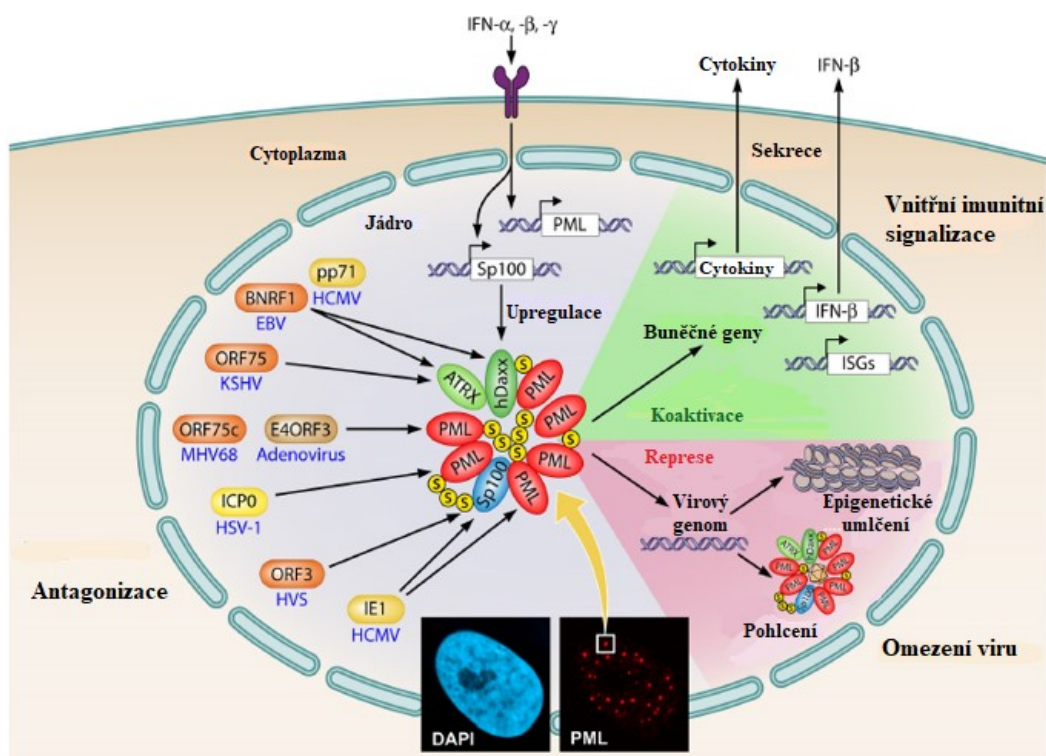
#### 4.4. Role PML při antivirové ochraně

Je známo, že virové infekce mohou mít negativní vliv na stabilitu genomu. Bylo totiž pozorováno, že při některých virových infekcích může docházet k integraci virového genomu do genomu hostitele. Tato integrace může mít za následek expresi onkogenních proteinů, což může vést k rozvoji rakoviny. Pro úspěšnou infekci, potřebují viry překonat bariéry obranného



systemu hostitelské buňky včetně vnitřní obrany a vrozené a získané imunity (shrnutí v Scherer a Stamminger, 2016). Bylo dokázáno, že PML hraje důležitou roli ve vnitřní obraně buňky tím, že se chová jako jaderný restriční faktor potlačující viry, které se dostávají do buňky (Kim a Ahn, 2015).

PML se může v důsledku vniknutí viru do buňky podílet na signalizaci vrozené imunity hostitele a může aktivovat geny pro cytokiny (Lin a kol., 2004) zahrnující interferony (Bougrini a kol., 2011) a následně geny stimulované interferony (*interferon-stimulated genes*, ISGs) (Kim a Ahn, 2015). Interferony mohou navíc zvyšovat expresi PML a Sp100 (Grotzinger a kol., 1996). Další strategií, kterou PML využívá v boji proti virové infekci, je pohlcení virového genomu do PML-NBs (Reichelt a kol., 2011) nebo jeho epigenetické umlčení (Sanyal a kol., 2018), což je znázorněno níže na **Obrázku 18**.



**Obrázek 18: Role PML-NBs při obranných mechanismech vnitřní a vrozené imunity a jejich interakce s virovými efektorovými proteiny.** PML-NBs jsou schopné zprostředkovat represi virové replikace tím, že indukují umlčení virového genomu nebo mohou virový genom pohltit. PML-NBs také fungují zároveň jako koaktivátory buněčných genů, které mají antivirovou aktivitu, jimiž jsou geny kódující cytokiny nebo ISGs. PML-NBs jsou v pozitivní zpětné vazbě regulovány působením interferonů. Mnoho virů disponuje proteiny, které negativně působí na strukturu PML-NBs (Scherer a Stamminger, 2016).

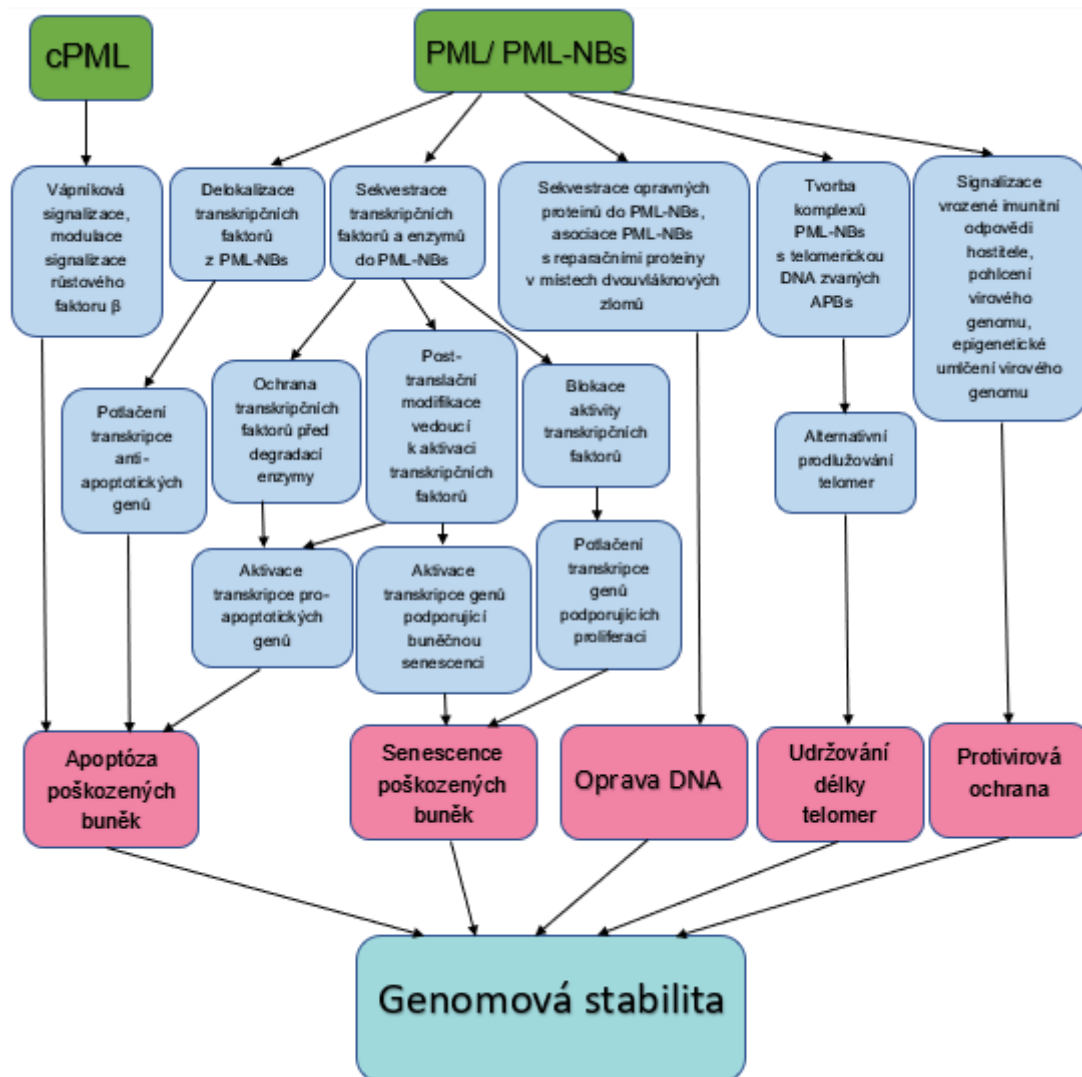
Určité virové infekce mají za následek narušení strukturní stability PML-NBs vedoucí k rozpadu této struktury a re-lokalizaci PML do cytoplazmy. Toto narušení stability PML-NBs

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

Mnoho virů kóduje proteiny, které zasahují do antivirové aktivity PML (Kim a Ahn, 2015). Těmito proteiny jsou multifunkční protein herpes viru simplex typu 1 ICP0 (McNally a kol., 2008), proteiny lidského cytomegaloviru IE1 (Ahn a kol., 2000) a pp71 (Hofmann a kol., 2002), protein adenoviru E4-ORF3 (Hoppe a kol., 2006), protein viru Epstein Barrové BZLF (Bell a kol., 2000), protein herpesviru asociovaného s Kaposiho sarkomem ORF75 (Full a kol., 2014), protein myšího gamaherpesviru ORF75c (Sewatanon a Ling, 2014) a protein herpesviru saimiri ORF3 (Leppard a kol., 2009).

Jak bylo zmíněno výše, PML-NBs mají schopnost pohlcovat virový genom (Reichelt a kol., 2011). Nejnovější studie ukazují, že na základě interferonové signalizace a signalizace poškozením DNA se během virové infekce PML-NBs strukturně mění ve velké PML klece, ve kterých je virový genom uvězněn a transkripčně umlčen (Scherer a kol., 2022). Pro tento experiment byla použita metoda vizualizace virové DNA pomocí fluorescentních azidů, která umožnila detekovat genom lidského cytomegaloviru v PML klecích za nepřítomnosti virového regulačního proteinu IE1, který narušuje mechanismy, kterými se PML/PML-NBs podílejí na antivirové ochraně (Scherer a kol., 2022). Autoři studie navíc pomocí transmisní elektronové mikroskopie pozorovali, že PML klece mohou také uchovávat nově vytvořené virové kapsidy, což může naznačovat, že dochází ke dvěma vlnám antivirové obrany (Scherer a kol., 2022).

Ještě, než přejdu k závěru práce, bych si dovoluila schematicky shrnout mechanismy, kterými cPML, PML a PML-NBs mohou ovlivňovat stabilitu genomu, o čemž je pojednáváno v této práci.



**Obrázek 19: Schématické znázornění vlivu cPML/PML/PML-NBs na udržování genomové stability.** cPML hraje roli při vápníkové signalizaci a modulaci signalizace růstového faktoru, což vede k apoptóze poškozených buněk. PML tvoří s transkripčním faktorem DAXX komplex, který se následně delokalizuje z PML-NBs a potlačuje transkripci anti-apoptotických genů, což má za následek spuštění apoptózy. Do PML-NBs může být sekvestrován enzym ubiquitin ligáza Mdm2, který zprostředkovává degradaci transkripčního faktoru p53 v proteasomu. To vede k zamezení degradace p53, který pak může spustit transkripci apoptotických genů. Do PML-NBs může být sekvestrován i p53, který je v PML-NBs post-translačně modifikován a aktivován a následně de-lokalizován z PML-NBs. Poté p53 aktivuje transkripci buď apoptotických nebo senescentních genů. Dalším faktorem, který je sekvestrován do PML-NBs je E2F, který aktivuje geny podporující proliferaci. Tato sekvestrace vede k potlačení transkripce těchto genů, což vede k buněčné senescenci. PML se podílí na opravách DNA tím, že interaguje s opravnými faktory a vnáší je do PML-NBs, které jsou schopny asociovat s dvouvláknovými zlomy. PML-NBs tvoří s telomerickou DNA komplexy zvané APBs, ve kterých se odehrává alternativní prodlužování telomer, které vede k udržování délky telomer. Během ochrany proti virovým infekcím může PML aktivovat geny pro cytokiny a interferony, což aktivuje vnitřní imunitní signalizaci. PML-NBs se účastní boje proti virové infekci pohlcením virového genomu a jeho epigenetickým umlčením.

## 5. Závěr

Cílem práce bylo objasnit roli promyelocytárního proteinu (PML) v udržování stability genomu. Jedná se o protein dominantně exprimován při stresové odpovědi, který je schopen přes SUMO-SIM interakce koncentrovat velké množství proteinů do určité oblasti jádra, a tím vytvořit nemembránové útvary, PML-NBs. PML je nezbytný stavební komponent PML-NBs, neboť bylo demonstrováno, že mutanty v PML nejsou schopny utvořit PML-NBs. Složení PML-NBs je variabilní a pravděpodobně se liší nejenom mezi experimentálními podmínkami a buněčnými modely, ale i v jednotlivých jádrech. A právě tato kompozitní variabilita naznačuje možnou funkční odlišnost. Bylo zjištěno, že PML-NBs jsou vysoce dynamické útvary, které se strukturně a biochemicky mění v závislosti na jednotlivých fázích buněčného cyklu, když bylo pozorováno, že během mitózy mohou být PML-NBs de-lokalizovány z jádra do cytoplazmy. Bylo také ukázáno, že PML může interagovat s chromatinem. PML-NBs mohou mít také afinitu k některým repetitivním oblastem genomu, které mohou být zdrojem genomové nestability.

Všeobecný zájem o PML-NBs započal díky těsné vazbě integrity PML-NBs a mnoha patologických stavů, kterými mohou být akutní promyelotická leukemie, neurodegenerativní onemocnění či virové infekce, které narušují genomovou stabilitu. Díky této souvislosti se začali zkoumat mechanismy, kterými by mohli PML či PML-NBs ovlivňovat stabilitu genomu. Tato práce shrnuje, že PML a PML-NBs mají kapacitu ovlivňovat stabilitu genomu zapojením do různých buněčných procesů včetně regulace buněčného cyklu, opravy DNA, alternativního prodlužování telomer či antivirové ochrany.

PML je znám pro svůj proti-nádorový charakter. Nicméně, PML může v závislosti na okolnostech mít i onkogenní účinek. Bylo objeveno, že PML může mít onkogenní charakter v buňkách rakoviny prsu či rakoviny vaječnicků. Mezi další onkogenní funkce PML se řadí také udržování rakovinných kmenových buněk či podněcování metastáze u chronické myeloidní leukemie či rakoviny prsu. Z toho důvodu PML představuje předmět zájmu mnoha výzkumných zařízení. Dá se předpokládat, že se v příštích letech budou více rozvíjet metody zaměřené na praktické využití PML při léčbě rakovin. Je však nutné poznamenat, že se PML zdá být u většiny typů nádorů deficientní a vyskytuje se pouze u menšího množství nádorů.

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

V reakci na poškození DNA má PML schopnost asociovat s místy zlomů DNA. Poslední dobou přibývá důkazů, že se PML-NBs přímo podílí na opravách komplikovaných lézí mechanismem HRR. Tyto výsledky naznačují, že aberantní lokalizace či hladina PML může vést k přetrvávajícímu poškození DNA, a tím i zvýšené genomové nestabilitě, což může způsobit různé patologické jevy. Bylo rovněž prokázáno, že PML může mít roli senzoru poškození DNA a může také ovlivnit kvalitu oprav DNA. Tyto funkce prokazují na to, že PML může mít při opravách DNA důležitou roli a vyplatí se v tomto směru do budoucna dělat další studie, jelikož detailní mechanismus, jakým PML ovlivňuje opravy DNA stále není znám. Dosud málo prozkoumanou rolí PML je obzvláště jeho funkce při opravách rDNA.

PML má klíčovou roli při alternativním udržování telomer (ALT), ke kterému dochází u nádorových buněk, které neexprimují telomerázu. PML-NBs tvoří s telomerickou DNA speciální struktury zvané ALT asociované PML útvary (APBs). Akumulace PML na telomerách je základním předpokladem pro ALT, neboť PML indukuje v raných fázích ALT shlukování telomer. Tato schopnost ukazuje na onkogenní potenciál PML, neboť jeho exprese umožňuje skoro neomezenou proliferaci některých nádorů. Vzhledem k tomu, že je PML hlavním předpokladem pro ALT, je možné knockout PML využít při léčbě ALT-pozitivních rakovin. Nicméně, v současnosti je výzkum léčby ALT-pozitivních rakovin zacílen na mechanismy regulace ALT.

PML také představuje bariéru, která chrání buňky před virovými infekcemi. PML se podílí na signalizaci vrozené imunity hostitele a rovněž využívá strategie, kterými jsou epigenetické potlačení virového genomu nebo pohlcení a uchování virového genomu v PML-NBs. Nové studie prokazují že pro pohlcení virového genomu se PML-NBs strukturně mění na PML klece, které kromě virového genomu pohlcují také nově vytvořené virové kapsidy, což značí, že může docházet ke dvěma vlnám antivirové obrany.

Možný směr, kterým by se výzkum PML dále mohl ubírat, naznačují recentní studie, které se zabývají vlivem typů isoform PML na jejich funkce. Nejnovější literatura ukazuje, že různé isoformy PML mohou tvořit specializované PML-NBs, které se od sebe liší svou funkcí. Nové studie také naznačují, že protichůdné funkce PML u rakovin mohou být ovlivněny právě typem exprimované isoformy, když bylo pozorováno, že PML IV převážně potlačuje nádory, zatímco PML I vykazuje pro-onkogenní potenciál. Z toho důvodu se vyplatí funkční různorodost isoform PML dále studovat.

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

## 6. Seznam použité literatury

- Ahn, J. H., & Hayward, G. S. (2000). Disruption of PML-associated nuclear bodies by IE1 correlates with efficient early stages of viral gene expression and DNA replication in human cytomegalovirus infection. *Virology*, *274*(1), 39–55. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0448>
- Attwood, K. M., Salsman, J., Chung, D., Mathavarajah, S., van Iderstine, C., & Dellaire, G. (2020). PML isoform expression and DNA break location relative to PML nuclear bodies impacts the efficiency of homologous recombination. *Biochemistry and Cell Biology*, *98*(3), 314–326. <https://doi.org/10.1139/bcb-2019-0115>
- Banani, S. F., Rice, A. M., Peeples, W. B., Lin, Y., Jain, S., Parker, R., & Rosen, M. K. (2016). Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies. *Cell*, *166*(3), 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.010>
- Bandaria, J. N., Qin, P., Berk, V., Chu, S., & Yildiz, A. (2016). Shelterin protects chromosome ends by compacting telomeric chromatin. *Cell*, *164*(4), 735–746. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.036>
- Beech, S. J., Lethbridge, K. J., Killick, N., McGlincy, N., & Leppard, K. N. (2005). Isoforms of the promyelocytic leukemia protein differ in their effects on ND10 organization. *Experimental Cell Research*, *307*(1), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.03.012>
- Bell, P., Lieberman, P. M., & Maul, G. G. (2000). Lytic but Not Latent Replication of Epstein-Barr Virus Is Associated with PML and Induces Sequential Release of Nuclear Domain 10 Proteins. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 74, Issue 24).
- Bernardi, (2004). *PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus*. <https://doi.org/10.1038/ncb1147>
- Bernardi and Pandolfi. (2003). Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207106>
- Bischof, O., Kim, S.-H., Irving, J., Beresten, S., Ellis, N. A., & Campisi, J. (2001). Regulation and Localization of the Bloom Syndrome Protein in Response to DNA Damage. In *The Journal of Cell Biology* (Vol. 153, Issue 2). <http://www.jcb.org/cgi/content/full/153/2/367>
- Blackford, A. N., & Jackson, S. P. (2017a). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. In *Molecular Cell* (Vol. 66, Issue 6, pp. 801–817). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>
- Boichuk, S., Hu, L., Makielski, K., Pandolfi, P. P., & Gjoerup, O. v. (2011). Functional connection between Rad51 and PML in homology-directed repair. *PLoS ONE*, *6*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025814>

- Boisvert, F. M., Hendzel, M. J., & Bazett-Jones, D. P. (2000). Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *Journal of Cell Biology*, *148*(2), 283–292. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.2.283>
- Bonura, T., Smith, K. C., & Kaplan, H. S. (1975). *Enzymatic induction of DNA double-strand breaks in  $\gamma$ -irradiated Escherichia coli K-12 (poL41 mutant/repair/excision/degradation)* (Vol. 72, Issue 11).
- Brown, J. R., Conn, K. L., Wasson, P., Charman, M., Tong, L., Grant, K., McFarlane, S., & Boutell, C. (2016). SUMO Ligase Protein Inhibitor of Activated STAT1 (PIAS1) Is a Constituent Promyelocytic Leukemia Nuclear Body Protein That Contributes to the Intrinsic Antiviral Immune Response to Herpes Simplex Virus 1. *Journal of Virology*, *90*(13), 5939–5952. <https://doi.org/10.1128/jvi.00426-16>
- Bryan, T. M., Marusic, L., Bacchetti, S., Namba, M., & Reddel, R. R. (1997). The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 6, Issue 6). Oxford University Press.
- Carolina, M., Moraes, S., Bispo, J., Neto, C., Frederico, C., & Menck, M. (2012). DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 17).
- Carracedo, A., Weiss, D., Leliaert, A. K., Bhasin, M., de Boer, V. C. J., Laurent, G., Adams, A. C., Sundvall, M., Song, S. J., Ito, K., Finley, L. S., Egia, A., Libermann, T., Gerhart-Hines, Z., Puigserver, P., Haigis, M. C., Maratos-Flier, E., Richardson, A. L., Schafer, Z. T., & Pandolfi, P. P. (2012). A metabolic prosurvival role for PML in breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(9), 3088–3100. <https://doi.org/10.1172/JCI62129>
- Chang, H. R., Munkhjargal, A., Kim, M. J., Park, S. Y., Jung, E., Ryu, J. H., Yang, Y., Lim, J. S., & Kim, Y. (2018). The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. In *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (Vol. 809, pp. 99–107). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.05.002>
- Chen, C. C., Avdievich, E., Zhang, Y., Zhang, Y., Wei, K., Lee, K., Edelman, W., Jasin, M., & LaRocque, J. R. (2017). EXO1 suppresses double-strand break induced homologous recombination between diverged sequences in mammalian cells. *DNA Repair*, *57*, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.07.003>
- Chicas, A., Wang, X., Zhang, C., McCurrach, M., Zhao, Z., Mert, O., Dickins, R. A., Narita, M., Zhang, M., & Lowe, S. W. (2010). Dissecting the Unique Role of the Retinoblastoma Tumor Suppressor during Cellular Senescence. *Cancer Cell*, *17*(4), 376–387. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.01.023>
- Chin, K., Liu, J., Lozano, G., & Chang, K. (1994). PML, a Growth Suppressor Disrupted in Acute Promyelocytic Leukemia The importance of the PML-RAR $\alpha$  fusion protein in the. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 14, Issue 10).
- Cho, N. W., Dilley, R. L., Lampson, M. A., & Greenberg, R. A. (2014). Interchromosomal homology searches drive directional ALT telomere movement and synapsis. *Cell*, *159*(1), 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.030>

- Chung, I., Leonhardt, H., & Rippe, K. (2011). De novo assembly of a PML nuclear subcompartment occurs through multiple pathways and induces telomere elongation. *Journal of Cell Science*, *124*(21), 3603–3618. <https://doi.org/10.1242/jcs.084681>
- Cohen, C., Corpet, A., Roubille, S., Maroui, M. A., Poccardi, N., Rousseau, A., Kleijwegt, C., Binda, O., Texier, P., Sawtell, N., Labetoulle, M., & Lomonte, P. (2018). Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies (NBs) induce latent/quiescent HSV-1 genomes chromatinization through a PML NB/Histone H3.3/H3.3 Chaperone Axis. In *PLoS Pathogens* (Vol. 14, Issue 9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007313>
- Corpet, A., Kleijwegt, C., Roubille, S., Juillard, F., Jacquet, K., Texier, P., & Lomonte, P. (2020). Survey and summary PML nuclear bodies and chromatin dynamics: Catch me if you can! *Nucleic Acids Research*, *48*(21), 11890–11912. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa828>
- Courcelle, C. T., Belle, J. J., & Courcelle, J. (2005). Nucleotide excision repair or polymerase V-mediated lesion bypass can act to restore UV-arrested replication forks in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *187*(20), 6953–6961. <https://doi.org/10.1128/JB.187.20.6953-6961.2005>
- Darbinyan, A., White, M. K., Akan, S., Radhakrishnan, S., del Valle, L., Amini, S., & Khalili, K. (2007). Alterations of DNA damage repair pathways resulting from JCV infection. *Virology*, *364*(1), 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.02.015>
- de Stanchina, E., Querido, E., Narita, M., Davuluri, R. v, Pandolfi, P. P., & Ferbeyre, G. (2004). PML Is a Direct p53 Target that Modulates p53 Effector Functions the importance of the p53 network in human cancer, it seems likely that key p53 target genes will also be linked to cancer development. In *Molecular Cell* (Vol. 13). <http://bioinformatics>.
- de Vitis, M., Berardinelli, F., & Sgura, A. (2018). Telomere length maintenance in cancer: At the crossroad between telomerase and alternative lengthening of telomeres (ALT). In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19020606>
- Dellaire, G., Ching, R. W., Ahmed, K., Jalali, F., Tse, K. C. K., Bristow, R. G., & Bazett-Jones, D. P. (2006a). Promyelocytic leukemia nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2, and ATR. *Journal of Cell Biology*, *175*(1), 55–66. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604009>
- Dellaire, G., Ching, R. W., Dehghani, H., Ren, Y., & Bazett-Jones, D. P. (2006). The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. *Journal of Cell Science*, *119*(6), 1026–1033. <https://doi.org/10.1242/jcs.02816>
- Dellaire, G., Eskiw, C. H., Dehghani, H., Ching, R. W., & Bazett-Jones, D. P. (2006). Mitotic accumulations of PML protein contribute to the re-establishment of PML nuclear bodies in G1. *Journal of Cell Science*, *119*(6), 1034–1042. <https://doi.org/10.1242/jcs.02817>
- Denchi, E. L., & de Lange, T. (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*, *448*(7157), 1068–1071. <https://doi.org/10.1038/nature06065>



- Douglas, P., Gupta, S., Morrice, N., Meek, K., & Lees-Miller, S. P. (2005). DNA-PK-dependent phosphorylation of Ku70/80 is not required for non-homologous end joining. *DNA Repair*, 4(9), 1006–1018. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.05.003>
- Draskovic, I., Arnoult, N., Steiner, V., Bacchetti, S., Lomonte, P., & Londoño-Vallejo, A. (2009). Probing PML body function in ALT cells reveals spatiotemporal requirements for telomere recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37), 15726–15731. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907689106>
- el Bougrini, J., Dianoux, L., & Chelbi-Alix, M. K. (2011). PML positively regulates interferon gamma signaling. *Biochimie*, 93(3), 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.11.005>
- Eskiw, C. H., Delleire, G., & Bazett-Jones, D. P. (2004). Chromatin Contributes to Structural Integrity of Promyelocytic Leukemia Bodies through a SUMO-1-independent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9577–9585. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312580200>
- Everett, R. D., Murray, J., Orr, A., & Preston, C. M. (2007a). Herpes Simplex Virus Type 1 Genomes Are Associated with ND10 Nuclear Substructures in Quiescently Infected Human Fibroblasts. *Journal of Virology*, 81(20), 10991–11004. <https://doi.org/10.1128/jvi.00705-07>
- Everett, R. D., Murray, J., Orr, A., & Preston, C. M. (2007b). Herpes Simplex Virus Type 1 Genomes Are Associated with ND10 Nuclear Substructures in Quiescently Infected Human Fibroblasts. *Journal of Virology*, 81(20), 10991–11004. <https://doi.org/10.1128/jvi.00705-07>
- Falck, J., Coates, J., & Jackson, S. P. (2005). *Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage*. [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature)
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., & Lowe, S. W. (2000). *PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence*. [www.genomesystems.com](http://www.genomesystems.com)
- Fornace, A. J., Kohnt, K. W., & Kann, H. E. (1976). DNA single-strand breaks during repair of UV damage in human fibroblasts and abnormalities of repair in xeroderma pigmentosum (alkaline elution of DNA/DNA crosslinking/x-ray sensitivity/excision repair). In *Biochemistry* (Vol. 73, Issue 1).
- Fu, S., Wei, J., Wang, G., Wang, B., Wang, Y., Lai, X., & Huang, H. (2015). The key role of PML in IFN- $\alpha$  induced cellular senescence of human mesenchymal stromal cells. *International Journal of Oncology*, 46(1), 351–359. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2738>
- Full, F., Jungnickl, D., Reuter, N., Bogner, E., Brulois, K., Scholz, B., Stürzl, M., Myoung, J., Jung, J. U., Stamminger, T., & Ensser, A. (2014). Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus Tegument Protein ORF75 Is Essential for Viral Lytic Replication and Plays a Critical Role in the Antagonization of ND10-Instituted Intrinsic Immunity. *PLoS Pathogens*, 10(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003863>
- 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., & Falini, B. (1996). Heterogeneous Nuclear Expression of the Promyelocytic Leukemia (PML) Protein in Normal and Neoplastic Human Tissues. In *American journal of Pathology* (Vol. 149, Issue 6).

- Gamell, C., Jan Paul, P., Haupt, Y., & Haupt, S. (2014). PML tumour suppression and beyond: Therapeutic implications. In *FEBS Letters* (Vol. 588, Issue 16, pp. 2653–2662). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.007>
- Gantt, R., Jones, G. M., Stephens, E. v, Baeck, A. E., & Sanford, K. K. (1979). VISIBLE LIGHT-INDUCED DNA CROSSLINKS IN CULTURED MOUSE AND HUMAN CELLS. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 565).
- Gartner, A., Milstein, S., Ahmed, S., Hodgkin, J., & Hengartner, M. O. (2000). Weinert, 1998; Caspari and Carr. In *Lydall and Weinert* (Vol. 5).
- Giorgi, C., Ito, K., Lin, H. K., Santangelo, C., Wieckowski, M. R., Lebiezinska, M., Bononi, A., Bonora, M., Duszynski, J., Bernardi, R., Rizzuto, R., Tacchetti, C., Pinton, P., & Pandolfi, P. P. (2010). PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release. *Science*, 330(6008), 1247–1251. <https://doi.org/10.1126/science.1189157>
- Glazer, P. M., Sarkar, S. N., Chisholm, G. E., & Summers, W. C. (1987). DNA Mismatch Repair Detected in Human Cell Extracts. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 7, Issue 1).
- Glover, T. W., & Stein, C. K. (1988). Chromosome Breakage and Recombination at Fragile Sites. In *Am. J. Hum. Genet* (Vol. 43).
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase Activity in Tetrahymena Extracts. In *Cell* (Vol. 43).
- Gottlieb, (1993). *The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90057-w](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90057-w)
- Grotzinger, T., Sternsdorf, T., Jensen, K., & Will, H. (1996). Interferon-modulated expression of genes encoding the nuclear-dot-associated proteins Sp100 and promyelocytic leukemia protein (PML). In *Eur. J. Biochem* (Vol. 23)
- Guo, (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol*.
- Gurrieri, C., Capodici, P., Bernardi, R., Scaglioni, P. P., Nafa, K., Rush, L. J., Verbel, D. A., Cordon-Cardo, C., & Pandolfi, P. P. (2004). Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(4), 269–279. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh043>
- Haber, J. E., Ira, G., Malkova, A., & Sugawara, N. (2004). Repairing a double-strand chromosome break by homologous recombination: Revisiting Robin Holliday's model. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1441), 79–86. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1367>
- Hanada, (2007). The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. <https://doi.org/10.1038/nsmb1313>
- Hands, K. J., Cuchet-Lourenco, D., Everett, R. D., & Hay, R. T. (2014). PML isoforms in response to arsenic: High-resolution analysis of PML body structure and degradation. *Journal of Cell Science*, 127(2), 365–375. <https://doi.org/10.1242/jcs.132290>

- Harmon, (1997). Apoptosis. *Adv Genet*. [https://doi.org/10.1016/s0065-2660\(08\)60447-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2660(08)60447-2)
- Hayakawa, (2004). *Phosphorylation of PML by mitogen-activated protein kinases plays a key role in arsenic trioxide-mediated apoptosis*. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00082-0](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00082-0)
- Hecht and Sutherland. (1984). *Fragile sites and cancer breakpoints*. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(84\)90132-8](https://doi.org/10.1016/0165-4608(84)90132-8)
- Hecht, (1984). *Cancer chromosome breakpoints and common fragile sites induced by aphidicolin*. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(84\)90060-8](https://doi.org/10.1016/0165-4608(84)90060-8)
- Hendriks, (2016). A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.81>
- Henson, (2005). A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. *Clin Cancer Res*.
- Henson, J. D., & Reddel, R. R. (2010). Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers. In *FEBS Letters* (Vol. 584, Issue 17, pp. 3800–3811). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.009>
- Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 128, Issue 4, pp. 1238–1246). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI95148>
- Hewett, (1998). *FRA10B Structure Reveals Common Elements in Repeat Expansion and Chromosomal Fragile Site Genesis*. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80077-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80077-5)
- Hofmann, H., Sindre, H., & Stamminger, T. (2002). Functional Interaction between the pp71 Protein of Human Cytomegalovirus and the PML-Interacting Protein Human Daxx. *Journal of Virology*, 76(11), 5769–5783. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5769-5783.2002>
- Hoppe, A., Beech, S. J., Dimmock, J., & Leppard, K. N. (2006). Interaction of the Adenovirus Type 5 E4 Orf3 Protein with Promyelocytic Leukemia Protein Isoform II Is Required for ND10 Disruption. *Journal of Virology*, 80(6), 3042–3049. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.6.3042-3049.2006>
- Hornofova, T., Pokorna, B., Hubackova, S. S., Uvizl, A., Kosla, J., Bartek, J., Hodny, Z., & Vasicova, P. (2022). Phospho-SIM and exon8b of PML protein regulate formation of doxorubicin-induced rDNA-PML compartment. *DNA Repair*, 114. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2022.103319>
- Hsu, K. S., & Kao, H. Y. (2018). PML: Regulation and multifaceted function beyond tumor suppression. In *Cell and Bioscience* (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0204-8>
- Huang, S. Y., Naik, M. T., Chang, C. F., Fang, P. J., Wang, Y. H., Shih, H. M., & Huang, T. H. (2014). The B-box 1 dimer of human promyelocytic leukemia protein. *Journal of Biomolecular NMR*, 60(4), 275–281. <https://doi.org/10.1007/s10858-014-9869-4>

- Imrichova, (2019). Dynamic PML protein nucleolar associations with persistent DNA damage lesions in response to nucleolar stress and senescence-inducing stimuli. *Aging (Albany NY)*.  
<https://doi.org/10.18632/aging.102248>
- Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. v, Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T. H., Strauss, J. F., & Maul, G. G. (1999). PML Is Critical for ND10 Formation and Recruits the PML-interacting Protein Daxx to this Nuclear Structure When Modified by SUMO-1. In *The Journal of Cell Biology* (Vol. 147, Issue 2). <http://www.jcb.org>
- Ishov, A. M., Vladimirova, O. v., & Maul, G. G. (2004). Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX. *Journal of Cell Science*, 117(17), 3807–3820.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.01230>
- Ito, K., Bernardi, R., Morotti, A., Matsuoka, S., Saglio, G., Ikeda, Y., Rosenblatt, J., Avigan, D. E., Teruya-Feldstein, J., & Pandolfi, P. P. (2008). PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature*, 453(7198), 1072–1078. <https://doi.org/10.1038/nature07016>
- Ivanschitz, L., de Thé, H., & le Bras, M. (2013). PML, SUMOylation, and senescence. In *Frontiers in Oncology: Vol. 3 JUL*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00171>
- Ivanschitz, L., Takahashi, Y., Jollivet, F., Ayrault, O., Bras, M. le, & de Thé, H. (2015). PML IV/ARF interaction enhances p53 SUMO-1 conjugation, activation, and senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(46), 14278–14283.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1507540112>
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. In *Nature* (Vol. 461, Issue 7267, pp. 1071–1078). <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Janderová-Rossmeislová, L., Nováková, Z., Vlasáková, J., Philimonenko, V., Hozák, P., & Hodný, Z. (2007). PML protein association with specific nucleolar structures differs in normal, tumor and senescent human cells. *Journal of Structural Biology*, 159(1), 56–70.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.02.008>
- Jensen, K., Shiels, C., & Freemont, P. S. (n.d.). *PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif*.  
[www.nature.com/onc](http://www.nature.com/onc)
- Jiang, H., Wang, Y., Gu, Y., Guo, X., Zou, Z., Scholz, F., Trenczek, T. E., & Kanost, M. R. (n.d.). *Molecular identification of a bevy of serine proteinases in Manduca sexta hemolymph*.
- Jimenez, G., Yucel, J., Rowley, R., & Subramani, S. (1992). The rad3+ gene of *Schizosaccharomyces pombe* is involved in multiple checkpoint functions and in DNA repair (G2 arres/COUPu of mitosis to DNA synthesis/moleculá checkpoints). In *Genetics* (Vol. 89).
- Jones, (1995). *Association of a chromosome deletion syndrome with a fragile site within the proto-oncogene CBL2*. <https://doi.org/10.1038/376145a0>

- Jul-Larsen, Å., Grudic, A., Bjerkvig, R., & Bøoe, S. O. (2009). Cell-cycle regulation and dynamics of cytoplasmic compartments containing the promyelocytic leukemia protein and nucleoporins. *Journal of Cell Science*, *122*(8), 1201–1210. <https://doi.org/10.1242/jcs.040840>
- Kalitsis, P., & Choo, K. H. A. (2012). The evolutionary life cycle of the resilient centromere. In *Chromosoma* (Vol. 121, Issue 4, pp. 327–340). <https://doi.org/10.1007/s00412-012-0369-6>
- Kastner, P., Perez, A., Lutz, Y., Rochette-Egly, C., Gaub, M.-P., Durand, B., Lanotte2, M., Berger, R., & Chambon, P. (1992). Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor a fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. In *The EMBO Journal* (Vol. 11, Issue 2).
- Kikuchi, K., Abdel-Aziz, H. I., Taniguchi, Y., Yamazoe, M., Takeda, S., & Hirota, K. (2009). Bloom DNA helicase facilitates homologous recombination between diverged homologous sequences. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(39), 26360–26367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.029348>
- Kim, Y. E., & Ahn, J. H. (2015). Positive Role of Promyelocytic Leukemia Protein in Type I Interferon Response and Its Regulation by Human Cytomegalovirus. *PLoS Pathogens*, *11*(3), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004785>
- Kurihara, M., Kato, K., Sanbo, C., Shigenobu, S., Ohkawa, Y., Fuchigami, T., & Miyanari, Y. (2020). Genomic Profiling by ALaP-Seq Reveals Transcriptional Regulation by PML Bodies through DNMT3A Exclusion. *Molecular Cell*, *78*(3), 493-505.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.004>
- Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honoré, N., Doubeikovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P. P., Puvion, E., Freemont, P., & de Thé, H. (2001). Role of Promyelocytic Leukemia (PML) Sumolation in Nuclear Body Formation, 11S Proteasome Recruitment, and As 2 O 3-induced PML or PML/Retinoic Acid Receptor Degradation. In *J. Exp. Med.* *The* (Vol. 193). Rockefeller University Press. <http://www.jem.org/cgi/content/full/193/12/1361>
- Lamorte, V. J., Dyck, J. A., Ochs, R. L., & Evans, R. M. (1998). Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. In *Cell Biology* (Vol. 95). [www.pnas.org](http://www.pnas.org).
- Lång, A., Lång, E., & Bøe, S. O. (2019a). PML Bodies in Mitosis. *Cells*, *8*(8), 893. <https://doi.org/10.3390/cells8080893>
- Lang, M., Jegou, T., Chung, I., Richter, K., Münch, S., Udvarhelyi, A., Cremer, C., Hemmerich, P., Engelhardt, J., Hell, S. W., & Rippe, K. (2010). Three-dimensional organization of promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Journal of Cell Science*, *123*(3), 392–400. <https://doi.org/10.1242/jcs.053496>
- Leppard, K. N., Emmott, E., Cortese, M. S., & Rich, T. (2009). Adenovirus type 5 E4 Orf3 protein targets promyelocytic leukaemia (PML) protein nuclear domains for disruption via a sequence in PML isoform II that is predicted as a protein interaction site by bioinformatic analysis. *Journal of General Virology*, *90*(1), 95–104. <https://doi.org/10.1099/vir.0.005512-0>

- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'neil, J., Park, E.-J., & Chen, J. D. (2000). Sequestration and Inhibition of Daxx-Mediated Transcriptional Repression by PML. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 20, Issue 5).
- Lin, (2004). *Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling*. <https://doi.org/10.1038/nature02783>
- Lin, D. Y., Huang, Y. S., Jeng, J. C., Kuo, H. Y., Chang, C. C., Chao, T. T., Ho, C. C., Chen, Y. C., Lin, T. P., Fang, H. I., Hung, C. C., Suen, C. S., Hwang, M. J., Chang, K. S., Maul, G. G., & Shih, H. M. (2006). Role of SUMO-Interacting Motif in Daxx SUMO Modification, Subnuclear Localization, and Repression of Sumoylated Transcription Factors. *Molecular Cell*, *24*(3), 341–354. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.10.019>
- Lindahl. (1993). *Instability and decay of the primary structure of DNA*. <https://doi.org/10.1038/362709a0>
- Louria-Hayon, I., Grossman, T., Sionov, R. V., Alsheich, O., Pandolfi, P. P., & Haupt, Y. (2003). The promyelocytic leukemia protein protects p53 from Mdm2-mediated inhibition and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(35), 33134–33141. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301264200>
- Luciani, J. J., Depetris, D., Usson, Y., Metzler-Guillemain, C., Mignon-Ravix, C., Mitchell, M. J., Megarbane, A., Sarda, P., Sirma, H., Moncla, A., Feunteun, J., & Mattei, M. G. (2006). PML nuclear bodies are highly organised DNA-protein structures with a function in heterochromatin remodelling at the G2 phase. *Journal of Cell Science*, *119*(12), 2518–2531. <https://doi.org/10.1242/jcs.02965>
- Markovits, J., Larsen, A. K., Sigal-Bendirdjian, E., Foss, P., Saucier, J.-M., Gazit, A., Levitzki, A., Umezawa, K., & Jacquemin-Sablon, A. (1994). INHIBITION OF DNA TOPOISOMERASES I AND II AND INDUCTION OF APOPTOSIS BY ERBSTATIN AND TYRPHOSTIN DERIVATIVES. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 48, Issue 3).
- Martin, N., Benhamed, M., Nacerddine, K., Demarque, M. D., van Lohuizen, M., Dejean, A., & Bischof, O. (2012). Physical and functional interaction between PML and TBX2 in the establishment of cellular senescence. *EMBO Journal*, *31*(1), 95–109. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.370>
- Matos, J., Blanco, M. G., Maslen, S., Skehel, J. M., & West, S. C. (2011). Regulatory control of the resolution of DNA recombination intermediates during meiosis and mitosis. *Cell*, *147*(1), 158–172. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.032>
- Maya-Mendoza, A., Moudry, P., Merchut-Maya, J. M., Lee, M., Strauss, R., & Bartek, J. (2018). High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. *Nature*, *559*(7713), 279–284. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0261-5>
- McNally, B. A., Trgovcich, J., Maul, G. G., Liu, Y., & Zheng, P. (2008). A role for cytoplasmic PML in cellular resistance to viral infection. *PLoS ONE*, *3*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002277>

- Mohindra, A., Hays, L. E., Phillips, E. N., Preston, B. D., Helleday, T., & Meuth, M. (n.d.). *Defects in homologous recombination repair in mismatch-repair-deficient tumour cell lines*. <https://academic.oup.com/hmg/article/11/18/2189/676573>
- Morgan, M. J., Kim, Y.-S., & Liu, Z. (2009). Membrane-Bound Fas Ligand Requires RIP1 for Efficient Activation of Caspase-8 within the Death-Inducing Signaling Complex. *The Journal of Immunology*, 183(5), 3278–3284. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803428>
- Morgan, W. F., Corcoran, J., Hartmann, A., Kaplan, M. I., Limoli, C. L., & Ponnaiya, B. (1998). DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability. In *Mutation Research* (Vol. 404).
- Morley, A. A., & Turner, D. R. (1999). The contribution of exogenous and endogenous mutagens to in vivo mutations. In *Mutation Research* (Vol. 428). [www.elsevier.com/locate/molmut](http://www.elsevier.com/locate/molmut) Community address: [www.elsevier.com/locate/mutres](http://www.elsevier.com/locate/mutres)
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Crams, L. S., Dani, M., Deavent, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., & Wu, J.-R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes (human repetitive DNA/in situ hybridization/trypanosome telomeres/BAL-31 nuclease/flow cytometry). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 85).
- Mu, Z.-M., Le, X.-F., Vallian, S., Glassman, A. B., & Chang, K.-S. (1997). Stable overexpression of PML alters regulation of cell cycle progression in HeLa cells. In *Carcinogenesis* (Vol. 18, Issue 11).
- Müller, H., Bracken, A. P., Vernell, R., Moroni, M. C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J. D., & Helin, K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes and Development*, 15(3), 267–285. <https://doi.org/10.1101/gad.864201>
- Münch, S., Weidtkamp-Peters, S., Klement, K., Grigaravicius, P., Monajembashi, S., Salomoni, P., Pandolfi, P. P., Weißhart, K., & Hemmerich, P. (2014). The Tumor Suppressor PML Specifically Accumulates at RPA/Rad51-Containing DNA Damage Repair Foci but Is Nonessential for DNA Damage-Induced Fibroblast Senescence. *Molecular and Cellular Biology*, 34(10), 1733–1746. <https://doi.org/10.1128/mcb.01345-13>
- Nabetani, A., Yokoyama, O., & Ishikawa, F. (2004). Localization of hRad9, hHus1, hRad1, and hRad17 and caffeine-sensitive DNA replication at the alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia body. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25849–25857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312652200>
- Natarajan, A. T., Darroudi, F., Jha, A. N., Meijers, M., & Zdzienicka, M. Z. (1993). Ionizing radiation induced DNA lesions which lead to chromosomal aberrations. In *Mutation Research* (Vol. 299).
- Nefkens, I., Negorev, D. G., Ishov, A. M., Michaelson, J. S., Yeh, E. T. H., Tanguay, R. M., Müller, W. E. G., & Maul, G. G. (2003). Heat shock and Cd<sup>2+</sup> exposure regulate PML and Daxx release from ND10 by independent mechanisms that modify the induction of heat-shock proteins 70 and 25 differently. In *Journal of Cell Science* (Vol. 116, Issue 3, pp. 513–524). <https://doi.org/10.1242/jcs.00253>

- Nisole, S., Maroui, M. A., Mascle, X. H., Aubry, M., & Chelbi-Alix, M. K. (2013). Differential roles of PML isoforms. In *Frontiers in Oncology: Vol. 3 MAY*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00125>
- Niwa-Kawakita, M., Ferhi, O., Soilihi, H., le Bras, M., Lallemand-Breitenbach, V., & de Thé, H. (2017). PML is a ROS sensor activating p53 upon oxidative stress. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(11), 3197–3206. <https://doi.org/10.1084/jem.20160301>
- Nussenzweig, A., & Nussenzweig, M. C. (2007). A Backup DNA Repair Pathway Moves to the Forefront. In *Cell* (Vol. 131, Issue 2, pp. 223–225). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.005>
- Olavarrieta, L., Hernández, P., Krimer, D. B., & Schwartzman, J. B. (2002). DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication. *Journal of Molecular Biology*, *322*(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00740-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00740-4)
- O’Neil, N., & Rose, A. (2006). DNA repair. In *WormBook : the online review of C. elegans biology* (pp. 1–12). <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.54.1>
- Osterwald, S., Deeg, K. I., Chung, I., Parisotto, D., Wörz, S., Rohr, K., Erfle, H., & Rippe, K. (2015). PML induces compaction, TRF2 depletion and DNA damage signaling at telomeres and promotes their alternative lengthening. *Journal of Cell Science*, *128*(10), 1887–1900. <https://doi.org/10.1242/jcs.148296>
- O’Sullivan, R. J., & Karlseder, J. (2010). Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 3, pp. 171–181). <https://doi.org/10.1038/nrm2848>
- Ouyang, K. J., Woo, L. L., & Ellis, N. A. (2008). Homologous recombination and maintenance of genome integrity: Cancer and aging through the prism of human RecQ helicases. *Mechanisms of Ageing and Development*, *129*(7–8), 425–440. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.03.003>
- Pearson, (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35018127>
- Pelczar, P., Kalck, V., & Kovalchuk, I. (2003). Different genome maintenance strategies in human and tobacco cells. *Journal of Molecular Biology*, *331*(4), 771–779. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00839-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00839-8)
- Pomerantz, R. T., Kurth, I., Goodman, M. F., & O’Donnell, M. E. (2013). Preferential D-loop extension by a translesion DNA polymerase underlies error-prone recombination. *Nature Structural and Molecular Biology*, *20*(6), 748–755. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2573>
- Porter-Goff, M. E., & Rhind, N. (2006). The Role of MRN in the S-Phase DNA Damage Checkpoint Is Independent of Its Ctp1-dependent Roles in Double-Strand Break Repair and Checkpoint Signaling. *Molecular Biology of the Cell*, *20*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Potts, (2007). *The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins*. <https://doi.org/10.1038/nsmb1259>



- Rassool, F. v, Mckeithan, T. W., Neilly, M. E., van Melle, E., Espinosa Iii, R., & le Beau, M. M. (1991). Preferential integration of marker DNA into the chromosomal fragile site at 3p14: An approach to cloning fragile sites (fluorescence in situ hybridization/DNA transfection/pSV2Neo/chromosome aberrations). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 88).
- Reichelt, M., Wang, L., Sommer, M., Perrino, J., Nour, A. M., Sen, N., Baiker, A., Zerboni, L., & Arvin, A. M. (2011). Entrapment of viral capsids in nuclear PML cages is an intrinsic antiviral host defense against Varicella-zoster virus. *PLoS Pathogens*, 7(2).  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001266>
- Rokudai, S., Laptenko, O., Arnal, S. M., Taya, Y., Kitabayashi, I., & Prives, C. (2013). MOZ increases p53 acetylation and premature senescence through its complex formation with PML. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(10), 3895–3900.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1300490110>
- Ruzo, A., Croft, G. F., Metzger, J. J., Galgoczi, S., Gerber, L. J., Pellegrini, C., Wang, H., Fenner, M., Tse, S., Marks, A., Nchako, C., & Brivanlou, A. H. (2018). Chromosomal instability during neurogenesis in huntington’s disease. *Development (Cambridge)*, 145(2).  
<https://doi.org/10.1242/dev.156844>
- Sahin, U., Ferhi, O., Jeanne, M., Benhenda, S., Berthier, C., Jollivet, F., Niwa-Kawakita, M., Faklaris, O., Setterblad, N., de Thé, H., & Lallemand-Breitenbach, V. (2014). Oxidative stress-induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. *Journal of Cell Biology*, 204(6), 931–945. <https://doi.org/10.1083/jcb.201305148>
- Salim, D., & Gerton, J. L. (2019). Ribosomal DNA instability and genome adaptability. In *Chromosome Research* (Vol. 27, Issues 1–2, pp. 73–87). Springer Netherlands.  
<https://doi.org/10.1007/s10577-018-9599-7>
- Sanyal, A., Wallaschek, N., Glass, M., Flamand, L., Wight, D. J., & Kaufer, B. B. (2018). The ND10 complex represses lytic human herpesvirus 6A replication and promotes silencing of the viral genome. *Viruses*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/v10080401>
- Scaglioni, P. P., Rabellino, A., Yung, T. M., Bernardi, R., Choi, S., Konstantinidou, G., Nardella, C., Cheng, K., & Pandolfi, P. P. (2012). Translation-dependent mechanisms lead to PML upregulation and mediate oncogenic K-RAS-induced cellular senescence. *EMBO Molecular Medicine*, 4(7), 594–602. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200233>
- Scherer, M., Read, C., Neusser, G., Kranz, C., Kuderna, A. K., Müller, R., Full, F., Wörz, S., Reichel, A., Schilling, E. M., Walther, P., & Stamminger, T. (2022). Dual signaling via interferon and DNA damage response elicits entrapment by giant PML nuclear bodies. *ELife*, 11.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.73006>
- Scherer, M., & Stamminger, T. (2016). Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. *Journal of Virology*, 90(13), 5850–5854. <https://doi.org/10.1128/jvi.01979-15>

- Scully, R., Panday, A., Elango, R., & Willis, N. A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 20, Issue 11, pp. 698–714). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>
- Seeler, J.-S., Marchio, A., Sitterlin, D., Transy, C., & Dejean, A. (1998). Interaction of SP100 with HP1 proteins: A link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. In *Biochemistry* (Vol. 95). [www.pnas.org](http://www.pnas.org).
- Seker, (2003). *UV-C-induced DNA damage leads to p53-dependent nuclear trafficking of PML*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206140>
- Sewatanon, J., & Ling, P. D. (2014). Murine Gammaherpesvirus 68 Encodes a Second PML-Modifying Protein. *Journal of Virology*, 88(6), 3591–3597. <https://doi.org/10.1128/jvi.03081-13>
- Sharova, (2005). *How does a cell repair damaged DNA?* <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0113-4>
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2002). *REVIEW Telomerase: A target for cancer therapeutics*.
- Shen, T. H., Lin, H.-K., Scaglioni, P. P., Yung, T. M., & Pandolfi, P. P. (n.d.). *The Mechanisms of PML-Nuclear Body Formation*.
- Shiraishi, T., Druck, T., Mimori, K., Flomenberg, J., Berk, L., Alder, H., Miller, W., Huebner, K., & Croce, C. M. (2001). Sequence conservation at human and mouse orthologous common fragile regions, FRA3BFHIT and Fra14A2Fhit. In *PNAS May* (Vol. 8, Issue 10). [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.091095898](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.091095898)
- Singer, (1982). Highly Repeated Sequences in Mammalian Genomes. *International Review of Cytology*. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61789-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61789-1)
- Sobinoff, A. P., Allen, J. A., Neumann, A. A., Yang, S. F., Walsh, M. E., Henson, J. D., Reddel, R. R., & Pickett, H. A. (2017). BLM and SLX4 play opposing roles in recombination-dependent replication at human telomeres. *The EMBO Journal*, 36(19), 2907–2919. <https://doi.org/10.15252/embj.201796889>
- Stadler, (1995). Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene*.
- Spirkoski, J., Shah, A., Reiner, A. H., Collas, P., & Delbarre, E. (2019). PML modulates H3.3 targeting to telomeric and centromeric repeats in mouse fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 511(4), 882–888. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.087>
- Stavropoulos, D. J., Bradshaw, P. S., Li, X., Pasic, I., Truong, K., Ikura, M., Ungrin, M., & Meyn, M. S. (n.d.). *The Bloom syndrome helicase BLM interacts with TRF2 in ALT cells and promotes telomeric DNA synthesis*. <https://academic.oup.com/hmg/article/11/25/3135/578795>
- Stults, D. M., Killen, M. W., Williamson, E. P., Hourigan, J. S., Vargas, H. D., Arnold, S. M., Moscow, J. A., & Pierce, A. J. (2009). Human rRNA gene clusters are recombinational hotspots in cancer. *Cancer Research*, 69(23), 9096–9104. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2680>

- Sun, J., Fu, S., Zhong, W., & Huang, H. (2013). PML overexpression inhibits proliferation and promotes the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Oncology Reports*, *30*(6), 2785–2794. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2786>
- Sung, K. S., Lee, Y. A., Kim, E. T., Lee, S. R., Ahn, J. H., & Choi, C. Y. (2011). Role of the SUMO-interacting motif in HIPK2 targeting to the PML nuclear bodies and regulation of p53. *Experimental Cell Research*, *317*(7), 1060–1070. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.12.016>
- Talluri, S., & Dick, F. A. (2014). The retinoblastoma protein and PML collaborate to organize heterochromatin and silence E2F-responsive genes during senescence. *Cell Cycle*, *13*(4), 641–651. <https://doi.org/10.4161/cc.27527>
- Tatham, (2005). *Unique binding interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 reveal a mechanism for SUMO paralog selection*. <https://doi.org/10.1038/nsmb878>
- Thadathil, N., Hori, R., Xiao, J., & Khan, M. M. (2019). DNA double-strand breaks: a potential therapeutic target for neurodegenerative diseases. In *Chromosome Research* (Vol. 27, Issue 4, pp. 345–364). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10577-019-09617-x>
- Ting, D. T., Lipson, D., Paul, S., Brannigan, B. W., Akhavanfard, S., Coffman, E. J., Contino, G., Deshpande, V., Iafrate, A. J., Letovsky, S., Rivera, M. N., Bardeesy, N., Maheswaran, S., & Haber, D. A. (2011). Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science*, *331*(6017), 593–596. <https://doi.org/10.1126/science.1200801>
- Trenz, K., Smith, E., Smith, S., & Costanzo, V. (2006). ATM and ATR promote Mre11 dependent restart of collapsed replication forks and prevent accumulation of DNA breaks. *EMBO Journal*, *25*(8), 1764–1774. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601045>
- Vaitiekunaite, R., Butkiewicz, D., Krześniak, M., Przybyłek, M., Gryc, A., Śnietura, M., Benedyk, M., Harris, C. C., & Rusin, M. (2007). Expression and localization of Werner syndrome protein is modulated by SIRT1 and PML. *Mechanisms of Ageing and Development*, *128*(11–12), 650–661. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.09.004>
- Vancurova, M., Hanzlikova, H., Knoblochova, L., Kosla, J., Majera, D., Mistrik, M., Burdova, K., Hodny, Z., & Bartek, J. (2019). PML nuclear bodies are recruited to persistent DNA damage lesions in an RNF168-53BP1 dependent manner and contribute to DNA repair. *DNA Repair*, *78*, 114–127. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.04.001>
- Vens, C., Hofland, I., & Begg, A. C. (2007). Involvement of DNA polymerase beta in repair of ionizing radiation damage as measured by in vitro plasmid assays. *Radiation Research*, *168*(3), 281–291. <https://doi.org/10.1667/RR0750.1>
- Vernier, M., Bourdeau, V., Gaumont-Leclerc, M. F., Moiseeva, O., Bégin, V., Saad, F., Mes-Masson, A. M., & Ferbeyre, G. (2011). Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes and Development*, *25*(1), 41–50. <https://doi.org/10.1101/gad.1975111>
- Vispé, S., Cazaux, C., Lesca, C., & Defais, M. (1998). Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 26, Issue 12).

- Vodenicharov, M. D., Sallmann, F. R., Satoh, M. S., & Poirier, G. G. (2000). Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase 1. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 28).
- Voisset, E., Moravcsik, E., Stratford, E. W., Jaye, A., Palgrave, C. J., Hills, R. K., Salomoni, P., Kogan, S. C., Solomon, E., & Grimwade, D. (2018). *Pml nuclear body disruption cooperates in APL pathogenesis and impairs DNA damage repair pathways in mice*.  
<http://ashpublications.org/blood/article-pdf/131/6/636/1466576/blood794784.pdf>
- von Bernuth, H., Ravindran, E., Du, H., Fröhler, S., Strehl, K., Krämer, N., Issa-Jahns, L., Amulic, B., Ninnemann, O., Xiao, M. S., Eirich, K., Kölsch, U., Hauptmann, K., John, R., Schindler, D., Wahn, V., Chen, W., & Kaindl, A. M. (2014). Combined immunodeficiency develops with age in Immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome 2 (ICF2). *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9, 116. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0116-6>
- Vousden, K. H., & Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. In *Cell* (Vol. 137, Issue 3, pp. 413–431). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.037>
- Wang, Z.-G., Rivi, R., Delva, L., Kö, A., Scheinberg, D. A., Gambacorti-Passerini, C., Gabrilove, J. L., Warrell, R. P., & Pandolfi, P. P. (n.d.). *Arsenic Trioxide and Melarsoprol Induce Programmed Cell Death in Myeloid Leukemia Cell Lines and Function in a PML and PML-RAR Independent Manner*.
- Watson. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*.  
<https://doi.org/10.1038/newbio239197a0>
- Weinblum, D., Breter, H. J., Zahn, R. K., & Berger, J. (1974). ALTERATION OF DNA REASSOCIATION KINETICS DUE TO BASE MISMATCH CAUSED BY THYMINE DIMERISATION. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 374).
- Wilson, (1997). Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature*.  
<https://doi.org/10.1038/41365>
- Yang, S. Y., Chang, E. Y. C., Lim, J., Kwan, H. H., Monchaud, D., Yip, S., Stirling, P. C., & Wong, J. M. Y. (2021). G-quadruplexes mark alternative lengthening of telomeres. *NAR Cancer*, 3(3).  
<https://doi.org/10.1093/narcan/zcab031>
- Yano, K. I., & Chen, D. J. (2008). Live cell imaging of XLF and XRCC4 reveals a novel view of protein assembly in the non-homologous end-joining pathway. In *Cell Cycle* (Vol. 7, Issue 10, pp. 1321–1325). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.7.10.5898>
- Yeager, (1999). Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res*.
- Yeung, P. L., Denissova, N. G., Nasello, C., Hakhverdyan, Z., Chen, J. D., & Brenneman, M. A. (2012). Promyelocytic leukemia nuclear bodies support a late step in DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(5), 1787–1799.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.24050>

- Yuan, J., & Chen, J. (2009). N terminus of CtIP is critical for homologous recombination-mediated double-strand break repair. *Journal of Biological Chemistry*, 284(46), 31746–31752. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.023424>
- Zeng, S., Xiang, T., Pandita, T. K., Gonzalez-Suarez, I., Gonzalo, S., Harris, C. C., & Yang, Q. (2009). Telomere recombination requires the MUS81 endonuclease. *Nature Cell Biology*, 11(5), 616–623. <https://doi.org/10.1038/ncb1867>
- Zhang, P., Chin, W., Chow, L. T. C., Chan, A. S. K., Yim, A. P. C., Leung, S.-F., Mok, T. S. K., Chang, K.-S., Johnson, P. J., & Chan, J. Y. H. (2000). LACK OF EXPRESSION FOR THE SUPPRESSOR PML IN HUMAN SMALL CELL LUNG CARCINOMA. In *J. Cancer* (Vol. 85).
- Zhang, J. M., Yadav, T., Ouyang, J., Lan, L., & Zou, L. (2019a). Alternative Lengthening of Telomeres through Two Distinct Break-Induced Replication Pathways. *Cell Reports*, 26(4), 955-968.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.102>
- Zhang, J. M., & Zou, L. (2020). Alternative lengthening of telomeres: From molecular mechanisms to therapeutic outlooks. In *Cell and Bioscience* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00391-6>
- Zhang, J. M., Genois, M. M., Ouyang, J., Lan, L., & Zou, L. (2021). Alternative lengthening of telomeres is a self-perpetuating process in ALT-associated PML bodies. *Molecular Cell*, 81(5), 1027-1042.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.030>
- Zhong, (1999). A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203367>
- Zhong, S., Mü, S., Ronchetti, S., Freemont, P. S., Dejean, A., & Pandolfi, P. P. (2000). *Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation*.
- Zlotorynski, E., Rahat, A., Skaug, J., Ben-Porat, N., Ozeri, E., Hershberg, R., Levi, A., Scherer, S. W., Margalit, H., & Kerem, B. (2003). Molecular Basis for Expression of Common and Rare Fragile Sites. *Molecular and Cellular Biology*, 23(20), 7143–7151. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.20.7143-7151.2003>
- Zou and Elledge, (2003). *Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes*. <https://doi.org/10.1126/science.1083430>