

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium interakce nukleových kyselin a proteinů pomocí
afinitní chromatografie

Disertační práce

Autor: Mgr. Lucie Béresová
Studijní program: P1406 Biochemie
Studijní obor: Biochemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: Mgr. René Lenobel, Ph.D.
Konzultant: Mgr. Martin Mistrík, Ph.D.

Olomouc 2017

„Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne:

.....

Mgr. Lucie Béresová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Dr. Renému Lenobelovi za odborné vedení, všechny konzultace, trpělivost a kritickou revizi jak publikovaných článků, tak disertační práce. Dále bych ráda poděkovala kolegům z Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Dr. Ivu Chamrádovi a Dr. Radimu Simerskému za metodické a technické rady a také za přátelské prostředí, které mi poskytli.

Poděkování patří Prof. Jiřímu Bártkovi a Dr. Martinu Mistríkovi za příležitost studovat a pracovat v Laboratoři Integrity Genomu, a také za jejich podporu, cenné rady a čas, který mě a moji práci věnovali. Za pomoc a rady při realizaci molekulárně-biologických experimentů bych ráda poděkovala Mgr. Evě Veselé, Mgr. Ivě Protivánkové, Mgr. Pavlíně Duškové a celému kolektivu Laboratoře Integrity Genomu. Poděkování patří také rodině a blízkým přátelům za trpělivost, pochopení a podporu, kterou mi poskytli během řešení této práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Lucie Béresová
Název práce:	Studium interakce nukleových kyselin a proteinů pomocí afinitní chromatografie
Typ práce:	Disertační
Pracoviště:	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci Laboratoř integrity genomu, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	Mgr. René Lenobel Ph.D
Rok obhajoby práce:	2017

Abstrakt:

DNA-afinitní chromatografie je jednou z metod studia vzájemných interakcí nukleových kyselin s proteiny. Tato metoda je principiálně založena na afinitě proteinu ke konkrétní nukleotidové sekvenci případně struktuře nukleové kyseliny. Vhodným způsobem ukotvení této sekvence k pevnému nosiči lze zkonstruovat DNA-afinitní matici a získat tak účinný nástroj k izolaci konkrétního proteinu případně celého proteomu. Ve spojení s metodami kvantitativní proteomiky a hmotnostní spektrometrie (MS) představuje DNA-afinitní chromatografie dostatečně účinnou a citlivou metodou pro izolaci a následnou identifikaci DNA vazebných proteinů. Tato disertační práce se věnuje použití metody DNA-afinitní chromatografie v izolaci a identifikaci proteinů hrajících roli v buněčných procesech replikace a zachování stability fragilních míst DNA. Literární rešerše poskytuje souhrn dosavadních metod studia vzájemných interakcí nukleových kyselin s proteiny pomocí DNA a RNA afinitní chromatografie. Probrány jsou klíčové kroky konstrukce specifické afinitní matrice, experimentální přístupy samotného provedení DNA/RNA-afinitní chromatografie a také identifikace a kvantifikace specificky vázaných proteinů pomocí metod kvantitativní

proteomiky a hmotnostní spektrometrie. Součástí je také kapitola věnována replikačnímu stresu a fragilním místům DNA, která přibližuje problematiku poškození DNA a jejich opravných mechanismů souvisejících s experimentální částí práce.

V této práci byla aplikována metoda DNA-afinitní chromatografie v kombinaci s kvantitativní proteomikou a MS jako nástroj izolace a identifikace proteinů interagujících s fragilními místy DNA. Pro izolaci proteinů vázajících se k těmto místům byl navržen specifický DNA-afinitní ligand napodobující sekundární strukturu fragilního místa FRA16D a také kontrolní ligand se stabilní lineární strukturou. Oba ligandy byly modifikovány na 5'konci biotinem a následně imobilizovány k magnetickým částicím pokrytým streptavidinem. S takto zhotovenými maticemi, specifickou a kontrolní, byla provedena DNA-afinitní chromatografie. K DNA afinitní purifikaci byly použity extrakty proteinů z jader pocházejících z buněk kultivovaných za normálních podmínek a z buněk vystavených replikačnímu stresu působením aphidicolinu. Kombinací DNA-afinitní chromatografie, metody relativní kvantifikace proteinů (izotopového značení proteinů v buňkách - SILAC) a MS byly identifikovány proteiny specificky vázané k ligandu FRA16D-fragment za normálních kultivačních podmínek i po působení aphidicolinu. Identifikováno bylo několik nových kandidátních proteinů, ze kterých byl zvolen a detailně charakterizován XPC protein. Přínosem předkládané práce je nejen odhalení nové biologické funkce proteinu XPC během replikačním stresu a v zachování stability fragilních míst, ale také unikátní přístup návrhu strukturně specifického ligandu FRA16D-fragment, který ve spojení s DNA-afinitní chromatografií a MS umožnil izolaci a následnou identifikaci zajímavých proteinů, jejichž role v zachování stability fragilních míst může být dále zkoumána pomocí molekulárně-biologických metod.

Klíčová slova: DNA-afinitní chromatografie, kvantitativní proteomika, hmotnostní spektrometrie, XPC protein, fragilní místa

Počet stran: 92

Počet příloh: 2

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Lucie Béresová

Title: The study of nucleic acid-protein interactions using affinity chromatography

Type of thesis: Ph.D.

Department: Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacky University
Laboratory of Genome Integrity, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of medicine, Palacky University Olomouc

Supervisor: Mgr. René Lenobel, Ph.D

The year of presentation: 2017

Abstract:

DNA affinity chromatography is one of the methods used for study of nucleic acid-protein interactions. It is based on the affinity of the protein to the specific sequence of nucleotides or specific DNA structure. Immobilization of this specific sequence to the solid phase allows the construction of DNA affinity resin convenient for isolation of specific binding protein or whole proteome. DNA affinity chromatography in combination with quantitative proteomics and mass spectrometry (MS) is an efficient and sensitive tool for isolation and subsequent identification of DNA binding proteins. This thesis explores the usage of DNA affinity chromatography for isolation and identification of proteins with potential role in biological processes such a replication and maintenance of fragile sites. Survey of literature provides general knowledge of current methods for study of interactions of nucleic acids and proteins using DNA affinity

chromatography. Key parameters in the purification of DNA binding proteins such as construction of specific DNA affinity resin, experimental workflow of DNA affinity chromatography and subsequent methods for identification and quantification of DNA binding proteins by quantitative proteomics and mass spectrometry are described. The chapter about replication stress and fragile sites explains consequences of replication stress and DNA damage response pathways which are connected to the experimental part of the thesis.

In this thesis the DNA affinity chromatography in combination with quantitative proteomics and MS was used as a powerful tool for isolation and subsequent identification of proteins interacting with fragile sites. For the isolation of fragile sites' binding proteins we designed a specific DNA affinity ligand mimicking a part of the secondary structure of the fragile site FRA16D and also a control ligand with stable linear structure. Both ligands were modified at the 5' end by biotin and immobilized to magnetic beads covered by streptavidin. These affinity resins, specific FRA16D-fragment and control, were used for DNA affinity chromatography. The extracts of nuclear proteins from cells cultivated under normal growth conditions and cells cultivated upon replication stress induced by aphidicolin were used for DNA affinity purification. DNA affinity chromatography coupled with a method of relative quantification of proteins (isotope labeling of proteins in cells - SILAC) and MS identified proteins specifically enriched at the FRA16D-fragment upon normal conditions and aphidicolin treatment. We identified several new protein candidates from which the XPC protein was chosen for further characterization.

The importance of this thesis is not only in the evaluation of new biological role of XPC protein in replication stress and maintenance of fragile site stability, but also in the unique experimental design of the structural specific FRA16D-fragment ligand. In combination with DNA affinity chromatography and MS, it allows identification of interesting proteins, which role in maintenance of fragile sites could be further explored by methods of molecular biology.

Keywords: DNA affinity chromatography, quantitative proteomics, mass spectrometry, XPC protein, common fragile sites

Number of pages: 92

Number of appendices: 2

Language: Czech

Obsah

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE	10
2. INTERAKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN S PROTEINY	12
2.1 Vazebné motivy proteinů interagujících s nukleovými kyselinami	13
3. AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE VE STUDIU INTERAKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN S PROTEINY	15
3.1 Konstrukce DNA/RNA afinitní matrice	15
3.1.1 Návrh a volba DNA/RNA ligandu	16
3.1.2 Imobilizace DNA/RNA ligandu k pevné fázi	18
3.2 <i>In vitro</i> izolace DNA a RNA vazebných proteinů	19
3.3 <i>In vivo</i> izolace DNA a RNA vazebných proteinů	23
3.4 Identifikace DNA a RNA vazebných proteinů pomocí kvantitativní proteomiky a MS	27
3.4.1 Příprava vzorků k MS analýze	28
3.4.2 Metodické postupy identifikace DNA a RNA vazebných proteinů	29
3.4.3 Metodické postupy relativní kvantifikace DNA a RNA vazebných proteinů	32
4. REPLIKAČNÍ STRES	35
4.1 Buněčná odpověď na RS a poškození DNA	36
5. BĚŽNÁ FRAGILNÍ MÍSTA	38
5.1 Molekulární příčiny exprese BFM	38
5.2 Opravné mechanismy a kontrolní body podílející se na zachování stability BFM	39
5.3 Spojitost BFM s nádorovým onemocněním	40
6. MATERIÁL A METODIKA	43
6.1 Návrh specifického a kontrolního DNA ligandu	43
6.2 Konstrukce afinitní matrice	45
6.3 Kultivace buněčných kultur	45
6.4 Příprava buněčného lyzátu a FRA16D-fragment afinitní chromatografie	46
6.5 Identifikace FRA16D-fragment vazebných proteinů pomocí MS	47
6.5.1 SDS-PAGE a proteolytické štěpení proteinů v gelu	47
6.5.2 Příprava vzorků pro MS analýzu	48
6.5.3 Analýza peptidů pomocí nLC-MS/MS	49
6.5.4 Zpracování MS dat a jejich vyhodnocení	50
6.6 Imunofluorescenční barvení vzorků	51
6.7 Analýza mitotických buněk-detekce chromozomálního poškození pomocí γ H2AX proteinu	51

6.8	Imunofluorescenční detekce proteinů buněčné odpovědi na poškození DNA.....	52
6.9	Western blot.....	52
6.10	Určení mitotického indexu pomocí průtokové cytometrie	53
7.	KOMENTOVANÉ VÝSLEDKY A DISKUZE	54
7.1	Experimentální strategie k identifikaci proteinů interagujících s BFM.....	54
7.2	Identifikace proteinů obohacených na ligandu FRA16D-fragment	56
7.3	Detekce exprese BFM na mitotických chromozomech	60
7.4	Studium role XPC proteinu v zachování stability fragilních míst.....	62
7.5	Úloha XPC proteinu v regulaci proteinů buněčné odpovědi na RS	65
8.	ZÁVĚR	68
9.	SEZNAM LITERATURY	70
10.	SEZNAM ZKRATEK	86
11.	ŽIVOTOPIS	89
12.	SEZNAM PŘÍLOH	92

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Vzájemné interakce nukleových kyselin s proteiny hrají významnou roli v řadě biologických procesů jako je transkripce, translace, replikace a regulace kontrolních a opravných mechanismů DNA. Studium těchto interakcí tak umožňuje objasnit procesy podílející se na zachování stability genomu a přispět nejen k odhalení podstaty možného vzniku řady onemocnění, ale i způsobu možné terapie.

Zásadním procesem probíhajícím mezi dělícími se buňkami je přenos genetické informace replikací DNA. Replikace DNA je evolučně konservovaný dynamický proces zahrnující řadu kaskádovitých interakcí proteinů s DNA (Masai et al., 2010). Průběh replikace DNA podléhá různým vnitřním a vnějším vlivům, které mohou způsobit její zpomalení případně zastavení. Příčinou tohoto replikačního stresu (RS) může být deficit nukleotidů potřebných k syntéze DNA (Poli et al., 2012), nedostatek replikačních počátků (Cayrou et al., 2010) anebo působení chemických látek, které ovlivňují strukturu DNA případně aktivitu proteinů replisomu (Sanderson a Shield, 1996). Jednou z těchto látek je aphidicolin (APH), tetracyklinový diterpenoid izolovaný z houby *Nigrospora sphaerica*, který působí jako inhibitor DNA polymerázy α , β a δ , a tím ovlivňuje rychlost průběhu DNA replikace (Cheng a Kuchta, 1993). Jedná se také o látku indukující expresi většiny běžných fragilních míst (BFM) (Mrasek et al., 2010).

BFM jsou specifické úseky genomu, u nichž působením RS dochází k delecii, translokaci a amplifikaci DNA (Arlt et al., 2006; Debatisse et al., 1998). Poškození v oblasti BFM je viditelné jako zlom nebo mezera přítomná na metafázních chromozomech (Glover et al., 1984). Strukturní analýza BFM odhalila, že se jedná o dlouhé oblasti genomu bohaté na báze adenin a thymin, a také oblasti chudé na replikační počátky (Becker et al., 2002; Letessier et al., 2011). Působením inhibitoru DNA polymerázy, aphidicolinu, v koncentracích jež způsobuje zpomalení replikační vidličky, dochází v těchto místech k tvorbě stabilních sekundárních struktur, které jsou těžce replikovatelné a náchylné k poškození (Schwartz et al., 2006; Zhang a Freudenreich, 2007). Dosavadní metody sloužící k identifikaci proteinů podílejících se na zachování stability BFM byly většinou založeny na uměle vytvořeném deficitu sledovaného proteinu a následné detekci počtu zlomů a mezer na metafázních chromozomech bez i s indukci RS pomocí APH (Pirzio et al., 2008). Metoda DNA-afinitní chromatografie v kombinaci s kvantitativní proteomikou a MS jako nástroj izolace a identifikace proteinů vázajících se k fragilním místům nebyla dosud provedena.

DNA/RNA-afinitní chromatografie (NK-afinitní chromatografie) je principiálně založena na afinitě vazebného místa proteinu ke konkrétní nukleotidové sekvenci anebo struktuře nukleové kyseliny. Vhodným způsobem ukotvení této sekvence k pevnému nosiči lze zkonstruovat afinitní matici a získat tak účinný nástroj k izolaci konkrétního proteinu případně celého proteomu (Gadgil et al., 2001). Ve spojení s metodami kvantitativní proteomiky a hmotnostní spektrometrie představuje NK-afinitní chromatografie dostatečně účinnou a citlivou metodou pro izolaci a následnou identifikaci DNA/RNA vazebných proteinů (Butter et al., 2009; Mittler et al., 2009; Scheibe et al., 2013a).

Cíle této disertační práce:

- Zpracování literární rešerše zadané tematiky a její shrnutí ve formě přehledového článku
- Zavedení metody DNA-afinitní chromatografie pro izolaci proteinů interagujících s fragilním místem FRA16D.
- Identifikace a kvantifikace FRA16D vazebných proteinů kombinací metod kvantitativní proteomiky a MS
- Ověření biologické role FRA16D-fragment vazebných proteinů v zachování stability fragilních míst pomocí molekulárně-biologických metod.

2. INTERAKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN S PROTEINY

Interakce nukleových kyselin (NK) s proteiny jsou založeny na vzájemné afinitě vazebných domén proteinu a specifické sekvence případně struktury NK. Tyto vazby umožňují regulaci životně důležitých procesů a jejich kaskádovité interakce jsou podstatou zachování integrity genomu.

Základní stavební jednotkou DNA je nukleotid složený z báze, monosacharidu 2-deoxyribózy a fosfátové skupiny. Jednotlivé nukleotidy jsou navzájem spojeny fosfodiesterovou vazbou vznikající mezi 5'uhlíkem 2-deoxyribózy jednoho nukleotidu a 3'uhlíkem 2-deoxyribózy sousedního nukleotidu, čímž vzniká polynukleotidové vlákno ve směru 5'-3'. DNA je složena ze dvou antiparalelních vláken spojených na základě komplementarity bází adenin-thymin a cytozin-guanin vodíkovými můstky. Strukturně se jedná o dvoušroubovici α -helix. DNA je v eukaryotické buňce součástí chromatinu. Chromatin je tvořen strukturními proteiny (histony), kolem nichž je DNA obtočena a tvoří tak vysoce kompaktní a organizovanou strukturu chromozomů. DNA a histony jsou spolu spojeny na základě nekovalentních vazeb mezi pozitivně nabitými postranními řetězci aminokyselin histonů a negativně nabitou fosfátovou skupinou DNA řetězce (Travers a Drew, 1997). Různé posttranslační modifikace (acetylace, metylace, fosforylace) těchto aminokyselin naruší vazby histonu k DNA molekule, a tím je DNA zpřístupněna regulaci genové exprese (Khorasanizadeh, 2004). Studium struktury chromatinu, jeho organizace stejně jako vzájemných interakcí nukleových kyselin s proteiny umožňuje objasnit významné biologické procesy jako je transkripce, replikace a oprava poškozené DNA.

Transkripce je hlavním mechanismem exprese genetické informace, která probíhá ve všech živých buňkách součinností transkripčních faktorů (TF). Přenos genetické informace, která má být transkribována je mezi buňkami zprostředkován procesem replikace DNA. Základním požadavkem pro průběh těchto mechanismů je rozpoznání místa, které má být transkribováno/replikováno. Vzájemnými interakcemi proteinů se specifickými DNA sekvencemi dochází k tvorbě aktivačních komplexů, které tak označují možný začátek transkripce/replikace.

V případě transkripce je to řada TF, které tvoří komplex v místě promotoru a označují místo pro vazbu RNA polymerázy. RNA polymeráza se podílí na rozvolnění DNA řetězce, vazbě k promotoru a zahájení transkripce, prodlužování mRNA dle DNA templátu a odstranění chyb

ve vznikajícím transkriptu. Všechny tyto procesy jsou regulovány vzájemnými interakcemi s dalšími TF, které označují samotné místo promotoru anebo regulují aktivaci případně potlačení transkripce vazbou k tzv. regulační oblasti (Hantsche a Cramer, 2016).

Stejně jako zahájení transkripce, tak i iniciace DNA replikace je umožněna tvorbou iniciačních komplexů v oblastech replikačních počátků, které mění konfiguraci chromatinu a označují počátek replikace. Vzájemnou interakcí těchto regulačních proteinů s DNA helikázou dochází k rozvolnění DNA řetězce, tvorbě replisomu a syntéze nového řetězce DNA pomocí DNA polymerázy. Také DNA replikace je regulována řadou mechanismů, vzájemných interakcí proteinů s DNA, které ovlivňují její správný průběh a bezchybný přepis genetické informace (Masai et al., 2010). V případě, že dojde k poruše v některém z těchto regulačních mechanismů a chybám nebo poškození v DNA dochází k zastavení replikační vidličky a zahájení opravných mechanismů. Vznikající chyby mohou být opraveny a dochází k restartu DNA replikace, v opačném případě je zastaven buněčný cyklus případně spuštěna apoptóza (Lukas et al., 2004; Paulsen a Cimprich, 2007; Sørensen et al., 2005).

2.1 Vazebné motivy proteinů interagujících s nukleovými kyselinami

DNA vazebné proteiny obsahují jednu nebo i více vazebných domén, které slouží nejen k interakci s DNA, ale také pro vazbu k dalším interakčním partnerům. Tyto domény se liší specifickými vazebnými motivy, které zprostředkovávají vazbu k DNA. Většina těchto motivů obsahuje α -helix strukturu, která slouží k vazbě velkého žlábků dvoušroubovice DNA a k rozpoznání specifických párů bází. Struktura β -skládaného listu umožňuje nespecifickou vodíkovou vazbu mezi amidovými skupinami peptidů s fosfáty DNA v oblasti malého žlábků. K nejběžnějším vazebným motivům patří motiv zinkového prstu, leucinový zip, helix-otočka-helix a helix-smyčka-helix.

Motiv zinkového prstu je tvořen jedním α -helixem a jedním β -skládaným listem, které jsou spojeny a stabilizovány různými počty zinečnatých iontů. Základní struktura je tvořena dvěma cysteiny oddělenými několika aminokyselinami, následuje delší řetězec aminokyselin a dva histidiny opět oddělené aminokyselinami. Tento základní motiv je označován Cys₂His₂. Histidiny a cystein vázící zinečnaté ionty tak tvoří zinkový motiv, zatím co ostatní aminokyseliny slouží k rozpoznání specifické sekvence DNA. Byla identifikována řada variant tohoto motivu lišící se především počtem cysteinů a histidinů jako Cys₃His₂, Cys₃His a Cys₄.

Většina proteinů obsahující tento motiv jsou transkripční faktory (Berg a Godwin, 1997; Laity et al., 2001).

Motiv leucinového zipu je tvořen dvěma α -helixy bohatými na leucin. Každý z α -helixů tvoří jeden monomer obsahující část tvořenou leuciny a vazebnou část obsahující ostatní aminokyseliny rozpoznávající specifické DNA sekvence. α -helixy jsou spojeny hydrofobní vazbou v leucinové oblasti. V případě, že vazebný motiv obou α -helixů rozpoznává stejnou DNA sekvenci, přítomnou ve velkém žlábků DNA, jedná se o homodimer. V případě rozdílných vazebných motivů rozpoznávajících dvě různé DNA sekvence mluvíme o heterodimeru (Alber, 1992)

Motiv helix-smyčka-helix je tvořen jedním delším a jedním kratším α -helixem, které jsou spojené smyčkou. Vazba k DNA je ve formě dimeru, tudíž jedna část slouží k dimerizaci a druhá k rozpoznání specifické DNA sekvence (Garrell a Campuzano, 1991).

Helix-otočka-helix motiv je tvořen dvěma α -helixy spojenými aminokyselinovým řetězcem do fixního úhlu. Jeden z helixů se váže k DNA a druhý kolmo k němu rozpoznává specifickou nukleotidovou sekvenci ve velkém žlábků nukleové kyseliny (Harrison a Aggarwal, 1990).

Rozhodujícími faktory pro vzájemnou interakci proteinů s konkrétní sekvencí DNA je charakter vazebného motivu proteinu a struktura nukleové kyseliny, která je ovlivněna sekvencí nukleotidů, prostředím a interakcemi s dalšími molekulami. Specifické vazby regulačních proteinů vznikají interakcí jejich vazebných domén s bázemi DNA v oblastech velkého žlábků a v menší míře v žlábků malém. Specifita vazby spočívá zejména ve schopnosti motivu rozpoznat sekvenci konkrétních párů bází, které poskytují zcela unikátní možnost vazby regulačního proteinu (Privalov et al., 2007; Rohs et al., 2010).

Vzájemné interakce RNA vazebných proteinů a RNA jsou ve srovnání s DNA vazebnými motivy méně objasněny a to jak z důvodu vysoké strukturní flexibility jednovláknových RNA molekul, tak i variabilitě vazebných domén RNA vazebných proteinů. Zatím co DNA vazebné proteiny rozpoznávají svými doménami konkrétní specifickou DNA sekvenci, RNA vazebné proteiny mohou svými doménami specificky rozpoznávat i několik sekvencí RNA (Murn et al., 2016). O vazbě RNA vazebného proteinu často rozhoduje nejen sekvence RNA molekuly, ale také vzájemná konformace vazebné domény a RNA (Duss et al., 2014). Některé vazby proteinů k RNA jsou založeny na rozpoznání specifické struktury nikoliv sekvence (Vasilyev et al., 2015). Vazebná afinita RNA vazebných proteinů je podstatně nižší, v některých případech zesílena přítomností více vazebných domén (Shamoo et al., 1994).

3. AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE VE STUDIU INTERAKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN S PROTEINY

Jeden ze způsobů izolace DNA a RNA vazebných proteinů je afinitní chromatografie. Tato metoda je založena na principu afinity proteinu k specifické sekvenci případně struktuře nukleové kyseliny, která je imobilizována k pevné matici. Pro správné provedení NK-afinitní chromatografie je zásadním krokem volba specifického DNA/RNA ligandu a konstrukce afinitní matrice vhodné k izolaci proteinu případně celého proteomu z komplexní proteinové směsi. Dále pak volba elučních podmínek a finální zpracování vzorku pro následnou analýzu pomocí MS.

Každý z uvedených kroků NK-afinitní purifikace prošel postupným vývojem, jehož cílem bylo zvýšit specifitu izolace a citlivost identifikace proteinů a tím zvýšit aplikovatelnost metody v praxi. Zásadního rozmachu dosáhla NK-afinitní chromatografie především díky zdokonalení metod MS, které se zvýšením citlivosti detekce proteinů umožňují nejen identifikaci minoritně zastoupených proteinů, ale v kombinaci s vhodně zvolenými přístupy kvantitativní proteomiky také jejich kvantifikaci a určení specifity vazby.

3.1 Konstrukce DNA/RNA afinitní matrice

Nejdůležitějšími částmi pro konstrukci DNA afinitní matrice je volba a návrh specifického afinitního ligandu, jeho syntéza a imobilizace k vhodně zvolené matici. Prováděny jsou DNA-afinitní chromatografie jak na krátkých a sekvenčně specifických oligonukleotidech, tak i na dlouhých strukturně specifických řetězcích DNA. Návrh a volba ligandu závisí na výsledku, který od metody očekáváme. Při izolaci konkrétního proteinu např. TF může být volen kratší sekvenčně specifický ligand, ke kterému má daný protein afinitu. Řada proteinů interaguje s DNA na základě kaskádovité vazby dalších proteinů k vzdálenějším regulačním oblastem DNA, a proto je k izolaci celého proteinového komplexu vhodné zvolit jako ligand delší úsek DNA (Babayeva et al., 2012; Jiang et al., 2006; Mittler et al., 2009). Během různých buněčných procesů jako je replikace, transkripce, rekombinace, ale také působením vnějších vlivů dochází k strukturálním změnám v řetězci DNA. Volbou strukturně specifických ligandů, tak získáme nástroj izolace proteinů hrajících roli v regulaci těchto fyziologických procesů (Fishel et al., 1988; Gao et al., 2015).

Izolace konkrétního RNA vazebného proteinu „in vitro“ pomocí sekvenčně specifické RNA je oproti izolaci DNA vazebných proteinů prováděna v menší míře. Úskalím je především volba specifického RNA ligandu, jelikož RNA molekuly mohou zaujímat různé konformace ovlivněné vazbou dalších proteinů a také nízká afinita RNA vazebných proteinů. Jako RNA ligandy jsou proto voleny dlouhé oligonukleotidy umožňující vazbu všech interakčních partnerů a schopné zaujmout potřebnou sekundární strukturu (Harris et al., 2006; Kar et al., 2011; Ward et al., 2011).

3.1.1 Návrh a volba DNA/RNA ligandu

Charakteristickými vlastnostmi jednotlivých ligandů jsou specifická sekvence, délka a struktura.

Specifické DNA-afinitní ligandy mohou být navrhovány na základě již známé informace o sekvenci, kterou studovaný protein rozpoznává. Tyto sekvence lze zjistit například metodami DNase footprintingu anebo gelovou retardační analýzou. DNase footprinting je metoda, která umožňuje určit specifické vazebné místo proteinu v DNA sekvenci a to na základě vzniku úseku neštěpitelného enzymem DNázou, který je blokován právě navázaným proteinem. Toto místo je identifikováno jako chybějící úsek při elektroforetickém dělení enzymaticky štěpených fragmentů DNA (Hampshire et al., 2007). Gelová retardační analýza také známá pod zkratkou EMSA (z angl. Electrophoretic mobility shift assay) potvrzuje vazbu proteinu k specifické sekvenci na základě zpomalení elektroforetické mobility oligonukleotidu s vázaným proteinem oproti samotnému DNA řetězci tzv. shift. V případě, že potvrzujeme vazbu známého proteinu k určité DNA sekvenci lze použít specifickou protilátku a detekovat tzv. supershift, zpomalení komplexu protilátka-protein-DNA oproti volnému DNA řetězci (Ahmad a Lingrel, 2005). Dalším způsobem určení specifického vazebného místa proteinu je *in silico* predikce DNA-ligandu s použitím bioinformatických nástrojů zpracovávajících informace o proteinech a jejich vazebných motivech dostupných v různých databázích (Matys et al., 2003; Teixeira et al., 2006; Tjong a Zhou, 2007)

Kromě sekvenčně specifických ligandů lze pro afinitní purifikaci použít i ligandy strukturně specifické. Řada proteinů rozpoznává charakteristické sekundární struktury nukleových kyselin jako je Z-DNA, G-kvadruplexy, vnitřní smyčky a vlásenky. Z-DNA struktura je levotočivá dvoušroubovice DNA vznikající z klasické pravotočivé B-DNA. Biologická role této struktury je spojována především s procesem DNA rekombinace a jako specifický ligand byla použita

právě pro izolaci proteinů podílejících se na rekombinaci (Fishel et al., 1988). G-kvadruplexy jsou sekundární struktury vyskytující se na DNA i RNA v oblastech bohatých na bázi guanin. Nejčastěji se jedná o promotorové oblasti genů a telomerické oblasti chromozomů a hrají tedy významnou roli v transkripci a regulaci telomer. G4-kvadruplex byl použit jako specifický ligand pro izolaci proteinů z buněčného lyzátu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Ve spojení s hmotnostní spektrometrií byl identifikován již známý G4-kvadruplex vazebný protein G4p1 a nový G4 vazebný protein Sub1, regulátor transkripce, jehož specifita vazby ke G4-kvadruplexu byla zpětně potvrzena pomocí molekulárně-biologických metod (Gao et al., 2015).

Dalším parametrem, který je třeba zvážit je délka ligandu. V počátcích DNA-afinitní chromatografie byly jako DNA-ligandy voleny krátké sekvenčně specifické oligonukleotidy sloužící především k izolaci konkrétního transkripčního faktoru (TF), který byl dále charakterizován pomocí biochemických metod (Kadonaga a Tjian, 1986). Důležité bylo dostatečné množství TF ve vstupním materiálu, tak aby byla afinitní purifikace a obohacení proteinu na matici dostačující. Vzhledem k tomu, že proteiny během interakce s DNA vzájemně kooperují, volba delších DNA ligandů usnadňuje požadovanou protein-DNA interakci a na afinitním ligandu dochází k bohatení celého interakčního komplexu (Mittler et al., 2009).

Jak již bylo zmíněno, pro aplikaci RNA-afinitní chromatografie jsou voleny dlouhé RNA ligandy. Tyto specifické ligandy jsou produkovány zejména *in vitro* anebo *in vivo* transkripcí. Během syntézy RNA ligandu lze do vznikajícího řetězce inkorporovat afinitní značku umožňující následnou imobilizaci k matici případně afinitní purifikaci RNA ligandu z buněčného lyzátu. Inkorporovat lze značený ribonukleotidfosfát umožňující imobilizaci k částicím pokrytým streptavidinem (Goraczniak a Gunderson, 2008). Dalším způsobem je biotinylace vzniklého řetězce na 3'konci (Paingankar a Arankalle, 2015) anebo vložení specifického RNA aptameru s afinitou k streptavidinu nebo sephadexu. RNA aptamery jsou sekvence RNA, které rozpoznávají malé molekuly s dostatečnou selektivitou a specifitou. Tyto specifické aptamery lze získat metodou systematického vývoje ligandů na základě exponenciálního růstu (SELEX z angl. Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment). Zjednodušeně se jedná o inkubaci proteinu/ligandu s knihovnou RNA oligonukleotidů a separaci komplexu RNA-protein/ligand s nejpevnější vazbou. Tento proces probíhá v několika cyklech, než dojde k izolaci RNA sekvence, k níž má daný protein/ligand největší afinitu (Tuerk a Gold, 1990; Walker et al., 2008).

K správnému odlišení specifických NK-vazebných proteinů od proteinů vázaných nespecificky ať už k matici nebo nukleové kyselině je třeba navrhnout kontrolní ligand. Vzájemným porovnáním proteinů identifikovaných na specifické NK-afinitní a kontrolní matici pak získáme proteiny obohacené na specifickém NK ligandu. Jako kontrolní ligandy se často volí sekvence, které obsahují mutované nebo jinak pozměněné vazebné místo rozpoznávané cílovým proteinem/proteiny (Himeda et al., 2004; Meng et al., 2006; Ranish et al., 2003). V případě identifikace proteinů rozpoznávajících specifické struktury NK je volen kontrolní ligand se zcela odlišnou většinou lineární strukturou (Gao et al., 2015).

V současné době a to především díky rozvoji metod kvantitativní proteomiky a MS jsou NK-afinitní chromatografie aplikovány jako nástroj izolace DNA/RNA vazebných proteinů v rámci necílených proteomických skríníngů. Tyto skríníngy jsou zaměřeny především na hledání nových proteinů vážících se k specifické sekvenci nebo struktuře nukleové kyseliny za přirozených podmínek případně jako odpověď na působení různých vnitřních a vnějších vlivů (Butter et al., 2009; Mittler et al., 2009; Ranish et al., 2003; Scheibe et al., 2013a).

3.1.2 Imobilizace DNA/RNA ligandu k pevné fázi

Dalším krokem konstrukce afinitní matrice je volba vhodné pevné fáze. Obecné požadavky kladené na pevnou fázi jsou dostatečná mechanická odolnost, stabilita a co nejmenší náchylnost k nespecifické adsorpci proteinů. Jednotlivé částice fáze by měli mít uniformní velikost a poskytovat dostatečně velký povrch vhodný ke kvantitativní imobilizaci ligandů.

První pevné fáze používané v DNA-afinitní chromatografii byly celulóza a sefaróza (Alberts et al., 1968; Gadgil a Jarrett, 1999). Obě tyto matrice ne zcela odpovídají hlavním požadavkům kladeným na vhodnou afinitní matici. Celulóza se vyznačuje vysokou nespecifickou adsorpcí proteinů a mechanickou nestabilitou. Sefaróza je vhodnější z hlediska nízké nespecifické adsorpce proteinů, ale jako matrice vykazuje stejnou nestabilitu jako celulóza. Jako vhodnější fáze z hlediska uniformity povrchu, stability a nízké nespecifické adsorpce byly používány částice pokryté porézním křemenem a latexové částice (Goss et al., 1990; Inomata et al., 1994). Přelomovým materiálem v oblasti imobilizace DNA ligandu jsou magnetické mikročástice. Magnetické mikročástice mají ve srovnání s chromatografickými kolonami řadu výhod jako je rychlá a snadná imobilizace DNA ligandu, jednoduchá manipulovatelnost a možnost provedení

DNA-afinitní chromatografie s použitím malých promývacích a elučních objemů (Lu et al., 2011; Mittler et al., 2009; Samuel et al., 2005; Tacheny et al., 2012).

Při volbě pevné fáze pro imobilizaci DNA-ligandu je třeba zvažovat také způsob samotné imobilizace. Od počátku DNA-afinitní chromatografie až do současnosti bylo použito několik technik imobilizace DNA ligandu. První DNA imobilizace byly založeny na nekovalentním charakteru vazby mezi DNA řetězcem a maticí (Litman, 1968; Rutberg a Ronai, 1992) nebo na zachycení DNA oligonukleotidu do polyakrylamidového gelu (Cavaliere a Carroll, 1970). Mnohem rozšířenějším způsobem se stala kovalentní imobilizace DNA ligandu, kdy byla chemickou reakcí aktivována funkční skupina povrchu pevné fáze a až poté provedena vazba DNA-ligandu (Kadonaga a Tjian, 1986). Dalším používaným způsobem je metoda tzv. DNA trappingu, která byla použita k izolaci proteinů interagujících s promotorovou oblastí genu. Podstata metody spočívá v tom, že nejprve dochází k inkubaci DNA ligandu s proteinovým lyzátem a až poté k jeho zachycení na matici a to na základě komplementarity vazby mezi DNA ligandem značeným poly(T)oligonukleotidem a maticí pokrytou poly(A)oligonukleotidem (Jiang et al., 2006) anebo přímou vazbou neznačeného DNA ligandu s vázanými proteiny na aktivovanou hydrazidovou agarózu (Jia a Jarrett, 2015). V současné době je imobilizace DNA ligandů prováděna především pomocí biospecifické vazby streptavidin-biotin. DNA ligand je již během své syntézy modifikován biotinem, což umožňuje jeho následnou vazbu k magnetickým částicím pokrytým streptavidinem (Lu et al., 2011; Samuel et al., 2005; Tacheny et al., 2012).

Imobilizace RNA ligandu je zcela obdobná metodám imobilizace DNA ligandů. Patří sem způsob chemické vazby ligandu k matici (Talukdar et al., 2011; Ward et al., 2011). Imobilizace pomocí RNA trappingu (Bose et al., 2006) a imobilizace na základě biospecifické vazby biotin-streptavidin (Blackwell et al., 2012; Goraczniak a Gunderson, 2008; Harris et al., 2006; Kar et al., 2011; Paingankar a Arankalle, 2015).

3.2 *In vitro* izolace DNA a RNA vazebných proteinů

Z hlediska způsobu provedení můžeme NK-afinitní chromatografii rozdělit na *in vitro* a *in vivo*. Rozdíl těchto metod je v prostředí, ve kterém dochází k vzájemné interakci NK s proteiny. Zatím co v *in vitro* provedení je DNA/RNA ligand pevně vázán k matici, kde také probíhá vzájemná interakce s proteiny, při *in vivo* provedení je vznikající komplex NK a proteinů

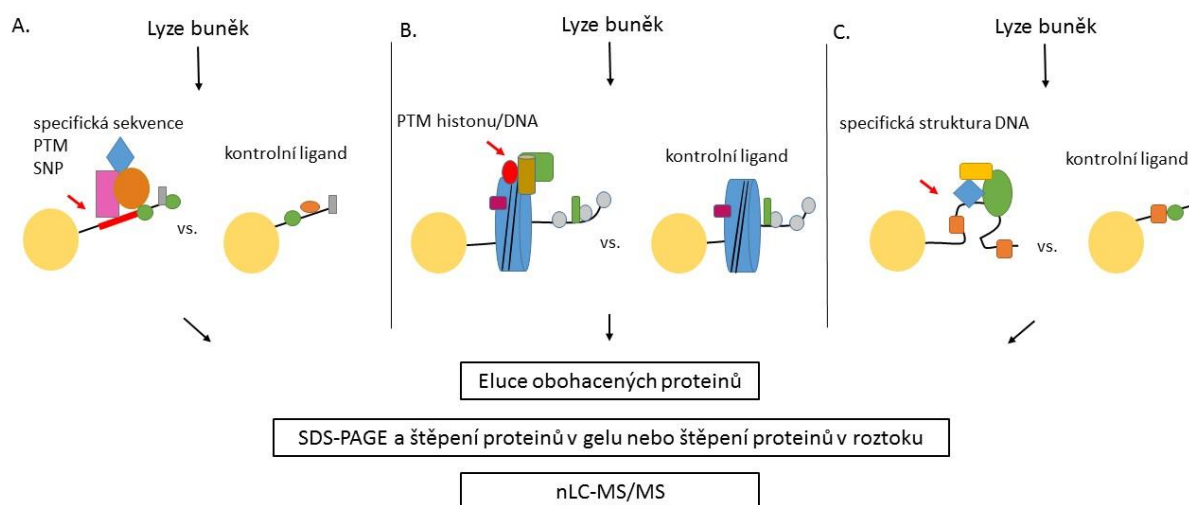
stabilizován pomocí činidel umožňujících provázání nukleové kyseliny a proteinů tzv. kroslink např. formaldehydem. Následuje lyze buněk a komplex NK s proteiny je purifikován pomocí specifické afinitní matrice.

Použití DNA-afinitní chromatografie *in vitro* je založeno na vazbě specifické nukleotidové sekvence anebo struktury k matrici a následné izolaci DNA vazebných proteinů. Nejčastěji je metoda využívána k izolaci transkripčních faktorů, které se podílejí na regulaci genové exprese. Jako specifické DNA ligandy jsou voleny sekvence regulačních a promotorových oblastí, DNA sekvence obsahující jednobodové mutace nebo sekvence telomer (Ahmad a Lingrel, 2005; Butter et al., 2012; Casas-Vila et al., 2015; Makowski et al., 2016; Reed et al., 2008). Proteiny rozpoznávající posttranslační modifikace (PTM) DNA jako je 5-methylace cytozinu dinukleotidu CpG anebo proteiny interagující s oxidovanými formami 5-methyl cytozinu byly identifikovány na základě DNA afinitní purifikace s použitím DNA ligandů obsahujících 5-methyl cytozin a hydroxymethyl cytozin (Bartels et al., 2011; Spruijt et al., 2013).

Interakce proteinů s DNA jsou ovlivněny konfigurací chromatinu, a proto jsou v popředí zájmu také interakce proteinů s histony případně nukleozomy. Pomocí afinitní chromatografie na specifickém peptidu histonu (modifikovaného metylací lyzinu) byly izolovány proteiny rozpoznávající PTM histonu H3 a regulují transkripci genů (Vermeulen et al., 2010). Stejně tak afinitní matricí s ligandem tvořeným nukleozomem s metylovanou DNA případně metylovaným histonem byla umožněna identifikace proteinů podílejících se na konfiguraci chromatinu a také sledování dynamiky vazby těchto proteinů v závislosti na konkrétní PTM (Bartke et al., 2010). V oblastech bohatých na bázi guanin (oblast promotoru genu případně telomerické oblasti) dochází k tvorbě sekundárních struktur tzv. G-kvadruplexů. Volbou strukturně specifického DNA ligandu tak můžeme izolovat významné TF (Gao et al., 2015). Schématické znázornění jednotlivých variant „*In vitro*“ afinitní purifikace DNA vazebných proteinů Obr. č. 1.

Samotný průběh DNA-afinitní purifikace zahrnuje několik důležitých kroků jako je příprava vzorku, inkubace afinitní matrice se vzorkem, promývání matrice, eluci DNA vazebných proteinů a přípravu eluátu pro následnou MS analýzu. Popisný přehled těchto klíčových bodů je součástí referátu **Příloha I**.

„In vitro“ afinitní purifikace



Obr. č. 1: Schématické znázornění jednotlivých způsobů provedení „In vitro“ afinitní purifikace a následné identifikace DNA vazebných proteinů. A) Jaderné proteiny jsou inkubovány s DNA afinitním ligandem představujícím specifickou sekvenci vazebného místa cílových proteinů, sekvencí obsahující PTM anebo jednobodovou mutaci. B) Jaderné proteiny jsou inkubovány s DNA afinitním ligandem tvořeným nukleozomem s posttranslačně modifikovanou DNA anebo histonem. C) Jaderné proteiny jsou inkubovány se strukturně specifickou DNA. Proteiny obohacené na specifické a kontrolní matici jsou eluovány a poté identifikovány pomocí MS. V případě použití proteomické metody relativní kvantifikace mohou být eluáty se specifické a kontrolní matrice smíchány 1:1 a podrobeny společné analýze viz kapitola 3.4. Obrázek upraven dle Wierer and Mann, 2016.

Limitací metody *in vitro* DNA-afinitní chromatografie je právě samotný fakt, že interakce proteinů s DNA probíhají mimo fyziologické prostředí buňky. Důležité je pečlivě zvážit a navrhnout specifický DNA ligand a to na základě předem známé informace o specifické vazebné sekvenci (izolace TF). V případě proteinů rozpoznávajících specifickou strukturu je třeba navrhnout DNA ligand se strukturou, která zůstane zachována během provedení DNA-afinitní chromatografie. I přesto DNA ligandy poskytují pouze možnou vazebnou sekvenci a samotná vazba proteinu je ovlivněna experimentálními podmínkami DNA-afinitní chromatografie. Řada interakcí závisí na vazbě dalších proteinů, které například regulují

strukturu DNA a stabilizují tak vznikající komplexy DNA s proteiny (Jagelská et al., 2008; Saiz a Vilar, 2006). Dalším limitujícím bodem *in vitro* provedení DNA-afinitní chromatografie je promývání matrice nespecificky vázaných proteinů, kdy může docházet k odstranění proteinů vázajících se specificky, ale s nízkou afinitou.

RNA-afinitní chromatografie slouží ve většině případů k izolaci celého proteinového komplexu, který interaguje se sekvenčně a strukturně specifickou RNA. Metoda byla aplikována například při studiu proteinů alternativního sestřihu primárního transkriptu RNA (Kar et al., 2011). Jako RNA afinitní ligand lze také zvolit specifickou sekvenci virového RNA řetězce a izolovat proteiny umožňující jeho replikaci v hostitelské buňce (Harris et al., 2006; Ward et al., 2011). Pomocí RNA ligandu, který odpovídá transkriptu telomerové DNA vázající se k oblasti telomer a regulující kondenzaci chromatinu, byly izolovány proteiny ovlivňující množství a lokalizaci tohoto transkriptu v místě telomer (López de Silanes et al., 2010; Scheibe et al., 2013a).

Samotný průběh RNA-afinitní chromatografie zahrnuje stejné kroky jako aplikace DNA-afinitní chromatografie. Připravená afinitní matrice může být před afinitní purifikací blokována pomocí BSA případně nespecifické RNA, čímž lze snížit možnost nespecifické adsorpce proteinů (Goraczniak and Gunderson, 2008). Stejně tak komplexnost vstupního materiálu (extrakt jaderných nebo cytoplazmatickými proteinů) může být snížena frakcionací. Vhodnost konkrétní frakce pro RNA-afinitní chromatografii tzn. potvrzení vazebné aktivity známých proteinů k RNA ligandu lze prověřit pomocí UV zářením vyvolaného svázání RNA s proteiny příslušné frakce „kroslinku“ anebo gelovou retardační analýzou. Metoda UV kroslinku je založena na principu provázání RNA s proteiny, které se nacházejí v její bezprostřední blízkosti působením UV záření. Přidáním RNázy dojde ke vzniku komplexu malých úseků RNA a proteinů. Tyto komplexy lze podrobit elektroforetické separaci a následné detekci proteinu western blotem (Bose et al., 2006).

K snížení nespecifických vazeb mohou být do vazebného pufru přidány také kompetitory, molekuly RNA, které vyváží RNA proteiny s potenciální vazbou k jakékoliv RNA sekvenci (Harris et al., 2006a). Eluce RNA vazebných proteinů může být provedena klasickými způsoby jako je volba systému pufrů se zvyšující se koncentrací solí, detergenty anebo přímo pomocí vzorkovacího pufru pro elektroforetické dělení. RNA ligandy obsahující aptamery s afinitou k streptavidinem pokrytým částicím lze eluovat přidávkem biotinu (Srisawat a Engelke, 2001).

3.3 *In vivo* izolace DNA a RNA vazebných proteinů

Nedostatky *in vitro* DNA-afinitní chromatografie jsou eliminovány metodami chromatinové precipitace. Během těchto metod dochází k *in vivo* interakci proteinů s chromatinem a až poté je vznikající komplex chromatinu a proteinů izolován afinitní purifikací. Cílem chromatinové precipitace může být identifikace specifické sekvence, kterou konkrétní DNA vazebný protein rozpoznává anebo identifikace interakčních partnerů daného proteinu vázaných v stejné oblasti chromatinu. Identifikace interakčních partnerů proteinů *in vivo* umožňuje získat představu o reálných interakcích proteinu s DNA v konkrétním čase a zachytit tak celý proteom podílející se na určitém buněčném procesu.

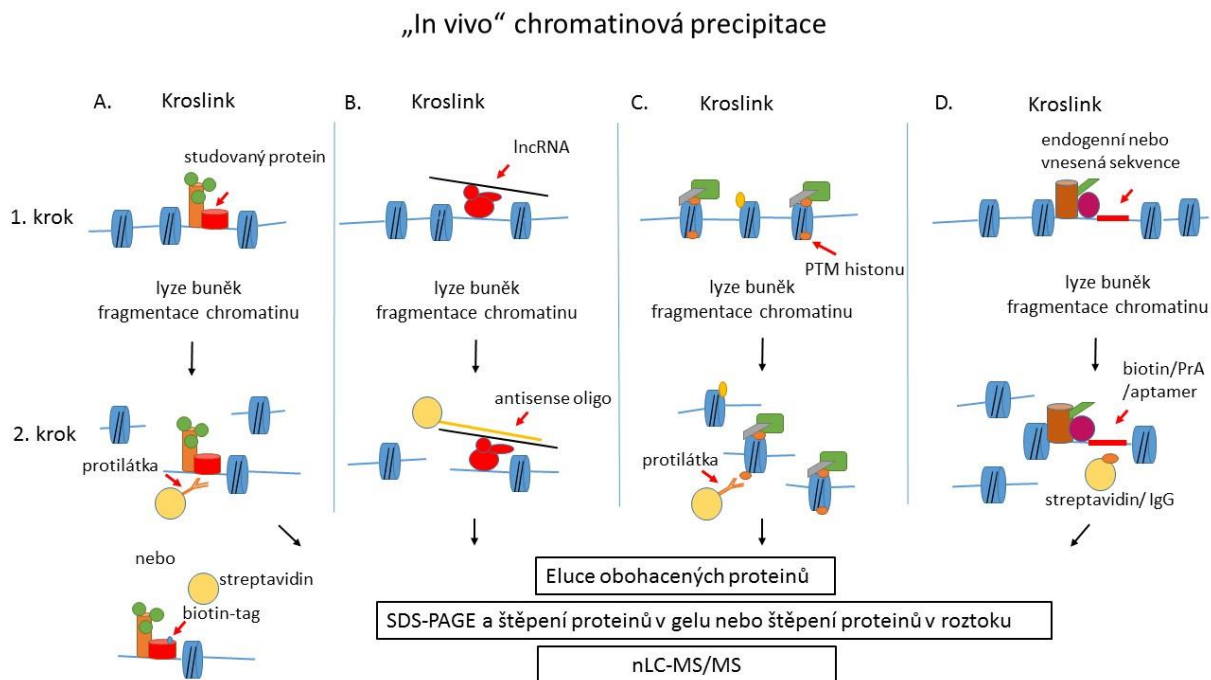
K identifikaci specifické sekvence vázané konkrétním proteinem slouží metody chromatinové imunoprecipitace (ChIP), které ve spojení s metodami sekvenace pomocí mikročipů (ChIP-chip) nebo s metodami tzv. nové generace sekvenování (ChIP-seq) určí specifické vazebné místo proteinu. Princip těchto metod spočívá v afinitní purifikaci komplexu konkrétního proteinu a DNA pomocí specifické protilátky, amplifikaci DNA a její sekvenaci (Mundade et al., 2014).

Chromatinové precipitace ve spojení s hmotnostní spektrometrií (ChIP-MS) umožňují identifikaci proteinových komplexů interagujících se specifickými oblastmi chromatinu případně identifikaci interakčních partnerů konkrétního proteinu na neurčitěm úseku DNA. Cílové molekuly, jejichž interakční partneři mají být identifikováni pomocí ChIP-MS, mohou být představovány endogenními proteiny případně rekombinantními proteiny s příslušnou značkou sloužící k jejich afinitní purifikaci (Lambert et al., 2009). Dále se může jednat o úseky chromatinu, které obsahují určitou posttranslační modifikaci histonů (Ji et al., 2015) anebo jiné endogenní nebo vnesené úseky DNA/RNA molekuly (Byrum et al., 2013; Chu et al., 2011). Schématické znázornění jednotlivých variant provedení „*in vivo*“ chromatinové precipitace Obr. č. 2.

Obecný postup provedení ChIP-MS metody lze rozdělit na dva základní kroky. První krok spočívá ve fixaci buněk formaldehydem a tím provázání vazby proteinů a chromatinu. Z buněčných lyzátů je získán chromatin, který je následně podroben sonikaci případně štěpení nukleázami. V druhém kroku dochází k afinitní purifikaci fragmentovaných úseků chromatinu pomocí specifické afinitní matrice. Eluce proteinů z afinitní matrice může být provedena enzymatickým štěpením v specifické oblasti ligandu anebo tryptickým štěpením proteinů přímo

na matici (Tsai et al., 2011). Další možností je pováření matrice ve vzorkovacím pufru pro SDS-PAGE (Scheibe et al., 2013) anebo vytěsnění ligandu ze streptavidinem pokryté matrice pomocí biotinu (Butter et al., 2012). Získaná směs proteinů/peptidů je dále zpracována a připravena k identifikaci pomocí MS.

Metody ChIP-MS se liší zejména ve způsobu izolace proteinových komplexů. Jednou z možností izolace komplexu chromatinu s proteiny je pomocí specifické protilátky proti endogennímu proteinu imobilizované na afinitní matici (Lambert et al., 2009) Aplikován je také postup ChIP-MS, kdy je obohacení komplexu chromatinu a proteinů na matici založeno na biospecifické vazbě biotinylovaného proteinu a streptavidinem pokryté matrice (Wang et al., 2013). Dalším způsobem je afinitní purifikace pomocí komplementárního (antisense) řetězce (Chu et al., 2011; Déjardin a Kingston, 2009) anebo pomocí značených proteinů, které „*in vivo*“ rozpoznávají cílovou sekvenci DNA (Byrum et al., 2013).



Obr. č. 2: Schématické znázornění jednotlivých způsobů „in vivo“ afinitní purifikace. A) Izolace interakčních partnerů konkrétního proteinu (např. TF) pomocí specifické protilátky proti proteinu nebo jeho značce, případně purifikace pomocí biospecifické vazby biotin-streptavidin. B) Izolace proteinů interagujících se specifickým úsekem NK (např. úsekem dlouhé nekódující RNA molekuly) pomocí antisense oligonukleotidu. C) Izolace

proteinů interagujících se specifickými posttranslačně modifikovanými oblastmi nukleozomu pomocí specifické protilátky proti konkrétní PTM. D) Izolace proteinů interagujících se specifickou endogenní anebo vnesenou DNA/RNA. Vnesené DNA/RNA molekuly obsahují specifickou značku, která umožňuje jejich purifikaci pomocí magnetických částic pokrytých interakčním partnerem (streptavidin, IgG nebo antisense oligonukleotid k specifické sekvenci). Obrázek upraven dle Wierer and Mann, 2016.

Specifickým typem identifikace proteinů vázaných k chromatinu je modifikovaná chromatinová precipitace mChIP. Odlišnost metody je daná absencí křížově reagujícího činidla formaldehydu. Buňky jsou lyzovány, získaný chromatin fragmentován za velmi mírných podmínek sonikací a následně enzymatickým štěpením pomocí MNázy nebo DNázy I. Cílové komplexy proteinů a chromatinu jsou purifikovány matricí se specifickou protilátkou proti značenému proteinu. Tato metoda byla použita k izolaci interakčních partnerů histonu H2A a jeho varianty Htz1p značených afinitní značkou TAP (z angl. tandem affinity purification) v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Díky nativním podmínkám afinitní purifikace byla identifikovaná řada nových proteinových interaktorů tohoto histonu a jeho varianty (Lambert et al., 2009).

K „*in vivo*“ afinitním purifikacím, jejichž cílem je identifikace proteinů interagujících se specifickým úsekem DNA patří metoda GENECAPP (z angl. Global ExoNuclease-based enrichment of chromatin associated proteins for proteomics). Princip metody spočívá v provázání komplexu chromatinu a proteinů pomocí formaldehydu a následné fragmentaci sonikací. Získané fragmenty jsou štěpeny pomocí exonukleázy III, což vede ke vzniku jednovláknového přesahu na 3'konci dvouvláknové DNA. Specifický úsek DNA je v tomto případě purifikován pomocí DNA čipu s komplementárními oligonukleotidy sledované sekvence. Po promytí čipu je provedena eluce, štěpení proteinu v roztoku a následná identifikace pomocí MS (Wu et al., 2011).

Další metodou identifikace proteinů vázaných k specifickému úseku DNA je metoda PICh (z angl. proteomics of isolated chromatin segments). Tato metoda byla použita pro izolaci proteinů zodpovědných za zachování stability telomer. Srovnáván byl proteom vážící se na telomery v přítomnosti funkční telomerázy a během alternativní dráhy prodlužování telomer. Podstatou metody je fixace buněk formaldehydem a solubilizace získaného chromatinu. Následuje denaturace DNA a hybridizace s desthbiotinem značeným oligonukleotidem

LNA (z angl. locked nucleic acid) komplementárním k telomerickému úseku. Izolace studovaného úseku DNA spolu s interagujícími proteiny je provedena na základě biospecifické vazby avidin-desthbiotin. Desthbiotin je analog biotinu s menší afinitou vůči avidinu, a proto je eluce DNA vazebných proteinů prováděna jeho vytěsněním přidávkem biotinu. Získané proteiny jsou separovány pomocí SDS-PAGE a identifikovány pomocí MS. Výhodou této metody je robustnost, jelikož použitá syntetická nukleová kyselina LNA je vysoce stabilní (Déjardin a Kingston, 2009).

K afinitní purifikaci proteinů, které vazbou k specifické sekvenci GAL1 promotoru regulují transkripci galaktózy, byl použit rekombinantní TAL protein (transkripční aktivátor GAL1 promotoru) fúzovaný s proteinem A, který sloužil k afinitní purifikaci komplexu GAL1 promotoru a jeho vazebných proteinů (Byrum et al., 2013).

Izolaci proteinů podílejících se na regulaci posttranslačně modifikovaných úseků chromatinu lze provést pomocí afinitní purifikace s použitím specifické protilátky k dané posttranslační modifikaci. Izolované proteiny lze identifikovat pomocí MS a získanou DNA sekvenci podrobit sekvenaci (Ji et al., 2015).

Identifikace proteinů zodpovědných za děje probíhající na řetězci DNA během replikace je umožněno díky specifické metodě iPOND (z angl. Identification of proteins on nascent DNA) a její kombinací s MS. Princip metody spočívá v přidávku 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu (EdU), analogu tymidinu, do kultivačního media a jeho začlenění do nově syntetizovaného vlákna DNA. Nově syntetizovaný úsek DNA spolu s proteiny lze purifikovat a použitím specifické protilátky proti EdU. Tyto úseky je možné také purifikovat na základě vazby biotin-streptavidin, jelikož EdU obsahuje alkynovou skupinu, která může být biotinylována pomocí tzv. klik chemie a tím umožní izolaci DNA s proteiny pomocí streptavidinem pokrytých částic (Sirbu et al., 2013).

In vivo izolace RNA vazebných proteinů zahrnuje metody založené na UV kroslinku RNA molekuly s interagujícími proteiny a jejich následné afinitní purifikaci. Izolovat lze proteiny interagující jak s endogenní RNA molekulou tak se specifickou sekvencí RNA, která byla do buněk vnesena pomocí plazmidové transfekce. Z hlediska obtížnosti provedení metody je jednodušším způsobem afinitní purifikace RNA-protein komplexů založená na hybridizaci sledované endogenní RNA sekvence s antisense RNA oligonukleotidy. Na druhou stranu ne všechny sekundární struktury RNA jednoduše interagují s antisense oligonukleotidy, což vyžaduje pečlivý a časově náročný návrh antisense sekvence.

Specifická RNA sekvence může být do buněk vpravena pomocí plazmidové transfekce, kdy součástí RNA řetězce bývá také aptamer sloužící k jeho afinitní purifikaci. Příkladem je metoda MS2-BioTRAP, která byla aplikována pro identifikaci proteinů interagujících s tzv. IRES (z angl. internal ribosome entry site), což jsou vnitřní místa mRNA sloužící k nasednutí ribozomu a spuštění translace. Co-expresí specifického plazmidu pro expresi mRNA sekvence (IRES místa) značené MS2 aptamerem a plazmidu pro expresi MS2 proteinu fúzaného se specifickou značkou pro *in vivo* biotinylation lze získat systém vhodný k izolaci proteinů interagujících s IRES místem této RNA molekuly. MS2 protein slouží k interakci s MS2 aptamerem specifické RNA sekvence a biotinylation k následné afinitní purifikaci komplexů RNA molekuly s proteiny (Tsai et al., 2011).

Několik studií poukázalo na význam dlouhých nekódující RNA molekul (lncRNAs) v regulaci interakce RNA vazebných proteinů s chromatinem, a tím regulaci genové exprese. ChIP-MS je jednou z aplikovaných metod ve studiu těchto molekulárních mechanismů. K afinitní purifikaci komplexu chromatin-lncRNA byl v tomto případě použit antisense oligonukleotid sledované lncRNA a ve spojení s MS bylo identifikováno několik zajímavých proteinů vázaných k RNA produktu genu XIST (Chu et al., 2011).

Pro afinitní purifikaci proteinů interagujících se specifickou RNA lze použít také nukleovou kyselinu PNA (z angl. peptide nucleic acid), která po vniknutí do buňky hybridizuje se sledovanou RNA molekulou. PNA nese fotoaktivní látku, která ozářením umožní kroslink komplexu RNA a proteinů. Buněčný lyzát je vystaven fragmentaci působením RNázy. Následuje purifikace komplexu RNA s proteiny pomocí matrice s antisense řetězcem PNA kyseliny (Zielinski et al., 2006).

3.4 Identifikace DNA a RNA vazebných proteinů pomocí kvantitativní proteomiky a MS

Identifikaci DNA a RNA vazebných proteinů lze provést, v případě afinitní purifikace známého proteinu, pomocí specifických protilátek například metodami gelové retardační analýzy nebo UV kroslinkem ve spojení s western blotem (Ahmad a Lingrel, 2005; Goracznik a Gunderson, 2008). V případě izolace neznámých proteinů v necíleném proteomickém skrínění je metodou identifikace MS. K tomuto účelu se nejčastěji používají dva typy instrumentálního uspořádání hmotnostního spektrometru. První zahrnuje ionizaci analytu pomocí MALDI a to většinou ve

spojení s analyzátozem doby letu iontů MALDI-TOF (z angl. matrix assisted laser desorption ionization-time of flight) (Bose et al., 2006; López de Silanes et al., 2010). Druhý způsob identifikace určený především k analýze složitějších směsí je ionizace elektrosprejem v kombinaci a tandemovou hmotnostní spektrometrií ESI-MS/MS (z angl. electrospray ionization) (Harris et al., 2006; Mittler et al., 2009; Scheibe et al., 2013).

3.4.1 Příprava vzorků k MS analýze

Vstupním materiálem k MS analýze je proteinová směs (eluát) získaná afinitní purifikací DNA a RNA vazebných proteinů. Může se stále jednat o vysoce komplexní směs, kde se řada cílových proteinů vyskytuje v minimálním množství a úspěšnost jejich detekce je snižována přítomností abundančních proteinů. Prvním krokem analýzy je tedy redukce komplexnosti těchto směsí.

Nejběžnějším způsobem snížení komplexnosti vzorku je elektroforetické dělení pomocí dvojrozměrné elektroforézy (2-DE) nebo jednorozměrné elektroforézy v přítomnosti dodecylsulfátu sodného SDS-PAGE (Laemmli, 1970; O'Farrell, 1975). Vybrané molekulové oblasti gelu jsou následně vyřezány a přítomné proteiny podrobeny proteolytickému štěpení v gelu (Shevchenko et al., 2006). Získané peptidové směsi jsou přečištěny pomocí špiček nebo kolonek plněných C18 reverzní fází a připraveny k MS analýze (Rappsilber et al., 2007).

Dalším způsobem jak lze redukovat komplexnost vzorku je kapalinová chromatografie, která může být provedena off-line anebo on-line ve spojení s iontovým zdrojem. První chromatografické frakcionace byly prováděny off-line pomocí mikrošpiček plněných reverzní fází, zatím co dnes je frakcionace prováděna zejména pomocí nanokapalinové chromatografie s dlouhými elučními gradienty v on-line spojení s MS (Erdjument-Bromage et al., 1998; Meng et al., 2006). K zlepšení separace peptidů v případech analýzy složitých buněčných lyzátů lze použít dvojrozměrné kapalinové chromatografie MudPIT (z angl. multidimensional protein identification technology) (Kar et al., 2011; Reed et al., 2008; Tsai et al., 2011). MudPIT separace je založena na dělení peptidové směsi pomocí dvou na sebe navazujících chromatografických kolon. Na první SCX koloně (katex) dochází k separaci okyseleného vzorku na základě izoelektrického bodu (pI) peptidů. Jednotlivé peptidové frakce jsou z SCX kolony eluovány systémem pufrů se zvyšujícím se obsahem solí tzn., postupně dle svého pI

přechází na druhou kolonu s reverzní fází. Z reverzní fáze jsou následně eluovány pomocí ACN a odváděny do iontového zdroje (Wolters et al., 2001).

3.4.2 Metodické postupy identifikace DNA a RNA vazebných proteinů

Identifikace proteinů pomocí MS je založena na získání informace o molekulové hmotnosti peptidů případně informace o jejich aminokyselinové sekvenci. Tyto poznatky jsou následně porovnávány s teoretickými hodnotami získanými *in silico* analýzou proteinů dostupných v databázi, čímž dochází k identifikaci proteinu (Keller et al., 2002; Perkins et al., 1999).

Hmotnostní analýza probíhá v hmotnostním spektrometru, který se skládá z iontového zdroje, analyzátoru a detektoru. Principem měření je ionizace vzorku v iontovém zdroji, kde jsou přítomné analyty převedeny na ionty. Následuje rozdělení iontů na základě hodnoty m/z (poměr hmotnosti látky a náboje získaného ionizací) v hmotnostním analyzátoru odkud putují k detektoru. Výstupem MS analýzy je hmotnostní spektrum vyjadřující závislost intenzity detekovaného iontu na m/z .

K analýze makromolekulárních látek (proteiny a peptidy, oligonukleotidy, sacharidy, polymery) se nejčastěji používají měkké ionizační techniky jako je elektrosprej ESI a ionizace laserem za přítomnosti matrice MALDI.

ESI je založena na odpařování rozpouštědla z kapky analytu, který je přiváděn do iontového zdroje kovovou kapilárou. Vloženým napětím získává kapka analytu náboj a postupným odpařováním rozpouštědla (způsobeném zvýšením teploty nebo proudem sušícího plynu) dochází k zvýšení hustoty povrchového napětí kapky a tzv. Coulombické explozi. Vznikají vícenásobně nabitě ionty, které jsou následně odváděny do analyzátoru. V současné době je používán systém využívajícího nízkého průtoku analytu tzv. nanoESI (Fenn et al., 1989; Kebarle a Verkerk, 2009).

V případě MALDI je analyt smíchán s matricí a nanesen na vzorkovací destičku. Matricí může být kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (vhodná pro neutrální sacharidy), kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (vhodná pro peptidy < 10 kDa), kyselina sinapová (vhodná pro peptidy >10 kDa) anebo 3-hydroxypikolinová (vhodná pro oligonukleotidy). Po vysušení matrice s analytem dojde k vytvoření krystalků, z nichž působením krátkých pulsů laseru dochází k desorpci matrice a zároveň iontů analytu. Excitované molekuly matrice ionizují

analyt a dochází k přenosu protonu. Výsledkem ionizace jsou jednonásobně nabitě ionty typu $[M + H]^+$, které putují do analyzátoru (Baker et al., 2016; Karas a Hillenkamp, 1988).

Analýza iontů probíhá v hmotnostním analyzátoru za vysokého vakua. K nejběžnějším analyzátorům patří především analyzátor doby letu (TOF, z angl. time-of-flight), kvadrupólový analyzátor (Q, z angl. quadrupole) a iontová past (IT, z angl. ion trap). Tyto analyzátory jsou obvykle spojeny v tandemu Q-TOF, TOF-TOF, Q-IT (Chernushevich et al., 2001; Jonscher a Yates, 1997). K dalším hmotnostním analyzátorům tzv. analyzátorům nové generace patří iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací FT-ICR (z angl. Fourier transform ion cyclotron resonance) a Orbitrap, které analyzují ionty na základě frekvenční rezonance iontů dle hodnoty m/z . Orbitrap ve spojení s lineární iontovou pastí (LTQ) vytváří hybridní systém LTQ-Orbitrap s vysokým rozlišením (Scigelova a Makarov, 2006).

TOF analyzátor je principiálně založen na měření doby letu iontů průletovou trubicí. Ionty získávají určitou kinetickou energii a jsou rozděleny na základě rychlosti pohybu, s jakou proletí analyzátozem. Tato rychlost závisí na hodnotě m/z , čím je ion těžší a má nižší náboj tím putuje pomaleji. Měření průletu iontů trubicí analyzátoru lze provést ve dvou módech a to v lineárním a reflektrovném módu. Lineární mód je využíván pouze pro analýzu proteinů a velkých makromolekulárních struktur. Reflektrovný mód má vyšší rozlišení a je využíván pro analýzu peptidů. Reflektrovný mód využívá iontového zrcadla, které je umístěné na konci průletové trubice. V této části působí elektromagnetické pole se vzrůstající intenzitou pole a s opačnou polaritou, což způsobí zpomalování iontů a obrácení dráhy jejich letu. Principem je různá vzdálenost zanoření iontů se shodnou měrnou hmotností, ale s různou kinetickou energií do elektromagnetického pole zrcadla. Dochází tak k zaostření a ionty se shodnou měrnou hmotností vycházející z reflektrovního dopadají společně na detektor (Radionova et al., 2016).

Kvadrupól tvoří čtyři paralelní pokovené tyče, na které je vložena kombinace stejnosměrného a frekvenčního elektrického napětí odpovídající stabilní oscilaci vybraným iontům s určitou hodnotou m/z . Tyto ionty jsou propuštěny dále na detektor, zatímco ostatní ionty zůstávají zachycené v analyzátoru. Postupnou změnou napětí dochází k analýze všech iontů. Tento analyzátor má v proteomice význam především v trojkombinaci (QqQ-trojité kvadrupól) anebo v kombinaci s analyzátozem doby letu (Q-TOF). V tandemovém uspořádání slouží první analyzátor, jako hmotnostní filtr tzn., dochází zde k výběru prekurzorových iontů, které následně putují do kolizní cely, kde jsou fragmentovány. Fragmentované ionty putují do druhého hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány na základě hodnot m/z a následně

detekovány detektorem. Výstupem je fragmentační MS/MS spektrum peptidů (Hunt et al., 1986; Jonscher a Yates, 1997)

Jedním z nejběžnějších způsobů fragmentace peptidů používaných v proteomice je kolizí indukovaná disociace CID (z angl. collision induced dissociation), která je spojována především s QqQ a Q-TOF analyzátory. Princip CID spočívá ve fragmentaci urychleného prekurzorového iontu peptidu vlivem srážek se vzácným plynem nacházejícím se v kolizní cele. Díky srážkám dochází ke štěpení peptidové vazby na fragmenty obsahující iontové série b/y. V případě, že náboj po fragmentaci zůstane na N-konci, vznikají fragmenty série b a pokud na C-konci, vznikají y- fragmenty. Z rozdílu hmotností mezi sousedními b-, resp. y- ionty získáme informaci o druhu aminokyseliny a tím můžeme následně získat informaci o sekvenci fragmentovaného peptidu (Biemann, 1990).

K dalším způsobům fragmentace patří techniky ECD (z angl. electron capture dissociation) a ETD (z angl. electron transfer dissociation). ETD je využívána zejména v analýze PTM, jelikož během fragmentace dochází k přednostnímu štěpení peptidové kostry a modifikace zůstávají zachovány (Good et al., 2007). ECD fragmentace je nejčastěji spojována s hybridním systémem FT-ICR a je aplikována především v top-down proteomických přístupech (analýza intaktních proteinů) a taktéž při identifikaci PTM (Han et al., 2006).

Výsledkem MS/MS analýzy je fragmentační spektrum, které je dále zpracováno pomocí vyhodnocovacích algoritmů jako je např. Sequest, Mascot nebo PepFrag. Tyto algoritmy umožňují srovnání experimentálních fragmentačních spekter s teoretickými, získanými na základě *in silico* štěpení sekvence proteinů v databázi (UniProt, NCBI). Teoretická fragmentační spektra jsou vytvořena na základě parametrů vlastní experimentální analýzy jako je typ použitého enzymu, možnost chemické modifikace peptidů, a také na základě informace o typu použité ionizace a fragmentace. Pro teoretické peptidy jsou predikovány hodnoty m/z a jejich MS/MS spektra, která jsou následně srovnávána s experimentálními spektry. Výsledkem prohledávání je list identifikovaných proteinů, u nichž míru shody teoretických a experimentálních spekter peptidů udává skóre (Keller et al., 2002; Perkins et al., 1999).

3.4.3 Metodické postupy relativní kvantifikace DNA a RNA vazebných proteinů

Cílem proteomického skrínungu s aplikací NK-afinitní chromatografie je nejen izolace a identifikace proteinů interagujících se specifickým DNA/RNA ligandem, ale také studium dynamiky těchto interakcí a jejich změna vlivem různých podmínek. Informaci o tom, který protein interaguje specificky s afinitními ligandy případně, které proteiny změnilly svou vazbu, jako odpověď na různé vlivy lze získat díky metodám relativní kvantifikace. Aplikací těchto metod lze srovnat proteiny interagující se specifickým ligandem s proteiny vázajícími se ke kontrolnímu ligandu před a po vystavení buněk různým stresovým podmínkám. Metody relativní kvantitativní proteomiky umožňují nejen identifikaci proteinů obohacených na specifické afinitní matici, ale také odlišují proteiny nesespecificky adsorbované k samotné DNA/RNA molekule nebo matici, případně odlišují proteiny, které se dostaly do vzorku během afinitního procesu (proteiny použité k blokaci matrice, eluci apod.).

Principem metod relativní kvantifikace je použití aminokyselin nebo činidel s různým obsahem izotopů prvků (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O nebo ^2H) k značení proteinů a peptidů. Toto značení umožňuje smíchání jednotlivých vzorků 1:1 a společnou analýzu pomocí nLC-MS případně MS/MS. Inkorporace izotopově značených aminokyselin nebo vazba činidla s různými izotopy prvků nijak neovlivňuje chemické vlastnosti peptidů a jejich retenční čas zůstává během chromatografické separace neměnný, avšak během analýzy těchto peptidů dochází k jejich posunu v hmotnostním spektru o hodnotu m/z , která je různá díky rozdílným izotopům prvků. Relativní kvantifikace proteinu pak probíhá na základě srovnání intenzity píků značeného a neznačeného peptidu. Z hlediska způsobu provedení značení peptidů/proteinů lze metody relativní kvantifikace rozdělit na metabolické, enzymatické a chemické (Bantscheff et al., 2012). Každý z uvedených způsobů má své klady i zápory a jejich volba závisí především na povaze biologického vzorku, který má být analyzován.

Aplikace metabolického značení vyžaduje schopnost biologického systému inkorporovat izotopově značené aminokyseliny, které jsou přidávány do kultivačního média případně do potravy. Výhodou metody je inkorporace značení během růstu buněčné kultury/organismu, čímž odpadá náročné zpracování vzorků. Na druhou stranu je tím snížena aplikovatelnost metody, jelikož inkorporace izotopově značených aminokyselin je úspěšná u dobře se dělících buněk především živočišných a jen u některých organismů. Dostačující inkorporace aminokyselin je dosaženo během jednoho až několika týdnů a jedná se o časově i finančně náročnou metodu (Gouw et al., 2010). Oproti tomu volba chemického či enzymatického

značení nezávisí na původu vzorku a umožňuje přímé značení proteinů/peptidů po jejich afinitní purifikaci nebo extrakci.

Enzymatické značení je založeno na proteolytickém štěpení proteinů v prostředí H_2^{18}O anebo H_2^{16}O . Vznikající C-konce peptidů jsou tak naznačeny dvěma atomy ^{18}O / ^{16}O , což způsobí jejich posun v hmotnostním spektru o 4 Da. Úskalím metody může být omezená vazba $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (vlivem prostředí, konformací proteinů), kdy dochází k vazbě pouze jednoho atomu kyslíku a tím nedostatečnému posunu peptidu v hmotnostním spektru a znesnadnění kvantifikace (Miyagi a Rao, 2007).

Chemické značení proteinů/peptidů je založeno na vazbě stabilních izotopických značek k vybranému N-konci, C-konci anebo postranním řetězcům aminokyselin peptidů. Jako příklad chemického značení lze uvést metodu, která v současné době umožňuje srovnání až 8 vzorků v jedné analýze, iTRAQ (z angl. isobaric tags for relative and absolute quantification). Kvantitativní srovnání je umožněno díky značení amino skupin peptidů izobarickými značkami lišícími se v hmotnosti „vyrovnávací“ a „reportérové“ skupiny. Právě reportérová skupina obsahuje různý počet izotopů prvků ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , což umožňuje odlišení peptidů během analýzy. Na rozdíl od ostatních metod relativní kvantifikace, probíhá srovnání peptidů až po fragmentaci v MS/MS módu, kde dochází k štěpení reportérové skupiny (Choe et al., 2007). Výhodou metody je vhodnost pro všechny typy vzorků a možnost porovnávání až 8 vzorků v jedné analýze. Nevýhodou je poměrně vysoká cena iTRAQ reagensů a náročnost na vyhodnocení fragmentačních spekter i přístrojové vybavení.

K chemickým metodám založeným na izotopickém značení proteinů patří také ICAT (z angl. isotope coded affinity tag) a ICPL (z angl. isotope-coded protein labeling). ICAT je metoda, která umožňuje značení proteinů na postranním řetězci cysteinu činidlem, které je tvořeno iodoacetamidem zprostředkovávajícím vazbu k peptidu, linkerem s 8 atomy ^2H nebo ^1H a biotinovou skupinou pro afinitní purifikaci (Gygi et al., 1999). Výhodou ICAT metody je separace proteinů na základě značení cysteinů, a tím snížení komplexnosti vzorku, jelikož cystein je aminokyselina vyskytující se v proteinech méně. Na druhou stranu izolace pouze těch peptidů, které obsahují cystein, snižuje také úspěšnost identifikace proteinů. Při aplikaci ICPL metody jsou proteiny značeny v místech volných primárních aminoskupin pomocí nicotinyln-N-hydroxysuccinimidu obsahujícího různé zastoupení izotopů ^{15}N a ^{13}C . Různými kombinacemi těchto prvků lze získat až 4 různé typy značení, což umožňuje současnou analýzu až 4 vzorků (Schmidt et al., 2005). Obě zmíněné metody ICAT, ICPL jsou jednoduše aplikovatelné, levné a časově nenáročné metody relativní kvantifikace.

Pro relativní kvantifikaci NK vazebných proteinů je aplikována zejména metoda metabolické značení proteinů SILAC (Butter et al., 2009; Mittler et al., 2009; Ren et al., 2012), která byla taktéž použita v této disertační práci. SILAC (z angl. stable isotope labeling of amino acids in cell culture) spočívá v obohacení kultivačního média o aminokyseliny nejčastěji lysin a arginin, obsahující stabilní izotopy prvků ^{15}N a ^{13}C . Tyto izotopově modifikované aminokyseliny jsou během kultivace buněk inkorporovány do nově vznikajících proteinů, čímž vzniká buněčná linie označovaná jako „heavy“. Buněčná linie, která je kultivována v přítomnosti aminokyselin s přirozeně se vyskytujícími základními izotopy prvků je označována jako „light“. Díky různému izotopovému značení proteinů mohou být vzorky (buněčné lyzáty, eluáty po afinitní purifikaci) smíchány 1:1 a podrobeny společné proteomické analýze (Ong a Mann, 2006, 2007).

K relativní kvantifikaci NK vazebných proteinů byla rovněž aplikována metoda chemického značení ICAT (Himeda et al., 2004, 2010) případně metoda dimetylace (Cheng et al., 2010; Makowski et al., 2016). Principem dimetylace je alkylace primárních aminů N-konce a postranních řetězců lysinu peptidů pomocí formaldehydu a kyanborohydridu sodného, která převede všechny primární aminy na dimetyl. Zdrojem izotopického značení je v tomto případě použití (deuterovaného) formaldehydu „těžká“ forma a použití obyčejného formaldehydu k vytvoření „lehké“ formy (Hsu et al., 2003).

4. REPLIKAČNÍ STRES

Jako replikační stres (RS) označujeme děje probíhající na replikační vidličce, které vedou ke zpomalení nebo zastavení replikace DNA případně kolapsu replikační vidličky. Vnějších i vnitřních příčin RS může být celá řada. Může se jednat o nedostatek jednotlivých komponent replikace případně strukturní bariéry znesnadňující její průběh.

Zdrojem RS může být nedostatek deoxynukleotid di- a tri- fosfátů (dNTPs) potřebných k syntéze DNA. Tento nedostatek může mít endogenní příčinu jako je zvýšená replikace DNA, a tím vznik nedostatku volných dNTPs anebo exogenní příčinu a to působení močoviny, která inhibuje enzym ribonukleotid reduktázu, a tím přeměnu nukleotidů na deoxyribonukleotidy potřebné k syntéze nového DNA řetězce (Bester et al., 2011; Bianchi et al., 1986). Se zvýšenou aktivací replikačních počátků dochází také k vyčerpání aktuálního množství replikačního proteinu A (RPA) podílejícího se na stabilizaci vznikající jednovláknové DNA (ssDNA), což může vést ke kolapsu replikační vidličky případně zlomům (Toledo et al., 2013). Důležitý je také dostatek nově vznikajících histonů, které vytváří komplex kolem nového DNA řetězce. Nedostatek nově syntetizovaných histonů zpomaluje průběh replikace (Clemente-Ruiz et al., 2011; Groth et al., 2007). Další příčinou RS může být malé množství replikačních počátků. V oblastech chudých na replikační počátky je mezi dvěma počátky velká vzdálenost pro DNA syntézu. Zde mohou vznikat replikační bariéry, které zapříčiní nekompletní DNA replikaci (Cayrou et al., 2010; Letessier et al., 2011). Specifickým typem vnitřního RS je kolize mezi replikačním a transkripčním aparátem. DNA replikace i transkripce využívají pro svůj proces stejný templát DNA. Vzájemným kontaktem rozvolněné DNA v místě replikační vidličky a nově syntetizované mRNA může dojít ke vzniku hybridní molekuly DNA:RNA, potenciálního zdroje různých mutací, rekombinací a chromozomálních aberací (Aguilera a García-Muse, 2012).

K vnějším zdrojům RS, které způsobují zejména strukturní bariéry (vnitřetězcové a meziřetězcové kroslinky, poškozené báze, sekundární struktury v DNA), patří ultrafialové záření případně působení různých chemických látek (Cadet et al., 2005; Sanderson a Shield, 1996).

4.1 Buněčná odpověď na RS a poškození DNA

Hlavními proteiny zodpovědnými za opravu poškozené DNA a zachování stability genomu jsou kinázy ATM (ataxia-telangiectasia mutated) a ATR (ataxia-telangiectasia RAD3-related) patřící do rodiny fosfatidylinositol-3-kináz. Jedná se o proteiny, které fosforylací (aminokyselinového motivu serinu a/nebo treoninu za nimiž následuje glutamin) svých substrátů signalizují dráhy buněčné odpovědi na poškození DNA (Kim et al., 1999; Matsuoka et al., 2007). ATR/ATM regulují kontrolní body buněčného cyklu tzv. checkpoint, a také zástavu buněčného cyklu a opravu poškozené DNA. Nevýznamnějšími substráty těchto proteinů jsou checkpoint kinázy Chk1 (substrát ATR) a Chk2 (substrát ATM). ATR a ATM se liší charakterem poškození, které preferenčně rozpoznávají. ATM je kinázou odpovědi na vznik dvouvláknových zlomů DNA, zatímco ATR kináza rozpoznává především oblasti ssDNA (Awasthi et al., 2015). ATR může být také aktivována přítomností dvouvláknových zlomů a to díky činnosti MRN komplexu (MRE11-RAD50-NBS1), který má exo- a endonukleolytickou aktivitu a v okolí dvouvláknového zlomu tak vytváří úseky ssDNA (Jazayeri et al., 2008). ATR rozpoznává a stabilizuje také ssDNA vznikající v oblastech běžných fragilních míst, která jsou působením RS náchylná k tvorbě těžce replikovatelných sekundárních struktur a ke vzniku DNA poškození (Casper et al., 2002)

ATR kináza jako hlavní senzor replikačního stresu aktivuje kontrolní a opravné mechanismy a zodpovídá tak za kompletní replikaci DNA během S fáze buněčného cyklu a přechod buňky do mitózy. Působením replikačního stresu ATR zpomaluje replikaci, spouští kontrolní mechanismy a zástavu buněčného cyklu, podílí se na stabilizaci DNA, případné opravě DNA a restartu replikace (Lukas et al., 2004; Paulsen a Cimprich, 2007; Sørensen et al., 2005). Mechanismus aktivace ATR je zahájen označením volné ssDNA pomocí proteinu RPA, který je dále rozpoznáván ATR interagujícím proteinem ATRIP a dochází ke vzniku heterodimeru ATR/ATRIP (Cortez et al., 2001). Aktivovaná ATR kináza dále fosforyluje své substráty, z nichž nejvýznamnější je kináza Chk1, regulující G2/M kontrolní bod buněčného cyklu (Liu et al., 2000).

Aktivací Chk1 dochází k regulaci buněčného cyklu přes fosforylací Cdc25 fosfatáz a cyklin dependentních kináz. Chk1 fosforyluje fosfatázu Cdc25A, což způsobí její degradaci proteasomem. Jelikož funkcí Cdc25A je defosforylace cyklin dependentních kináz 1,2 a tím umožnění progresu buněčného cyklu, dochází k jeho zástavě v G1/S a G2/M kontrolních

bodech. V tomto případě se jedná o tzv. akutní fázi checkpointové odpovědi (Mailand et al., 2002; Sørensen et al., 2003).

Druhým způsobem regulace buněčného cyklu tzv. opožděné fáze checkpointové odpovědi je fosforylace proteinu p53 ať už přímo od ATR/ATM anebo přes Chk1/Chk2 kinázy (Shieh et al., 2000). Aktivací a stabilizací p53 proteinu dochází k zesílení jeho funkce transkripčního faktoru a expresi p21 proteinu, což vede k zástavě buněčného cyklu v G1 fázi (Lukas et al., 2004). Dalším významným proteinem zvyšujícím stabilizaci p53 proteinu je ubiquitin ligáza Mdm2, substrát ATM kinázy. Fosforylací Mdm2 proteinu dochází k inhibici ubiquitinylatione p53 a jeho degradace proteasomem (Khosravi et al., 1999).

5. BĚŽNÁ FRAGILNÍ MÍSTA

Běžná fragilní místa (BFM) jsou specifické úseky DNA, u nichž vlivem replikačního stresu dochází k poškození viditelnému jako mezery a zlomy na metafázích chromozomech (Glover et al., 1984). Detekce poškození v místě chromozomu se obecně označuje jako exprese fragilního místa. BFM jsou spojována s chromozomálními aberacemi, jako jsou delece a translokace (Arlt et al., 2006). Jedná se také o místa, kde může docházet k amplifikaci onkogenů a integraci viru do genomu (Hellman et al., 2002; Thorland et al., 2003). Navzdory tomu, že BFM jsou častým zdrojem nestability genomu, díky které může docházet ke vzniku prekancerózních lézí (Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005), jedná se o vysoce konzervované úseky, které nebyly během evoluce odstraněny jako nežádoucí a vyskytují se u několika savčích druhů (Krummel et al., 2002; Ruiz-Herrera et al., 2004). Skutečný význam těchto míst nebyl dosud objasněn. Existuje teorie, že BFM místa slouží jako senzory replikačního stresu a poškození DNA, čímž přispívají k aktivaci opravných mechanismů buňky a signalizaci jejího odstranění (Georgakilas et al., 2014).

V současné době bylo v lidském genomu identifikováno kolem 90 BFM a variabilita jejich výskytu a exprese vlivem replikačního stresu je buněčně specifická. Studium exprese BFM (přítomnost zlomu, mezery nebo zúžení v chromozomu) lze provést na základě cytogenetického pozorování fragilního místa, které je rozpoznáno na základě chromozomálního pruhování nebo metodou fluorescenční in situ hybridizace (Pirzio et al., 2008; Richards, 2001).

5.1 Molekulární příčiny exprese BFM

BFM místa jsou oblasti DNA, které jsou replikovány zejména v pozdní S fázi buněčného cyklu. Vlivem RS může v těchto místech docházet k poškození DNA, nekompletní replikaci a neúplné kondenzaci chromatinu, což se projeví jako zlom, mezera anebo zúžení na metafázních chromozomech.

Molekulární analýzou BFM bylo odhaleno několik základních charakteristik, které mohou být příčinou jejich nestability/fragility. Nestabilita těchto míst může být způsobena jejich strukturními vlastnostmi. Bylo prokázáno, že se jedná o velmi dlouhé oblasti genomu bohaté na A-T repetice. Tyto oblasti se zároveň vyznačují vysokou DNA flexibilitou, která zapříčiní vznik superhelikální struktury a znesnadní tak průběh replikace (Gardiner, 1995; Mishmar et al., 1998). Další teorie se opírá o fakt, že BFM jsou oblasti chudé na replikační počátky, což

může mít za následek nekompletní replikaci DNA (Cayrou et al., 2010; Letessier et al., 2011a). Příčinou fragility může být také kolize replikace a transkripce na jednom templátu DNA a to zejména u BFM, které obsahují dlouhé geny (>800kb) a nedokončí transkripci před replikací. Tato situace způsobí, že dojde k setkání replikace a transkripce na jednom DNA templátu a dojde ke vzniku RNA:DNA hybridních molekul tzv. R-loops, které vedou k nestabilitě fragilních míst (Helmrich et al., 2011)

Analýzou exprese fragilních míst v lymfoblastech, fibroblastech a epiteliálních buňkách bylo zjištěno, že zastoupení fragilních míst je tkáňově odlišné a stejně tak i míra jejich fragility. Tato tkáňová variabilita exprese BFM může být způsobena různým množstvím replikačních počátků v těchto místech, které se v rámci tkáně liší anebo také epigenetickými vlastnostmi jednotlivých buněčných linií (Hosseini et al., 2013; Le Tallec et al., 2011, 2013). Bylo zjištěno, že v některých oblastech BFM dochází k hypoacetylaci histonu, a tím zvýšené kompaktnosti chromatinu ve srovnání s okolními stabilními oblastmi. Tento jev může být příčinou znesnadněné replikace, která v kombinaci s RS vede ke vzniku nekompletně replikované DNA a následné fragilitě (Jiang et al., 2009).

Látka indukující expresi většiny fragilních míst je aphidicolin (APH). Jedná se o tetracyklinový diterpenoid izolovaný z houby *Nigrospora sphaerica*. APH působí inhibičně na DNA polymerázu α , δ , ϵ a v menších koncentracích způsobuje zpomalení nikoliv zastavení DNA replikace (Glover et al., 1984; Mrasek et al., 2010). Během této inhibice dochází k stálému rozvolňování DNA dvoušroubovice pomocí DNA helikázy a hromadění ssDNA, která tak vytváří stabilní těžce replikovatelné sekundární struktury náchylné k poškození (Zlotorynski et al., 2003). Mezi další induktory exprese BFM patří např. 5-azacytidin (analog cytozinu) nebo bromodeoxyuridin BrdU (analog thymidinu). Tyto látky jsou inkorporovány do DNA během její syntézy a v malých koncentracích taktéž způsobují zpomalení replikace (Sutherland et al., 1985).

5.2 Opravné mechanismy a kontrolní body podílející se na zachování stability BFM

Expresa BFM je důsledkem poškození DNA nebo nekompletní DNA replikace, která nebyla rozpoznána kontrolními mechanismy buňky a unikla do mitózy. Právě mechanismy zodpovědné za zachování stability BFM, význam BFM pro buňku a příčiny jejich fragility jsou předmětem současného studia těchto oblastí.

Byla identifikována celá řada proteinů podílejících se na zachování stability BFM. Hlavním mechanismem podílejícím se na kontrole replikace a taktéž zachování stability BFM je signální dráha ATR-Chk1 (viz. 4.1). Význam ATR kinázy v zachování stability fragilních míst byl potvrzen v buněčné linii pocházející z pacientů trpících Seckel syndromem, který se vyznačuje právě deficiencí tohoto proteinu. U těchto buněk bylo znatelné spontánní zvýšení exprese BFM, které bylo zesíleno působením APH (Casper et al., 2004). Stejně tak deficiencie ATR pomocí siRNA interference vedla k zvýšení exprese BFM bez i s indukci RS pomocí APH. Srovnáním významu role ATR kinázy s ATM v zachování stability BFM bylo zjištěno, že deficiencie ATM na rozdíl od ATR neovlivní fragilitu těchto míst. Stejně tak deficiencie jejich hlavních substrátů kináz Chk1 a Chk2 potvrdila preferenční význam ATR-Chk1 signální dráhy v zachování stability BFM (Casper et al., 2002; Durkin et al., 2006).

ATR a její substráty vzájemně regulují mechanismy opravy DNA a podílí se na obnovení procesu DNA replikace s cílem předejít vzniku potenciálně nebezpečných forem, jako jsou jednovláknové a dvouvláknové DNA zlomy. Významným proteinem, jehož role v zachování stability BFM byla také potvrzena je BRCA1. BRCA1 je fosforylován ATR kinázou jako odpověď na zástavu replikační vidličky a hraje zásadní roli v regulaci G2/M kontrolním bodu (Arlt et al., 2004; Tibbetts et al., 2000; Yarden et al., 2002). K dalším proteinům, substrátům ATR, jejichž role v zachování stability BFM je také potvrzena patří např. SMC1 (Musio et al., 2005), Claspin (Focarelli et al., 2009), WRN (Pirzio et al., 2008), FANCD2 (Howlett et al., 2005) atd.

V případě, že dojde k porušení kontrolních mechanismů ATR-Chk1 signální dráhy může dojít ke kolapsu replikační vidličky a vzniku DSBs. Existují dvě základní dráhy opravy DSBs a to homologní rekombinace (HR) a přímé spojování DNA konců (NHEJ). Některé významné proteiny těchto drah jako je RAD51, DNA-PKcs a Ligáza IV hrají taktéž roli v stabilitě BFM, což potvrzuje i význam obou opravných mechanismů v zachování integrity genomu v těchto oblastech (Schwartz et al., 2005).

5.3 Spojitost BFM s nádorovým onemocněním

Chromozomální aberace v oblastech BFM byly nalezeny v řadě nádorových linií. Jedná se především o delecce, translokace a amplifikace genů. V některých případech je možným zdrojem tumorigeneze integrace viru do oblasti BFM (Callahan et al., 2003; O'Keefe a Richards, 2006; Wilke et al., 1996)

FRA3B a FRA16D patří k nejčastěji exprimovaným a nejméně stabilním fragilním místům. Mnoho studií bylo věnováno jejich genetickému mapování a bylo zjištěno, že se jedná o rozsáhlé oblasti genomu, které obsahují dlouhé geny pokrývající velkou část jejich sekvence. Tyto geny kódují významné tumor supresory a ztráta případně změna genetické informace v těchto oblastech může vést ke vzniku nádorového onemocnění (Chang et al., 2003; Ishii et al., 2004; Zanesi et al., 2001)

Významným genem v oblasti FRA3B je gen FHIT. Jedná se o gen s poměrně malým transkriptem, avšak jeho krátké exony jsou rozloženy v rozsáhlé oblasti intronů pokrývající téměř celou oblast tohoto místa. Analýzou delecí nestabilní oblasti FHIT genu bylo zjištěno, že většina těchto mutací se vyskytuje zejména v intronové části genu (Smith et al., 2007). Některé rakovinné buňky vytváří neúplný transkript tohoto genu, jiné nádorové linie vykazují delece v sekvencích intronů a vzniká kompletní transkript (Druck et al., 1997; Le Beau et al., 1998; Michael et al., 1997). V každém případě studované nádory vykazují sníženou nebo zcela potlačenou expresi genu FHIT (Sozzi et al., 1998). Předpokládaným důvodem vzniku tumorigeneze je deficit hydrolázy diadenosin trifosfátu, proteinu FHIT, který je touto oblastí kódován a jehož činností je ovlivněna proliferace buněk a signalizace apoptózy (Barnes et al., 1996; Kisselev et al., 1998). Jako příklad lze uvést myší modely FHIT (+/-) případně FHIT (-/-) u nichž působením N-nitrosomethylbenzylaminu došlo k zvýšené tvorbě nádorů. Také u myší s nefunkčním genem, které nebyly vystaveny stresovým podmínkám, došlo postupně ke vzniku spontánních nádorů (Zanesi et al., 2001). Integrace funkčního genu FHIT do FHIT deficientního myšího modelu má proapoptickou aktivitu a dochází k redukci růstu nádorů (Ishii et al., 2004). Tyto výsledky potvrzují, že gen FHIT je skutečně funkčním tumorsupresorem.

V oblasti dalšího hojně exprimovaného fragilního místa FRA16D byl identifikován dlouhý gen WWOX. Translokace v této oblasti genu jsou spojovány s mnohočetnými myelomy, delece se vznikem rakoviny prostaty a adenokarcinomy (Krummel et al., 2002; O'Keefe and Richards, 2006; Qin et al., 2006). Bylo zjištěno, že WWOX protein se ve své fosforylované formě váže k fosforylovanému proteinu p53 a podílí se tak na aktivaci apoptózy (Chang et al., 2003). Jedná se tedy také o tumorsupresor.

Další BFM v jejichž oblasti dochází k delecí významných genů, jsou FRA6E a FRA9E. FRA6E obsahuje gen PARK2, jehož mutace byla odhalena u pacientů s Parkinsonovou chorobou a v rakovině vaječníků (Denison et al., 2003; Smith et al., 2007). S tímto typem rakoviny je také spojovaná delece genu pro expresi proteinu PAPP A v oblasti fragilního místa

FRA9E (Callahan et al., 2003). Kromě delecí a translokací dochází také k amplifikaci genů přítomných v oblasti BFM, což může vést k aktivaci některých onkogenů (Hellman et al., 2002). Oblast fragilního místa FRA3B byla označena jako místo integrace viru HPV-16, který je spojován se vznikem karcinomu děložního hrdla (Wilke et al., 1996).

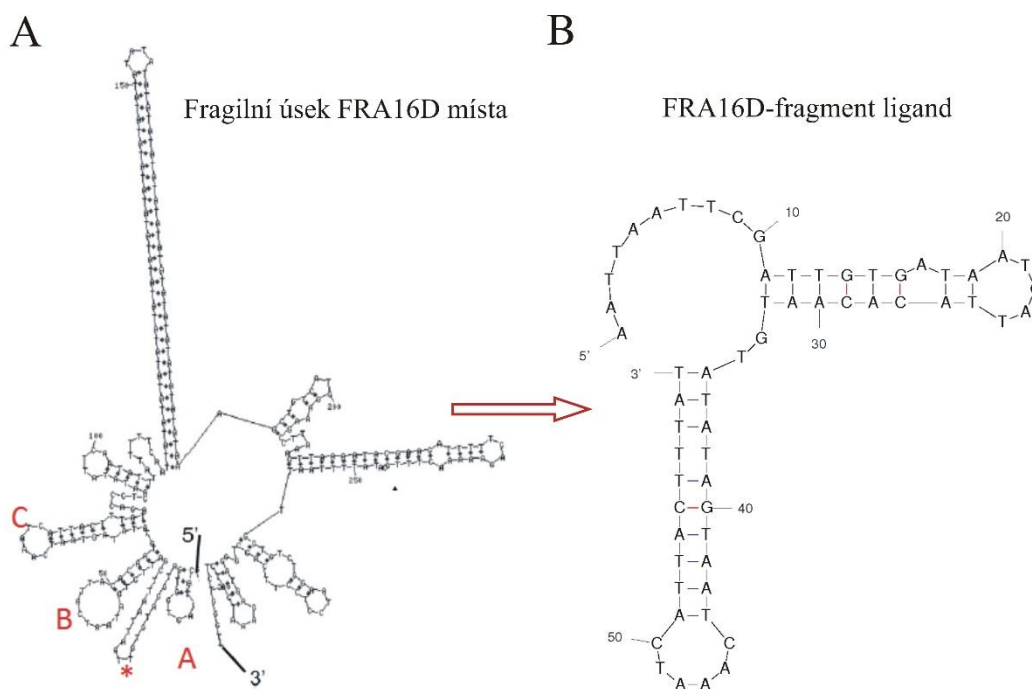
Co je příčinou nestability BFM, a jaký je jejich význam pro organismus zůstává stále neobjasněno. Bylo zjištěno, že rakovinné buňky v rané fázi vykazují poškození v oblasti BFM a s tím související aktivaci opravných drah (ATR-Chk1, ATM-Chk2, p53), která signalizuje zastavení případně kolaps replikace, a tím zastavení buněčného cyklu (Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005). BFM lze tedy označit za oblasti, jejichž poškození v normálních buňkách signalizuje porušení stability genomu a aktivaci kontrolního bodů, opravu DNA, případně eliminaci buňky apoptózou. Zvýšená nestabilita těchto míst v rakovinných buňkách je pak důsledkem porušení některého z těchto signálních mechanismů.

6. MATERIÁL A METODIKA

6.1 Návrh specifického a kontrolního DNA ligandu

Návrh specifického ligandu pro izolaci proteinů vázajících se k sekundární struktuře fragilního místa FRA16D a *in silico* predikce kontrolního ligandu, který nevytváří stabilní sekundární strukturu, byla provedena ve spolupráci s Dr. Jiřím Vollerem a detailní postup práce je vysvětlen v jedné z prvoautorských publikací (**Beresova et al., 2016, příloha II**).

Návrh specifického ligandu, sekundární struktury fragilního místa FRA16D, vycházel z již publikované sekvence fragilního úseku tohoto místa Obr. č. 3A (Zhang a Freudenreich, 2007). Pro syntézu ligandu byla vybrána strukturně variabilnější část sekvence, vlásenka B, C a část označená hvězdičkou Obr. č. 3B. Prvních 9 pozic z 5' konce vybraného úseku bylo nahrazeno cytosinem a slouží jako linker. Analýzou v programu Mfold (Zuker, 2003) bylo ověřeno, že navržená sekvence 68-mer (5'-3') CCC CCC CCC GAT TGT GAT AAT CAT TAC ACA ATG TAT ATA GTA ATC AAA TCA TTA CTT TAT vytváří strukturu, která je v podstatě stejná jako struktura, kterou vytváří odpovídající část celé sekvence fragilního místa FRA16D. Na rozdíl od plné sekvence má nejstabilnější forma navržené sekvence spárované 2 další nukleotidové páry v oku vlásenky B. Vzhledem k tomu, že tyto dva páry jsou odděleny od dvouvláknové části vlásenky, lze očekávat, že toto párování nebude příliš stabilní. Analýza v Mfold programu probíhala s nastavením parametrů, které odpovídaly experimentálním podmínkám námi provedené DNA-afinitní purifikace (150 mM Cl⁻, 4°C, 1 mM Mg²⁺).



(převzato z: Zhang a Freudenreich 2007)

Obr. č. 3: Struktura specifického afinitního ligandu DNA. *Finální struktura FRA16D-fragment ligandu použitého pro afinitní purifikaci FRA16D vazebných proteinů B) vycházející ze známé sekundární struktury fragilního místa FRA16D A).*

Základním požadavkem kladeným na kontrolní ligand byla absence tvorby stabilní sekundární struktury během experimentálních podmínek provedení DNA-afinitní purifikace. *In silico* predikce tohoto ligandu byla provedena pomocí programu Mfold a k manipulaci s DNA sekvencemi byly použity skripty v programu R. Z jednoho milionu náhodně generovaných oligonukleotidů o délce 40 bází bylo vybráno 5% sekvencí s nejnižší hodnotou bodu tání (T_m). Pro vybrané sekvence byly vytvořeny všechny subsekvence o délce 20 bází a spojením náhodných dvojic byl vytvořen nový soubor 40-merů. Takto získané 40-mery byly opět podrobeny analýze v Mfold programu. Na základě nejnižší hodnoty T_m a zároveň nejvyšší variability (eliminace repetitivních sekvencí) bylo vybráno 5% 40-merů. Tyto sekvence byly opět rozděleny na subsekvence o délce 20 bází a jejich náhodným spojením byl vytvořen nový soubor 40-merů. Celkem 20 cykly rekombinace a selekce 40-merů byla postupně vybrána nukleotidová sekvence (5'-3') CAA ATT TTA GCC AGT CAT CCC ATA GTA TCG TCC GTT CAA G, která vykazovala nejnižší T_m , dostatečnou variabilitu nukleotidů s minimem nukleotidových repetitiv a nejnižší možnost vazby transkripčních faktorů. Absence

promotorových oblastí byla testována aplikací TESS (z angl. Transcription Element Search Systém) programu (Schug 2008). Navržené sekvence, specifická i kontrolní, byly následně komerčně syntetizovány a modifikovány na 5' konci biotinem.

6.2 Konstrukce afinitní matrice

1 mg magnetických částic SIMAG-streptavidine (Chemicell) byl převeden do 1,5 ml mikrokumavky a promyt 3x1 ml citrátového pufru (150 mM NaCl, 15 mM Na₃C₆H₅O₇, pH 7) k odstranění skladovacího pufru obsahujícího azid. Poté bylo k částicím přidáno 0,5 ml citrátového pufru a 200 pmol biotinem značených DNA oligonukleotidů. Imobilizace probíhala po dobu 15 minut při laboratorní teplotě za mírného míchání na rotační třepače. Následovalo pomývání částic 3x1 ml citrátového pufru k odstranění nenavázaných DNA oligonukleotidů.

Zhotovená DNA-afinitní matrice byla následně promyta 2x 1 ml vazebného pufru (25 mM HEPES, 150 mM NaCl a 1 mM MgCl₂). Po druhém promytí matrice následovala inkubace s 1 ml vazebného pufru při 4°C po dobu 15 minut za mírného míchání na rotační třepače. Takto připravená matrice byla ponechána v lednici při 4°C a okamžitě použita pro následnou afinitní purifikaci.

6.3 Kultivace buněčných kultur

Pro tuto práci byly použity buněčné linie: HeLa S3 (ATCC) epiteliální buňky karcinomu děložního čípku, U2OS (ATCC) buněčná linie izolovaná z lidského osteosarkomu, TIG-3 (ATCC) primární linie plicních fibroblastů. Tyto kultury byly kultivovány v DMEM mediu se stabilním glutaminem a 4,5 g/l glukózy (Invitrogen), doplněném o 10% fetální sérum a 1% penicilin/streptomycin. Kultivace byla prováděna v inkubátoru s 5% CO₂ při 37°C.

U stabilně transfekované U2OS buněčné linie byla exprese shRNA namířená proti ATR indukována přidávkem doxycyklinu 1 µg/ml po dobu 4 dní před plánovaným experimentem. Selektce stabilně transfekovaných buněk byla prováděna pomocí puromycinu 1 µg/ml a blastidinu 5 µg/ml.

Metabolické značení proteinů (SILAC):

HeLa S3 buněčná linie byla kultivována v RPMI 1640 mediu původně prostém na přítomnost aminokyselin lysinu a argininu, doplněném o 10% dialyzované fetální sérum a 1%

penicilin/streptomycin. Buněčná linie byla rozdělena na dvě pasáže, z nichž jedna byla podrobena metabolickému značení proteinů a to přidavkem L- ($U\text{-}^{13}\text{C}^6$, $^{15}\text{N}^4$) argininu a L- ($U\text{-}^{13}\text{C}^6$, $^{15}\text{N}^2$) lysinu (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) do kultivačního media k buněčné kultuře dále označované jako „heavy“. Druhá část buněčné kultury byla kultivována s přidavkem argininu a lysinu s přirozeně se vyskytujícími izotopy prvků a označena jako „light“. Po 5 pasážích buněk bylo pomocí MS analýzy ověřeno, zda došlo k správnému začlenění izotopově značených aminokyselin. Buněčné kultury byla rozpěstována na požadované množství buněk.

Ošetření buněk aphidicolinem:

Replikační stress byl indukován přidavkem aphidicolinu v koncentracích 0,2-0,8 μM (v závislosti na typu experimentu) a to po dobu 24 hodin.

Transfekce pomocí siRNA:

Transfekce byla provedena na 6 cm Petriho misce s konfluencí buněčné kultury 60-80% pomocí lipofectaminu RNAiMAX (Invitrogen) a komerčně dostupné směsi siRNA proti XPC proteinu (siXPC SMART pool (Dharmacon, M-016040-01-0010)), anebo kontrolní siRNA (Dharmacon, D-001220-01-05). Do dvou mikrozkušavek bylo napipetováno 400 μl OPTI-MEM roztoku (Invitrogen). Do jedné zkumavky bylo přidáno 8 μl lipofectaminu a do druhé 8 μl 20 μM siRNA. Po 5 minutách inkubace byly obě mikrozkušavky smíchány a za občasného promíchání inkubovány 30 minut. Takto připravený transfekční roztok byl přidán k buněčné kultuře inkubované v 3 ml media bez antibiotik. Transfekce probíhala v inkubátoru po dobu 6 hodin. Poté bylo medium s transfekčním roztokem odstraněno a přidáno 5 ml kompletního DMEM media. Úspěšnost transfekce byla ověřena western blotem.

6.4 Příprava buněčného lyzátu a FRA16D-fragment afinitní chromatografie

HeLa S3 „heavy“ a „light“ buněčné linie byly kultivovány za normálních podmínek a za podmínek způsobujících replikační stres tj. s přidavkem 0,4 μM aphidicolinu po dobu 24 h anebo 0,5% DMSO.

Prvními kroky FRA16D-fragment afinitní chromatografie byla izolace jaderných proteinů, která byla provedena pomocí komerčně dostupného kitu NEP-PER nuclear and cytoplasmatic extraction kit (Thermo Scientific) a kvantifikace získaných proteinů pomocí Bradfordovy metody (Biorad).

1 mg „heavy“ jaderného lyzátu byl přidán do 1 ml vazebného pufru k FRA16D-fragment afinitní matrici a poté byla provedena inkubace (umožňující vzájemnou interakci FRA16D-fragment ligandu s proteiny) po dobu 1 hodiny při 4°C za pomalého míchání na rotační třepače. Následovalo promytí matrice vazebným pufrům 5x 1 ml k odstranění nnavázaných proteinů a eluce proteinů vázaných k FRA16D-fragment afinitní matrici. Eluce vázaných proteinů byla provedena přímo do vzorkovacího pufru pro elektroforetické dělení a to tak, že 25 µl vzorkovacího pufru bylo napipetováno k magnetickým částicím a 10 minut při 95°C intenzivně třepáno. Po proběhlé eluci byl vzorkovací pufr obsahující vazebné proteiny pečlivě odpipetován od magnetických částic. Stejný postup byl proveden také se stejným množstvím „light“ jaderných proteinů inkubovaných s matricí s kontrolním DNA ligandem. Tento experiment je dále v textu označován jako „forward“.

Při druhém opakování tohoto experimentu bylo značení jaderných proteinů přidávajících se k matrici obráceno. „Light“ jaderné proteiny byly inkubovány s FRA16D-fragment afinitní matricí a „heavy“ jaderné proteiny s kontrolní DNA matricí. Tento experiment je dále v textu označován jako „reverse“.

Jednotlivé eluáty s FRA16D-fragment afinitní matrice a matrice s kontrolním DNA ligandem byly smíchány v poměru 1:1 a dále zpracovány pro následnou MS analýzu.

DNA-afinitní chromatografie určená k izolaci FRA16D vazebných proteinů byla nejprve provedena s jadernými proteiny pocházejícími z buněk kultivovaných za normálních podmínek, a poté s proteiny z buněk vystavených replikačnímu stresu.

6.5 Identifikace FRA16D-fragment vazebných proteinů pomocí MS

6.5.1 SDS-PAGE a proteolytické štěpení proteinů v gelu

SDS-PAGE

Jednotlivé eluce proteinů z FRA16D-fragment afinitní matrice a kontrolní matrice smíchané v poměru 1:1 byly separovány pomocí elektroforetického dělení v polyakrylamidovém gelu (4-15% BIS-TRIS SDS-PAGE (Biorad)). Po separaci byl gel obarven pomocí roztoku Commassie Brilliant blue a oblasti detekovaných proteinů rozděleny na 13 částí, u nichž bylo provedeno proteolytické štěpení proteinů.

Proteolytické štěpení proteinů v gelu

Proteolytické štěpení proteinů v gelu bylo provedeno dle již publikovaného metodického postupu (Sebela et al., 2006; Shevchenko et al., 2006).

Jednotlivé části gelu obsahující separované proteiny byly přeneseny do 1,5 ml mikrozkušavky rozkrájeny na malé kousky a za intenzivního třepání v termomixeru (1000 rpm, 15 minut, 25°C) odbarveny přidavkem odbarvovacího roztoku (50% (v/v) acetonitril (ACN)/100 mM NH_4HCO_3). Odbarvovací roztok byl od gelových kousků odstraněn a gelové kousky byly následně dehydratovány přidavkem 100% ACN tzv. shrinking. Po dostatečné dehydrataci byly gelové kousky vysušeny ve vakuu.

Následovala redukce pomocí redukčního činidla (10 mM dithiothreitol/ 100 mM NH_4CO_3) po dobu 30 minut při 56°C v termomixeru. Po redukci byl opět proveden shrinking gelových kousků následovaný alkylací proteinů přidavkem alkylačního činidla (55 mM iodoacetamid /100 mM NH_4CO_3) po dobu 20 minut ve tmě. Po proběhlé alkylaci byl roztok nahrazen deionizovanou vodou a gelové kousky promyty třepáním v termomixeru (1000 rpm, 15 minut, 25°C). Poté následoval opět shrinking gelových kousků.

Samotné enzymatické štěpení proteinů probíhalo po přidání štěpícího pufru (20 ng/ μl trypsinu ve 20 mM NH_4CO_3 /1 mM CaCl_2) přes noc při 37°C.

6.5.2 Příprava vzorků pro MS analýzu

Po proběhlém proteolytickém štěpení byla provedena extrakce peptidů přidavkem 2x 100 μl extrakčního pufru (30% (v/v) ACN/5% (v/v) kyselina mravenčí (FA)) a třepáním v termomixeru při 1400 rpm, 37°C po dobu 30 minut. Získané roztoky s extrahovanými peptidy byly odpařeny na vakuové centrifugační odparce.

Odparky byly rozpuštěny přidavkem 50 μl 5% (v/v) FA a třepáním v termomixeru při 1400 rpm. a laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Následovala 5 minutová sonikace ve vodní lázni. Takto rozpuštěné peptidové směsi byly přečištěny pomocí, StageTips, špiček s C18 reverzní fází dle již publikovaného postupu (Rappsilber et al., 2007).

StageTip špičky byly naplněny C18 reverzní fází a umístěny do otvoru ve víčku 1,5 ml mikrozkušavky. Jednotlivé mobilní fáze procházely přes C18 reverzní fázi na základě odstředivé síly vznikající při centrifugaci. Reverzní fáze byla aktivována přidavkem 40 μl

isopropanolu (2000 rpm, 5 minut) a ekvilibrována 2x 40 μ l 5% (v/v) FA (1500 rpm, 10 minut). Špička byla umístěna do nové 1,5 ml mikrozkušavky a následovalo nanesení vzorku (1000 rpm, 15 minut). Po průchodu vzorku C18 fází bylo provedeno její promytí a to 2x 40 μ l 5% (v/v) FA (1500 rpm, 10 minut). Následovala eluce peptidů do nové 0,5 ml mikrozkušavky pomocí 2x 40 μ l 50% (v/v) metanolu s 2% (v/v) FA (1000 rpm, 10 minut). Roztoky s přečištěnými peptidy byly odpařeny na rotační vakuové odparce a rozpuštěny v 0,5% FA před samotnou MS analýzou.

6.5.3 Analýza peptidů pomocí nLC-MS/MS

Analýza peptidových vzorků byla provedena pomocí nanokapalinové chromatografie (nanoEASY-nLC System, Thermo Fisher Scientific) ve spojení s UHR-Q-TOF maXis systémem vybaveným iontovým zdrojem nanoESI (Bruker Daltonik). Jednotlivé vzorky byly nastříknuty v objemu 5 μ l na předkolonu (2 cm x 75 μ m plněnou 5 μ m částicemi ReproSil-Pur C18-AQ serbentem), kde byl vzorek zakoncentrován a následně separován na analytické koloně (15 cm x 75 μ m plněné 3 μ m částicemi ReproSil-Pur C18-AQ sorbentu). Separace probíhala 185 minutovou gradientovou elucí s průtokem 200 nl/minutu. Gradient byl tvořen různým poměrem mobilní fáze A: 0,4% (v/v) FA a B: 0,4% (v/v) FA v 80% (v/v) ACN viz tabulka.

Tabulka 1.: Gradient separace peptidů pomocí nLC-MS

Čas (min.)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	98	2
3	92	8
80	82	18
125	72	28
135	68	32
148	55	45
157	35	65
160	15	85
165	15	85
168	98	2
185	98	2

Při samotné MS analýze byly ionty tříděny v MS módu v rozsahu m/z 50-2500 Da za 1s. MS/MS data byla pořízena v rozsahu m/z 50-350 Da pro 5 nejintenzivnějších prekurzorových iontů s nábojem ≥ 2 . Prekurzorové ionty skenované v MS/MS módu byly vyloučeny z další fragmentace po dobu 18s.

Nastavení iontového zdroje: napětí kapiláry 1750 V, průtok sušícího plynu 1,5 l/minutu, teplota sušení 180°C.

6.5.4 Zpracování MS dat a jejich vyhodnocení

Data získaná MS analýzou byla vyhodnocena softwarem Data Analysis 4.2 SPI (Bruker Daltonik). Získané XML soubory dat obsahující prekurzory a jejich fragmentace byly dále zpracovány pomocí serveru Mascot v2.2.7 (Matrix Science) vyhledáváním proti UniProt databázi (20150107, 89706 seq; www.uniprot.org) doplněné o informace o přítomných kontaminantech jako keratiny, trypsin použitý k proteolytickému štěpení, hovězí sérový albumin a také o reverzní sekvence všech lidských proteinů pro stanovení false discovery rate (FDR). Parametry pro vyhledávání v Mascot serveru byly následující: tolerance MS módu ± 25 ppm a v MS/MS módu ± 0.05 Da, proteolytický enzym-trypsin, jedno vynechané štěpení, fixní modifikace karbamidometylace cysteinu, jako variabilní modifikace pak byla určena oxidace methioninu, N-terminální acetylace a značení peptidů $^{13}\text{C}(6)^{15}\text{N}(2)$ lysinem a $^{13}\text{C}(6)^{15}\text{N}(4)$ argininem.

Proteiny identifikované prohledáváním pomocí Mascot serveru byly dále zpracovány v ProteinScape v2.1 programu dle následujících parametrů: Pro identifikaci proteinu byla požadována přítomnost minimálně dvou peptidů se skóre ≥ 15 a FDR 5%. Pro kvantifikaci proteinu pak bylo třeba minimálně 3 peptidových párů daného proteinu.

Relativní poměry proteinů identifikovaných v „forward“ a „reverse“ experimentu byly logaritmicky transformovány log₂ a vyneseny proti sobě do grafů. Dle normálního rozdělení hodnot jednotlivých poměrů proteinů byly jako signifikantní ($p < 0.01$) určeny proteiny s hodnotou poměru větší jak 2.58σ (Oppermann et al., 2009). Tyto proteiny se vyskytují v pravém horním rohu grafu a mohou být označovány za proteiny specificky se vázající k ligandu FRA16D-fragment.

Informace o molekulární a biologické funkci proteinů interagujících s ligandem FRA16D-fragment byly analyzovány pomocí Cytoscape programu, plug-in CluGO oproti databázi genové ontologie (GO) (Bindea et al., 2009).

6.6 Imunofluorescenční barvení vzorků

Buňky byly fixovány 10% formalínem po dobu 15 minut. Následovala permeabilizace přidavkem 0,5% Triton X v PBS po dobu 5 min. Blokace vzorků byla provedena roztokem 1% BSA v PBS po dobu 20 minut na vertikální třepačce. Po blokaci byly přidány primární protilátky a inkubovány přes noc při 4°C v lednici. Po promytí roztokem PBS s 1% Tween 20 byly přidány sekundární protilátky a následovala inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě. DNA byla obarvena pomocí roztoku Hoechst 33342 (Invitrogen) v PBS 5 µg/ml.

6.7 Analýza mitotických buněk-detekce chromozomálního poškození pomocí γ H2AX proteinu

Transfekovaná buněčná linie byla vysazena na 24 jamkovou destičku a ošetřena pomocí 0,4 µM APH anebo 0,5% DMSO po dobu 24h. Poté byly vzorky fixovány a barveny systémem protilátek. Primárními protilátkami pH3 (pSer10, Milipore, 6-570, 1:1000) a γ H2AX (pSer139, Santa Cruze 07-146, 1:500). Sekundární protilátky proti myši Alexa Fluor 488 (A11001, Invitrogen, 1:1000) a králičí Alexa Fluor 568 (A11036, Invitrogen 1:1000).

Snímky byly pořízeny pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu (Zeiss Cell Observer Spining disk konfokální mikroskop). Destička byla umístěna na posuvný stolek mikroskopu a jednotlivé pozice v jamkách automaticky skenovány s rozlišením 10x. Na základě pH3 pozitivivity byly vyselektovány mitotické buňky, v nichž byly detailně (rozlišení 63x) detekovány γ H2AX fokusy. Analýza γ H2AX fokusů v nejméně 150 mitózách byla provedena pomocí MatLab programu, softwarem navrženým Dr. Tomášem Fürstem. Každý experiment byl proveden minimálně ve třech biologických opakováních.

6.8 Imunofluorescenční detekce proteinů buněčné odpovědi na poškození DNA

Transfekovaná buněčná linie byla vysazena na 24 jamkovou destičku a ošetřena pomocí 0,2-0,4 μM APH anebo 0,5% DMSO po dobu 24h. Poté byly buňky fixovány a obarveny systémem protilátek.

Detekce 53BP1 proteinu tzv. 53BP1 bodies v G1 buněčné populaci: 53BP1 (Santa Cruz, 500x), cyklin A (Leica, 50x), sekundární protilátky Alexa Fluor 488 (A11001, Invitrogen, 1:1000) a Alexa Fluor 568 (A11036, Invitrogen 1:1000). Snímky byly pořízeny pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu BX71 (Olympus) a vyhodnoceny ScanR softwarem (Olympus). Jednotlivé buňky byly rozpoznány na základě barvení roztokem Hoechst 33342. Na základě detekce intenzity cyklin A proteinu byly odlišeny S/G2 buňky (cyklin A pozitivní) a cyklin A negativní G1 populace. Pouze v cyklin A negativních buňkách byl detekován počet fokusů 53BP1.

Při přípravě vzorků k detekci vazby ATR a ATRIP proteinů k chromatinu byly použity primární protilátky: ATR (Santa Cruz, sc-22760, 1:500), ATRIP (Cell Signaling, 2737, 1:250). U těchto vzorků byla před samotnou fixací provedena preextrakce (10 mM PIPES, 300 mM sacharóza, 1,5 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 0,5% Triton X, inhibitory proteáz a fosfatáz, inkubace 20 minut na ledu), která umožnila odstranit proteiny nevázané k chromatinu. Během analýzy byly buňky rozpoznávány na základě barvení roztokem Hoechst 33342. Intenzita signálu ATR a ATRIP proteinu odráží množství proteinu přítomného na chromatinu. Každý experiment byl proveden minimálně ve třech biologických opakováních.

6.9 Western blot

Buněčné kultury byly vysazeny v počtu 35×10^4 na 6 cm petriho misku. Lyze buněk byla provedena přímo přidávkem pufu pro elektroforetické dělení k buněčné kultuře. Vzorek byl převeden do 1,5 ml mikrozkmavky a buňky řádně lyzovány v termomixeru 1400 rpm při 95°C. Následovalo elektroforetické dělení pomocí 4-15% SDS-PAGE gradientových gelů (Biorad), 20 mA 90 minut. Po separaci byl gel přenesen na nitrocelulosoovou membránu pomocí semi-dry western blotu (150 mA 90 minut). Membrána byla blokována v 5% mléku po dobu 1 h. Primární protilátky byly inkubovány přes noc při 4°C, sekundární protilátka značená křenovou

peroxidázou při laboratorní teplotě 1 hodinu. Detekce proteinu byla provedena pomocí chemiluminiscenčního kitu ECL (Thermo Scientific).

Použité primární protilátky: XPC (Novus Biological, NB100-477, 1:1000), pChK1 (Ser345, Cell Signalling, 2348, 1:500), ChK1 (Santa Cruz, sc-8408, 1:500), GAPDH (GeneTex, GTX30666, 1:2000), MCM7 (Santa Cruz, sc-65469, 1:100). Sekundární protilátky proti myší protilátce (GE-Healthcare, NA931V, 1:1000), proti králičí protilátce (GE-Healthcare, NA934V, 1:1000).

6.10 Určení mitotického indexu pomocí průtokové cytometrie

Transfekované buněčné linie byly vysazeny na 6 cm Petriho misky a ošetřeny 0,2 μM APH, 0,4 μM APH, anebo 0,5% DMSO po dobu 24 h. 6 h před fixací buněk byl přidán nocodazol ve výsledné koncentraci 100 ng/ml. Buňky byly trypsinizovány, fixovány studeným 10% formalínem po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Následovala permeabilizace 0,5% Tritonem X 5 minut. Vzorky byly obarveny primární protilátkou na detekci pH3 (pSer10, Milipore, 6-570, 1:1000) 1 h při laboratorní teplotě. Poté následovalo barvení sekundární protilátkou (Alexa Fluor 488, Invitrogen A11034, 1:1000) taktéž 1h při laboratorní teplotě. Buňky byly centrifugovány a resuspendovány v roztoku PBS s 2% fetálního telecího séra a s přídatkem 0,5 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Následovala analýza pomocí průtokového cytometru (BD FACSVerser).

7. KOMENTOVANÉ VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Experimentální strategie k identifikaci proteinů interagujících s BFM

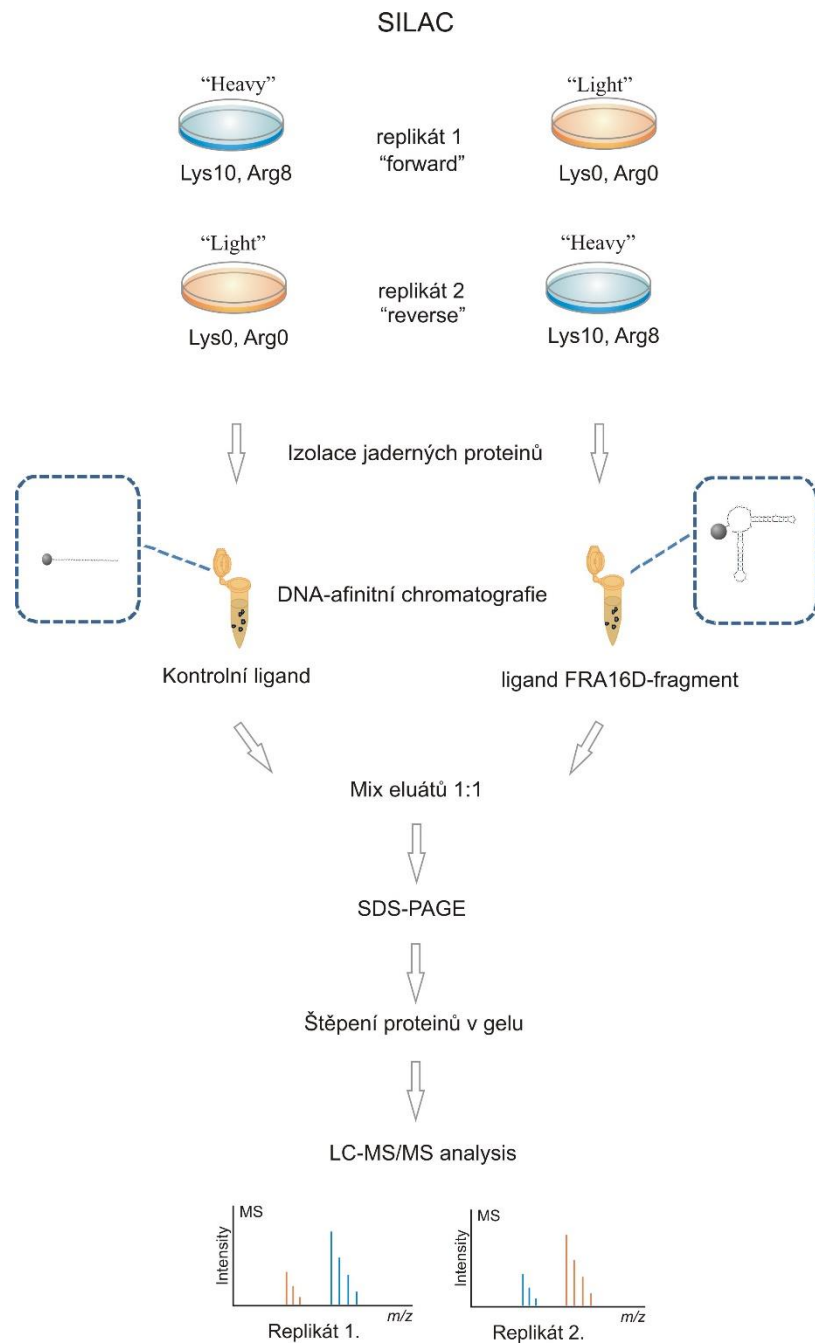
Jedním z cílů této práce bylo zhotovit vhodný afinitní systém pro izolaci proteinů vázajících se k fragilním místům DNA. Zásadním krokem byl návrh specifického DNA afinitního ligandu a konstrukce afinitní matrice. Hlavním myšlenkou při návrhu specifického afinitního ligandu bylo získat strukturu, která bude představovat oblast BFM během RS, a tedy znázorní stabilní sekundární strukturu, která představuje pro buňku bariéru znesnadňující průběh replikace. Jako předloha pro návrh takového ligandu byla zvolena část fragilního místa FRA16D. Pomocí kvasinkového modelu s uměle vloženým FRA16D místem byla v tomto místě identifikována oblast DNA s vysokou flexibilitou a sklonem k zvýšené fragilitě působením RS (Zhang a Freudenreich, 2007). Z tohoto místa byl vybrán strukturně nejvariabilnější úsek a pomocí Mfold programu, který umožňuje analýzu strukturních vlastností DNA a RNA molekul, bylo ověřeno zachování sekundární struktury tohoto úseku během experimentálních podmínek námi provedené DNA-afinitní chromatografie (Zuker, 2003).

Dalším neméně podstatným krokem byl návrh kontrolního DNA ligandu, který by spolu s aplikací metody relativní kvantifikace SILAC umožnil identifikovat a odlišit proteiny vázané k specifickému ligandu FRA16D-fragment. Hlavním požadavky kladené na kontrolní ligand bylo zachování stabilní lineární struktury během experimentálních podmínek DNA-afinitní chromatografie a absence promotorových oblastí.

Finální vzhled specifického úseku fragilního místa, označovaného jako ligand FRA16D-fragment, stejně jako postup návrhu kontrolního ligandu je součástí kapitoly materiál a metodika, a také **přílohy č. II**. Oba DNA afinitní ligandy byly během komerční syntézy modifikovány na 5'-konci biotinem, což umožnilo jejich následnou imobilizaci k magnetickým částicím pokrytým streptavidinem.

Samotná DNA afinitní chromatografie byla provedena paralelně na specifické FRA16D-fragment a kontrolní afinitní matici s jadernými proteiny získanými z buněk (HeLa S3) kultivovaných za normálních podmínek, a následně z buněk vystavených RS indukovanému pomocí 0,4 μ M APH po dobu 24 hodin. Každý z experimentů (bez a s indukovaným RS) byl proveden ve dvou replikátech tzv. forward a reverse, během kterých bylo vyměněno SILAC značení proteinů vkládaných na specifickou a kontrolní matici.

Tato výměna poskytuje nejen opakování daného experimentu a nástroj k vyhodnocení specifických FRA16D-fragment vazebných proteinů, ale také eliminuje možné falešně pozitivní vazby proteinů způsobené inkorporací izotopicky značených aminokyselin. Schematické znázornění experimentálního provedení DNA-afinitní chromatografie Obr. č. 4.



Obr. č. 4: Experimentální schéma identifikace a kvantifikace FRA16D-fragment vazebných proteinů pomocí DNA-afinitní chromatografie a MS. Buňky byly kultivovány v „heavy“ a „light“ SILAC mediu. Jaderné proteiny izolované z těchto buněk byly podrobeny DNA-afinitní

chromatografii na afinitní matrici s ligandem FRA16D-fragment a kontrolním ligandem. Eluáty z afinitních matric byly smíchány v poměru 1:1, separovány pomocí SDS-PAGE a podrobeny proteolytickému štěpení v gelu. Získané peptidové směsi byly analyzovány pomocí nLC-MS/MS. Experiment byl proveden s jadernými lyzáty buněk kultivovaných za normálních podmínek a následně s jadernými proteiny buněk vystavených RS pomocí 0,4 μ M APH po dobu 24 hodin. Každý z experimentů byl proveden ve dvou replikátech „forward a reverse“ se záměnou izotopově značených jaderných proteinů přidávaných k afinitním matricím.

7.2 Identifikace proteinů obohacených na ligandu FRA16D-fragment

Identifikace proteinů probíhala na základě analýzy fragmentačních spekter pomocí programu ProteinScape s využitím vyhodnocovacího algoritmu Mascot ve spojení s databází UniProt. Na základě stanovených podmínek pro identifikaci proteinů tj. identifikace minimálně 2 peptidů daného proteinu s hodnotou score >15 a FDR 5% byl získán seznam proteinů obohacených na FRA16D-fragment a kontrolní matrici. Pro následnou bioinformatickou analýzu, relativní kvantifikaci proteinů, byly vybrány pouze ty proteiny, u nichž bylo možné nalézt 3 peptidové páry.

V prvním experimentu DNA-afinitní chromatografie provedené s jadernými proteiny buněk, které nebyly vystaveny RS bylo identifikováno celkem 282 proteinů, z nichž 228 bylo kvantifikováno a 150 se vyskytlo v obou provedených replikátech (forward i reverse).

V druhém experimentu DNA-afinitní chromatografie provedené s jadernými proteiny buněk, které byly vystaveny působení 0,4 μ M APH po dobu 24 h jsme získali 655 proteinů, z nichž 559 vyhovovalo stanoveným podmínkám kvantifikace a 410 se nacházelo v obou replikátech.

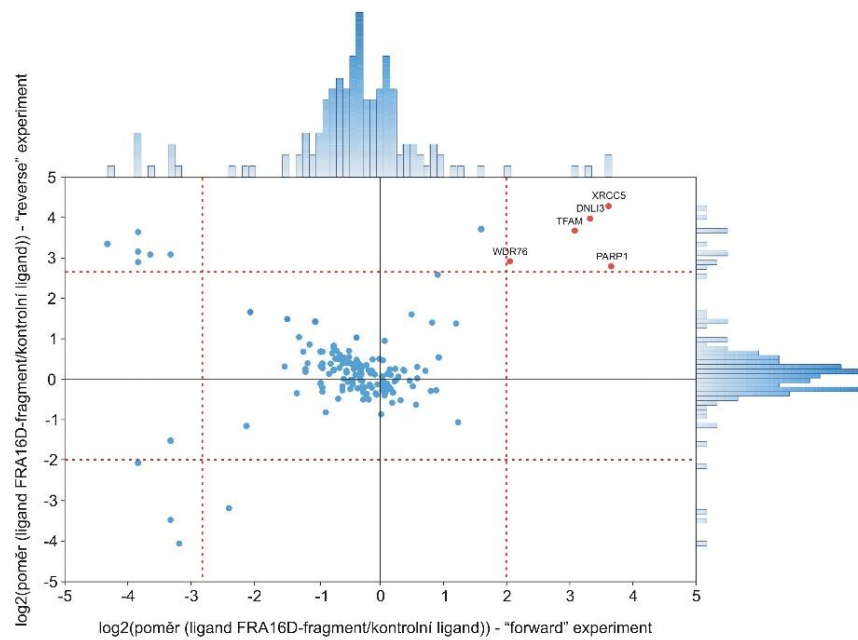
Aplikace proteomického přístupu relativní kvantifikace proteinů SILAC nám umožnila identifikovat proteiny obohacené na ligandu FRA16D-fragment (za normálních podmínek a po vystavení buněk RS) a zároveň odlišit proteiny nespecificky adsorbované k DNA ligandu anebo samotné matrici. Logaritmicky normalizované (\log_2) hodnoty poměru výskytu proteinu v směsi eluátů z ligandu FRA16D-fragment a kontrolní matrice smíchané (1:1) byly vyneseny do grafu (forward vs. reverse), což nám umožnilo odlišit proteiny specificky vázané k FRA16D-fragment ligandu bez a s indukcí RS. Signifikantně obohacené proteiny v obou replikátech jsou

viditelné jako odlehle body v oblasti pravého horního kvartálu, zatím co nespecifické proteiny se stejnými hodnotami poměrů v obou replikátech jsou lokalizovány ve středu grafu Obr. č. 5.

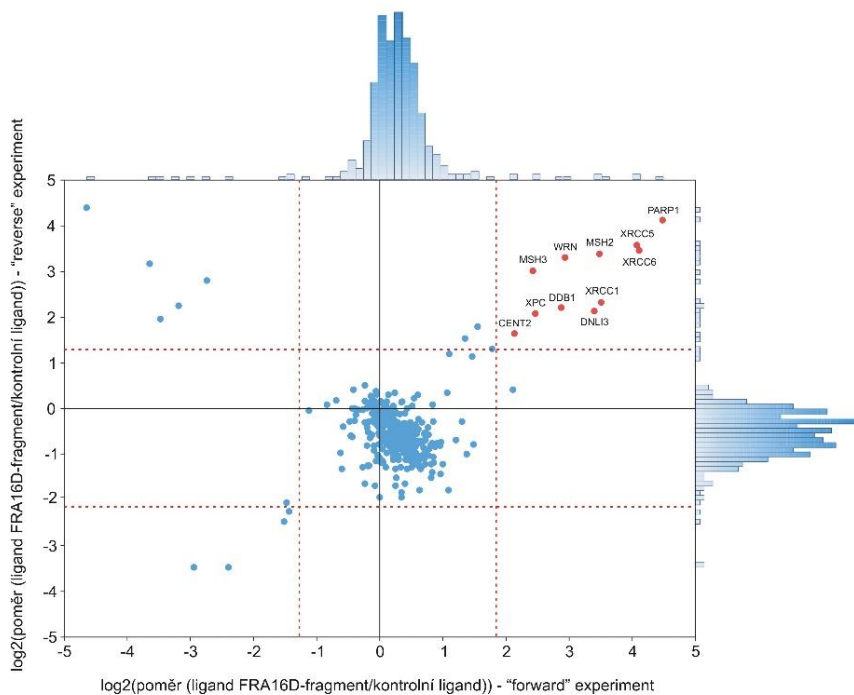
Celkem jsme získali 13 proteinů signifikantně obohacených na ligandu FRA16D-fragment. Z toho 3 proteiny (PARP-1, XRCC5, DNLI3) jsou společné pro oba experimenty, 2 proteiny (WDR76, TFAM) jsou přítomny pouze v experimentu bez indukce RS a zbylých 8 proteinů (WRN, XRCC1, XPC, MSH2, MSH3, Centrin-2, DDB1, XRCC6) je obohaceno na ligandu FRA16D-fragment po ovlivnění buněk pomocí APH.

S použitím programu Cytoscape, plug-in ClueGo (Bindea et al., 2009) byly FRA16D-fragment vazebné proteiny prohledány v databázi genové ontologie, která umožnila jejich klasifikaci na základě biologické a molekulární funkce (**příloha II**, Obr. č. 4 A, B). Analýzou proteinů v KEGG (z angl. Kyoto gene encyclopedia of genes and genomes) databázi jsme získali informaci o signálních drahách, v nichž jsou proteiny zahrnuty (**příloha II**, Obr. č. 4 C). Z výsledků vyplývá, že identifikované FRA16D-fragment vazebné proteiny vykazují vazebnou afinitu vůči abnormálním strukturám DNA a jejich známá biologická funkce je především v opravných a rekombinačních mechanismech DNA. Jedná se především o dráhu přímého spojování konců dvouvláknových zlomů DNA (non-homologous end-joining, NHEJ), dráhy excizní reparace chybného párování bází (mismatch repair), excizní reparace bází (base excision repair, BER) a excizní reparace nukleotidů (nucleotide excision repair, NER). Získané výsledky podporují správnost návrhu DNA-afinitní chromatografie a možnou identifikaci proteinů s potencionální rolí v zachování stability fragilních míst. Dalším významným validačním faktorem potvrzujícím správnost provedení experimentu je identifikace WRN a MSH2. Spojitost těchto proteinů se zachováním stability fragilních míst byla již detailně popsána (Pirzio et al., 2008; Turner et al., 2002).

A. Identifikace FRA16D-fragment vazebných proteinů bez ovlivnění buněk



B. Identifikace FRA16D-fragment vazebných proteinů po ovlivnění buněk pomocí APH



Obr. č. 5: Identifikace FRA16D-fragment vazebných proteinů. V grafech jsou vyneseny hodnoty normalizovaných poměrů (\log_2) proteinů získané z forward a reverse experimentů. Nespecificky vázané proteiny lze pozorovat ve středu grafu, specificky obohacené se akumulují v pravém horním kvartálu. A) Proteiny specificky vázané k FRA16D-fragmentu bez přítomnosti RS. B) Proteiny specificky vázané k FRA16D-fragmentu vlivem RS.

Hlavním cílem FRA16D-fragment afinitní chromatografie byla izolace proteinů zodpovědných za zachování stability fragilních míst především během působení RS. V dalším kroku jsme se tedy změřili na studium biologické funkce proteinů identifikovaných na ligandu FRA16D-fragment po působení APH. Na základě literatury bylo zjištěno, že téměř polovina těchto proteinů (DDB1, XPC, Centrin-2, XRCC1, LIG3 kooperuje v jedné opravné dráze a to globální genomové-NER (Global Genome-NER, GG-NER) (Nospikel, 2009).

GG-NER je opravný mechanismus eliminující nejen (6-4) pyrimidin–pyrimidonové fotoprodukty (6-4PP) a cyklobutan-pyrimidinové dimery (CPD) vznikající působením UV záření, ale také vnitřetěžcové můstky a bublinové struktury vznikající v DNA působením různých chemických látek. DDB1, XPC a Centrin-2 se podílí na rozpoznání poškozeného místa a aktivaci opravné dráhy tvorbou iniciačního komplexu XPC-RAD23B-Centrin 2 (Nishi et al., 2005; Sugasawa et al., 1998).

DDB1 protein je součástí UV-DDB komplexu (DDB1, DDB2 a ubiquitin ligáza), který zprostředkovává vazbu XPC proteinu k místu poškození. Následuje ubiquitynlace DDB2 a XPC proteinu. Zatím co DDB2 je degradován proteasomem, ubiquitynlace XPC zvyšuje jeho stabilizaci a afinitu k DNA (Sugasawa et al., 2005). Tento mechanismus je většinou spojován s rozpoznáváním poškození, které vzniklo UV zářením a zároveň málo deformuje DNA strukturu např. CPD (Fitch et al., 2003). Naopak některé (6-4)PP fotoprodukty a další DNA poškození vyvolané různými chemickými látkami jsou rozpoznány přímo pomocí XPC bez následné ubiquitynlace.

Proteiny XRCC1 a LIG3 se podílí především na syntéze nového řetězce DNA vznikajícího až po excizi chybového úseku (Moser et al., 2007)

Souvislost XPC proteinu a stejně tak celé dráhy GG-NER s fragilními místy nebyla dosud ověřována. Ze současné literatury vyplývá, že XPC protein může představovat obecný senzor abnormálních struktur v DNA. Rozpoznává různé bubliny, smyčky, sekundárních struktury a to bez ohledu na původ poškození (Krasikova et al., 2013; Sugasawa et al., 2002, 2009). Právě tato substrátová variabilita podporuje také myšlenku jeho další biologické funkce mimo aktivaci GG-NER (Shell et al., 2013). Nové role XPC proteinu byly prokázány v regulaci BER (Melis et al., 2013), remodelaci chromatinu (Ray et al., 2009), proteolytické degradaci proteinů (Krzyszinski et al., 2014) a také v zachování stability telomer (Stout a Blasco, 2013).

Na základě dostupných informací o XPC proteinu a vlastních výsledcích proteomického skrínungu byl tento protein vybrán jako vhodný kandidát k dalšímu studiu a jeho biologická role

v RS a zachování stability fragilních míst byla následně ověřována pomocí molekulárně-biologických metod.

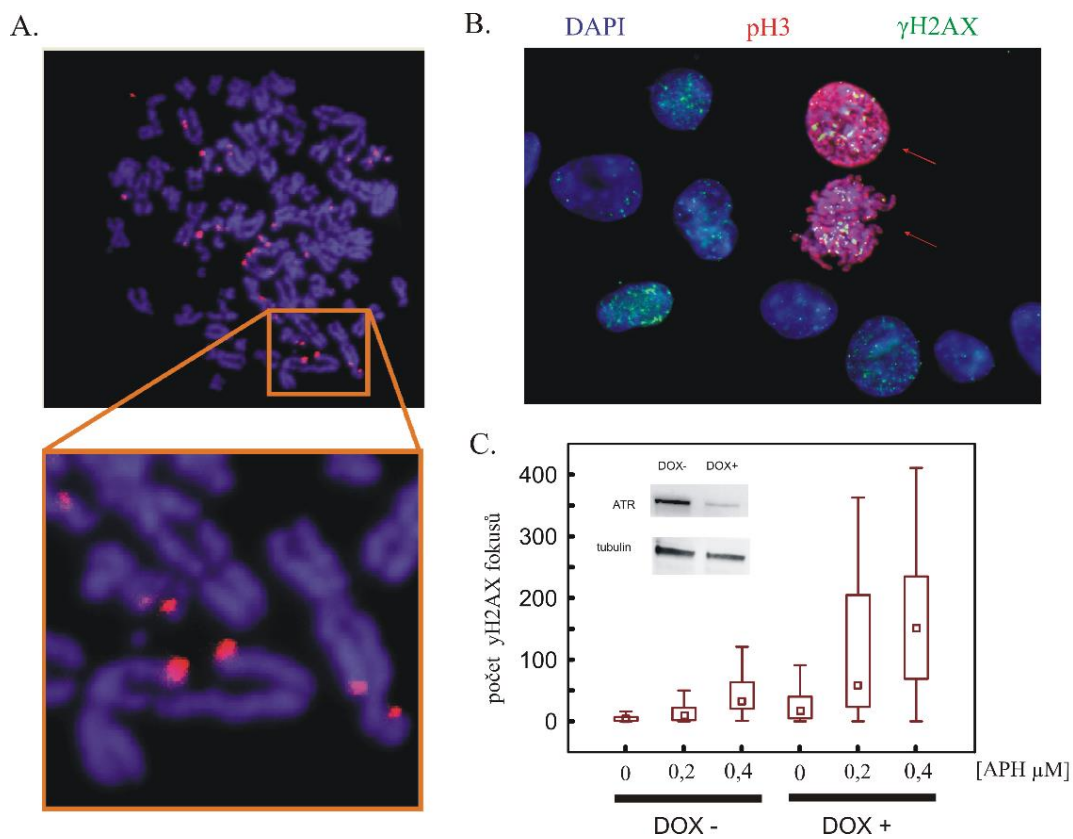
Jelikož působení APH vytváří stabilní sekundární struktury v oblasti fragilních míst, předpokládali jsme, že rozpoznání těchto struktur XPC proteinem by mohlo probíhat přímo, nezávisle na výše zmíněném UV-DDB komplexu. Pomocí buněčné frakcionace bylo ověřeno, zda působením 0,4 μM APH po dobu 24 h dochází k XPC ubiquitylaci. Tuto posttranslační modifikaci lze pozorovat jako elektroforetický posun XPC proteinu během SDS-PAGE, který je detekován pomocí specifické protilátky následným western blotem. V případě vzorku, který byl vystaven RS pomocí APH nedošlo během elektroforetického dělení k posunu charakteristického bandu ubiquitylovaného XPC proteinu v porovnání se vzorkem, který byl vystaven působení UV záření (**příloha II., doplněk Obr. č. 2**). Na základě tohoto výsledku se můžeme domnívat, že působením APH nedochází k XPC ubiquitylaci a případné rozpoznání sekundárních struktur DNA by mohlo být nezávislé na UV-DDB komplexu.

7.3 Detekce exprese BFM na mitotických chromozomech

Jednou z nejužívanějších metod pro studium role proteinu v zachování stability BFM je vizuální detekce zlomů a mezer přítomných na metafázních chromozomech v uměle vytvořeném funkčním deficitu daného proteinu bez a s vlivem RS. Přítomnost mezer a zlomů na metafázních chromozomech se obecně označuje jako exprese fragilních míst. Chromozomální poškození je v oblasti fragilních míst rozpoznáváno pomocí Giemsova barvení anebo pomocí FISH k danému místu (Durkin et al., 2006; Howlett et al., 2005; Pirzio et al., 2008). Limitacemi těchto metod je časová náročnost přípravy mitotických vzorků tzv. spreadů, které navíc vyžadují velkou zkušenost hodnotitele s detekcí chromozomálních aberací a samozřejmě mohou být ovlivněny jeho subjektivním názorem.

Druhou možností detekce chromozomálního poškození je identifikace dvouvláknových DNA zlomů pomocí markeru DNA poškození, fosforylovaného histonu H2AX (γH2AX) (Rogakou et al., 1998). Bylo potvrzeno, že 20 z nejvíce exprimovaných fragilních míst je spojeno s 80% dvouvláknových DNA zlomů detekovaných na metafázních chromozomech lymfoblastů po indukci RS pomocí APH (Glover et al., 1984), což podporuje možnost detekce fokusů γH2AX proteinu jako markeru exprese BFM na metafázních chromozomech.

Pro detekci γ H2AX proteinu v mitotických buňkách jsme použili již publikovanou metodu (Löffler et al., 2011), jejíž provedení jsme ve spolupráci s Dr. Martinem Mistríkem modifikovali a aplikovali pro naše účely. Princip metody spočívá v detekci mitotických buněk na základě pH3 mitotického markeru a následné detekci γ H2AX fokusů v těchto mitotických buňkách (Obr. č. 6A, B). Aplikovatelnost metody byla ověřena detekcí exprese fragilních míst na mitotických chromozomech po indukci RS v ATR deficientní buněčné linii (U2OS shATR) (Obr. č. 6C). Zřetelný nárůst γ H2AX fokusů v mitotických buňkách jako důsledek ATR deficiencie, který je zesílen působením APH je v souladu s již publikovanými výsledky (Casper et al., 2002).

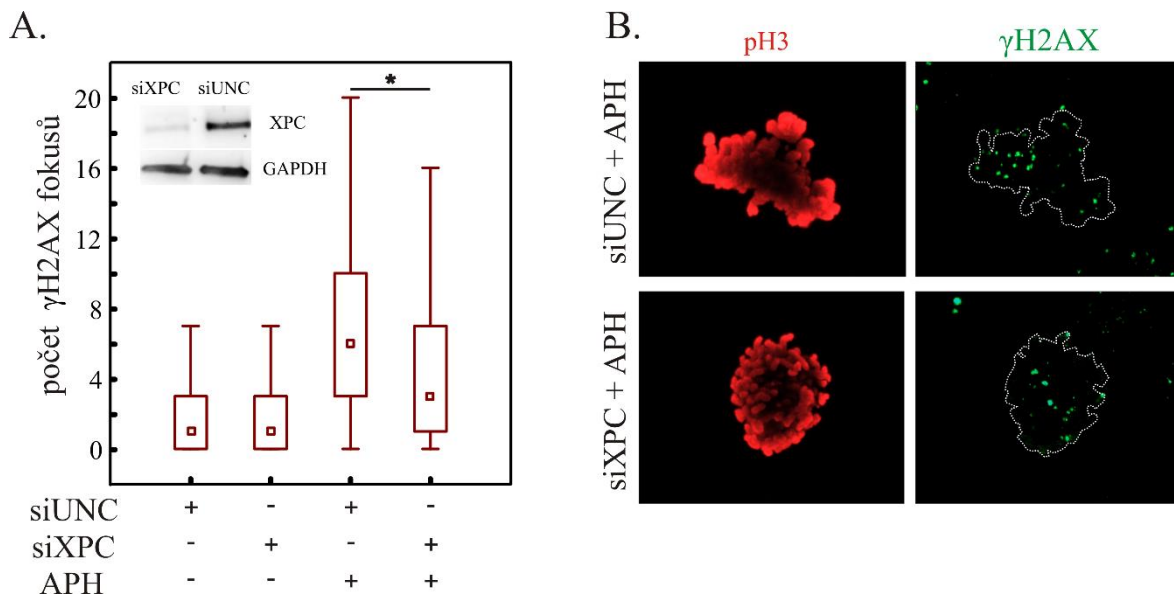


Obr. č. 6 *Automatizace metody detekce fokusů γ H2AX proteinu v mitotických buňkách.* A) Ilustrativní znázornění chromozomálního zlomu a přítomnost γ H2AX v místě poškození. B) Výběr mitotických buněk na základě pH3 positivity a následná detekce exprese fragilního místa pomocí γ H2AX markeru. C) Detekce γ H2AX fokusů v shATR U2OS buněčné linii po indukci RS.

7.4 Studium role XPC proteinu v zachování stability fragilních míst

Role XPC v zachování stability fragilních míst byla hodnocena pomocí automatizované metody detekce fokusů γ H2AX proteinu v mitotických buňkách. Pomocí interferenční siRNA jsme v U2OS buněčné linii provedli specifické snížení exprese XPC genu na úrovni mRNA tzv. knock-down (KD) a sledovali vliv na expresi fragilních míst v mitotických buňkách bez a s působením 0,4 μ M APH po dobu 24 hodin.

Působením RS dochází v XPC KD U2OS buněčné linii k poklesu γ H2AX fokusů v mitotických buňkách ve srovnání s kontrolní XPC proficientní linií (Obr. č. 7 A, B).



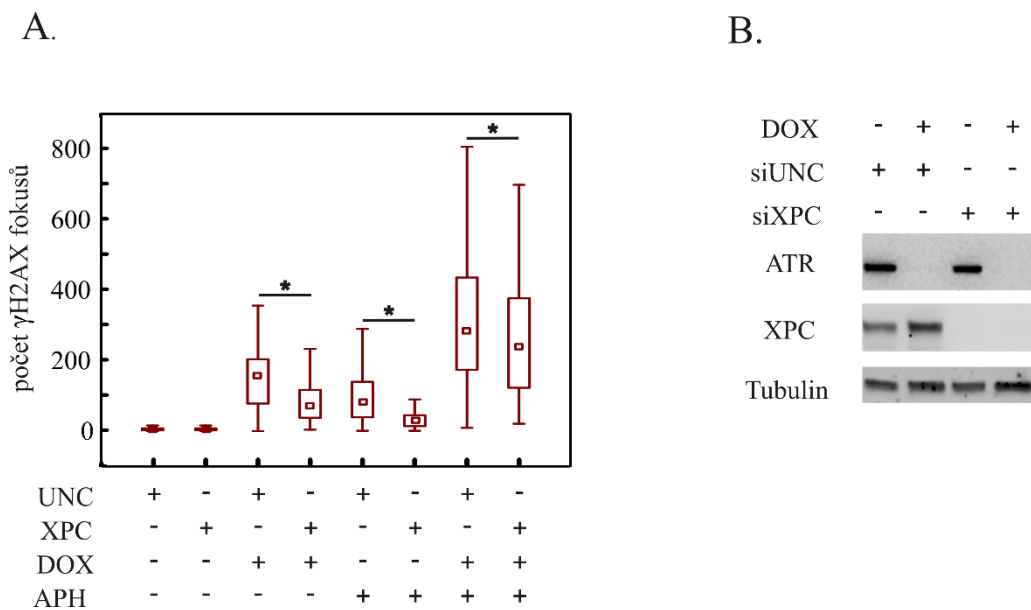
Obr. č. 7: Analýza chromozomálního poškození v XPC deficientní U2OS buněčné linii. A) Detekce γ H2AX fokusů v XPC KD mitotických buňkách pomocí imunofluorescenční mikroskopie B) Ilustrativní obrázek detekce pH3 pozitivní buňky a přítomných γ H2AX fokusů.

Snížení počtu γ H2AX fokusů v mitotických XPC KD buňkách po indukci RS lze vysvětlit dvěma způsoby. V prvním případě by ztráta XPC proteinu představovala značnou genomickou nestabilitu, která by vedla k aktivaci G2/M kontrolního bodu buněčného cyklu, a tím zastavení buněčného cyklu a znemožnění vstupu buňky do mitózy. Tento fakt by se projevil následnou absencí poškození (γ H2AX fokusů) v mitotických buňkách. V druhém případě by deficit XPC

mohl vést ke snížení signalizace DNA poškození a/nebo snížení aktivace opravných drah, a tím i detekce poškození v mitóze pomocí γ H2AX proteinu.

Jak již bylo zmíněno hlavní kinázou v regulaci buněčné odpovědi na poškození vznikající během RS je ATR kináza, jejíž deficit způsobuje expresi fragilních míst a detekci γ H2AX fokusů v mitotických buňkách. Použitím U2OS buněčné linie s doxycyklin indukovatelnou shRNA proti ATR proteinu jsme sledovali změnu exprese fragilních míst detekcí γ H2AX v mitotických buňkách ATR deficientní linie a v mitotických buňkách se společnou deficiencí ATR a XPC proteinu.

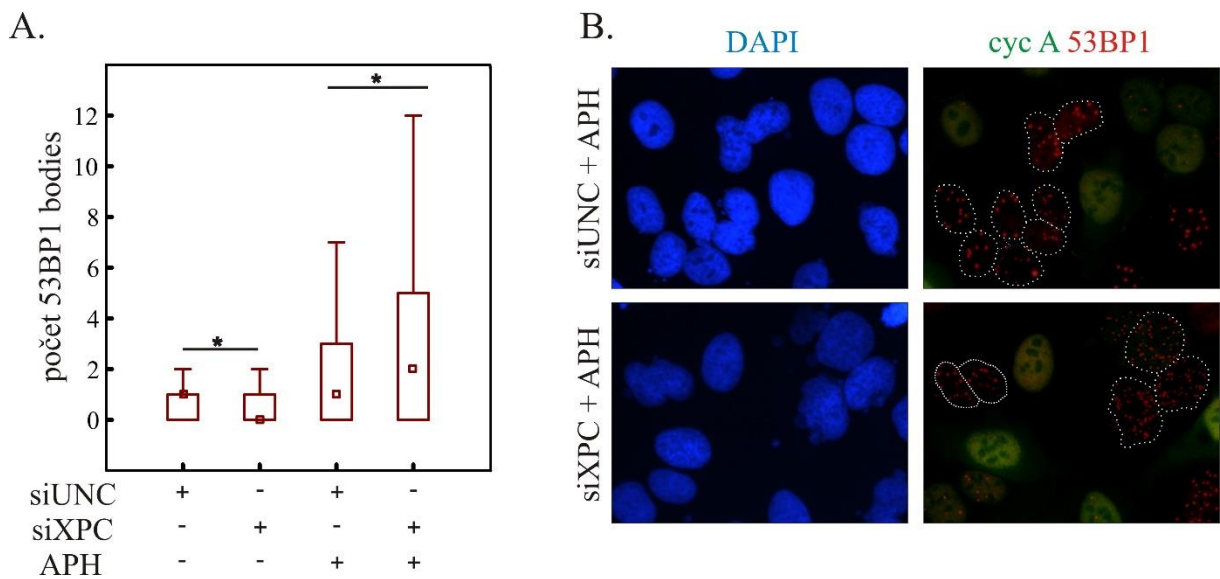
Výsledkem je snížení detekce γ H2AX fokusů v mitotických buňkách ATR/XPC KD oproti samotnému ATR KD, což poukazuje na možné porušení signalizace replikačních problémů a aktivace opravných drah z důsledku deficiencie XPC proteinu Obr. č. 8.



Obr. č. 8: Analýza chromozomálního poškození v U2OS-shATR buněčné linii se společným deficitem ATR a XPC proteinu. A) Detekce γ H2AX fokusů v XPC a XPC/ATR KD mitotických buňkách pomocí imunofluorescenční mikroskopie B) Ověření úspěšnosti XPC/ATR KD pomocí western blotu.

V oblastech fragilních míst může vlivem APH docházet k nekompletní replikaci DNA a vzniku tzv. replikačních intermediátů. Tyto replikační intermediáty nerozpoznané kontrolními mechanizmy buňky unikají do mitózy, kde se stávají potencionálním zdrojem DNA poškození. Takové DNA poškození je pozorovatelné v následující G1 buněčné populaci, kde je detekovatelné pomocí fokusů 53BP1 proteinu tzv. 53BP1 bodies a označené tak pro případnou opravu (Lukas et al., 2011).

Ověření, zda při XPC deficienci dochází ke vzniku nekompletně replikované DNA a přenosu DNA poškození do další buněčné generace bylo provedeno detekcí 53BP1 bodies v cyklin A negativních (G1) XPC KD U2OS buňkách vystavených působení 0,4 μ M APH po dobu 24 h (Obr. č. 9 A, B). Zvýšená detekce hladiny 53BP1 bodies v G1 populaci XPC deficientních buněk vystavených RS potvrdila předpokládanou hypotézu. Deficience XPC proteinu umožňuje vznik nedoreplikovaných úseků DNA, které unikají do mitózy.



Obr. č. 9: Analýza 53BP1 bodies v G1 buněčné fázi XPC deficientní U2OS buněčné linie.
A) Detekce 53BP1 bodies v cyklin A- buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie. B) Ilustrativní obrázek detekce cyklin A- negativních buněk a zvýšeného množství 53BP1 bodies XPC KD buňkách vystavených RS.

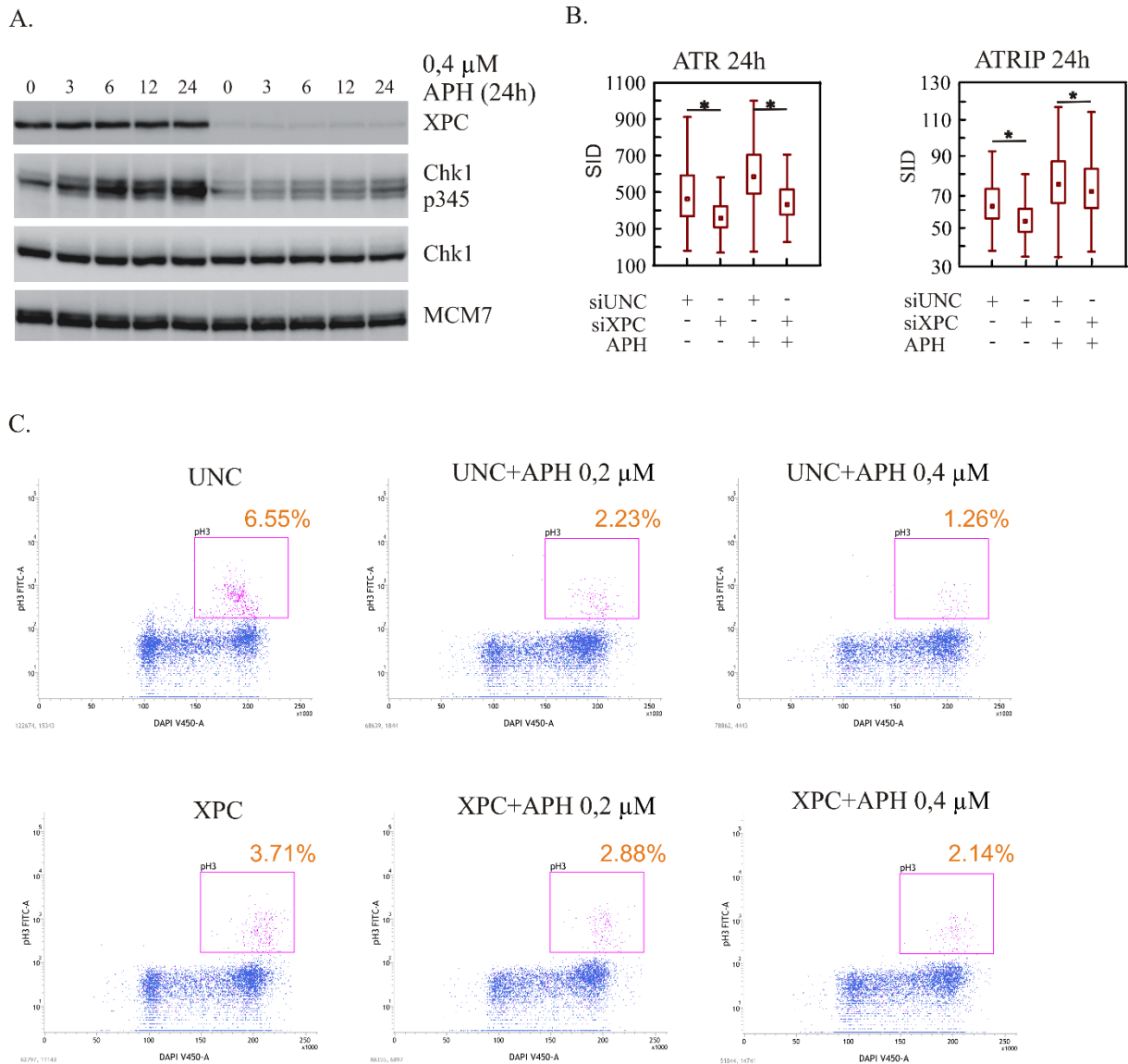
7.5 Úloha XPC proteinu v regulaci proteinů buněčné odpovědi na RS

V další fázi experimentů jsme se zaměřili na ověření vlivu XPC proteinu na regulaci proteinů buněčné odpovědi na RS tzn. regulaci ATR-Chk1 signální dráhy a G2/M kontrolního bodu buněčného cyklu. Pomocí imunofluorescenční mikroskopie byla sledována schopnost vazby ATR kinázy a jejího interakčního partnera proteinu ATRIP k chromatinu v XPC deficientní buněčné linii. Snížená schopnost vazby ATR/ATRIP proteinů k chromatinu a zároveň pokles fosforylace Chk1 kinázy potvrdili porušení aktivace ATR/ATRIP-Chk1 signální dráhy buněčné odpovědi (Obr. č. 10 A, B). Způsob jakým XPC interaguje s ATR, a tím ovlivňuje jeho vazbu k chromatinu, není dosud objasněn. Snížená aktivace ATR/ATRIP-Chk1 signální dráhy však poukazuje na roli XPC proteinu v regulaci buněčné odpovědi na RS.

Jedním z důsledků porušení funkce kontrolního bodu G2/M buněčného cyklu je únik poškozených buněk do mitózy. Množství buněk v M-fázi buněčného cyklu udává tzv. mitotický index (MI). Měřeními MI v XPC KD buněčné linii vystavené působení 0,2 μ M a 0,4 μ M APH po dobu 24 h byl potvrzen nárůst mitotických buněk oproti kontrolním XPC proficientním buňkám (Obr. č. 10 C).

Stejného výsledku tj. snížení fosforylace Chk1 kinázy v XPC KD buňkách působením APH a zvýšení MI vlivem RS bylo dosaženo také v dalších testovaných liniích HeLa S3 a TIG-3 (**příloha II, doplněk Obr. č. 3 a 4**). Na druhou stranu zvýšený výskyt 53BP1 bodies v G1 XPC KD buněčné linii TIG-3 a HeLa S3 nebyl vlivem APH potvrzen. Příčinou tohoto rozdílného výsledku je zřejmě biologického pozadí jednotlivých buněčných linií, u nichž mohla manifestace DNA poškození způsobená XPC deficiencí vyústit k eliminaci defektních buněk například apoptózou.

Získaná data snížené signalizace a aktivace ATR/ATRIP-Chk1 signální dráhy v XPC KD buněčné linii působením APH jsou v souladu s již publikovanými výsledky o roli XPC proteinu v odpovědi na poškození vyvolané UV zářením. XPC deficientní buňky vykazují porušenou funkci signální dráhy buněčné odpovědi ATR-Chk1 a ATM-Chk2 na DNA poškození vyvolané UV zářením, a také porušení opravné dráhy HR. Stejně tak byla potvrzena také vzájemná interakce XPC proteinu s ATR/ATM kinázami jako odpověď na působení UV záření (Ray et al., 2013). Tato práce byla později rozšířena, a význam role XPC proteinu pro opravu poškození DNA způsobeném UV zářením byl specifikován pouze pro G1 fázi buněčného cyklu, nikoli S fázi (Ray et al., 2016).



Obr. č. 10: Analýza role XPC v regulaci ATR/ATRIP-Chk1 signální dráhy buněčné odpovědi na RS. A) Detekce snížení fosforylace Chk1 (Ser345) v XPC deficientní U2OS buněčné linii pomocí western blotu. B) Detekce snížení vazby ATR/ATRIP k chromatinu v XPC deficientní U2OS buněčné linii pomocí imunofluorescenční mikroskopie. C) Analýza mitotického indexu pomocí průtokové cytometrie-detekce p33 pozitivních buněk.

V naší práci jsme pro indukci RS použili APH v koncentracím 0,2 μ M a 0,4 μ M, což vyvolává zcela jiný typ DNA poškození než zmíněné UV záření. Zatím co UV záření způsobuje zejména vznik fotoproduktů 6-4PP anebo CPD (Cadet et al., 2015), APH inhibuje DNA

polymerázu a tím zpomaluje postup replikační vidličky (Cheng a Kuchta, 1993). Působením APH v koncentracích, které zpomalují, nikoliv zastavují replikační vidličku, dochází v oblasti BFM ke vzniku těžce replikovatelných sekundárních struktur náchylných k poškození (Mishmar et al., 1998; Mrasek et al., 2010; Zhang a Freudenreich, 2007). Ovlivněna je tedy především S fáze buněčného cyklu.

Na základě získaných dat se tedy můžeme domnívat, že XPC protein hraje roli v buněčné odpovědi na RS, kdy se účastní rozpoznávání a signalizace replikačních bariér v oblastech BFM a také aktivace ATR/ATRIP-Chk1 kontrolní dráhy zodpovědné za zachování jejich stability.

8. ZÁVĚR

Vzájemné interakce proteinů a nukleových kyselinami hrají zásadní roli v řadě biologických procesů jako je transkripce, replikace, a také v opravě poškození DNA, které tyto procesy mohou doprovázet. Studium interakce nukleových kyselin s proteiny umožňuje porozumět principiální podstatě těchto mechanismů, jejichž nedostatečností může dojít k porušení homeostázy a vzniku různých onemocnění. Jednou z metod studia interakce nukleových kyselin s proteiny je DNA/RNA-afinitní chromatografie. Vhodnou volbou specifického afinitního ligandu lze izolovat proteiny vázané k určité sekvenci případně struktury nukleové kyseliny a ve spojení s metodami MS provést identifikaci specificky vázaných proteinů.

Tato disertační práce je zaměřena na aplikaci metody DNA-afinitní chromatografie, která v kombinaci s metodou relativní kvantifikace proteinů SILAC a MS umožňuje izolaci a následnou identifikaci proteinů hrajících roli v zachování stability fragilních míst. Návrhem specifického ligandu FRA16D-fragment jsme získali DNA-afinitní matici vhodnou k izolaci proteinů interagujících s BFM a s použitím kontrolního DNA ligandu a SILAC metody jsme pomocí nLC-MS/MS identifikovali proteiny specificky vázané k ligandu FRA16D-fragment před a po vystavení buněk RS.

Správnost návrhu a experimentálního provedení DNA-afinitní chromatografie byla potvrzena nejen identifikací několika zajímavých proteinových kandidátů, ale také identifikací WRN a MSH2 proteinů, jejichž úloha v zachování stability fragilních míst již byla publikována.

Více jak polovina identifikovaných FRA16D-fragment vazebných proteinů kooperuje v jedné DNA opravné dráze a to GG-NER. Souvislost GG-NER dráhy se zachováním stability BFM nebyla dosud ověřována a proto byl XPC protein, její hlavní iniciátor, zvolen k dalšímu studiu.

Na základě získaných výsledků jsme dospěli k hypotéze, že XPC proteinu hraje roli v zachování stability fragilních míst a také v buněčné odpovědi na RS. Zjistili jsme, že XPC deficientní buňky vykazují sníženou aktivaci buněčné odpovědi na RS, která vede ke zvýšení nestability genomu. Předpokládáme, že XPC protein rozpoznává těžce replikovatelné struktury v oblastech BFM vznikající působením RS a aktivuje tak kontrolní a opravné mechanismy. XPC deficientní buňky vykazují porušení aktivace ATR/ATRIP-Chk1 signální dráhy, což vyústí v únik buněk s nekompletně replikovanou DNA do mitózy. Osud takto poškozených buněk závisí na biologickém pozadí konkrétní buněčné linie a schopnosti její odpovědi na

poškození DNA. V U2OS buněčné linii je toto poškození přeneseno do další buněčné generace, kde jsou vznikající dvouvláknové zlomy DNA viditelné jako fokusy 53BP1 bodies. U dalších testovaných liniích jako je TIG-3 a HeLa S3 se XPC deficiencie projevuje taktéž snížením ATR/ATRIP-Chk1 signální dráhy buněčné odpovědi na RS, avšak buňky s nekompletně replikovanou DNA nepřechází do další buněčné generace a jsou pravděpodobně eliminovány apoptózou. Tato možnost je v souladu s teorií, že BFM místa fungují jako senzory pro eliminaci buněk s nestabilním genetickým materiálem, čímž slouží jako ochranná bariéra před vznikem tumorigeneze.

Vědeckým přínosem předkládané práce je nejen unikátní použití strukturně specifického DNA afinitního ligandu FRA16D-fragment, který ve spojení s metodami kvantitativní proteomiky umožnil izolaci a následnou identifikaci XPC proteinu, ale také odhalení nové biologické role XPC proteinu v RS a zachování stability fragilních míst.

Komentované výsledky disertační práce jsou součástí publikace vydané v recenzovaném zahraničním časopise *Journal of Proteome Research* a to pod názvem „Role of DNA repair factor xeroderma pigmentosum protein group C in response to replication stress as revealed by DNA fragile site affinity chromatography and quantitative proteomics“ (**příloha II**).

Stručná literární rešerše o metodách DNA afinitní chromatografie, gelové retardační analýzy a fluorescenční mikroskopie, jejichž vzájemnou kombinací lze dospět ke konkrétnímu cíli a to izolaci, identifikaci a charakterizaci biologické funkce DNA vazebných proteinů je součástí přehledového referátu publikovaného v českém recenzovaném časopise *Chemické listy* pod názvem „Pokročilé metody studia vzájemných interakcí proteinů s DNA“ (**příloha I**).

9. SEZNAM LITERATURY

- Aguilera, A., and García-Muse, T. (2012). R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Mol. Cell* 46, 115–124.
- Ahmad, N., and Lingrel, J.B. (2005). Kruppel-like factor 2 transcriptional regulation involves heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and acetyltransferases. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 6276–6285.
- Alber, T. (1992). Structure of the leucine zipper. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 205–210.
- Alberts, B.M., Amodio, F.J., Jenkins, M., Gutmann, E.D., and Ferris, F.L. (1968). Studies with DNA-cellulose chromatography. I. DNA-binding proteins from *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 33, 289–305.
- Arlt, M.F., Xu, B., Durkin, S.G., Casper, A.M., Kastan, M.B., and Glover, T.W. (2004). BRCA1 is required for common-fragile-site stability via its G2/M checkpoint function. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6701–6709.
- Arlt, M.F., Durkin, S.G., Ragland, R.L., and Glover, T.W. (2006). Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA Repair* 5, 1126–1135.
- Awasthi, P., Foiani, M., and Kumar, A. (2015). ATM and ATR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 128, 4255–4262.
- Babayeva, N.D., Baranovskaya, O.I., and Tahirov, T.H. (2012). Structural basis of Ets1 cooperative binding to widely separated sites on promoter DNA. *PloS One* 7, e33698.
- Baker, T.C., Han, J., and Borchers, C.H. (2016). Recent advancements in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.* 43, 62–69.
- Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M.M., and Kuster, B. (2012). Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 939–965.
- Barnes, L.D., Garrison, P.N., Siplashvili, Z., Guranowski, A., Robinson, A.K., Ingram, S.W., Croce, C.M., Ohta, M., and Huebner, K. (1996). Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5''-P1,P3-triphosphate hydrolase. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 11529–11535.
- Bartels, S.J.J., Spruijt, C.G., Brinkman, A.B., Jansen, P.W.T.C., Vermeulen, M., and Stunnenberg, H.G. (2011). A SILAC-based screen for Methyl-CpG binding proteins identifies RBP-J as a DNA methylation and sequence-specific binding protein. *PloS One* 6, e25884.
- Bartke, T., Vermeulen, M., Xhemalce, B., Robson, S.C., Mann, M., and Kouzarides, T. (2010). Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell* 143, 470–484.
- Bartkova, J., Horejsí, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434, 864–870.

- Becker, N.A., Thorland, E.C., Denison, S.R., Phillips, L.A., and Smith, D.I. (2002). Evidence that instability within the FRA3B region extends four megabases. *Oncogene* 21, 8713–8722.
- Berg, J.M., and Godwin, H.A. (1997). Lessons from zinc-binding peptides. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 357–371.
- Bester, A.C., Roniger, M., Oren, Y.S., Im, M.M., Sarni, D., Chaoat, M., Bensimon, A., Zamir, G., Shewach, D.S., and Kerem, B. (2011). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* 145, 435–446.
- Bianchi, V., Pontis, E., and Reichard, P. (1986). Changes of deoxyribonucleoside triphosphate pools induced by hydroxyurea and their relation to DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 261, 16037–16042.
- Biemann, K. (1990). Sequencing of peptides by tandem mass spectrometry and high-energy collision-induced dissociation. *Methods Enzymol.* 193, 455–479.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.-H., Pagès, F., Trajanoski, Z., and Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 1091–1093.
- Blackwell, B.J., Lopez, M.F., Wang, J., Krastins, B., Sarracino, D., Tollervey, J.R., Dobke, M., Jordan, I.K., and Lunyak, V.V. (2012). Protein interactions with piALU RNA indicates putative participation of retroRNA in the cell cycle, DNA repair and chromatin assembly. *Mob. Genet. Elem.* 2, 26–35.
- Bose, S.K., Sengupta, T.K., Bandyopadhyay, S., and Spicer, E.K. (2006). Identification of Ebp1 as a component of cytoplasmic bcl-2 mRNP (messenger ribonucleoprotein particle) complexes. *Biochem. J.* 396, 99–107.
- Butter, F., Scheibe, M., Mörl, M., and Mann, M. (2009). Unbiased RNA-protein interaction screen by quantitative proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10626–10631.
- Butter, F., Davison, L., Viturawong, T., Scheibe, M., Vermeulen, M., Todd, J.A., and Mann, M. (2012). Proteome-wide analysis of disease-associated SNPs that show allele-specific transcription factor binding. *PLoS Genet.* 8, e1002982.
- Byrum, S.D., Taverna, S.D., and Tackett, A.J. (2013). Purification of a specific native genomic locus for proteomic analysis. *Nucleic Acids Res.* 41, e195.
- Cadet, J., Sage, E., and Douki, T. (2005). Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat. Res.* 571, 3–17.
- Cadet, J., Grand, A., and Douki, T. (2015). Solar UV radiation-induced DNA Bipyrimidine photoproducts: formation and mechanistic insights. *Top. Curr. Chem.* 356, 249–275.
- Callahan, G., Denison, S.R., Phillips, L.A., Shridhar, V., and Smith, D.I. (2003). Characterization of the common fragile site FRA9E and its potential role in ovarian cancer. *Oncogene* 22, 590–601.

- Casas-Vila, N., Scheibe, M., Freiwald, A., Kappei, D., and Butter, F. (2015). Identification of TTAGGG-binding proteins in *Neurospora crassa*, a fungus with vertebrate-like telomere repeats. *BMC Genomics* 16, 965.
- Casper, A.M., Nghiem, P., Arlt, M.F., and Glover, T.W. (2002). ATR regulates fragile site stability. *Cell* 111, 779–789.
- Casper, A.M., Durkin, S.G., Arlt, M.F., and Glover, T.W. (2004). Chromosomal instability at common fragile sites in Seckel syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 654–660.
- Cavalieri, L.F., and Carroll, E. (1970). A DNA-acrylamide gel column for analyzing proteins that bind to DNA. I. DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 67, 807–812.
- Cayrou, C., Coulombe, P., and Méchali, M. (2010a). Programming DNA replication origins and chromosome organization. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 18, 137–145.
- Chang, N.-S., Doherty, J., Ensign, A., Lewis, J., Heath, J., Schultz, L., Chen, S.-T., and Oppermann, U. (2003). Molecular mechanisms underlying WOX1 activation during apoptotic and stress responses. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1347–1354.
- Cheng, C.H., and Kuchta, R.D. (1993). DNA polymerase epsilon: aphidicolin inhibition and the relationship between polymerase and exonuclease activity. *Biochemistry (Mosc.)* 32, 8568–8574.
- Cheng, P.-C., Chang, H.-K., and Chen, S.-H. (2010). Quantitative nanoproteomics for protein complexes (QNanoPX) related to estrogen transcriptional action. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 9, 209–224.
- Chernushevich, I.V., Loboda, A.V., and Thomson, B.A. (2001). An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. JMS* 36, 849–865.
- Choe, L., D’Ascenzo, M., Relkin, N.R., Pappin, D., Ross, P., Williamson, B., Guertin, S., Pribil, P., and Lee, K.H. (2007). 8-plex quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer’s disease. *Proteomics* 7, 3651–3660.
- Chu, C., Qu, K., Zhong, F.L., Artandi, S.E., and Chang, H.Y. (2011). Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions. *Mol. Cell* 44, 667–678.
- Clemente-Ruiz, M., González-Prieto, R., and Prado, F. (2011). Histone H3K56 acetylation, CAF1, and Rtt106 coordinate nucleosome assembly and stability of advancing replication forks. *PLoS Genet.* 7, e1002376.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294, 1713–1716.
- Debatisse, M., Coquelle, A., Toledo, F., and Buttin, G. (1998). Gene amplification mechanisms: the role of fragile sites. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer* 154, 216–226.

- Déjardin, J., and Kingston, R.E. (2009). Purification of proteins associated with specific genomic Loci. *Cell* 136, 175–186.
- Denison, S.R., Callahan, G., Becker, N.A., Phillips, L.A., and Smith, D.I. (2003). Characterization of FRA6E and its potential role in autosomal recessive juvenile parkinsonism and ovarian cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* 38, 40–52.
- Druck, T., Hadaczek, P., Fu, T.B., Ohta, M., Siprashvili, Z., Baffa, R., Negrini, M., Kastury, K., Veronese, M.L., Rosen, D., et al. (1997). Structure and expression of the human FHIT gene in normal and tumor cells. *Cancer Res.* 57, 504–512.
- Durkin, S.G., Arlt, M.F., Howlett, N.G., and Glover, T.W. (2006). Depletion of CHK1, but not CHK2, induces chromosomal instability and breaks at common fragile sites. *Oncogene* 25, 4381–4388.
- Duss, O., Michel, E., Diarra dit Konté, N., Schubert, M., and Allain, F.H.-T. (2014). Molecular basis for the wide range of affinity found in Csr/Rsm protein-RNA recognition. *Nucleic Acids Res.* 42, 5332–5346.
- Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Lacomis, L., Grewal, A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Carr, S.A., and Tempst, P. (1998). Examination of micro-tip reversed-phase liquid chromatographic extraction of peptide pools for mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A* 826, 167–181.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71.
- Fishel, R.A., Detmer, K., and Rich, A. (1988). Identification of homologous pairing and strand-exchange activity from a human tumor cell line based on Z-DNA affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 36–40.
- Fitch, M.E., Nakajima, S., Yasui, A., and Ford, J.M. (2003). In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *J. Biol. Chem.* 278, 46906–46910.
- Focarelli, M.L., Soza, S., Mannini, L., Paulis, M., Montecucco, A., and Musio, A. (2009). Claspin inhibition leads to fragile site expression. *Genes. Chromosomes Cancer* 48, 1083–1090.
- Gadgil, H., and Jarrett, H.W. (1999). Heparin elution of transcription factors from DNA-Sepharose columns. *J. Chromatogr. A* 848, 131–138.
- Gadgil, H., Oak, S.A., and Jarrett, H.W. (2001). Affinity purification of DNA-binding proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* 49, 607–624.
- Gao, J., Zybailov, B.L., Byrd, A.K., Griffin, W.C., Chib, S., Mackintosh, S.G., Tackett, A.J., and Raney, K.D. (2015). Yeast transcription co-activator Sub1 and its human homolog PC4 preferentially bind to G-quadruplex DNA. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 51, 7242–7244.
- Gardiner, K. (1995). Human genome organization. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 315–322.
- Garrell, J., and Campuzano, S. (1991). The helix-loop-helix domain: a common motif for bristles, muscles and sex. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 13, 493–498.

- Georgakilas, A.G., Tsantoulis, P., Kotsinas, A., Michalopoulos, I., Townsend, P., and Gorgoulis, V.G. (2014). Are common fragile sites merely structural domains or highly organized “functional” units susceptible to oncogenic stress? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *71*, 4519–4544.
- Glover, T.W., Berger, C., Coyle, J., and Echo, B. (1984). DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum. Genet.* *67*, 136–142.
- Good, D.M., Wirtala, M., McAlister, G.C., and Coon, J.J. (2007). Performance characteristics of electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *6*, 1942–1951.
- Goraczniak, R., and Gunderson, S.I. (2008). The regulatory element in the 3'-untranslated region of human papillomavirus 16 inhibits expression by binding CUG-binding protein 1. *J. Biol. Chem.* *283*, 2286–2296.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.-V.F., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Kastrinakis, N.G., Levy, B., et al. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* *434*, 907–913.
- Goss, T.A., Bard, M., and Jarrett, H.W. (1990). High-performance affinity chromatography of DNA. *J. Chromatogr.* *508*, 279–287.
- Gouw, J.W., Krijgsveld, J., and Heck, A.J.R. (2010). Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *9*, 11–24.
- Groth, A., Rocha, W., Verreault, A., and Almouzni, G. (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* *128*, 721–733.
- Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., and Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* *17*, 994–999.
- Hampshire, A.J., Rusling, D.A., Broughton-Head, V.J., and Fox, K.R. (2007). Footprinting: a method for determining the sequence selectivity, affinity and kinetics of DNA-binding ligands. *Methods San Diego Calif* *42*, 128–140.
- Han, X., Jin, M., Breuker, K., and McLafferty, F.W. (2006). Extending Top-Down Mass Spectrometry to Proteins with Masses Greater Than 200 Kilodaltons. *Science* *314*, 109–112.
- Hantsche, M., and Cramer, P. (2016). The Structural Basis of Transcription: 10 Years After the Nobel Prize in Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *55*, 15972–15981.
- Harris, D., Zhang, Z., Chaubey, B., and Pandey, V.N. (2006a). Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *5*, 1006–1018.
- Harrison, S.C., and Aggarwal, A.K. (1990). DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu. Rev. Biochem.* *59*, 933–969.

- Hellman, A., Zlotorynski, E., Scherer, S.W., Cheung, J., Vincent, J.B., Smith, D.I., Trakhtenbrot, L., and Kerem, B. (2002). A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. *Cancer Cell* 1, 89–97.
- Helmrich, A., Ballarino, M., and Tora, L. (2011). Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Mol. Cell* 44, 966–977.
- Himeda, C.L., Ranish, J.A., Angello, J.C., Maire, P., Aebersold, R., and Hauschka, S.D. (2004). Quantitative proteomic identification of six4 as the trex-binding factor in the muscle creatine kinase enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2132–2143.
- Himeda, C.L., Ranish, J.A., Pearson, R.C.M., Crossley, M., and Hauschka, S.D. (2010). KLF3 regulates muscle-specific gene expression and synergizes with serum response factor on KLF binding sites. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3430–3443.
- Hosseini, S.A., Horton, S., Saldivar, J.C., Miuma, S., Stampfer, M.R., Heerema, N.A., and Huebner, K. (2013). Common chromosome fragile sites in human and murine epithelial cells and FHIT/FRA3B loss-induced global genome instability. *Genes. Chromosomes Cancer* 52, 1017–1029.
- Howlett, N.G., Taniguchi, T., Durkin, S.G., D’Andrea, A.D., and Glover, T.W. (2005). The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Hum. Mol. Genet.* 14, 693–701.
- Hsu, J.-L., Huang, S.-Y., Chow, N.-H., and Chen, S.-H. (2003). Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Anal. Chem.* 75, 6843–6852.
- Hunt, D.F., Yates, J.R., Shabanowitz, J., Winston, S., and Hauer, C.R. (1986). Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 6233–6237.
- Inomata, Y., Wada, T., Handa, H., Fujimoto, K., and Kawaguchi, H. (1994). Preparation of DNA-carrying affinity latex and purification of transcription factors with the latex. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 5, 293–302.
- Ishii, H., Vecchione, A., Fong, L.Y.Y., Zanasi, N., Trapasso, F., Furukawa, Y., Baffa, R., Huebner, K., and Croce, C.M. (2004). Cancer prevention and therapy in a preclinical mouse model: impact of FHIT viruses. *Curr. Gene Ther.* 4, 53–63.
- Jagelská, E.B., Brázda, V., Pecinka, P., Palecek, E., and Fojta, M. (2008). DNA topology influences p53 sequence-specific DNA binding through structural transitions within the target sites. *Biochem. J.* 412, 57–63.
- Jazayeri, A., Balestrini, A., Garner, E., Haber, J.E., and Costanzo, V. (2008). Mre11-Rad50-Nbs1-dependent processing of DNA breaks generates oligonucleotides that stimulate ATM activity. *EMBO J.* 27, 1953–1962.
- Ji, X., Dadon, D.B., Abraham, B.J., Lee, T.I., Jaenisch, R., Bradner, J.E., and Young, R.A. (2015). Chromatin proteomic profiling reveals novel proteins associated with histone-marked genomic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 3841–3846.

- Jia, Y., and Jarrett, H.W. (2015). Method for trapping affinity chromatography of transcription factors using aldehyde-hydrazide coupling to agarose. *Anal. Biochem.* *482*, 1–6.
- Jiang, D., Moxley, R.A., and Jarrett, H.W. (2006). Promoter trapping of c-jun promoter-binding transcription factors. *J. Chromatogr. A* *1133*, 83–94.
- Jiang, Y., Lucas, I., Young, D.J., Davis, E.M., Karrison, T., Rest, J.S., and Le Beau, M.M. (2009). Common fragile sites are characterized by histone hypoacetylation. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 4501–4512.
- Jonscher, K.R., and Yates, J.R. (1997). The quadrupole ion trap mass spectrometer--a small solution to a big challenge. *Anal. Biochem.* *244*, 1–15.
- Kadonaga, J.T., and Tjian, R. (1986). Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 5889–5893.
- Kar, A., Fushimi, K., Zhou, X., Ray, P., Shi, C., Chen, X., Liu, Z., Chen, S., and Wu, J.Y. (2011). RNA helicase p68 (DDX5) regulates tau exon 10 splicing by modulating a stem-loop structure at the 5' splice site. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1812–1821.
- Karas, M., and Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* *60*, 2299–2301.
- Kebarle, P., and Verkerk, U.H. (2009). Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.* *28*, 898–917.
- Keller, A., Nesvizhskii, A.I., Kolker, E., and Aebersold, R. (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem.* *74*, 5383–5392.
- Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* *116*, 259–272.
- Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y., and Shkedy, D. (1999). Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14973–14977.
- Kim, S.T., Lim, D.S., Canman, C.E., and Kastan, M.B. (1999). Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J. Biol. Chem.* *274*, 37538–37543.
- Kisselev, L.L., Justesen, J., Wolfson, A.D., and Frolova, L.Y. (1998). Diadenosine oligophosphates (Ap(n)A), a novel class of signalling molecules? *FEBS Lett.* *427*, 157–163.
- Krasikova, Y.S., Rechkunova, N.I., Maltseva, E.A., Anarbaev, R.O., Pestryakov, P.E., Sugawara, K., Min, J.-H., and Lavrik, O.I. (2013). Human and yeast DNA damage recognition complexes bind with high affinity DNA structures mimicking in size transcription bubble. *J. Mol. Recognit. JMR* *26*, 653–661.
- Krummel, K.A., Denison, S.R., Calhoun, E., Phillips, L.A., and Smith, D.I. (2002). The common fragile site FRA16D and its associated gene WWOX are highly conserved in the mouse at Fra8E1. *Genes. Chromosomes Cancer* *34*, 154–167.

- Krzyszinski, J.Y., Choe, V., Shao, J., Bao, X., Cheng, H., Luo, S., Huo, K., and Rao, H. (2014). XPC promotes MDM2-mediated degradation of the p53 tumor suppressor. *Mol. Biol. Cell* 25, 213–221.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Laity, J.H., Lee, B.M., and Wright, P.E. (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 39–46.
- Lambert, J.-P., Mitchell, L., Rudner, A., Baetz, K., and Figeys, D. (2009). A novel proteomics approach for the discovery of chromatin-associated protein networks. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 8, 870–882.
- Le Beau, M.M., Drabkin, H., Glover, T.W., Gemmill, R., Rassool, F.V., McKeithan, T.W., and Smith, D.I. (1998). An FHIT tumor suppressor gene? *Genes. Chromosomes Cancer* 21, 281–289.
- Le Tallec, B., Dutrillaux, B., Lachages, A.-M., Millot, G.A., Brison, O., and Debatisse, M. (2011). Molecular profiling of common fragile sites in human fibroblasts. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1421–1423.
- Le Tallec, B., Millot, G.A., Blin, M.E., Brison, O., Dutrillaux, B., and Debatisse, M. (2013). Common fragile site profiling in epithelial and erythroid cells reveals that most recurrent cancer deletions lie in fragile sites hosting large genes. *Cell Rep.* 4, 420–428.
- Letessier, A., Millot, G.A., Koundrioukoff, S., Lachagès, A.-M., Vogt, N., Hansen, R.S., Malfoy, B., Brison, O., and Debatisse, M. (2011b). Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* 470, 120–123.
- Litman, R.M. (1968). A deoxyribonucleic acid polymerase from *Micrococcus luteus* (*Micrococcus lysodeikticus*) isolated on deoxyribonucleic acid-cellulose. *J. Biol. Chem.* 243, 6222–6233.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., et al. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* 14, 1448–1459.
- Löffler, H., Fechter, A., Matuszewska, M., Saffrich, R., Mistrik, M., Marhold, J., Hornung, C., Westermann, F., Bartek, J., and Krämer, A. (2011). Cep63 recruits Cdk1 to the centrosome: implications for regulation of mitotic entry, centrosome amplification, and genome maintenance. *Cancer Res.* 71, 2129–2139.
- López de Silanes, I., Stagno d’Alcontres, M., and Blasco, M.A. (2010). TERRA transcripts are bound by a complex array of RNA-binding proteins. *Nat. Commun.* 1, 33.
- Lu, X., Beck, G.R., Gilbert, L.C., Camalier, C.E., Bateman, N.W., Hood, B.L., Conrads, T.P., Kern, M.J., You, S., Chen, H., et al. (2011). Identification of the homeobox protein Prx1 (MHox, Prx-1) as a regulator of osterix expression and mediator of tumor necrosis factor α action in osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 26, 209–219.

- Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R.S., Grøfte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J., et al. (2011). 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat. Cell Biol.* *13*, 243–253.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* *3*, 997–1007.
- Mailand, N., Podtelejnikov, A.V., Groth, A., Mann, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2002). Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J.* *21*, 5911–5920.
- Makowski, M.M., Willems, E., Fang, J., Choi, J., Zhang, T., Jansen, P.W.T.C., Brown, K.M., and Vermeulen, M. (2016). An interaction proteomics survey of transcription factor binding at recurrent TERT promoter mutations. *Proteomics* *16*, 417–426.
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., and Oda, M. (2010). Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 89–130.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., et al. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* *316*, 1160–1166.
- Matys, V., Fricke, E., Geffers, R., Gössling, E., Haubrock, M., Hehl, R., Hornischer, K., Karas, D., Kel, A.E., Kel-Margoulis, O.V., et al. (2003). TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res.* *31*, 374–378.
- Melis, J.P.M., Kuiper, R.V., Zwart, E., Robinson, J., Pennings, J.L.A., van Oostrom, C.T.M., Luijten, M., and van Steeg, H. (2013). Slow accumulation of mutations in Xpc^{-/-} mice upon induction of oxidative stress. *DNA Repair* *12*, 1081–1086.
- Meng, Z., Camalier, C.E., Lucas, D.A., Veenstra, T.D., Beck, G.R., and Conrads, T.P. (2006). Probing early growth response 1 interacting proteins at the active promoter in osteoblast cells using oligoprecipitation and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* *5*, 1931–1939.
- Michael, D., Beer, D.G., Wilke, C.W., Miller, D.E., and Glover, T.W. (1997). Frequent deletions of FHIT and FRA3B in Barrett's metaplasia and esophageal adenocarcinomas. *Oncogene* *15*, 1653–1659.
- Mishmar, D., Rahat, A., Scherer, S.W., Nyakatura, G., Hinzmann, B., Kohwi, Y., Mandel-Gutfroind, Y., Lee, J.R., Drescher, B., Sas, D.E., et al. (1998). Molecular characterization of a common fragile site (FRA7H) on human chromosome 7 by the cloning of a simian virus 40 integration site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 8141–8146.
- Mittler, G., Butter, F., and Mann, M. (2009). A SILAC-based DNA protein interaction screen that identifies candidate binding proteins to functional DNA elements. *Genome Res.* *19*, 284–293.
- Miyagi, M., and Rao, K.C.S. (2007). Proteolytic 18O-labeling strategies for quantitative proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* *26*, 121–136.

- Moser, J., Kool, H., Giakzidis, I., Caldecott, K., Mullenders, L.H.F., and Foustero, M.I. (2007). Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol. Cell* 27, 311–323.
- Mrasek, K., Schoder, C., Teichmann, A.-C., Behr, K., Franze, B., Wilhelm, K., Blaurock, N., Claussen, U., Liehr, T., and Weise, A. (2010). Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. *Int. J. Oncol.* 36, 929–940.
- Mundade, R., Ozer, H.G., Wei, H., Prabhu, L., and Lu, T. (2014). Role of ChIP-seq in the discovery of transcription factor binding sites, differential gene regulation mechanism, epigenetic marks and beyond. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 2847–2852.
- Murn, J., Teplova, M., Zarnack, K., Shi, Y., and Patel, D.J. (2016). Recognition of distinct RNA motifs by the clustered CCCH zinc fingers of neuronal protein Unkempt. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 16–23.
- Musio, A., Montagna, C., Mariani, T., Tilenni, M., Focarelli, M.L., Brait, L., Indino, E., Benedetti, P.A., Chessa, L., Albertini, A., et al. (2005). SMC1 involvement in fragile site expression. *Hum. Mol. Genet.* 14, 525–533.
- Nishi, R., Okuda, Y., Watanabe, E., Mori, T., Iwai, S., Masutani, C., Sugawara, K., and Hanaoka, F. (2005). Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5664–5674.
- Nouspikel, T. (2009). DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 994–1009.
- O’Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.
- O’Keefe, L.V., and Richards, R.I. (2006). Common chromosomal fragile sites and cancer: focus on FRA16D. *Cancer Lett.* 232, 37–47.
- Ong, S.-E., and Mann, M. (2006). A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat. Protoc.* 1, 2650–2660.
- Ong, S.-E., and Mann, M. (2007). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture for quantitative proteomics. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 359, 37–52.
- Oppermann, F.S., Gnad, F., Olsen, J.V., Hornberger, R., Greff, Z., Kéri, G., Mann, M., and Daub, H. (2009). Large-scale proteomics analysis of the human kinome. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 8, 1751–1764.
- Paingankar, M.S., and Arankalle, V.A. (2015). Identification and characterization of cellular proteins interacting with Hepatitis E virus untranslated regions. *Virus Res.* 208, 98–109.
- Paulsen, R.D., and Cimprich, K.A. (2007). The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair* 6, 953–966.

- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., and Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* *20*, 3551–3567.
- Pirzio, L.M., Pichierri, P., Bignami, M., and Franchitto, A. (2008). Werner syndrome helicase activity is essential in maintaining fragile site stability. *J. Cell Biol.* *180*, 305–314.
- Poli, J., Tsaponina, O., Crabbé, L., Keszthelyi, A., Pantesco, V., Chabes, A., Lengronne, A., and Pasero, P. (2012). dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *EMBO J.* *31*, 883–894.
- Privalov, P.L., Dragan, A.I., Crane-Robinson, C., Breslauer, K.J., Remeta, D.P., and Minetti, C.A.S.A. (2007). What drives proteins into the major or minor grooves of DNA? *J. Mol. Biol.* *365*, 1–9.
- Qin, H.R., Iliopoulos, D., Semba, S., Fabbri, M., Druck, T., Volinia, S., Croce, C.M., Morrison, C.D., Klein, R.D., and Huebner, K. (2006). A role for the WWOX gene in prostate cancer. *Cancer Res.* *66*, 6477–6481.
- Radionova, A., Filippov, I., and Derrick, P.J. (2016). In pursuit of resolution in time-of-flight mass spectrometry: A historical perspective. *Mass Spectrom. Rev.* *35*, 738–757.
- Ranish, J.A., Yi, E.C., Leslie, D.M., Purvine, S.O., Goodlett, D.R., Eng, J., and Aebersold, R. (2003). The study of macromolecular complexes by quantitative proteomics. *Nat. Genet.* *33*, 349–355.
- Rappsilber, J., Mann, M., and Ishihama, Y. (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* *2*, 1896–1906.
- Ray, A., Mir, S.N., Wani, G., Zhao, Q., Battu, A., Zhu, Q., Wang, Q.-E., and Wani, A.A. (2009). Human SNF5/INI1, a component of the human SWI/SNF chromatin remodeling complex, promotes nucleotide excision repair by influencing ATM recruitment and downstream H2AX phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 6206–6219.
- Ray, A., Milum, K., Battu, A., Wani, G., and Wani, A.A. (2013). NER initiation factors, DDB2 and XPC, regulate UV radiation response by recruiting ATR and ATM kinases to DNA damage sites. *DNA Repair* *12*, 273–283.
- Ray, A., Blevins, C., Wani, G., and Wani, A.A. (2016). ATR- and ATM-Mediated DNA Damage Response Is Dependent on Excision Repair Assembly during G1 but Not in S Phase of Cell Cycle. *PLoS One* *11*, e0159344.
- Reed, D.E., Huang, X.M., Wohlschlegel, J.A., Levine, M.S., and Senger, K. (2008). DEAF-1 regulates immunity gene expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 8351–8356.
- Ren, Y.R., Chaerkady, R., Hu, S., Wan, J., Qian, J., Zhu, H., Pandey, A., and Kern, S.E. (2012). Unbiased discovery of interactions at a control locus driving expression of the cancer-specific therapeutic and diagnostic target, mesothelin. *J. Proteome Res.* *11*, 5301–5310.

- Richards, R.I. (2001). Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends Genet. TIG* 17, 339–345.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868.
- Rohs, R., Jin, X., West, S.M., Joshi, R., Honig, B., and Mann, R.S. (2010). Origins of specificity in protein-DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 233–269.
- Ruiz-Herrera, A., Garcia, F., Frönicke, L., Ponsà, M., Egozcue, J., Caldés, M.G., and Stanyon, R. (2004). Conservation of aphidicolin-induced fragile sites in Papionini (Primates) species and humans. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 12, 683–690.
- Rutberg, S.E., and Ronai, Z. (1992). A simple and efficient method for the purification of specific DNA binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 20, 1815.
- Saiz, L., and Vilar, J.M.G. (2006). DNA looping: the consequences and its control. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 344–350.
- Samuel, S., Twizere, J.-C., and Bernstein, L.R. (2005). YB-1 represses AP1-dependent gene transactivation and interacts with an AP-1 DNA sequence. *Biochem. J.* 388, 921–928.
- Sanderson, B.J., and Shield, A.J. (1996). Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. *Mutat. Res.* 355, 41–57.
- Scheibe, M., Arnoult, N., Kappei, D., Buchholz, F., Decottignies, A., Butter, F., and Mann, M. (2013). Quantitative interaction screen of telomeric repeat-containing RNA reveals novel TERRA regulators. *Genome Res.* 23, 2149–2157.
- Schmidt, A., Kellermann, J., and Lottspeich, F. (2005). A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* 5, 4–15.
- Schwartz, M., Zlotorynski, E., Goldberg, M., Ozeri, E., Rahat, A., le Sage, C., Chen, B.P.C., Chen, D.J., Agami, R., and Kerem, B. (2005). Homologous recombination and nonhomologous end-joining repair pathways regulate fragile site stability. *Genes Dev.* 19, 2715–2726.
- Schwartz, M., Zlotorynski, E., and Kerem, B. (2006). The molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Lett.* 232, 13–26.
- Scigelova, M., and Makarov, A. (2006). Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics* 6 Suppl 2, 16–21.
- Sebela, M., Stosová, T., Štáňa, Havlis, J., Wielsch, N., Thomas, H., Zdráhal, Z., and Shevchenko, A. (2006). Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* 6, 2959–2963.
- Shamoo, Y., Abdul-Manan, N., Patten, A.M., Crawford, J.K., Pellegrini, M.C., and Williams, K.R. (1994). Both RNA-binding domains in heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 contribute toward single-stranded-RNA binding. *Biochemistry (Mosc.)* 33, 8272–8281.

- Shell, S.M., Hawkins, E.K., Tsai, M.-S., Hlaing, A.S., Rizzo, C.J., and Chazin, W.J. (2013). Xeroderma pigmentosum complementation group C protein (XPC) serves as a general sensor of damaged DNA. *DNA Repair* 12, 947–953.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., and Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1, 2856–2860.
- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* 14, 289–300.
- Sirbu, B.M., McDonald, W.H., Dungalwala, H., Badu-Nkansah, A., Kavanaugh, G.M., Chen, Y., Tabb, D.L., and Cortez, D. (2013). Identification of proteins at active, stalled, and collapsed replication forks using isolation of proteins on nascent DNA (iPOND) coupled with mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 288, 31458–31467.
- Smith, D.I., McAvoy, S., Zhu, Y., and Perez, D.S. (2007). Large common fragile site genes and cancer. *Semin. Cancer Biol.* 17, 31–41.
- Sørensen, C.S., Syljuåsen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Rönnstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.-B., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3, 247–258.
- Sørensen, C.S., Hansen, L.T., Dziegielewska, J., Syljuåsen, R.G., Lundin, C., Bartek, J., and Helleday, T. (2005). The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat. Cell Biol.* 7, 195–201.
- Sozzi, G., Pastorino, U., Moiraghi, L., Tagliabue, E., Pezzella, F., Ghirelli, C., Tornielli, S., Sard, L., Huebner, K., Pierotti, M.A., et al. (1998). Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Res.* 58, 5032–5037.
- Spruijt, C.G., Gnerlich, F., Smits, A.H., Pfaffeneder, T., Jansen, P.W.T.C., Bauer, C., Münzel, M., Wagner, M., Müller, M., Khan, F., et al. (2013). Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell* 152, 1146–1159.
- Srisawat, C., and Engelke, D.R. (2001). Streptavidin aptamers: affinity tags for the study of RNAs and ribonucleoproteins. *RNA N. Y. N* 7, 632–641.
- Stout, G.J., and Blasco, M.A. (2013). Telomere length and telomerase activity impact the UV sensitivity syndrome xeroderma pigmentosum C. *Cancer Res.* 73, 1844–1854.
- Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J.H. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol. Cell* 2, 223–232.
- Sugasawa, K., Shimizu, Y., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2002). A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair* 1, 95–107.

- Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, K., Tanaka, K., et al. (2005). UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* *121*, 387–400.
- Sugasawa, K., Akagi, J., Nishi, R., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2009). Two-step recognition of DNA damage for mammalian nucleotide excision repair: Directional binding of the XPC complex and DNA strand scanning. *Mol. Cell* *36*, 642–653.
- Sutherland, G.R., Parslow, M.I., and Baker, E. (1985). New classes of common fragile sites induced by 5-azacytidine and bromodeoxyuridine. *Hum. Genet.* *69*, 233–237.
- Tacheny, A., Michel, S., Dieu, M., Payen, L., Arnould, T., and Renard, P. (2012). Unbiased proteomic analysis of proteins interacting with the HIV-1 5’LTR sequence: role of the transcription factor Meis. *Nucleic Acids Res.* *40*, e168.
- Talukdar, I., Sen, S., Urbano, R., Thompson, J., Yates, J.R., and Webster, N.J.G. (2011). hnRNP A1 and hnRNP F modulate the alternative splicing of exon 11 of the insulin receptor gene. *PLoS One* *6*, e27869.
- Teixeira, M.C., Monteiro, P., Jain, P., Tenreiro, S., Fernandes, A.R., Mira, N.P., Alenquer, M., Freitas, A.T., Oliveira, A.L., and Sá-Correia, I. (2006). The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *34*, D446-451.
- Thorland, E.C., Myers, S.L., Gostout, B.S., and Smith, D.I. (2003). Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* *22*, 1225–1237.
- Tibbetts, R.S., Cortez, D., Brumbaugh, K.M., Scully, R., Livingston, D., Elledge, S.J., and Abraham, R.T. (2000). Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev.* *14*, 2989–3002.
- Tjong, H., and Zhou, H.-X. (2007). DISPLAR: an accurate method for predicting DNA-binding sites on protein surfaces. *Nucleic Acids Res.* *35*, 1465–1477.
- Toledo, L.I., Altmeyer, M., Rask, M.-B., Lukas, C., Larsen, D.H., Povlsen, L.K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J., and Lukas, J. (2013). ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* *155*, 1088–1103.
- Travers, A., and Drew, H. (1997). DNA recognition and nucleosome organization. *Biopolymers* *44*, 423–433.
- Tsai, B.P., Wang, X., Huang, L., and Waterman, M.L. (2011). Quantitative profiling of in vivo-assembled RNA-protein complexes using a novel integrated proteomic approach. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *10*, M110.007385.
- Tuerk, C., and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* *249*, 505–510.
- Turner, B.C., Ottey, M., Zimonjic, D.B., Potoczek, M., Hauck, W.W., Pequignot, E., Keck-Waggoner, C.L., Sevignani, C., Aldaz, C.M., McCue, P.A., et al. (2002). The fragile histidine triad/common chromosome fragile site 3B locus and repair-deficient cancers. *Cancer Res.* *62*, 4054–4060.

- Vasilyev, N., Polonskaia, A., Darnell, J.C., Darnell, R.B., Patel, D.J., and Serganov, A. (2015). Crystal structure reveals specific recognition of a G-quadruplex RNA by a β -turn in the RGG motif of FMRP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E5391-5400.
- Vermeulen, M., Eberl, H.C., Matarese, F., Marks, H., Denissov, S., Butter, F., Lee, K.K., Olsen, J.V., Hyman, A.A., Stunnenberg, H.G., et al. (2010). Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell* *142*, 967–980.
- Walker, S.C., Scott, F.H., Srisawat, C., and Engelke, D.R. (2008). RNA affinity tags for the rapid purification and investigation of RNAs and RNA-protein complexes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *488*, 23–40.
- Wang, C.I., Alekseyenko, A.A., LeRoy, G., Elia, A.E.H., Gorchakov, A.A., Britton, L.-M.P., Elledge, S.J., Kharchenko, P.V., Garcia, B.A., and Kuroda, M.I. (2013). Chromatin proteins captured by ChIP-mass spectrometry are linked to dosage compensation in *Drosophila*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 202–209.
- Ward, A.M., Bidet, K., Yinglin, A., Ler, S.G., Hogue, K., Blackstock, W., Gunaratne, J., and Garcia-Blanco, M.A. (2011). Quantitative mass spectrometry of DENV-2 RNA-interacting proteins reveals that the DEAD-box RNA helicase DDX6 binds the DB1 and DB2 3' UTR structures. *RNA Biol.* *8*, 1173–1186.
- Wierer, M., and Mann, M. (2016). Proteomics to study DNA-bound and chromatin-associated gene regulatory complexes. *Hum. Mol. Genet.* *25*, R106–R114.
- Wilke, C.M., Hall, B.K., Hoge, A., Paradee, W., Smith, D.I., and Glover, T.W. (1996). FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites. *Hum. Mol. Genet.* *5*, 187–195.
- Wolters, D.A., Washburn, M.P., and Yates, J.R. (2001). An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.* *73*, 5683–5690.
- Wu, C.-H., Chen, S., Shortreed, M.R., Kreitinger, G.M., Yuan, Y., Frey, B.L., Zhang, Y., Mirza, S., Cirillo, L.A., Olivier, M., et al. (2011). Sequence-specific capture of protein-DNA complexes for mass spectrometric protein identification. *PloS One* *6*, e26217.
- Yarden, R.I., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K.H., and Brody, L.C. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat. Genet.* *30*, 285–289.
- Zanesi, N., Fidanza, V., Fong, L.Y., Mancini, R., Druck, T., Valtieri, M., Rüdiger, T., McCue, P.A., Croce, C.M., and Huebner, K. (2001). The tumor spectrum in FHIT-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10250–10255.
- Zhang, H., and Freudenreich, C.H. (2007). An AT-rich sequence in human common fragile site FRA16D causes fork stalling and chromosome breakage in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* *27*, 367–379.
- Zhu, M., and Weiss, R.S. (2007). Increased common fragile site expression, cell proliferation defects, and apoptosis following conditional inactivation of mouse Hus1 in primary cultured cells. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1044–1055.

Zielinski, J., Kilk, K., Peritz, T., Kannanayakal, T., Miyashiro, K.Y., Eiríksdóttir, E., Jochems, J., Langel, U., and Eberwine, J. (2006). In vivo identification of ribonucleoprotein-RNA interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 1557–1562.

Zlotorynski, E., Rahat, A., Skaug, J., Ben-Porat, N., Ozeri, E., Hershberg, R., Levi, A., Scherer, S.W., Margalit, H., and Kerem, B. (2003). Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 7143–7151.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* *31*, 3406–3415.

10. SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
ATM	ataxia-telangiectasia mutated kinase
APH	aphidicolin
ATR	ataxia-telangiectasia RAD3-related kinase
ATRIP	ataxia-telangiectasia RAD3-related interaction protein
BER	excizní reparace bází (z angl. base excision repair)
BFM	běžná fragilní místa
BRCA1	breast cancer-1 protein
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
CID	kolizí indukovaná disociace (z angl. collision induced dissociation)
CPD	cyklobutan pyrimidinový dimer
DDB1	DNA vazebný protein 1 (z ang. DNA binding protein 1)
2-DE	dvojrozměrná elektroforéza
DMSO	dimethylsulfoxid
DSBs	dvouvláknové zlomy DNA (z angl. double-stranded DNA breaks)
EMSA	gelová retardační analýza (z angl. electrophoretic mobility shift assay)
ESI	ionizace elektrosprejem (z angl. electrospray ionization)
ECD	disociace záchytem elektronů (z angl. electron capture dissociation)
ETD	disociace přenosem elektronů (z angl. electron transfer dissociation)
FA	kyselina mravenčí (z angl. formic acid)
FANCD2	Fanconi anemia protein 2
FHIT	fragile histidine triad
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FRA16D	fragilní místo FRA16D
FRA3B	fragilní místo FRA3B
FT-ICR	iontová cyklotronová resonance s Fourierovou transformací (z angl. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry)

HR	homologní rekombinace (z angl. homologous recombination)
GENECAPP	Global ExoNuclease –based enrichment of chromatin associated proteins for proteomics
GG-NER	globální genomová excizní reparace nukleotidů (z angl. global genome nucleotide excision repair)
Chk1	checkpoint kinase 1
Chk2	checkpoint kinase 2
ICAT	isotope coded-affinity tag
ICPL	isotope coded-protein labeling
IF	imunofluorescence
iTRAQ	metoda chemického značení proteinů pomocí izobarických značek (z angl. isobaric tags for relative and absolute quantification)
KEGG	Kyoto gene encyclopedia of genes and genomes
LIG3	Ligase 3
LNA	kyselina s uzamčenou konformací (z angl. locked nucleic acid)
LTQ	lineární iontová past (z angl. linear trap quadrupole)
MALDI	laserová desorpční ionizace s pomocí matrice (z angl. Matrix-assisted laser desorption/ionization)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
MSH2	Mismatch repair protein 2
MSH3	Mismatch repair protein 3
MI	mitotický index
MudPIT	vícerozměrná identifikace proteinů (z angl. multidimensional protein identification technology)
NK	nukleové kyseliny
NHEJ	přímé spojování DNA konců (z angl. non-homologous end joining)
nLC	nanokaplinová chromatografie
PARP-1	Poly(ADP)ribose polymerase 1
pH3	fosforylovaný histon H3
(6-4) PP	pyrimidin pyrimidonové (6-4) fotoprodukty

pI	izoelektrický bod
PNA	peptidová nukleová kyselina
PTM	posttranslační modifikace
P53	protein 53
Q	kvadrupól (z angl. quadrupole)
QqQ	trojitý kvadrupól (z angl. triple quadrupole)
RPA	replikační protein A
RS	replikační stress
SCX	silný kationtoměnič (z angl. strong cation exchange)
SELEX	metoda systematického vývoje ligandů na základě exponenciálního růstu (z angl. Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment)
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SILAC	izotopové značení proteinů v buněčné kultuře (z angl. stable isotope labeling of amino acids in cell culture)
SMC1	Structural maintenance of chromosomes protein 1
ssDNA	jednovláknová DNA (z angl. single-stranded DNA)
TF	transkripční faktor
TFAM	Mitochondrial transcription factor A
T _m	teplota tání
UV	ultrafialové záření
WDR76	WD repeat domain 76
WWOX	WW domain containing oxidoreductase
WRN	Werner helicase
XPC	Xeroderma pigmentosum complementing protein C
XRCC1	X-ray repair cross-complementing group protein 1
XRCC6	X-ray repair cross-complementing group protein 6
53BP1	53-vazebný protein 1 (z angl. 53-binding protein 1)
γH2AX	fosforylovaný histon H2AX

11. ŽIVOTOPIS

Osobní údaje

Jméno a příjmení: Lucie Béresová (roz. Švehlová)

Narozena: 27. 5. 1984

Bydliště: Werichova 11, Olomouc 77900

Zaměstnání

Od r. 2012 Ústav molekulární a translační medicíny, Laboratoř integrity genomu, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

2010-2012 Centrum Regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Vzdělání

2006-2008 Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Navazující magisterské studium obor: Analýza biologických materiálů,

(téma diplomové práce: Použití metod afinitní chromatografie ke studiu

nespecifické sorpce a kvantifikace ligandu)

2003-2006 Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,

Bakalářské studium obor: Klinická biologie a chemie

1995-2003 Všeobecné Gymnázium, ZŠ a G Konice

Absolvované vědecké stáže

2011 (3 měsíce) Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald-Insel Riems, Germany. Náplní pracovního pobytu byla práce na optimalizaci proteomického přístupu pro analýzu a identifikaci cílových epitopů na povrchu B- a T-lymfocytů pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*).

Zapojení do grantových projektů

2011 – Spoluřešitel projektu FRVŠ G3/1743/2011

Téma: Analýza markerů buněčného cyklu průtokovou cytometrií

2010 – Řešitel projektu FRVŠ 2722/2010/G4

Téma: Zavedení experimentálních metod funkční a kvantitativní proteomiky

Seznam publikovaných prací

Beresova L., Vesela E., Chamrad I., Voller J., Yamada M., Furst T., Lenobel R., Chroma K., Gursky J., Krizova K., Mistrik M., Bartek J.: Role of DNA repair factor Xeroderma pigmentosum protein group C in response to replication stress as revealed by DNA fragile site affinity chromatography and quantitative proteomics. *Journal of Proteome Research* 2016, 15, 4505-4517.

Beresova L. a Lenobel R. Pokročilé metody studia vzájemných interakcí proteinů s DNA. *Chemické Listy* 2017, 111, 136-141.

Chamrad I., Simersky R., **Beresova L.**, Strnad M., Sebel M., Lenobel R.: Proteomic identification of candidate sequence of wheat cytokinin-binding protein 1. *Journal of Plant Growth Regulators* 2014, 33, 896-902.

Konferenční příspěvky

Beresova L., Vesela E., Chamrad I., Voller J., Yamada M., Furst T., Lenobel R., Chroma K., Gursky J., Krizova K., Mistrik M., Bartek J.: DNA affinity chromatography combined with quantitative proteomics revealed role of XPC protein in replication stress and common fragile site stability. XII Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, November 30-December 1 2016, Olomouc, ČR. Poster

Mistrik M., **Beresova L.**, Vesela E., Lenobel R., Chamrad I., Voller J., Yamada M., Furst T., Chroma K., Gursky J., Bartek J.: Replication obstacles formed within common fragile sites under replication stress are targeted by the global genomic nucleotide excision repair pathway.

XII Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, November 30-December 1 2016, Olomouc, ČR. Prezentace Dr. Mistrík

Beresova L., Vesela E., Mistrík M., Voller J., Yamada M., Chamrad I., Lenobel R., Bartek J.: Molecular insight into XPC role in replication stress and common fragile site stability. XI. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, December 2-3 2015, Olomouc, ČR. Prezentace Mgr. Vesela

Chamrad I., Klaskova J., Simersky R., **Svehlova L.**, Lenobel R.: Establishment of advanced proteomic techniques for the study of cytokinin-binding protein 1. 3rd Central and Eastern European Proteomic Conference, October 6-9, 2009, Budapešť, Maďarsko. Poster

Klaskova J., Chamrad I., Simersky R., **Svehlova L.**, Sebel M., Spichal L., Lenobel R., Strnad M.: Dynamic of a wheat cytokinin-binding protein during seed germination. 20th International Conference on Plant Growth Substances, June 28-July 2, 2010, Taragona, Španělsko. Poster

Svehlova L., Chamrad I., Simersky R., Mistrík M., Voller J., Lenobel R.: Studying of DNA-Protein interactions by proteomic approaches. Conference: Nová léčiva závažných lidských onemocnění; Kouty nad Desnou 29.-31. May 2011, ČR. Prezentace

Simersky R., Chamrad I., **Svehlova L.**, Mik V., Strnad M., Lenobel R.: Compound-centric chemical proteomics as a tool for the identification of plant hormone interactors. Proteomic Forum 2011, April 2-7, 2011, Berlín, Německo. Poster

Svehlova L., Chamrad I., Simerský R., Mik V., Vesela E., Strnad M., Lenobel R.: Labeling of peptides on the solid phase as an improvement of the original GIST approach. Proteomic forum 2011, April 2-7, 2011, Berlín, Německo. Poster

12. SEZNAM PŘÍLOH

1. **Beresova L.** a Lenobel R. Pokročilé metody studia vzájemných interakcí proteinů s DNA. *Chemické Listy* 2017, 111, 136-141.
2. **Beresova L.**, Vesela E., Chamrad I., Voller J., Yamada M., Furst T., Lenobel R., Chroma K., Gursky J., Krizova K., Mistrik M., Bartek J.: Role of DNA repair factor Xeroderma pigmentosum protein group C in response to replication stress as revealed by DNA fragile site affinity chromatography and quantitative proteomics. *Journal of Proteome Research* 2016, 15, 4505-4517.

PŘÍLOHA I

Beresova L. a Lenobel R. Pokročilé metody studia vzájemných interakcí proteinů s DNA.
Chemické Listy 2017, 111, 136-141.

POKROČILÉ METODY STUDIA VZÁJEMNÝCH INTERAKCÍ PROTEINŮ S DNA

LUCIE BÉRESOVÁ^{a,b} a RENÉ LENOBEL^b

^a Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc, ^b Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 27, 783 91 Olomouc
lucie.beresova@upol.cz, rene.lenobel@upol.cz

Došlo 4.11.16, přijato 30.11.16.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: DNA, afinitní chromatografie, hmotnostní spektrometrie, fluorescenční mikroskopie, gelová retardační analýza

Obsah

1. Úvod
2. DNA-afinitní chromatografie
 - 2.1 Konstrukce DNA-afinitní matrice
 - 2.2 Způsob provedení DNA-afinitní chromatografie
 - 2.3 Identifikace proteinů interagujících s DNA pomocí kvantitativní proteomiky a hmotnostní spektrometrie
3. Gelová retardační analýza (EMSA)
4. Fluorescenční mikroskopie
 - 4.1 Přímá detekce interakce proteinů s DNA
 - 4.2 Nepřímá detekce interakce proteinů s DNA
5. Závěr

1. Úvod

Interakce proteinů s DNA hrají klíčovou roli v regulaci buněčných mechanismů jako je replikace, transkripce, rekombinace a reparace poškozené DNA. Různé vnější faktory, meziprodukty metabolismu a genetické mutace mohou vést ke změně vzájemné kooperace proteinů s DNA, porušení regulace buněčných mechanismů a mohou vyústit až k rozvoji nádorového onemocnění¹. Taktéž řada virů využívá interakce proteinů s DNA hostitelské buňky během svého životního cyklu². Izolace DNA vazebných proteinů, jejich následná identifikace a charakterizace biologické funkce tak pomáhá objasnit fungování a vzájemnou synchronizaci životně důležitých buněčných mechanismů.

Zdokonalování metod studia proteinových interakcí s DNA molekulami je v popředí zájmu řady molekulárně-biologických oborů. Tyto metody mohou být klasifikovány na základě způsobu provedení (*in vitro* a *in vivo*), nebo na základě výsledku, který očekáváme. Výsledkem může být určení specifické DNA sekvence, se kterou studovaný protein interaguje³, nebo naopak identifikace proteinů interagujících se známou DNA sekvencí^{4,5}.

Tento souhrnný referát je věnován metodám izolace DNA vazebných proteinů a technikám jejich následné identifikace (DNA-afinitní chromatografii v kombinaci s přístupy kvantitativní proteomiky a hmotnostní spektrometrie). Pozornost je věnována i přímým metodám potvrzení DNA-proteinové interakce, gelové retardační analýze a jejím současným modifikacím. Zmíněny jsou také postupy fluorescenční mikroskopie, které slouží zejména ke sledování DNA-proteinové interakce s cílem objasnit biologické funkce již předem identifikovaných DNA vazebných proteinů. Jednotlivé kapitoly jsou koncipovány tak, aby čtenář získal představu o současných trendech v metodách studia interakcí proteinů s DNA, jejich kladech i záporech a potenciální aplikaci při vlastní experimentální práci.

2. DNA-afinitní chromatografie

Izolaci a identifikaci proteinů schopných interakce s DNA lze provést pomocí metod DNA-afinitní chromatografie v kombinaci s metodami kvantitativní proteomiky a MS. Princip DNA-afinitní chromatografie spočívá v izolaci proteinů na základě jejich interakce se specifickou DNA sekvencí – ligandem, který je imobilizován na pevném nosiči. V současné době dosáhla DNA-afinitní chromatografie značné obliby a to nejen díky variabilitě DNA úseků, které lze volit jako specifický ligand, ale především díky rozvoji moderních metod identifikace proteinů technikami hmotnostní spektrometrie. Ve spojení s metodami kvantitativní proteomiky představuje DNA-afinitní chromatografie významnou, dostatečně selektivní a citlivou metodu k identifikaci či případné charakterizaci minoritně zastoupených proteinů schopných interakce jak s krátkými sekvencně specifickými DNA ligandy^{6,7}, tak i s dlouhými strukturně specifickými DNA sekvencemi⁸.

Pro úspěšné provedení DNA-afinitní chromatografie je třeba optimalizovat několik zásadních kroků. Nejvýznamnějším krokem je návrh a konstrukce vhodné afinitní matrice (výběr specifického DNA ligandu a jeho imobilizace). Následuje optimalizace způsobu provedení DNA-afinitní chromatografie, kde je možné zahrnout přípravu vzorků, optimalizaci interakčních podmínek, promývání matrice a eluci zachycených proteinů. Neméně důležité je

také finální zpracování eluátu pro následnou identifikaci proteinů proteomickými metodami a MS.

2.1. Konstrukce DNA-afinitní matrice

Při konstrukci DNA-afinitní matrice hraje zásadní roli především výběr a syntéza DNA ligandu a jeho ukotvení k vhodně zvolené matici tzv. imobilizace. Predikci specifického DNA ligandu vhodného pro izolaci transkripčních faktorů a dalších DNA vazebných proteinů lze získat *in silico* analýzou. Na základě známé informace o transkripčních faktorech a promotorových sekvencích, případně informacích o povrchových či strukturních vlastnostech proteinů lze předvídat jejich potenciální vazbu ke konkrétní sekvenci DNA⁹. K nevýhodám těchto bioinformatických analýz patří především fakt, že špatně zvoleným algoritmem získáme řadu falešně pozitivních i negativních výsledků a také to, že *in silico* metody vychází již ze známých informací a většinou se jedná již o detailně charakterizované proteiny.

Současné DNA-afinitní chromatografie jsou prováděny na různých dlouhých sekvencích či strukturně specifických úsecích DNA a slouží především k izolaci *de novo* DNA vazebných proteinů, jejichž biologickou funkci je třeba dále ověřit pomocí molekulárně-biologických metod^{8,10}.

Nezbytným požadavkem pro správné odlišení specificky a nespecificky zachycených proteinů je volba kontrolního ligandu. Kontrolní DNA ligand by měl být co nejvíce podobný specifickému avšak bez vazebného místa. Tohoto způsobu se nejčastěji užívá při identifikaci transkripčních faktorů, kdy kontrolní sekvenci získáme mutací ve specifické regulační oblasti, která má být proteinem rozpoznána¹¹. Při izolaci proteinů vázajících se specificky k strukturované DNA je nutné ověřit zachování této struktury za daných experimentálních podmínek, ale také navrhnout kontrolní (většinou lineární) sekvenci, jejíž struktura zůstane během experimentu nezměněna⁸. V případě, že sledujeme změnu schopnosti vazby proteinu ke konkrétní sekvenci DNA za určitých stresových podmínek, provedeme DNA-afinitní chromatografii s proteiny z buněk kultivovaných za normálních podmínek, a poté s proteiny buněk, které byly vystaveny stresovým podmínkám¹². Srovnáváme tedy proteom (soubor proteinů) vázaný ke specifickému a kontrolnímu ligandu, případně proteiny vázané ke stejné sekvenci bez a po působení stresového faktoru.

Dalším krokem konstrukce DNA-afinitní matrice je imobilizace zvoleného ligandu. Původní způsoby imobilizace byly prováděny pomocí adsorpce molekul DNA k matici, nekovalentními vazbami mezi DNA ligandem značeným poly(A)oligonukleotidem a maticí z poly(T) oligonukleotidem, a také kovalentními vazbami vznikajícími na základě chemické reakce mezi postranními skupinami DNA ligandu (5' nebo 3' konec) a aktivovaným povrchem matrice¹³. V současné době je imobilizace molekul DNA, ve většině případů, prováděna pomocí biospecifické vazby biotin-streptavidin. Zvolený DNA ligand je již během syntézy modifikován biotinem, což umožní jeho pev-

nou nekovalentní vazbu k nosiči pokrytému streptavidinem. Vhodným nosičem jsou zejména magnetické mikročástice. Hlavní výhodou tohoto způsobu imobilizace je snadná příprava DNA-afinitní matrice bez složitých chemických reakcí a jednoduchá manipulace s magnetickými mikročásticemi, která umožňuje použití malých promývacích i elučních objemů^{5,8}.

2.2. Způsob provedení DNA afinitní chromatografie

Jednotlivé kroky DNA-afinitní chromatografie zahrnují přípravu vzorku a jeho inkubaci s DNA-afinitní maticí, promývání afinitní matrice a nakonec eluci zachycených proteinů.

Vstupním materiálem pro DNA-afinitní chromatografii je zpravidla buněčný lyzát živočišného, bakteriálního nebo rostlinného původu obsahující proteiny v nativní formě. Ve většině případů se jedná o komplexní proteinovou směs, ve které řada majoritně zastoupených proteinů může ovlivňovat možnost interakce hledaného proteinu, často minoritně zastoupeného, nespecifickými interakcemi jak se samotnou maticí, tak i s DNA-ligandem. Možným řešením tohoto nežádoucího jevu je snížení komplexnosti vstupního proteinového lyzátu. V počátcích DNA-afinitní chromatografie byly lyzáty nejprve separovány pomocí iontové výměnné chromatografie na jednotlivé frakce a až poté podrobeny specifické DNA-afinitní chromatografii. Hlavní nevýhodou tohoto postupu je požadavek velkého množství vstupního materiálu a možná ztráta minoritně zastoupených proteinů během separačních kroků^{14,15}. Další postupy, jimiž lze snížit množství nespecificky se vázajících proteinů, je preinkubace vzorku s prázdnou maticí anebo také s maticí obsahující nespecifickou, mutovanou nebo jinak změněnou DNA sekvenci¹⁵⁻¹⁷. Nespecifické vazbě proteinů lze také zamezit blokací matrice pomocí hovězího sérového albuminu (BSA). Nevýhodou je, že spolu s izolovanými proteiny dochází k postupné eluci BSA, který tak působí jako nechtěný kontaminant a může ztěžovat podmínky identifikace specificky vázaných proteinů metodou MS¹⁸. V současné době existuje řada postupů i komerčně dostupných kitů, které umožňují frakcionaci biologického vzorku např. oddělení jaderných proteinů od proteinů cytosolu. Rozvoj nových metod kvantitativní proteomiky v kombinaci se stále modernějšími, rychlejšími a vysoce citlivými analyzátory hmotnostní spektrometrie nabízí nové přístupy, které jsou schopny eliminovat úskalí nespecifických interakcí a zvyšují citlivost detekce specificky interagujících proteinů (viz 2.3).

Zásadním krokem pro zachycení proteinů interagujících se specifickým DNA ligandem je samotná inkubace vzorku s DNA-afinitní maticí. Složení pufru pro inkubaci vzorku s DNA-afinitní maticí by mělo co nejvíce odpovídat fyziologickým podmínkám vhodným pro žádanou interakci proteinů s DNA ligandem. Důležité je kontrolovat obsah solí, detergentů a kovových iontů, které mohou výrazně ovlivnit sílu a specifitu interakce proteinů s DNA. Vyšší koncentrace solí ve vazebném pufru zamezí vzniku nespecifických vazeb, avšak příliš vysoká koncentrace

může způsobit inhibici požadované interakce a destabilizaci vznikajících komplexů¹⁹.

Promývání afinitní matrice po inkubaci s proteinovým lyzátem slouží především k odstranění nenavázaných a nespecificky zachycených proteinů. K tomuto účelu je vhodné zvolit systém promývacích pufrů se zvyšující se koncentrací solí¹¹ a s přidávkem tzv. kompetitorů. Jako kompetitory označujeme jednovláknové případně dvouvláknové řetězce DNA, které po přidání do promývacího pufru vyváží proteiny schopné nespecifické interakce s jakýmkoliv DNA řetězcem. Klíčová je volba správného množství tohoto kompetitoru, jelikož při vysokých koncentracích může dojít k nechtěnému vyvázání hledaného proteinu¹⁹.

Posledním krokem, který je následován samotnou identifikací izolovaných proteinů, je jejich eluce z afinitní matrice. Eluci provádíme systémem pufrů se zvyšující se koncentrací solí a detergentů nebo přímo vzorkovacím pufrům pro elektroforetické dělení proteinů^{8,11,18,19}. U mikročástic pokrytých streptavidinem lze provést eluci DNA vázaných proteinů biotinem. V tomto případě je k samotné imobilizaci DNA ligandu použitý desthbiotin místo biotinu, který vykazuje slabší afinitu k streptavidinu. Po provedení inkubace proteinů s DNA-ligandem, a promytí DNA-afinitní matrice, je samotný DNA ligand včetně navázaných proteinů vytěsněn z matrice biotinem²⁰. Dalším cíleným způsobem eluce proteinů je zavedení restrikčního místa do sekvence DNA ligandu a použití restrikčního enzymu k uvolnění komplexu DNA-protein. Nevýhodou může být falešně pozitivní zachycení proteinů, které se budou vázat k modifikovanému místu a také nezanedbatelné množství kontaminantu v podobě restrikčního enzymu přítomného ve vzorku během identifikace⁵.

2.3. Identifikace proteinů interagujících s DNA pomocí kvantitativní proteomiky a hmotnostní spektrometrie

Výstupem DNA-afinitní chromatografie je tzv. eluát, směs zachycených proteinů, které jsou následně identifikovány proteomickými technikami a MS.

Existují dva základní postupy, jimiž lze získaný eluát zpracovat a připravit tak k následné analýze. První postup zahrnuje elektroforetické dělení eluátu denaturační gelovou elektroforézou (SDS-PAGE), která umožňuje separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti (MW) a zároveň vede ke snížení komplexnosti proteinové směsi. Z takto rozděleného eluátu lze vybrat konkrétní oblast MW (případně celý gradient MW rozdělit na několik dílů) a provést identifikaci přítomných proteinů. Vybrané oblasti MW jsou vyřezány, odbarveny, proteiny redukovány, alkylovány a podrobeny proteolytickému štěpení v gelu „in-gel digestion“^{21,22}. Druhým způsobem je přímé štěpení proteinů v roztoku „in-solution digestion“. Štěpit lze proteiny přítomné v eluátu anebo přímo vázané na DNA-afinitní matici^{11,6}. V obou případech získáme peptidovou směs, kterou je třeba přečistit pomocí StageTip, špiček s C18 reverzní fází²³ a připravit tak pro následnou MS analýzu.

Metody kvantitativní proteomiky v kombinaci s MS umožňují identifikaci všech proteinů vázaných k DNA ligandu a zároveň nabízí možnosti, jak odlišit proteiny vázané specificky či nespecificky ať už k samotné DNA anebo pomocnému nosiči. Identifikace specificky vázaných proteinů je založena na relativním porovnání množství zachycených proteinů vázaných k specifickému a kontrolnímu DNA ligandu. Toto porovnání je umožněno především díky isotopovému značení proteinů, které lze provést metabolickou anebo chemickou cestou. Metabolické značení (SILAC, z angl. stable isotope labeling of amino acids in cell culture) představuje inkorporaci isotopově značených aminokyselin při buněčné proteosyntéze a probíhá během kultivace buněčné kultury v médiu obsahujícím isotopově modifikované aminokyseliny arginin a lysin s různou kombinací ¹⁵N a ¹³C prvků²⁴. Podstatou chemického značení proteinů nebo peptidů je kovalentní modifikace těchto analytů zavedením chemických isotopových hmotnostních značek („mass tags“), které mají shodné fyzikálně-chemické vlastnosti, ale liší se molekulovou hmotností vlivem různého obsahu isotopů. K cílenému značení dochází až během procesu zpracování proteinů eluovaných z DNA-afinitních matic (specifické a kontrolní) buď na úrovni samotných proteinů nebo následně až po proteolytickém štěpení na úrovni peptidů²⁵. Takto modifikované vzorky, které obsahují isotopově odlišné varianty použité značky, jsou smíchány a nejčastěji podrobeny analýze kapalinovou chromatografií spojenou online s MS detekcí. Informace o kvantitativním zastoupení jednotlivých proteinů v původních vzorcích je získáno na základě porovnání MS intenzit nebo ploch charakteristických iontů, a to buď prekurzorových iontů peptidů v „survey“ MS spektru, anebo reportérových iontů v MSMS spektrech získaných fragmentací prekurzorového iontu v kolizní cele.

Současná identifikace a kvantifikace proteinů ve vzorcích izolovaných ze specifického a kontrolního ligandu udává poměr množství proteinu vázaného na specifické vs. nespecifické DNA sekvenci, čímž získáme nástroj k odlišení nespecificky vázaných proteinů, které jsou v obou vzorcích zastoupeny ve stejném poměru^{5,26}.

Finálním výstupem celého procesu DNA-afinitní chromatografie a proteomické kvantitativní analýzy je seznam proteinů vázaných k specifické DNA sekvenci. Další otázkou tedy je, o jaký protein se jedná a jaká je jeho biologická funkce. Existuje řada volně dostupných proteinových databází jako např. UniProt, kde jsou shrnuty známé informace o daném proteinu (sekvence, post-translační modifikace, molekulární a biologické funkce)²⁷. Další možností je znázornění interakční sítě identifikovaných proteinů pomocí volně dostupných databází String²⁸ nebo IntAct²⁹, které na základě dostupných experimentálních dat znázorní známé případně možné interakce jak s DNA, tak i vzájemné mezi proteiny. Na základě *in silico* informace, informací dostupných z literatury a z vlastního experimentu lze *de novo* identifikovaný protein dále studovat a popsat jeho biologickou funkci v konkrétním mechanismu.

3. Gelová retardační analýza (EMSA)

K přímým metodám potvrzení DNA-proteinové interakce založeným na elektroforetickém dělení patří gelová retardační analýza (EMSA, z angl. electrophoretic mobility shift assay).

Touto metodou lze získat nejen kvalitativní informaci o vazbě proteinu k specifickému úseku DNA, ale v závislosti na zvolených experimentálních podmínkách také kvantitativní informaci o kinetických vlastnostech vzniklého komplexu DNA-protein. Obecný princip metody spočívá v rozdílné elektroforetické mobilitě komplexu DNA-protein vůči samotné DNA. Nenavázaný úsek DNA se v nedenaturujícím polyakrylamidovém nebo agarozovém gelu pohybuje podstatně rychleji než komplex DNA-protein, který je díky své velikosti v průchodu gelem zpomalen – retardován. V případě, že se jedná o známý protein, jehož interakci s danou sekvencí pouze ověřujeme, lze vznikající DNA-protein komplex potvrdit přidáním specifické protilátky. DNA-protein-protilátka komplex vykazuje větší retardaci během elektroforetického pohybu oproti komplexu DNA-protein tzv. super posun (z angl. supershift)³⁰. Následná detekce DNA a komplexu DNA-protein je umožněna díky značení DNA sekvence radioisotopem ³²P anebo fluoroforem³¹.

Samotné provedení EMSA metody spočívá v inkubaci celkového buněčného lyzátu anebo frakce předem upraveného lyzátu se specifickou DNA sekvencí, kompetitory k snížení nespecifické vazby a případně protilátkou. Tato směs je poté podrobena elektroforetické separaci a vznikající komplexy DNA-protein/DNA-protein-protilátka jsou detegovány³².

K hlavním výhodám metody EMSA patří zejména její jednoduchost, rychlost provedení a možnost pracovat s celkovým buněčným lyzátem bez složitých purifikačních kroků. K nevýhodám patří fakt, že některé komplexy proteinů s DNA řetězcí mohou během elektroforetického dělení rychle disociovat nebo naopak vznikat jen kvůli stabilitě, kterou jim nabízí prostředí gelu, ve kterém jsou separovány³³. Výsledný komplex DNA-protein poskytuje pouze informaci o vazbě proteinu k specifické sekvenci a v případě, že jde o neznámý protein, je třeba provést jeho charakterizaci dalšími analytickými přístupy. V případě identifikace *de novo* DNA vazebných proteinů lze metodu EMSA využít k testování jednotlivých frakcí získaných předchozí separací komplexního lyzátu např. na heparin-sepharosovém nosiči. Frakce pozitivní v EMSA metodě mohou být následně podrobena DNA-afinitní chromatografii, kdy výsledné DNA vazebné proteiny detegujeme přímo pomocí MS (viz 2.3.) anebo opět metodou EMSA³⁴. EMSA v kombinaci s SDS-PAGE umožní určit MW studovaného proteinu. Buněčný lyzát je nejprve podroben SDS-PAGE, proteiny z konkrétních molekulových oblastí jsou eluovány, renaturovány a podrobena gelové retardační analýze. U proteinu, který vytvořil komplex DNA-protein, tak známe jeho MW. Analogickým způsobem lze určit isoelektrický bod (*pI*) proteinu. Buněčný lyzát je podroben isoelektrické fokusaci, jednotlivé oblasti *pI* jsou

separovány metodou EMSA. U proteinu, který vytvořil komplex DNA-protein tak zjistíme jeho *pI*. Provedeme-li dvojrozměrnou elektroforézu (2D ELFO), můžeme pomocí již známé informace o MW a *pI* sledovaného proteinu předpokládat jeho pozici v gelu. Proteolytické štěpení této oblasti a následná hmotnostní spektrometrie umožní identifikaci DNA vazebného proteinu⁴. Velkou výhodou zmíněného postupu je absence jakýchkoliv složitých purifikačních procesů a díky větší citlivosti detekce proteinů pomocí MS také nižší požadavek na koncentraci analyzovaného proteinu. Limitací je optimalizace eluce a především renaturace proteinů po SDS-PAGE a 2D ELFO tak, aby byly zachovány nativní vlastnosti proteinu pro vazbu k specifické DNA sekvenci při EMSA separaci.

4. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je optická metoda využívající fyzikálního jevu označovaného jako fluorescence a v současné době je hojně aplikovaná v oblasti molekulární biologie. Na základě detekce fluorescenčního signálu umožňuje studovat protein z hlediska jeho translokace v rámci buňky, lokalizace/delokalizace k DNA, ale i vzájemné interakce s dalšími proteiny.

Lokalizaci proteinu k DNA lze sledovat několika způsoby. Jedním je tzv. imunofluorescence (IF), kdy je protein detegován systémem protilátek. Primární protilátku sloužící k rozpoznání studovaného proteinu lze detegovat přímo jejím značením pomocí syntetického fluoroforu anebo nepřímo přes značenou sekundární protilátku. Dalším způsobem je detekce proteinu fúзованého s fluorescenčním proteinem např. GFP (z angl. green fluorescent protein)³⁵. Zcela novým postupem je také detekce pomocí tzv. chromobody. Zmíněná technologie využívá protilátky specificky se vyskytující u zvířat z čeledi velbloudovitých. Tyto protilátky se vyznačují velmi malou molekulovou hmotností (z důvodu absence lehkého řetězce) a lze je ektopicky exprimovat přímo v buňce včetně fluorescenční GFP značky. Jedná se tedy o systém, kdy pomocí plazmidové transfekce vnášíme do buňky informaci pro expresi fluorescenčně značené protilátky proti studovanému proteinu. Lokalizace proteinu je pak sledována přímo v buňce díky interakci s touto protilátkou³⁶.

Z hlediska studia interakce proteinu s DNA lze metody fluorescenční mikroskopie rozdělit na přímé, kdy detegovaná fluorescence potvrzuje vazbu proteinu ke konkrétnímu místu v DNA a nepřímé metody, kdy vazbu proteinu k DNA/chromatinu předpokládáme na základě jeho lokalizace v jádře. Samotná detekce fluorescence proteinu pouze ukazuje jeho lokalizaci v jádře, avšak neumožňuje přímé potvrzení vazby proteinu k DNA.

4.1. Přímá metoda detekce interakce proteinů s DNA

Fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET) je jednou z metod, která umožňuje přímé sledování interakce DNA-protein. Princip detekce vazby proteinu je založen

na přenosu energie mezi dvěma fluorescenčními molekulami – donorem a akceptorem, které se nachází v těsné blízkosti. Pohlcením monochromatického světla určité vlnové délky dojde k excitaci donoru a emisi světla, které je pohlceno akceptorem. Akceptor je následně excitován a emituje světlo o větší vlnové délce, které je detegováno. K tomuto jevu dochází pouze v případech, že donor a akceptor jsou v bezprostřední blízkosti. Při kontaktu fluoroforu značeného proteinu s fluorescenční značkou v místě vazby k DNA, tzv. intermolekulární FRET, dojde k přenosu energie a detekci interakce DNA-protein. Jinou možností je umístění obou fluoroforů na interagující protein, kdy vzájemná interakce DNA s proteinem vede ke konformační změně, při níž dojde ke kontaktu fluoroforů či naopak se již existující kontakt přeruší, tzv. intramolekulární FRET³⁷.

4.2. Nepřímá metoda detekce interakce proteinů s DNA

Nepřímé metody fluorescenční mikroskopie používáme zejména k objasnění biologické funkce již známé případně předpokládané interakce DNA-protein. Na základě působení různých vnějších a vnitřních vlivů sledujeme změnu lokalizace proteinu s cílem zjistit jeho úlohu v konkrétním mechanismu. Interakci DNA s proteinem lze sledovat v konkrétním čase po fixaci buněk anebo v průběhu určitého časového úseku v živých buňkách tzv. „live cell imaging“.

Podstatnou částí imunofluorescenční mikroskopie je příprava vhodného preparátu. Základní kroky přípravy vzorku zahrnují správnou kultivaci buněčné kultury, fixaci buněk k vhodně zvolenému materiálu, blokaci vzorku a volbu vhodného systému protilátek. Jedině správná optimalizace všech zmíněných kroků zaručuje dostačující kvalitu mikroskopie a následnou analýzu dat³⁸. Řada proteinů je vázána k DNA na základě interakce s dalšími proteiny, a proto lze ještě před fixací provést preextrakci vzorku a zvýšit tak možnost detekce proteinů skutečně vázaných k DNA³⁹.

Pro aplikaci *in vivo* pozorování lokalizace proteinu v jádře je třeba zhotovit systém s fluorescenčně značeným proteinem případně chromobody systém. Těchto systémů se využívá především ke studiu dynamických procesů. Příkladem může být metoda lokalizovaného poškození DNA, kdy se pomocí lokálního UV ozáření vyvolá poškození DNA jen v určité části buněčného jádra a mikroskopicky se sleduje lokalizace/delokalizace proteinu k místu poškození v čase⁴⁰.

Zásadním požadavkem pro nepřímou fluorescenční mikroskopii je dostupnost specifické protilátky proti studovanému proteinu (v případě IF), v případě přímé vizualizace může být limitací toxicita nebo prostá nefunkčnost ektopicky exprimovaného GFP-značeného proteinu či chromobody.

I přes náročné optimalizace tvorby fluorescenčních systémů vykazuje fluorescenční mikroskopie obrovský přínos pro molekulárně-biologické obory. Především možnost detailní obrazové analýzy jednotlivých buněk, pozoro-

ování dynamických jevů jako jsou různé lokalizace/delokalizace proteinu v jádře či v konkrétních subcelulárních oblastech umožňuje objasnit řadu regulačních mechanismů.

5. Závěr

Metody studia interakce mezi proteiny a DNA jsou významným nástrojem k porozumění řadě biologických procesů. Mohou být využity jak k identifikaci *de novo* DNA vazebných proteinů, jejichž úloha v integritě organismu musí být teprve zkoumána, ale také k prohloubení již známé informace o biologické funkci proteinu. Vzhledem k tomu, že dochází k stále většímu zdokonalování metod hmotnostní spektrometrie a zvýšení citlivosti daných technik, je kombinace DNA-afinitní chromatografie a kvantitativní proteomiky vhodným nástrojem k identifikaci nových DNA vazebných proteinů, jejichž biologická funkce může být dále charakterizována řadou molekulárně-biologických metod. Jako neméně důležité lze označit také přímé metody sledování DNA-proteinové interakce. EMSA umožňuje nejen zpětné potvrzení předpokládané interakce proteinu s DNA, ale v kombinaci s dalšími analytickými metodami také jeho identifikaci. Metody fluorescenční mikroskopie slouží především k vizualizaci lokalizace proteinu k DNA, čímž umožňují studovat odpověď buňky na působení vnějších, ale i vnitřních vlivů a potvrdit tak biologickou funkci proteinu. Výše zmíněné metody se svou aplikovatelností vzájemně doplňují a vhodná kombinace jejich pracovních postupů je dostačující k izolaci, identifikaci a finální charakterizaci DNA vazebných proteinů.

LITERATURA

1. Boulon S., Westman B. J., Hutten S., Boisvert F. M., Lamond A. I.: *Mol. Cell* 40, 216 (2010).
2. Krupovic M., Forterre P.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1341, 41 (2015).
3. Furey T. S.: *Nat. Rev. Genet.* 13, 840 (2012).
4. Woo A. J., Dods J. S., Susanto E., Ulgiati D., Abraham L. J.: *Mol. Cell. Proteomics* 1, 472, (2002).
5. Mittler G., Butter F., Mann M.: *Genome Res.* 19, 284 (2009).
6. Makowski M. M., Willems E., Fang J., Choi J., Zhang T., Jansen P. W., Brown K. M., Vermeulen M.: *Proteomics* 16, 417 (2016).
7. Casas-Vila N., Scheibe M., Freiwald A., Kappei D., Butter F.: *BMC Genomics* 16, 965 (2015).
8. Beresova L., Vesela E., Chamrad I., Voller J., Yamada M., Furst T., Lenobel R., Chroma K., Gursky J., Krizova K., Mistrik M., Bartek J.: *J. Proteome Res.* 15, 4505 (2016).
9. Dey B., Thukral S., Krishnan S., Chakrobarty M., Gupta S., Manghani Ch., Rani V.: *Mol. Cell. Biochem.* 365, 279 (2012).

10. Berthelot V., Mouta-Cardoso G., Hégarat N., Guillonneau F., François J. C., Giovannangeli C., Praseuth D., Rusconi F.: *Nucleic Acids Res.* 44, 4721 (2016).
11. Meng Z., Camalier C. E., Lucas D. A., Veenstra T. D., Beck G. R. Jr., Condrads T. P.: *J. Proteome Res.* 5, 1931 (2006).
12. Lu X., Beck G. R. Jr., Gilbert L. C., Camalier C. E., Bateman N. W., Hood B. L., Condrads T. P., Kern M. J., You S., Chen H., Nanes M. S.: *J. Bone Miner. Res.* 26, 209 (2011).
13. Gadgil H., Jurado L. A., Jarrett H. W.: *Anal. Biochem.* 290, 147 (2001).
14. O'Neill D., Yang J., Erdjument-Bromage H., Bornschlegel K., Tempst P., Bank A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 349 (1999).
15. Yaneva M., Tempst P.: *Methods Mol. Biol.* 338, 291 (2006).
16. Dobretsova A., Johnson J. W., Jones R. C., Edmondson R. D., Wight P. A.: *J. Neurochem.* 105, 1979 (2008).
17. Kumar N. V., Bernstein L. R.: *Anal. Biochem.* 299, 203 (2001).
18. Drewett V., Molina H., Millar A., Muller S., von Hessler F., Shaw P. E.: *Nucleic Acids Res.* 29, 479 (2001).
19. Yeneva M., Tempst P.: *Anal. Chem.* 75, 6437 (2003).
20. Hirsch J. D., Eslamizar L., Filanoski B. J., Malekzadeh N., Haugland R. P., Beechem J. M.: *Anal. Biochem.* 308, 343 (2002).
21. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J. V., Mann M.: *Nat. Protoc.* 1, 2856 (2006).
22. Sebela M., Stosova T., Havlis J., Wielsch N., Thomas H., Zdrahal Z., Shevchenko A.: *Proteomics* 6, 2959 (2006).
23. Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y.: *Nat. Protoc.* 2, 1896 (2007).
24. Chen X., Wei S., Ji Y., Guo X., Yang F.: *Proteomics* 15, 3175 (2015).
25. Chahrour O., Cobice D., Malone J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113, 2 (2015).
26. Hubner N. C., Bird A.W., Cox J., Splettstoesser B., Bandilla P., Poser I., Hyman A., Mann M.: *J. Cell Biol.* 189, 739 (2010).
27. UniProt Consortium: *Nucleic Acids Res.* 38, D142, (2010).
28. Szklarczyk D., Franceschini A., Wyder S., Forslund K., Heller D., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Roth A., Santos A., Tsafou K. P., Kuhn M., Bork P., Jensen L. J., von Mering C.: *Nucleic Acids Res.* 43, D447 (2015).
29. Licata L., Orchard S.: *Methods Mol. Biol.* 1415, 55 (2016).
30. Helmann L. M., Fried M. G.: *Nat. Protoc.* 2, 1849 (2007).
31. Pagano J. M., Clingman C. C., Ryder S. P.: *RNA* 17, 14 (2011).
32. Holden N. S., Tacon C. E.: *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 63, 7 (2011).
33. Fried M. G., Bromberg J. L.: *Electrophoresis* 18, 6 (1997).
34. Steiner S., Pfannschmidt T.: *Methods Mol. Biol.* 479, 273 (2009).
35. Chudakov D. M., Matz M. V., Lukyanov S., Lukyanov K. A.: *Physiol. Rev.* 90, 1103 (2010).
36. Maier J., Traenkle B., Rothbauer U.: *Cancer Res.* 76, 5592 (2016).
37. Blouin S., Craggs T. D., Lafontaine D. A., Penedo J. C.: *Methods Mol. Biol.* 543, 475 (2009).
38. Bennett B. T., Bewersdorf J., Knight K. L.: *Methods* 48, 63 (2009).
39. Britton S., Coates J., Jackson S. P.: *J. Cell Biol.* 202, 579 (2013).
40. Mistrik M., Vesela E., Furst T., Hanzlikova H., Gursky J., Majera D., Bartek J.: *Sci. Rep.* 6, 19567 (2016).

L. Béresová^{a,b} and R. Lenobel^b (^a *Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc*, ^b *Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc*): **Advanced Approaches in Study of DNA-protein Interaction**

DNA-protein interactions play an essential role in many regulatory mechanisms such as replication, transcription or translation and are responsible for the maintenance of the genome integrity. Isolation, identification and subsequent characterization of the biological function of DNA binding proteins propose insight into the pathological mechanisms that underlie various diseases. This review brings an overview of methods used for isolation and identification of DNA binding proteins (DNA-affinity chromatography coupled with quantitative proteomics and mass spectrometry) and subsequent methods for the characterization of their biological functions (fluorescence microscopy). Principles, advantages and disadvantages of individual methods are briefly discussed.

PŘÍLOHA II

Beresova L., Vesela E., Chamrad I., Voller J., Yamada M., Furst T., Lenobel R., Chroma K., Gursky J., Krizova K., Mistrik M., Bartek J.: Role of DNA repair factor Xeroderma pigmentosum protein group C in response to replication stress as revealed by DNA fragile site affinity chromatography and quantitative proteomics. *Journal of Proteome Research* 2016, 15, 4505-4517.

Role of DNA Repair Factor Xeroderma Pigmentosum Protein Group C in Response to Replication Stress As Revealed by DNA Fragile Site Affinity Chromatography and Quantitative Proteomics

Lucie Beresova,^{†,‡} Eva Vesela,[†] Ivo Chamrad,[‡] Jiri Voller,[†] Masayuki Yamada,[†] Tomas Furst,[†] Rene Lenobel,[‡] Katarina Chroma,[†] Jan Gursky,[†] Katerina Krizova,[†] Martin Mistrik,^{*,†} and Jiri Bartek^{*,†,§,||}

[†]Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

[‡]Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

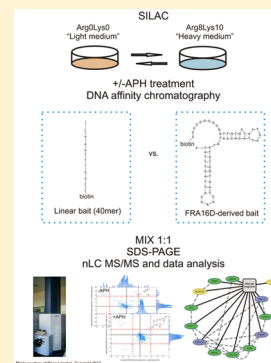
[§]Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen, Denmark

^{||}Science for Life Laboratory, Division of Translational Medicine and Chemical Biology, Department of Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

S Supporting Information

ABSTRACT: Replication stress (RS) fuels genomic instability and cancer development and may contribute to aging, raising the need to identify factors involved in cellular responses to such stress. Here, we present a strategy for identification of factors affecting the maintenance of common fragile sites (CFSs), which are genomic loci that are particularly sensitive to RS and suffer from increased breakage and rearrangements in tumors. A DNA probe designed to match the high flexibility island sequence typical for the commonly expressed CFS (FRA16D) was used as specific DNA affinity bait. Proteins significantly enriched at the FRA16D fragment under normal and replication stress conditions were identified using stable isotope labeling of amino acids in cell culture-based quantitative mass spectrometry. The identified proteins interacting with the FRA16D fragment included some known CFS stabilizers, thereby validating this screening approach. Among the hits from our screen so far not implicated in CFS maintenance, we chose Xeroderma pigmentosum protein group C (XPC) for further characterization. XPC is a key factor in the DNA repair pathway known as global genomic nucleotide excision repair (GG-NER), a mechanism whose several components were enriched at the FRA16D fragment in our screen. Functional experiments revealed defective checkpoint signaling and escape of DNA replication intermediates into mitosis and the next generation of XPC-depleted cells exposed to RS. Overall, our results provide insights into an unexpected biological role of XPC in response to replication stress and document the power of proteomics-based screening strategies to elucidate mechanisms of pathophysiological significance.

KEYWORDS: DNA affinity chromatography, SILAC proteomics, common fragile sites, replication stress, FRA16D, mitosis, 53BP1 bodies, γ H2AX, DNA damage response, Xeroderma pigmentosum complementation group C (XPC) protein



I INTRODUCTION

Common fragile sites (CFSs) are defined as a nonrandom distribution of breaks, gaps, and constrictions visible on metaphase chromosomes, especially under conditions of replication stress.¹ These sites are conserved among diverse mammalian species² and have been intensively studied mainly owing to their association with chromosomal aberrations (deletions, translocations, amplifications) that are found in many types of cancer³ and may play a causative role in tumorigenesis.⁴

The molecular basis of CFS-associated chromosomal instability has been partially explained through structural analyses. Many CFSs contain AT-rich stretches that form highly flexible sequence islands. The common feature of all these atypical sequences is the formation of unusual secondary DNA structures that have been shown to compromise DNA replication in vitro.^{5,6} Furthermore, an increased occurrence of

replication fork collapse and DNA double strand break (DSB) formation in the flexible islands were reported for a yeast model with artificially introduced human CFS, FRA16D, upon replication stress.⁷ An additional explanation for CFSs' instability may reflect frequent collisions between DNA replication and transcription machinery due to very large genes located in some of the CFSs.⁸

Aphidicolin (APH), an inhibitor of DNA polymerases α and ϵ is the most potent inducer of the majority of known CFSs and is used at a concentration that slows but does not arrest replication fork progression.^{9,10} Such a RS scenario induces long stretches of single-stranded DNA as a consequence of the inhibited DNA polymerases lagging behind the advancing DNA helicase during DNA replication.¹¹ The cellular response to RS

Received: July 4, 2016

Published: October 30, 2016

and stabilization of CFSs involves multiple cellular factors as also documented by spontaneous expression of CFSs in cells from patients with genetic instability disorders such as Seckel syndrome.¹² Furthermore, genetic models based on experimental knock-down of checkpoint and/or DNA repair proteins like ATR or Chk1 kinases,^{13,14} BRCA1,¹⁵ FANCD2,¹⁶ SMC1,¹⁷ WRN,¹⁸ and MSH2¹⁹ show enhanced APH-induced CFS expression. Importantly, oncogenic stress evoked by mutated RAS,²⁰ Cyclin E, and E2F²¹ overexpression leads to CFS-associated instability and deletions, and rearrangements in CFS areas are often detected in human premalignant lesions and xenografts experiencing high oncogenic activity.^{22–24}

The roles of the aforementioned factors in the protection against fragility of CFSs were mostly discovered using methods of visual detection of chromosomal breaks and gaps on mitotic spreads. Several reports also utilized chromatin immunoprecipitation followed by quantitative PCR that allowed the detection of the studied protein at the CFS sequences.^{25,26} Nevertheless, an unbiased proteome-wide screening for identification of new protein candidates that could contribute to CFS maintenance has not been reported.

As shown recently, quantitative mass spectrometry in combination with nucleic acid-based affinity chromatography is a powerful tool for proteome-wide screens of specific DNA and RNA binding proteins pointing to new protein candidates for deeper functional characterization.^{27–29} In this regard, stable isotope labeling of amino acids in cell culture (SILAC) appears to be a method of choice that is straightforward, minimizes chances of bias caused by sample processing errors, and allows simple distinguishing of specific interactors from background binding proteins.^{30,31} Here, we present a new strategy combining DNA-affinity chromatography with SILAC and mass spectrometry to isolate potential CFS protein interactors. Besides the advantages mentioned above, SILAC allowed us not only to identify CFS binding factors but also to distinguish between those bound under normal unperturbed cell growth and those enriched under conditions of APH-evoked replication stress. The results obtained with our combinatorial screening approach and functional characterization of XPC as a surprising new factor involved in CFS stability and overall cellular response to RS are presented below.

MATERIALS AND EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals

All chemicals used in this study were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich unless stated otherwise.

Cell Culture

In this study, the following human cell types were used: cervical cancer cell line (HeLa S3; ATCC), normal diploid fibroblast strain (TIG3, ATCC), and osteosarcoma cell line (U-2 OS; ATCC).

For the SILAC screen, HeLa S3 cells were grown in RPMI 1640 medium with omitted lysine and arginine (Biowest) supplemented with 10% dialyzed fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin solution. For quantitative SILAC-based MS analysis, the RPMI 1640 medium was supplemented separately with L-arginine and L-lysine (Arg⁰, Lys⁰) or L-[U-¹³C₆, ¹⁵N₄]arginine, L-[U-¹³C₆, ¹⁵N₂]lysine (Arg¹⁰, Lys⁸) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). After five cellular doublings, the success rate of protein labeling was verified by in-solution digestion and a shotgun LC-MS/MS analysis.

The other cell types were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. The doxycycline-inducible shRNA ATR knockdown model in the U-2 OS cell line was characterized previously.³²

Affinity Ligands and Immobilization on Chromatography Media

As an affinity ligand mimicking CFS, an oligonucleotide with the sequence (5'-3') CCC CCC CCC GAT TGT GAT AAT CAT TAC ACA ATG TAT ATA GTA ATC AAA TCA TTA CTT TAT was used. With the exception of the first nine cytosines that served as a linker, the sequence corresponds to a part of the common fragile site FRA16D.⁷ The ability of the sequence to form the same secondary structures as the corresponding part of FRA16D was tested in the Mfold program.³³ Default parameters were modified to reflect our experimental conditions (150 mM Cl⁻, 1 mM Mg²⁺, 4 °C).

As a second ligand, a control oligonucleotide with linear structure, oligonucleotide (5'-3') CAA ATT TTA GCC AGT CAT CCC ATA GTA TCG TCC GTT CAA G, was used. The oligonucleotide should not be able to form stable secondary structure and was designed in silico as follows.

One million random 40-mers were generated and T_m (melting temperature) of the most stable secondary structure was calculated in MFold (settings same as above). Five percent of sequences with the lowest T_m were selected, and all of the 20 bp subsequences were extracted. Another set of 40-mers was created by concatenation of random pairs from this pool. For avoiding the creation of oligonucleotides deprived of certain nucleotides or dominated by repetitions, sequences with the lowest variability (expressed as entropy) at the level of mono-, di-, tri-, and tetranucleotides were removed. After 20 rounds of this "selection" and "recombination", 100 40-mers with the lowest T_m together with their reverse sequences were selected for closer inspection. Sequences predicted to interact with single strand binding transcription factors by Transcription Element Search System web service³⁴ were removed. Final selection took into consideration the following parameters: T_m of the most stable structure, number of structures predicted by MFold, and sequence variability. The selected 40-mer is not able to form any structure with negative ΔG , and the corresponding T_m are lower than -47 °C.

Both oligonucleotide sequences were custom synthesized and modified with biotin at the 5' end (Generi Biotech). Affinity beads were prepared by immobilization of the oligonucleotides to streptavidin-covered magnetic beads (Chemicell) according to the manufacturer's instructions. Briefly, SIMAG-streptavidin beads (1 mg) were washed three times with 1 mL of citrate buffer (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate, pH 7.0) and resuspended in 0.5 mL of citrate buffer. Then, 200 pmol of the specific oligonucleotide was added, and immobilization was performed at room temperature under slow rotation of the beads in 15 min. Unbound oligonucleotides were removed by washing of affinity beads with three volumes of the citrate buffer. Before use, the prepared affinity beads were finally equilibrated to a starting condition for DNA affinity chromatography with 1 mL of a binding buffer (25 mM HEPES with 150 mM NaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.5) at 4 °C under slow rotation for 15 min.

Preparation of Cell Lysate and DNA Affinity Chromatography

Two differently labeled HeLa S3 cell populations, marked as light and heavy, were both cultivated with or without the presence of APH for induction of replication stress. In the first experiment, the light and heavy labeled cell populations were cultured under normal growth conditions and subsequently used in the SILAC comparative analysis of specific CFS binding proteins enriched by DNA affinity chromatography on the FRA16D fragment and control beads covered by the linear oligonucleotide. In the second experiment, both labeled cell populations were exposed to 0.4 μ M APH for 24 h before harvesting and also employed for the isolation of specific CFS binding proteins in the same way as in the first experiment.

Briefly, HeLa S3 cells, light and heavy, were harvested, and the cellular pellets were resuspended in a buffer from a NEPER nuclear and cytoplasmic extraction kit (Thermo Scientific) for isolation of nuclear proteins. The concentrations of isolated nuclear proteins were determined by Bradford protein assay (Biorad) with BSA as a standard. Equal amounts of nuclear proteins (1 mg) isolated from light and heavy cell populations were mixed with 1 mL of the binding buffer and incubated with affinity beads containing either the FRA16D fragment or a control linear sequence. The association of the nuclear proteins with oligonucleotide beads was performed at 4 °C under continuous slow vertical rotation for 1 h. After the interaction of the proteins with oligonucleotide baits, the unbound proteins were removed by washing of the beads with 1 mL of the binding buffer (repeated five times). The retained proteins were eluted from the beads directly by the addition of 25 μ L of SDS-PAGE sample buffer and boiling at 95 °C with continuous shaking for 10 min. The eluates were carefully removed from the beads and mixed 1:1. All affinity experiments were performed in two independent biological replicates. In one replicate, the FRA16D fragment was incubated with the heavy labeled nuclear proteins, and to the beads with control linear sequence, the light labeled nuclear proteins were added. In the second replicate, the labeled protein extracts added to the resins were swapped. The same SILAC comparative experiment with beads covered by the FRA16D fragment and control linear sequence was carried out with both HeLa S3 cell populations exposed to 0.4 μ M APH for 24 h. This experiment was repeated in two independent biological replicates with swapping of the labeled nuclear proteins added to the affinity beads as well.

Protein Separation and Digestion

Proteins retained and eluted from both oligonucleotide affinity beads (FRA16D fragment sequence vs linear control sequence) were mixed in a 1:1 ratio, separated on 4–16% BIS-TRIS SDS-PAGE gradient gels (Biorad), and stained with colloidal Coomassie Blue. Each sample line was divided into 13 fractions, which were further cut into small pieces. Then, proteins were destained, reduced with DDT, and subsequently alkylated with iodacetamide and digested with rafinose-modified trypsin overnight.^{35,36} The released peptides were extracted from the gel pieces with 5% formic acid in 30% acetonitrile (v/v) and purified using C18 StageTips.³⁷

Nanoflow Liquid Chromatography Mass Spectrometry

The desalted peptides were analyzed by nanoflow liquid chromatography (nanoEASY-nLC System; Thermo Fisher Scientific) coupled to a UHR-Q-TOF maXis instrument equipped with online nanoESI source (Bruker Daltonics).

Peptides loaded on a precolumn (2 cm \times 75 μ m packed with ReproSil-Pur C18-AQ 5 μ m resin) were eluted and separated on an analytical column with a multistep gradient at a flow rate of 200 nL/min for 185 min. The gradient was created by mixing of 0.4% (v/v) formic acid (solvent phase A) and 0.4% formic acid in 80% acetonitrile (v/v) (Table S-1). The analytical column was prepared in a 15 cm fused silica emitter with an inner diameter of 75 μ m (New Objective) packed in-house with reverse phase ReproSil-Pur C18-AQ 3 μ m resin (Dr. Maisch GmbH). The MS instrument was operated in data-dependent acquisition mode using the top five precursors with charge states \geq 2. The selected precursors were fragmented with the use of collision-induced dissociation. The fragmented precursors were dynamically excluded for 18 s. Detailed settings of the MS analyzer are described in the Supporting Information. Each sample was analyzed in two technical replicates.

Data Processing

The collected raw data were processed using the DataAnalysis v 4.2 SP1 software (Bruker Daltonik). The XML files containing precursor and fragmentation data were created and used for consequent bioinformatics analysis. The XML files were uploaded to ProteinScape v 2.1 and searched by Mascot v2.2.07 (in-house server; Matrix Science) against a custom-prepared database containing human proteins downloaded from UniProt (20150107, 89706 seq; www.uniprot.org) supplemented with common contaminants (keratins, trypsin, bovine serum albumin) and reversed sequences of all human proteins for the determination of false discovery rate (FDR). The Mascot search was carried out with the following parameters: MS and MS/MS tolerances were set to \pm 25 ppm and \pm 0.05 Da, respectively; protease specificity was set to trypsin, and one missed cleavage was allowed; carbamidomethylation of cysteine was set as a fixed modification, and N-terminal protein acetylation, methionine oxidation, and heavy labeled ¹³C(6)¹⁵N(2)lysine and ¹³C(6)¹⁵N(4)arginine were set as a variable modification. Proteins identified by Mascot algorithm were subsequently processed in ProteinScape v2.1 with the following parameters: a minimum of two peptides with a score \geq 15 and the FDR at 5% at the protein level were needed to accept protein identification. From the list of identified proteins, only those associated with at least three quantified peptide pairs were considered as quantifiable proteins and used for subsequent bioinformatics analysis.

The relative ratios of quantified proteins identified in both forward and reverse label-swap experiments were normalized by log₂ transformation and plotted in a scatter plot. For significant differences in relative protein abundance, the normalized ratios of the proteins were statistically evaluated for their normal distribution, and protein abundance was considered as significantly different ($p < 0.01$) in the case of ratios differing from the mean by 2.58 σ as determined from the normalized ratio distributions of the biological replicate analyses.³⁸ Such proteins, clustered at the right top corner of the scatter plot, represent candidates for FRA16D fragment-specific interactors.

Gene Ontology Annotation Analysis

To determine the significantly enriched gene ontology (GO) molecular function and biological process terms related to FRA16D fragment-associated proteins, ClueGO,³⁹ a Cytoscape⁴⁰ plug-in, was employed. A two-sided minimal-likelihood test on the hypergeometric distribution, an equivalent to the classical Fisher's exact test, was utilized for the enrichment

analysis with the human genome set as a background gene population. The *p*-values for all enriched GO terms were adjusted with the Benjamini–Hochberg correction method.

Antibodies

For immunoblotting, the following antibodies were used: XPC (Novus Biological, NB100-477, 1:1000), pChK1 (Ser345, Cell Signaling, 2348, 1:500), ChK1 (Santa Cruz, sc-8408, 1:500), GAPDH (GeneTex, GTX30666, 1:2000), and MCM7 (Santa Cruz, sc-65469, 1:100). HRP-conjugated secondary antibodies were as follows: antimouse (GE-Healthcare, NA931 V, 1:1000), antirabbit (GE-Healthcare, NA934 V, 1:1000), and antigoat (Santa Cruz, sc-2020, 1:1000).

For immunofluorescence microscopy, the following primary antibodies were used: ATR (Santa Cruz (N-19) sc-1887, 1:250), ATRIP (Cell Signaling, 2737, 1:250), γ H2AX (pSer139, Millipore, 07-146, 1:500), 53BP1 (Santa Cruz, sc-22760, 1:500), Cyclin A (Leica, NCL-cyclinA, 1:200), and pH3 (pSer10, Millipore, 06-570, 1:1000). Secondary antimouse and antirabbit antibodies were Alexa Fluor 488 (A11001) and Alexa Fluor 568 (A11036) (Invitrogen, 1:1000).

Immunoblotting

For the analysis of checkpoint response, the same amounts of cells were resuspended in the SDS-PAGE sample buffer and incubated at 95 °C for 8 min with shaking (1400 rpm). The samples were resolved by SDS-PAGE (4–15% gradient) (Biorad) and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane for immunoblotting detection by specific antibodies.

Gene Silencing

siGenome Human XPC (7508) siRNA SMART pool was purchased from Dharmacon (Cat. No. M-016040-01-0010), and transfection was conducted using siRNA MAX (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. As a control siRNA, GGCUACGUCCAGGAGCGCACC from Eurofin MWG operon or siGenome RISC FREE control siRNA from Dharmacon (Cat. No. D-001220-01-05) were used. Both control siRNAs were tested to exclude cytotoxicity using the colony formation assay.

Biochemical Analysis of XPC Ubiquitination upon APH Treatment

U-2 OS were transfected with siXPC pool or control siRNA. Two days after the transfection, the cells were treated with 0.4 μ M aphidicolin for 24 h and subjected to lysis or biochemical cell fractionation and then analyzed by immunoblotting as previously described.⁴¹ The primary antibody used in this study was against XPC (Novus Biological, NB100-477).

Fluorescence Microscopy

Immunofluorescence Detection of DDR Factors. The transfected cells were seeded in 24 well plates and treated with 0.4 μ M APH or 0.5% DMSO 24 h before fixation. The cells were either fixed directly with 10% formalin, followed by 5 min permeabilization with 0.5% TritonX (staining for 53BP1, cyclin A), or fixed after pre-extraction (ATR, ATRIP). Samples were stained with primary antibodies at 4 °C overnight and then with secondary antibodies at room temperature for 1 h and incubated with Hoechst 33342 at room temperature for 5 min before mounting. Images were automatically recorded using an inverted fluorescence microscope BX71 (Olympus) and ScanR Acquisition software (Olympus), analyzed with ScanR Analysis software (Olympus), and evaluated with Statistica software (StatSoft). On the basis of DNA cyclin A

staining, the cell population was gated to G1 (cyclin A negative cells). Number of foci or signal intensity of respective markers was counted. Each experiment was performed with at least three biological replicates.

Immunofluorescence Analysis of Mitotic Cells. The transfected cells were seeded in a 24-well plate and treated with either 0.4 μ M APH or 0.5% DMSO for 24 h. After treatment, the cells were fixed with 10% formalin, permeabilized by 0.5% Triton X, and stained for the specific markers. Images were taken using an inverted fluorescent microscope (Zeiss Observer Z.1, 63 \times oil objective). The plates were placed onto the sliding table of the microscope and automatically scanned. On the basis of phospho-H3 marker positivity, approximately 150 mitotic cells were chosen and subsequently scanned for phospho-H2AX (γ H2AX) foci. γ H2AX foci were analyzed in custom-made software implemented in MatLab. Each experiment was performed with at least three biological replicates.

Flow Cytometry Analysis of pH3-Positive Cells

The transfected cells were seeded on 6 cm diameter Petri dish and treated with 0.2 μ M APH, 0.4 μ M APH, or 0.5% DMSO 24 h before fixation with 100 ng/mL of nocodazole added 6 h before fixation. The cells were trypsinized, fixed with cold (4 °C) 10% formalin for 15 min at RT, and permeabilized with 0.5% Triton X for 5 min. Samples were stained with the primary antibody against pH3 for 1 h at RT and then with the secondary antibody for 1 h. Cells were centrifuged and resuspended in PBS + 2% FBS with 0.5 μ g/mL of DAPI. Samples were analyzed with the BD FACSVerser flow cytometer, and pH3-positive cells were gated as indicated in Figure S-4.

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental Strategy for the Identification of Potential CFS Interactors

The main goal of this work was to identify candidate CFS binding proteins and provide further insight into the biological function of selected hits. To perform the first unbiased proteome screen that would allow the detection of proteins bound to the structurally specific CFS sequence, we designed and performed DNA affinity chromatography²⁸ in combination with SILAC-based quantitative proteomics^{42,43} (Figure 1).

The crucial step of our experimental approach was the DNA affinity chromatography that demanded the design and synthesis of baits suitable for isolation of specific CFS interacting proteins. We based our bait on the concept that CFSs arise as a consequence of specific DNA sequences, which under replication stress create stable secondary structures that are difficult to replicate. Thus, we used a fragment mimicking the high-flexibility island within the well-characterized CFS, FRA16D,⁷ as the specific DNA bait. The ability of this sequence to form the hard-to-replicate secondary structure under our experimental conditions was verified in the Mfold program,³³ (for the final form, see Figure S-1). For distinguishing the candidate-specific CFS interactors from common DNA binding proteins, control bait with linear structure was designed and employed in parallel. Moreover, the nucleotide order was selected in a way to avoid resemblance with known promoters (for further details on control bait construction, see the Experimental Procedures). Both baits were modified at the 5' end by adding biotin to facilitate their immobilization to streptavidin-covered magnetic beads. To identify FRA16D

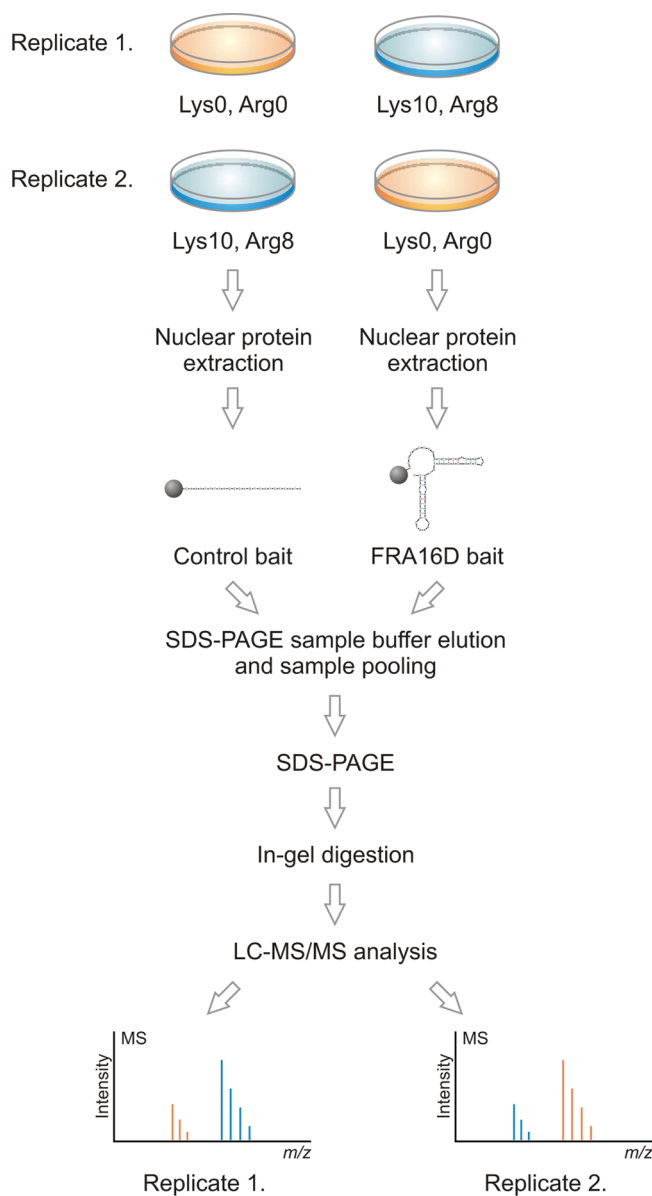


Figure 1. Experimental strategy for identification and quantification of specific FRA16D fragment interactors. Cells were grown in the SILAC “heavy” and “light” medium. The extracts of nuclear proteins were added to the resins covered by a specific FRA16D fragment as a bait and control linear sequence. After the affinity purification step, the eluates were mixed 1:1, separated by SDS-PAGE, and in-gel digested. Resulting peptide mixtures were analyzed by LC-MS/MS. The workflow was performed with cells cultured under normal conditions and also upon $0.4 \mu\text{M}$ APH for 24 h.

fragment binding proteins, we used the following experimental strategy.

First, we performed an experiment to obtain a list of nuclear proteins interacting with the FRA16D fragment-specific bait from lysates of HeLa S3 cells grown under normal conditions. In the next experiment, the HeLa S3 cells were exposed to replication stress induced by $0.4 \mu\text{M}$ APH, a concentration of the drug that reliably induces CFS expression.^{9,10} Importantly, a comparison of FRA16D fragment interactors from cells under normal versus replication stress conditions revealed multiple interacting proteins (Figure 2), some of which have not yet been associated with CFS biology.

Analysis of CFS-Enriched Proteins

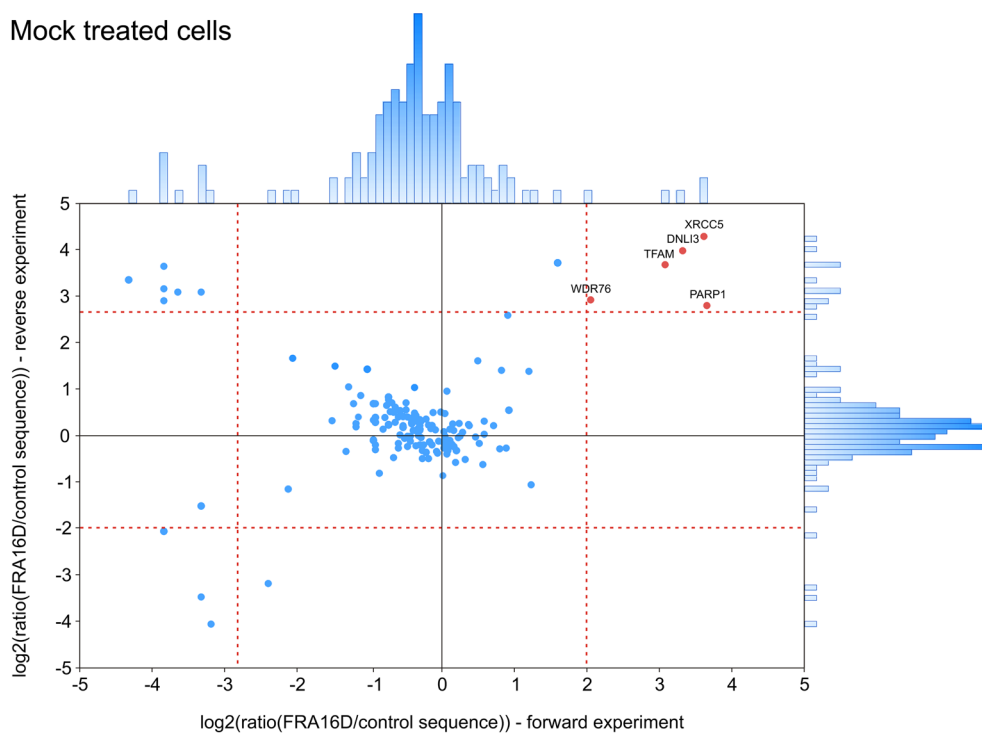
Using a stringent threshold for FDR at less than 5%, we identified in total 655 and 282 proteins binding to the FRA16D bait in APH-treated and control cells, respectively. Protein ratios for FRA16D fragment-specific versus control bait beads could be assessed for at least 559 and 228 proteins from the above two groups, of which 410 and 150 were detected in independent biological replicates. As documented by scatter plots of \log_2 transformed ratios (Figure 2), 13 distinct proteins appeared to specifically and robustly interact with the FRA16D fragment but not with the control bait.

Among these 13 selected hits, two and eight proteins were bound to FRA16D exclusively under normal and APH-induced stress conditions, respectively, and three proteins interacted with FRA16D under both conditions (Figure 3). A validation in the form of a proof of principle for our screen was provided by the following two results. First, examination of the GO annotations of the candidate CFS binders revealed a high enrichment of proteins involved in binding to various DNA structures and proteins implicated in mechanisms responsible for genome maintenance (Figure 4A and B). This is in agreement with the use of structured DNA as the specific bait. A second and possibly even more important validation was provided by the fact that our list of 13 hits included Werner helicase (WRN) and mismatch repair protein 2 (MSH2), both proteins previously characterized for their biological functions in the maintenance of CFS stability.^{18,19}

According to the Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis, our 13 selected candidate FRA16D interactors play roles in several DNA repair pathways, including nonhomologous end-joining (NHEJ), mismatch repair (MMR), base excision repair (BER), and nucleotide excision repair (NER) (Figure 4C). The last mentioned, NER, is the pathway that operates anywhere within the genome to eliminate “bulky” DNA lesions.⁴⁵ DNA damage-binding protein 1 (DDB1), XPC, and Centrin-2 (CETN2) form the so-called initiation complex of global-genome NER (GG-NER), whereas XRCC1 and LIG3 are involved in sealing nicks or gaps after excision of the nucleotides.^{46–49} Our observation that these proteins together accumulate at the FRA16D fragment under replication stress conditions together with their high interconnectivity (Figure 3) may suggest that GG-NER could be involved in resolution of DNA structures that occur within CFS regions under replication stress.

The GG-NER initiation is supported by XPC ubiquitylation, which is promoted by the UV-DDB-ubiquitin ligase complex.⁴⁷ This UV-DDB-mediated recognition of DNA damage by XPC is particularly observed in the case of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers and lesions that cause low distortion of DNA helix,⁵⁰ whereas direct recognition of (6–4) pyrimidine-pyrimidone photoproducts and some other lesions caused by chemical adducts could be UV-DDB independent. To verify whether the DNA structures created upon APH treatment in CFS loci are recognized through a process that involves XPC ubiquitylation, we performed cell fractionation and assessed the ubiquitylation status of chromatin-bound XPC after APH treatment through the electrophoretic mobility of XPC. In contrast to UV-induced ubiquitylation-mediated electrophoretic mobility shift, XPC did not show such altered mobility upon treatment of cells with APH (Figure S-2), indicating a mechanism distinct from the UV response and potentially direct recognition of these replication barriers by XPC.

A. Mock treated cells



B. APH treated cells

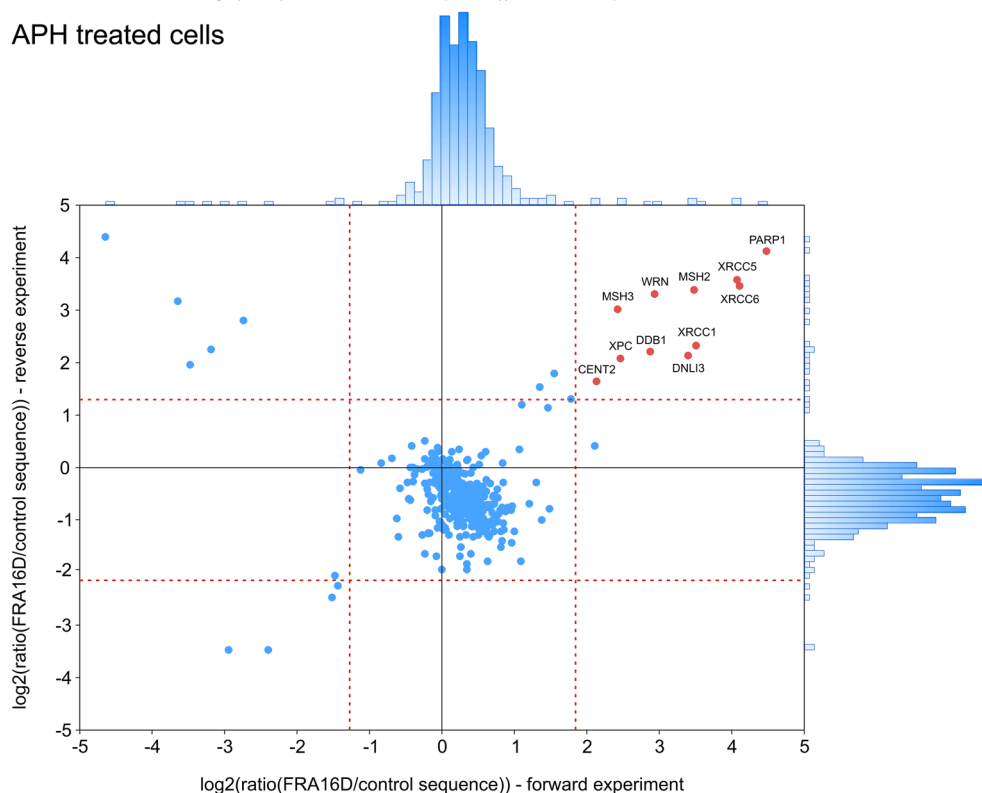


Figure 2. Determination of FRA16D fragment interaction partners. Graphs contain logarithmic ratios from both replicates “forward” H/L and “reverse” L/H plotted against each other. The specific FRA16D fragment interactors are clustered in the upper right corner (red points) because of the high ratio in both replicates of the experiment. Background proteins are centered to the origin with a 1:1 ratio in both replicates, and contaminants are observed in the upper left corner with a high ratio in the light form in both repetitions. (A) Cells cultured under normal conditions. (B) Cells exposed to 0.4 μ M APH for 24 h.

Recent studies indicate that XPC is not only the main initiator of NER, but thanks to its substrate versatility, it seems to be a general sensor of aberrant structures such as DNA cross-links and various “DNA bubbles”^{51,52} with the potential to be involved in other cellular mechanisms besides NER.⁵³ It

was shown that XPC plays a role in the elimination of oxidative damage by regulating BER,^{54,55} in chromatin remodeling and checkpoint response,^{56,57} in regulation of transcription,⁵⁸ and in the maintenance of telomere stability.⁵⁹ On the basis of these emerging reports, we next developed an automated approach to

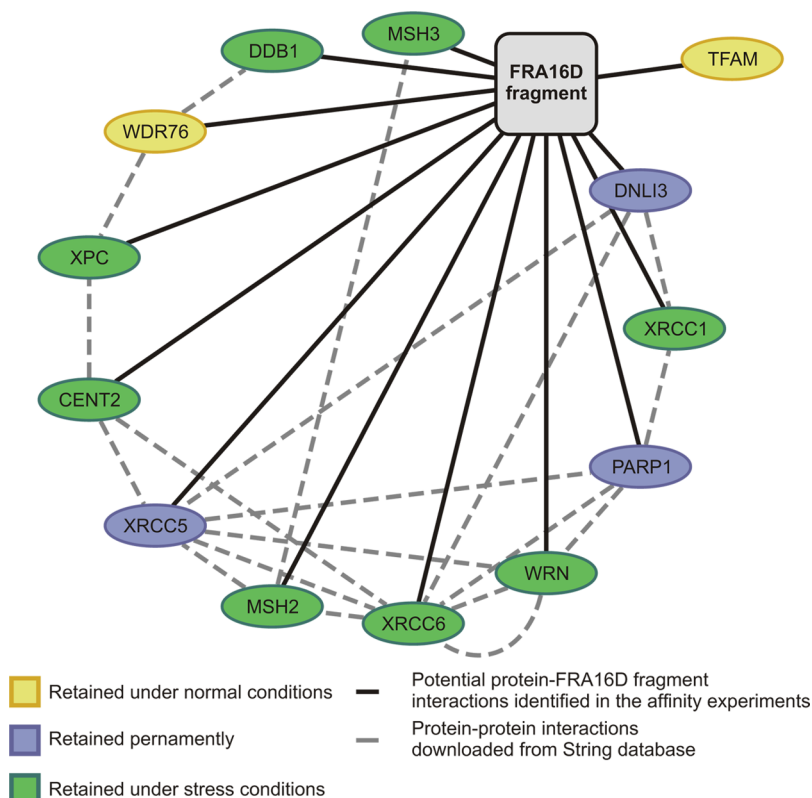


Figure 3. FRA16D fragment retained proteins and their mutual interactions. Interaction network for the proteins specifically enriched by the FRA16D fragment under normal and replication stress conditions. The depicted interactions were drawn in Cytoscape software⁴⁰ after importing the data from Figure 2 and downloading the protein–protein interactions from the String database.⁴⁴

assess mitotic CFSs and tested the possibility that CFS regions (especially under replication stress) generate some secondary DNA structures that are “sensed” by XPC.

Method for Automated Evaluation of CFS Expression in Mitosis

The involvement of proteins in the maintenance of CFS stability is usually determined by scoring for chromosomal aberrations under unperturbed control and replication stress conditions with the protein of interest either absent (mutant, deleted, or knocked down) or overexpressed. For better resolution of individual CFS regions, Giemsa staining or the FISH method on mitotic spreads is usually used.^{14,16,18} A major technical shortcoming associated with such standard approaches is high demand for the quality of mitotic spreads. Furthermore, such evaluations are very time-consuming, and a subset of smaller lesions may remain undetected. For these limitations to be overcome, a more precise method for the detection of phosphorylated histone H2AX (γ H2AX) in mitosis was developed⁶⁰ and further optimized in our present project for our purposes (Figure S-5). γ H2AX foci are commonly accepted as a marker of DNA double-stranded breaks,⁶¹ and quantification of γ H2AX immunofluorescence signal intensity, or rather the number of foci, can be used to estimate the extent of DNA damage or repair kinetics.⁶²

Our quantitative method for CFS expression is principally based on the fact that, in APH-treated human lymphoblasts, the 20 most expressed CFSs account for 80% of all detectable mitotic DNA double strand breaks.¹ Because these mitotic breaks are marked by the γ H2AX signal (Figure S-5A), the overall quantification of γ H2AX foci in mitosis after APH treatment correlates with CFS expression. Our method was

further optimized by combined immunofluorescence staining for γ H2AX and serine 10-phosphorylated histone H3 (pH3), the latter a recognized marker of mitosis. Such a setup allows for high throughput analysis using automated microscopy-based detection of mitotic cells within the cell population followed by detailed γ H2AX foci scoring selectively in the mitotic cells (Figure S-5B). The feasibility of our method for identification of factors involved in CFS stability was validated in a cellular model allowing inducible knockdown of ATR by shRNA. APH treatment resulted in an increase of γ -H2AX in mitotic cells that was strongly augmented after ATR depletion (Figure S-5C), consistent with published data regarding the ATR kinase and its involvement in CFS stability.¹³

XPC Participates in Replication Stress-Induced DNA Damage Response and in the Maintenance of CFS Stability

For testing if XPC plays a role in CFS stability, the human U-2 OS cells depleted of XPC by RNAi-mediated knockdown were treated with 0.4 μ M APH for 24 h. The mitotic γ H2AX foci were quantified by the automated routine described above. Surprisingly, in an analogous experiment as with ATR knockdown, XPC deficiency caused a significant decrease in the number of γ H2AX foci after APH treatment (Figure 5A,B). This observation has two possible explanations. Either the depletion of XPC leads to such a prominent form of CFS-associated instability that the G2/M checkpoint blocks such cells from mitotic entry or the CFS-associated aberrant DNA structures are sensed by a cellular mechanism that may involve XPC and that is required for the signaling from such aberrant DNA structures and thereby for generation of the ensuing enhanced γ H2AX signal. To address this intriguing observation further, we also compared the number of γ H2AX foci in XPC-

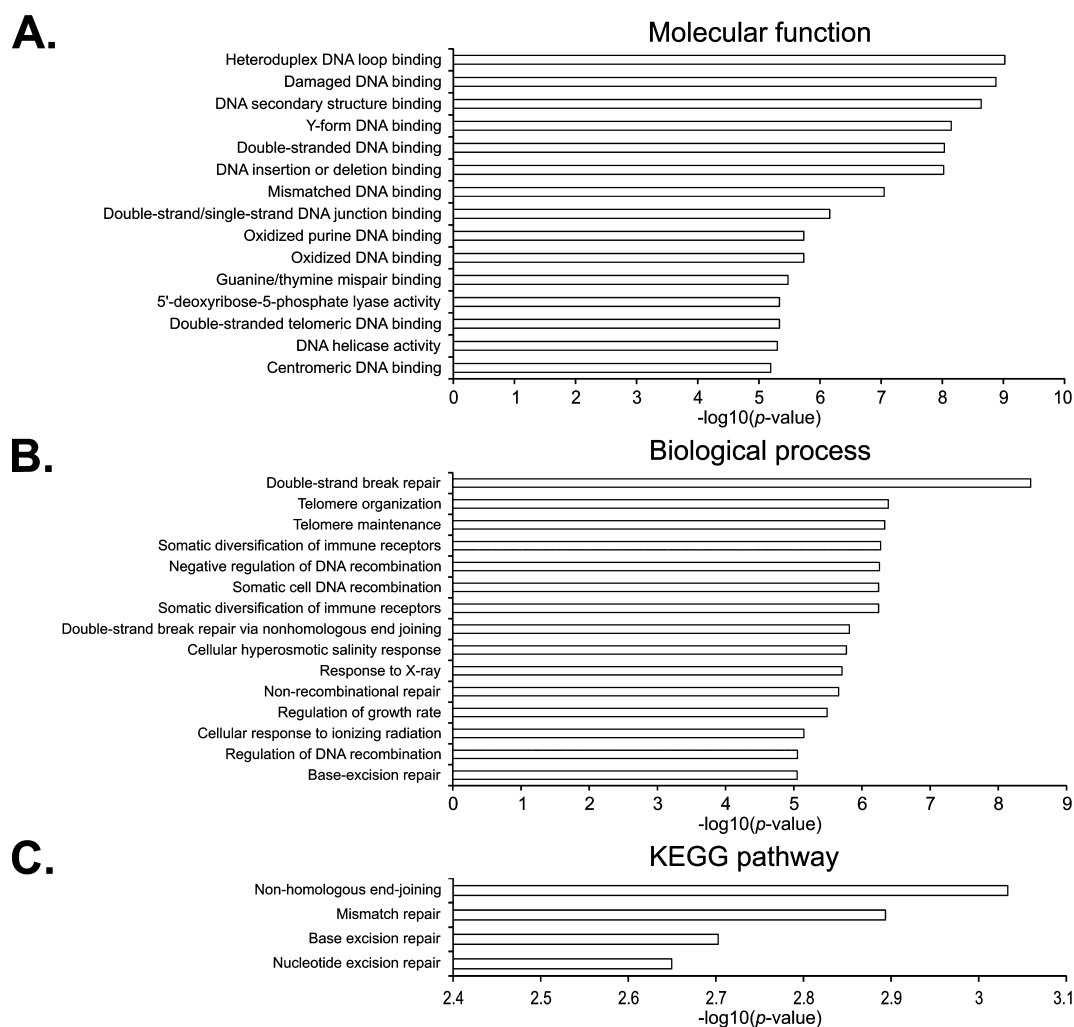


Figure 4. Gene ontology annotation enrichment analysis of identified FRA16D fragment interaction partners. Most significantly enriched terms of identified interaction proteins reveal structured DNA affinity, DNA damage signaling, and repair signatures as depicted in the graphs. (A) Molecular functions, (B) biological functions, and (C) significantly enriched KEGG pathways with significance expressed as $-\log_{10}$ of the respective p values.

depleted and ATR/XPC codepleted U-2 OS mitotic cells after APH treatment. XPC depletion resulted in decreased γ H2AX foci in mitotic cells compared to that in control mock-depleted cells (Figure S-6). In addition, depletion of XPC in cells codepleted for ATR further decreased the number of γ H2AX foci in mitotic cells compared to cells depleted of ATR alone (Figure S-6).

Given that ATR is the major checkpoint kinase whose signaling ensures arrest of cells with damaged DNA at the G2/M boundary,⁶³ we argued that the observed decrease or loss of mitotic γ H2AX signaling might reflect a previously unrecognized positive role of XPC in promoting checkpoint signaling within CFSs. On the basis of our results with mitotic γ H2AX, we suggest the possibility that XPC may bind to stalled replication forks to initiate incision of the DNA structures, which are difficult to replicate, such as the high-flexibility islands within CFSs. The XPC-driven incision process could then initiate and/or contribute to activation of the DDR signaling and create structures marked by γ H2AX foci in mitosis. Thus, in the absence of XPC, at least a fraction of stalled replication forks are not turned into such “visible” lesions, leading to insufficient checkpoint response documented here by the impaired γ H2AX signal. Provided that this proposed scenario is correct, XPC-deficient cells exposed to

replication stress should accumulate unresolved replication fork intermediates, particularly in the vulnerable genomic loci in the vicinity of CFSs. Importantly, ineffective checkpoint signaling due to XPC depletion would make such cells largely unresponsive (“blind”) to the accumulating aberrant and potentially hazardous structures at CFSs and allow entry into mitosis despite the danger of breaking the chromosomes.

To test if such unresolved abnormal replication intermediates are indeed present and transferred through mitosis to the next cell generation, we scored the so-called 53BP1 bodies in G1 cells, a commonly recognized feature of cells undergoing enhanced replication stress in the previous cell cycle.⁶⁴ Mechanistically, unresolved aberrant underreplicated loci that escape into mitosis may result in DNA double strand breaks during mitosis and then were recognized and stabilized in early postmitotic daughter cells by 53BP1 and related proteins, forming the microscopically recognizable G1 53BP1 bodies.⁶⁴

Indeed, quantification of 53BP1 bodies in G1 cells in our experiments revealed a significant increase in the XPC-depleted cells upon 0.4 μ M APH treatment, a result which is fully in line with the above hypothesis (Figure 5C,D).

On the basis of the obtained data, we conclude that XPC participates in detection and/or resolution of replication

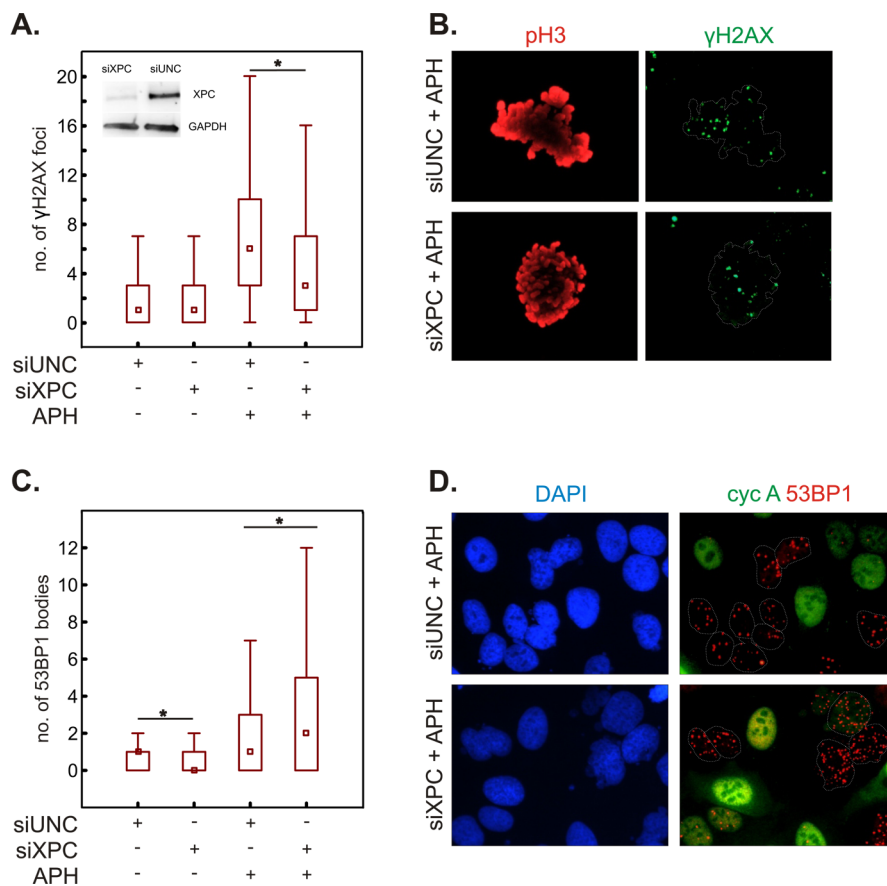


Figure 5. Analysis of DNA damage in XPC-depleted cells. Replication stress-induced DNA damage signaling is significantly altered in XPC-silenced cells. (A) Immunofluorescence detection shows a significant decrease of γ H2AX foci signal in XPC-depleted mitotic cells. (B) Illustrative pictures depicting the evaluation based on pH3 immunostaining of mitotic cells and γ H2AX foci. (C) Immunofluorescence detection shows a significant increase in G1 phase-associated 53BP1 bodies in XPC-depleted cells. (D) Illustrative pictures depicting the evaluation based on immunostaining of the S-G2 marker (Cyclin A) and 53BP1 bodies. Only cells negative for Cyclin A (encircled) were analyzed. The asterisks mean significance with a p -value < 0.05.

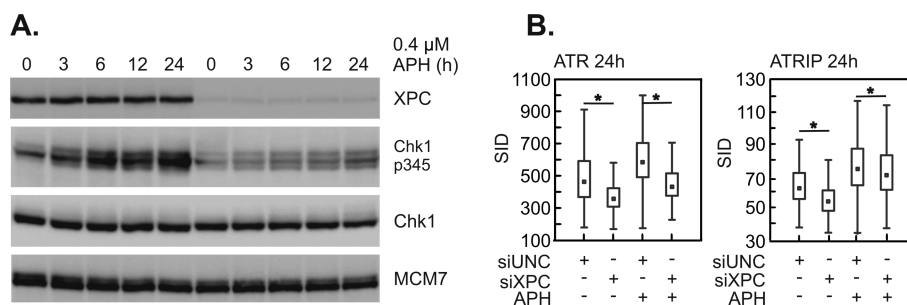


Figure 6. ATR-promoted checkpoint signaling is altered in XPC-depleted cells. (A) Western blot-based analysis of impaired phosphorylation of direct ATR target Chk1 in XPC-silenced cells. Cells were treated by APH and harvested at various time points. MCM7 served as a loading control. (B) Microscopy-based quantification of ATR and ATRIP recruitment to the chromatin shows a significant decrease in XPC-silenced cells under normal conditions and also after APH-induced replication stress.

barriers arising at CFS regions and promotes checkpoint activation.

XPC Influences Checkpoint Response after Replication Stress

To assess whether XPC depletion indeed influences checkpoint signaling after APH-induced replication stress, we tested phosphorylation of Chk1, the key ATR substrate and effector kinase promoting G2/M checkpoint arrest.⁶³ Consistent with our conceptual predictions, knockdown of XPC in two human cancer cell lines (U-2 OS, HeLa S3) and a diploid fibroblast

strain (TIG-3) resulted in a prominent negative impact on Chk1 phosphorylation at early time points after treatment with 0.4 μ M APH (Figure 6A and Figure S-3). In addition, the mitotic indices in such experiments, measured as the accumulation of nocodazole-arrested pH3 positive mitotic cells, were shifted toward unscheduled mitotic entry, pointing at impaired checkpoint function in the XPC-depleted cells (Figure S-4A,B). XPC-depleted U-2 OS cells treated with APH also showed elevated numbers of 53BP1 bodies in G1 phase after aberrant mitotic progression. Similarly, XPC-depleted

APH-treated TIG3 and HeLa S3 cells did not show a prominent elevation of G1 53BP1 bodies, suggesting that this type of readout is not manifested in all cell lines, probably due to rapid elimination of the damaged cells (data not shown). As the ATR-Chk1 cascade represents a major checkpoint signaling “unit”, we also performed quantitative immunofluorescence microscopy analysis of chromatin-bound ATR and its partner ATRIP. The chromatin-bound signal of both proteins was decreased in XPC-depleted cells (Figure 6B). How XPC promotes binding of the ATR/ATRIP complex to chromatin remains elusive, but it is known that the binding of ATR is a necessary prerequisite for subsequent ATR-dependent checkpoint activation,⁶³ thereby providing a plausible explanation for the impaired Chk1 phosphorylation detected in our experiments with XPC-depleted cells under replication stress.

Altogether, the data set obtained in our present study supports the idea of the XPC/ATR-Chk1 pathway interaction in response to replication stress and their functional link in promoting activation of checkpoint signaling. Notably, a broadly analogous function of XPC was described for the lesions induced by UV radiation where cells depleted for XPC displayed impaired ATR activation and phosphorylation of its downstream target Chk1.⁵⁷ On the other hand, signaling of UV-induced lesions reportedly relied on XPC during G1 phase but not during S phase.⁶⁵ Our data in response to APH on the other hand demonstrate an S-phase relevant ATR/Chk1-promoting role of XPC in checkpoint signaling, most likely reflecting the different nature of the APH-induced relative to UV-induced DNA lesions as well as the differential requirement for XPC ubiquitylation, which are important mechanistic differences demonstrated in our present study. In terms of the impact on DNA, APH generates long stretches of single-stranded DNA by uncoupling of DNA polymerases and helicases, thereby creating vulnerable secondary structures, especially at CFSs that become the substrate for XPC and possibly GG-NER. Upon UV irradiation, on the other hand, DNA cross-links are formed and rapidly processed either by translesion synthesis⁶⁶ or converted into DNA double-strand breaks.⁶⁷

Overall, we propose that, in the absence of XPC, the replication problems that occur at CFSs are not properly recognized and/or processed during the S phase and become the source of subsequent genomic instability. Last but not least, our results also illustrate the power of innovative high-throughput screens based on quantitative proteomics and hypothesis-driven strategies to identify new components of fundamental mechanisms, such as cellular stress responses and maintenance of genomic integrity.

CONCLUSIONS

In this study, we performed the first unbiased proteome-wide screen to identify new putative proteins responsible for maintenance of CFS stability. Besides previously characterized WRN and MSH2 proteins, we also identified several additional candidates whose role in CFS maintenance warrants deeper characterization. Because of the fact that almost half of the identified proteins are implicated in NER, the XPC protein as the main initiator of the NER pathway was chosen for a follow-up functional study.

On the basis of our results, we propose a hypothesis for the role of XPC in preventing CFS expression by promoting checkpoint signaling under replication stress. We show that XPC deficient cells are incapable of proper checkpoint

activation in response to RS, leading to increased genomic instability manifested as accumulation of specific DNA lesions marked by 53BP1 bodies in G1 cells. We further suggest that this phenotype may reflect a new role for XPC, or possibly the whole GG-NER repair pathway, in sensing aberrant replication structures and providing the incision step, a role that is particularly required at hard-to-replicate structures in CFS loci formed after RS. Thus, XPC deficiency leads to impaired CFS-associated signaling through the ATR/ATRIP-Chk1 axis, thereby allowing for inappropriate passage of cells with aberrant structures associated with stalled replication forks through mitosis. The fate of such damaged cells depends on the respective genetic background and fitness of cellular DDR. In the next cell generation of U-2 OS cells passing through the unscheduled mitosis, such aberrant DNA structures can be detected as DNA double strand breaks marked by focal accumulation of 53BP1 in the form of the 53BP1 bodies. In some other cell lines, represented here by HeLa S3 or TIG-3 cells, this aberrant scenario during the metaphase/anaphase transition and/or immediately after mitosis of APH-exposed cells is “solved” by elimination of such abnormal cells through apoptosis. This is consistent with the notion that CFSs are important sites of the genome that may serve as alarm sensors for elimination of cells with unstable genetic material arising upon replication stress. Through this mechanism, CFSs may contribute to the intrinsic cellular barrier against tumorigenesis.⁶⁸

Apart from this important biological insight into the function of XPC protein and its relevance for chromosomal (in)stability and cancer, we also document that the strategy of using DNA structure-specific baits, which can be successfully combined with quantitative proteomics, can generate a wealth of results valuable for contemporary biomedicine.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00622.

Final structure of specific FRA16D fragment bait, verification of XPC ubiquitination upon APH, 53BP1 bodies in G1 cells, checkpoint response and MI of TIG-3, HeLa XPC KD cells, illustration of automated evaluation of γ H2AX foci in mitosis, detection of γ H2AX in XPC-silenced U-2 OS shATR mitotic cells, and description of MS analyzer settings and gradient for peptide separation during LC-MS/MS (PDF)

Quantification of FRA16D interactors with APH treatment with a comparison of normal vs reverse experiment (XLSX)

Quantification of FRA16D interactors with MOCK treatment with a comparison of normal vs reverse experiment (XLSX)

Detailed protein report of APH treatment normal experiment (PDF)

Detailed protein report of APH treatment reverse experiment. (PDF)

Detailed protein report of MOCK treatment normal experiment (PDF)

Detailed protein report of MOCK treatment reverse experiment (PDF)

Summary of complete protein identification and quantification MS data (XLSX)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: martin.mistik@upol.cz.

*E-mail: jb@cancer.dk.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank our colleagues Juraj Kramara for discussion of experiments and Iva Protivankova for assistance with western blot analyses. L.B., I.C., and R.L. were supported by grant LO1204 from the National Program of Sustainability I, MEYS. M.M. and J.B. were supported by the Kellner Family Foundation. L.B. and E.V. were supported by the internal grant IGA-LF-2016-030. J.B. was supported by the Danish Council for Independent Research (DFR-1331-00262B), the Novo Nordisk Foundation (grant 16584), and the Swedish Research Council. M.M., J.B. and M.Y. were supported by the Grant Agency of the Czech Republic 13-17555S and the Norwegian Financial Mechanism CZ09 (Project PHOSCAN 7F14061); E.V., M.M., J.B., T.F., J.G., K.C., and J.V. were supported by the grant LO1304 from the National Program of Sustainability I, MEYS. M.M. was supported by Czech-BioImaging project (LM2015062 funded by MEYS, CR). K.K. was supported by the Endowment Fund of Palacky University.

ABBREVIATIONS

APH, aphidicolin; BER, base excision repair; CFS, common fragile site; DDR, DNA damage response; DSB, double-stranded break; FDR, false discovery rate; GG-NER, global genome nucleotide excision repair; GO, gene ontology; KEGG, Kyoto encyclopedia of genes and genomes; pH3, mitotically phosphorylated histone H3; RS, replication stress; SILAC, stable isotope labeling of amino acids in cell culture; MMR, mismatch repair; NER, nucleotide excision repair; NHEJ, nonhomologous end joining; γ H2AX, phosphohistone H2AX

REFERENCES

- Glover, T. W.; Berger, C.; Coyle, J.; Echo, B. DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum. Genet.* **1984**, *67*, 136–142.
- Ruiz-Herrera, A.; Ponsá, M.; Gargá, F.; Egozcue, J.; García, M. Fragile sites in human and Macaca fascicularis chromosomes are breakpoints in chromosome evolution. *Chromosome Res.* **2002**, *10*, 33–44.
- Arlt, M. F.; Durkin, S. G.; Ragland, R. L.; Glover, T. W. Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA Repair* **2006**, *5*, 1126–1135.
- Durkin, S. G.; Ragland, R. L.; Arlt, M. F.; Mülle, J. G.; Warren, S. T.; Glover, T. W. Replication stress induces tumor-like microdeletions in FHT1/FRA3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 246–251.
- Schwartz, M.; Zlotorynski, E.; Kerem, B. The molecular basis of rare and common fragile sites. *Cancer Lett.* **2006**, *232*, 13–26.
- Zlotorynski, E.; Rahat, A.; Skaug, J.; Ben-Porat, N.; Ozeri, E.; Hershberg, R.; Levi, A.; Scherer, S. W.; Margalit, H.; Kerem, B. Molecular basis of expression of common and rare fragile sites. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 7143–7151.
- Zhang, H.; Freudenreich, C. H. An AT-Rich sequence in human common fragile site FRA16D causes fork stalling and chromosome breakage in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* **2007**, *27*, 367–379.

(8) Helmrich, A.; Ballarino, M.; Tora, L. Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Mol. Cell* **2011**, *44*, 966–977.

(9) Cheng, C. H.; Kuchta, R. D. DNA polymerase ϵ : Aphidicolin inhibition and the relationship between polymerase and exonuclease activity. *Biochemistry* **1993**, *32*, 8568–8574.

(10) Mrasek, K.; Schoder, C.; Teichmann, A. C.; Behr, K.; Franze, B.; Wilhelm, K.; Blaurock, N.; Claussen, U.; Liehr, T.; Weise, A. Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. *Int. J. Oncol.* **2010**, *36*, 929–940.

(11) Chang, D. J.; Lupardus, P. J.; Cimprich, K. A. Monoubiquitination of proliferating cell nuclear antigen induced by stalled replication requires uncoupling of DNA polymerase and mini-chromosome maintenance helicase activities. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 32081–32088.

(12) Casper, A. M.; Durkin, S. G.; Arlt, M. F.; Glover, T. W. Chromosomal instability at common fragile sites in Seckel Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **2004**, *75*, 654–660.

(13) Casper, A. M.; Nghiem, P.; Arlt, M. F.; Glover, T. W. ATR regulates fragile site stability. *Cell* **2002**, *111*, 779–789.

(14) Durkin, S. G.; Arlt, M. F.; Howlett, N. G.; Glover, T. W. Depletion of Chk1, but not Chk2, induces chromosomal instability and breaks at common fragile sites. *Oncogene* **2006**, *25*, 4381–4388.

(15) Arlt, M. F.; Xu, B.; Durkin, S. G.; Casper, A. M.; Kastan, M. B.; Glover, T. W. BRCA1 is required for common fragile site stability via its G2/M checkpoint function. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 6701–6709.

(16) Howlett, N. G.; Taniuchi, T.; Durkin, S. G.; D'Andrea, A. D.; Glover, T. W. The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 693–701.

(17) Musio, A.; Montagna, C.; Mariani, T.; Tilenni, M.; Focarelli, M. L.; Brait, L.; Indino, E.; Benedetti, P. A.; Chessa, L.; Albertini, A.; Ried, T.; Vezzi, P. SMC1 involvement in fragile site expression. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 525–533.

(18) Pirzio, L. M.; Pichierrri, P.; Bignami, M.; Franchitto, A. Werner syndrome helicase activity is essential in maintaining fragile site stability. *J. Cell Biol.* **2008**, *180*, 305–314.

(19) Turner, B. C.; Ottey, M.; Zimonjic, D. B.; Potoczek, M.; Hauck, W. W.; Pequinot, E.; Keck-Waggoner, C. L.; Seignani, C.; Aldaz, C. M.; McCue, P. A.; Palazzo, J.; Huebner, K.; Popescu, N. C. The Fragile histidine triad/common chromosome fragile site 3B locus and repair-deficient cancers. *Cancer Res.* **2002**, *61*, 4054–4060.

(20) Di Micco, R.; Fumagalli, M.; Cicalese, A.; Piccinin, S.; Gasparini, P.; Luise, C.; Schurra, C.; Garre, M.; Nuciforo, P. G.; Bensimon, A.; Maestro, R.; Pelicci, P. G.; d'Adda di Fagnana, F. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **2006**, *444*, 638–642.

(21) Bester, A. C.; Roniger, M.; Oren, Y. S.; Im, M. M.; Sarni, D.; Chaoat, M.; Bensimon, A.; Zamir, G.; Shewach, D. S.; Kerem, B. Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stage of cancer development. *Cell* **2011**, *145*, 435–446.

(22) Bartkova, J.; Horejsi, Z.; Koed, K.; Kramer, A.; Tort, F.; Zieger, K.; Guldborg, P.; Sehested, M.; Nesland, J. M.; Lukas, C.; Ørntoft, T.; Lukas, J.; Bartek, J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **2005**, *434*, 864–870.

(23) Bartkova, J.; Rezaei, N.; Liontos, M.; Karakaidos, P.; Kletsas, D.; Issaeva, N.; Vassiliou, L. V.; Kolettas, E.; Niforou, K.; Zoumpourlis, V. C.; Takaoka, M.; Nakagawa, H.; Tort, F.; Fugger, K.; Johansson, F.; Sehested, M.; Andersen, C. L.; Dyrskjot, L.; Ørntoft, T.; Lukas, J.; Kittas, C.; Helleday, T.; Halazonetis, T. D.; Bartek, J.; Gorgoulis, V. G. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **2006**, *444*, 633–637.

(24) Gorgoulis, V. G.; Vassiliou, L. V.; Karakaidos, P.; Zacharatos, P.; Kotsinas, A.; Liloglou, T.; Venere, M.; Dittullo, R. A., Jr.; Kastrinakis, N. G.; Levy, B.; Kletsas, D.; Yoneta, A.; Herlyn, M.; Kittas, C.; Halazonetis, T. D. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **2005**, *434*, 907–913.

- (25) Lu, X.; Parvathaneni, S.; Hara, T.; Lal, A.; Sharma, S. Replication stress induces specific enrichment of RECQ1 at common fragile site FRA3B and FRA16D. *Mol. Cancer* **2013**, *12*, 1–12.
- (26) Bergoglio, V.; Boyer, A. S.; Walsh, E.; Naim, V.; Legube, G.; Lee, M. Y.; Rey, L.; Rosselli, F.; Cazaux, C.; Eckert, K. A.; Hoffmann, J. S. DNA synthesis by Pol η promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. *J. Cell Biol.* **2013**, *201*, 395–408.
- (27) Butter, F.; Scheibe, M.; Morl, M.; Mann, M. Unbiased RNA-protein interaction screen by quantitative proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 10626–10631.
- (28) Mittler, G.; Butter, F.; Mann, M. A SILAC-based DNA protein interaction screen that identifies candidate binding proteins to functional DNA elements. *Genome Res.* **2009**, *19*, 284–293.
- (29) Scheibe, M.; Arnoult, N.; Kappei, D.; Buchholz, F.; Decottignies, A.; Butter, F.; Mann, M. Quantitative interaction screen of telomeric repeat-containing RNA reveals novel TERRA regulators. *Genome Res.* **2015**, *23*, 2149–2157.
- (30) Trinkle-Mulcahy, L.; Boulon, S.; Lam, Y. W.; Urcia, R.; Boisvert, F. M.; Vandermoere, F.; Morrice, N. A.; Swift, S.; Rothbauer, U.; Leonhardt, H.; Lamond, A. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J. Cell Biol.* **2008**, *183*, 223–239.
- (31) Hubner, N. C.; Bird, A. W.; Cox, J.; Splettstoesser, B.; Bandilla, P.; Poser, I.; Hyman, A.; Mann, M. Quantitative proteomics combined with BAC TransgeneOmics reveals in vivo protein interactions. *J. Cell Biol.* **2010**, *189*, 739–754.
- (32) Danielsen, J. M. R.; Larsen, D. H.; Schou, K. B.; Freire, R.; Falck, J.; Bartek, J.; Lukas, J. HCLK2 is required for activity of the DNA damage response kinase ATR. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4140–4147.
- (33) Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406–3415.
- (34) Schug, J. Using TESS to predict transcription factor binding sites in DNA sequence. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **2008**, *1*.
- (35) Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havlis, J.; Olsen, J. V.; Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2856–2860.
- (36) Sebela, M.; Stosova, T.; Havlis, J.; Wielsch, N.; Thomas, H.; Zdrahal, Z.; Shevchenko, A. Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* **2006**, *6*, 2959–2963.
- (37) Rappsilber, J.; Mann, M.; Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1896–1906.
- (38) Oppermann, F. S.; Gnad, F.; Olsen, J. V.; Hornberger, R.; Greff, Z.; Keri, G.; Mann, M.; Daub, H. Large-scale proteomics analysis of the human kinome. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 1751–1764.
- (39) Bindea, G.; Mlecnik, B.; Hackl, H.; Charoentong, P.; Tosolini, M.; Kirilovsky, A.; Fridman, W. H.; Pages, F.; Trajanoski, Z.; Galon, J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1091–1093.
- (40) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504.
- (41) Yamada, M.; Watanabe, K.; Mistrik, M.; Vesela, E.; Protivankova, I.; Mailand, N.; Lee, M.; Masai, H.; Lukas, J.; Bartek, J. ATR-Chk1-APC/C^{dh1}-dependent stabilization of Cdc7-ASK (Dbf4) kinase is required for DNA lesion bypass under replication stress. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 2459–2472.
- (42) Ong, S. E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D. B.; Steen, H.; Pandey, A.; Mann, M. Stable isotope labeling of amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 376–386.
- (43) Ong, S. E.; Mann, M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat. Protoc.* **2007**, *1*, 2650–2660.
- (44) von Mering, C.; Huynen, M.; Jaeggi, D.; Schmidt, S.; Bork, S.; Snel, B. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 258–261.
- (45) Gillet, L. C. J.; Scharer, O. D. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 253–276.
- (46) Sugasawa, K.; Ng, J. M. Y.; Masutani, Ch.; Iwai, S.; van der Spek, P. J.; Eker, A. P. M.; Hanaoka, F.; Bootsma, D.; Hoeijmakers, J. H. J. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of Global Genome Nucleotide Excision repair. *Mol. Cell* **1998**, *2*, 223–232.
- (47) Sugasawa, K.; Okuda, Y.; Saijo, M.; Nishi, R.; Matsuda, N.; Chu, G.; Mori, T.; Iwai, S.; Tanaka, K.; Hanaoka, F. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* **2005**, *121*, 387–400.
- (48) Nishi, R.; Okuda, Y.; Watanabe, E.; Mori, T.; Iwai, S.; Masutani, C.; Sugasawa, K.; Hanaoka, F. Centrin-2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 5664–5674.
- (49) Moser, J.; Kool, H.; Giakzidis, I.; Caldecott, K.; Mullenders, L. H. F.; Foustier, M. I. Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol. Cell* **2007**, *27*, 311–323.
- (50) Fitch, M. E.; Nakajima, S.; Yasui, A.; Ford, J. M. In vivo recruitment of XPC to UV induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46906–46910.
- (51) Sugasawa, K.; Shimizu, Y.; Iwai, S.; Hanaoka, F. A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair* **2002**, *1*, 95–107.
- (52) Krasikova, Y. S.; Rechkunova, N. Y.; Maltseva, E. A.; Anarbaev, R. O.; Pestryakov, P. E.; Sugasawa, K.; Min, J. H.; Lavrik, O. L. Human and yeast DNA damage recognition complexes bind with high affinity DNA structures mimicking in size transcription bubble. *J. Mol. Recognit.* **2013**, *26*, 653–661.
- (53) Shell, S. M.; Hawkins, E. K.; Tsai, M. S.; Hlaing, A. S.; Rizzo, C. J.; Chazin, W. J. Xeroderma pigmentosum complementation group C protein (XPC) serves as a general sensor of damaged DNA. *DNA Repair* **2013**, *12*, 947–953.
- (54) Melis, J. P. M.; Kuiper, R. V.; Zwart, E.; Robinson, J.; Pennings, J. L. A.; van Oostrom, C. T. M.; Luijten, M.; van Steeg, H. Slow accumulation of mutations in (XPC^{-/-}) mice upon induction of oxidative stress. *DNA Repair* **2013**, *12*, 1081–1086.
- (55) D'Errico, M.; Parlanti, E.; Teson, M.; de Jesus, B. M. B.; Degan, P.; Calcagnile, A.; Jaruga, P.; Bjoras, M.; Crescenzi, M.; Pedrini, A. M.; Egly, J. M.; Zambruno, G.; Stefanini, M.; Dizdaroglu, M.; Dogliotti, E. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *EMBO J.* **2006**, *25*, 4305–4315.
- (56) Ray, A.; Mir, S. N.; Wani, G.; Zhao, Q.; Battu, A.; Zhu, Q.; Wang, Q. E.; Wani, A. A. Human SNF5/IN11, a component of the human SWI/SNF chromatin remodeling complex, promotes nucleotide excision repair by influencing ATM recruitment and downstream H2AX phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 6206–6219.
- (57) Ray, A.; Milum, K.; Battu, A.; Wani, G.; Wani, A. A. NER initiation factors, DDB2 and XPC, regulate UV radiation response by recruiting ATR and ATM kinases to DNA damage sites. *DNA Repair* **2013**, *12*, 273–283.
- (58) Le May, N.; Mota-Fernandes, D.; Velez-Cruz, R.; Iltis, I.; Biard, D.; Egly, J. M. NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. *Mol. Cell* **2010**, *38*, 54–66.
- (59) Stout, G. J.; Blasco, M. A. Telomere length and telomerase activity impact the UV sensitivity syndrome xeroderma pigmentosum C. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 1844–1854.
- (60) Loffler, H.; Fechter, A.; Matuszewska, M.; Saffrich, R.; Mistrik, M.; Marhold, J.; Hornung, C.; Westermann, F.; Bartek, J.; Kramer, A. Cep63 recruits Cdk1 to the centrosome: Implications for regulation of mitotic entry, centrosome amplification and genome maintenance. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 2129–2139.

(61) Rogakou, E. P.; Pilch, D. R.; Orr, A. H.; Ivanova, V. S.; Bonner, W. M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5858–5868.

(62) Ibuki, Y.; Shikata, M.; Toyooka, T. γ H2AX is a sensitive marker of DNA damage induced by metabolically activated 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Toxicol. In Vitro* **2015**, *29*, 1831–1838.

(63) Liu, Q. H.; Guntuku, S.; Cui, X. S.; Matsuoka, S.; Cortez, D.; Tamai, K.; Luo, G. B.; Carattini-Rivera, S.; DeMayo, F.; Bradley, A.; Donehower, L. A.; Elledge, S. J. Chk1 is an essential kinase that is regulated by ATR and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 1448–1459.

(64) Lukas, C.; Savic, V.; Bekker-Jensen, S.; Doil, C.; Neumann, B.; Pedersen, R. S.; Grøfte, M.; Chan, K. L.; Hickson, I. D.; Bartek, J.; Lukas, J. 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 243–253.

(65) Ray, A.; Blevins, Ch.; Wani, G.; Wani, A. A. ATR- and ATM-mediated DNA damage response is dependent on excision repair assembly during G but not in S phase of cell cycle. *PLoS One* **2016**, *11*, e0159344.

(66) Shachar, S.; Ziv, O.; Avkin, S.; Adar, S.; Wittschieben, J.; Reißner, T.; Chaney, S.; Friedberg, E. C.; Wang, Z.; Carell, T.; Geacintov, N.; Livneh, Z. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO J.* **2009**, *28*, 383–393.

(67) Elvers, I.; Johansson, F.; Groth, P.; Erixon, K.; Helleday, T. UV stalled replication fork restart by re-priming in human fibroblasts. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 7049–7057.

(68) Georgakilas, A. G.; Tsantoulis, P.; Kotsinas, A.; Michalopoulos, I.; Townsend, P.; Gorgoulis, V. G. Are common fragile sites merely structural domains or highly organized functional units susceptible to oncogenic stress? *Cell. Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 4519–4544.

Supplement information :

Role of DNA repair factor XPC in response to replication stress, revealed by DNA fragile site affinity chromatography and quantitative proteomics

Lucie Beresova,^{1,2} Eva Vesela,¹ Ivo Chamrad,² Jiri Voller,¹ Masayuki Yamada,¹ Tomas Furst,¹ Rene Lenobel,² Katarina Chroma,¹ Jan Gursky,¹ Katerina Krizova,¹ Martin Mistrik^{1*} and Jiri Bartek^{1,3,4*}

¹Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

²Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

³Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen, Denmark

⁴Science for Life Laboratory, Division of Translational Medicine and Chemical Biology, Department of Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

*Corresponding authors: Jiri Bartek, E-mail: jb@cancer.dk
Martin Mistrik, E-mail: martin.mistik@upol.cz

Figure S-1

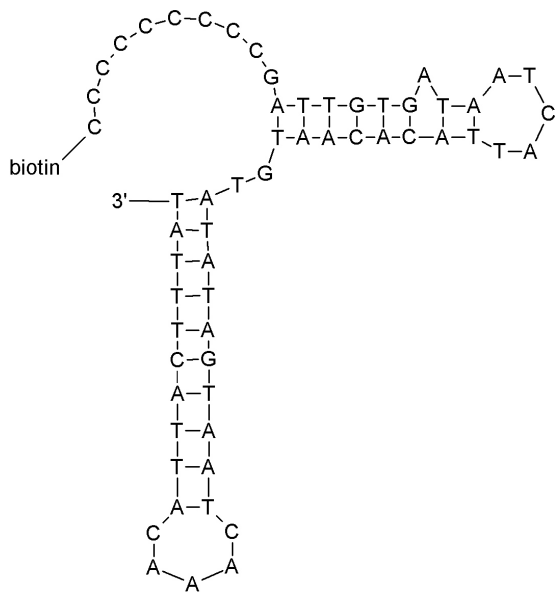


Figure S-1 Final structure of specific DNA bait „FRA16D-fragment“ : The sequence was selected from secondary structure of the 314 bp fragment containing Flex1(AT)34.⁷ The 5' end of the sequence was replaced by nine cytosines to eliminate proteins that specifically bind AT rich sequences, and modified by biotin.

S-2

Figure S-2

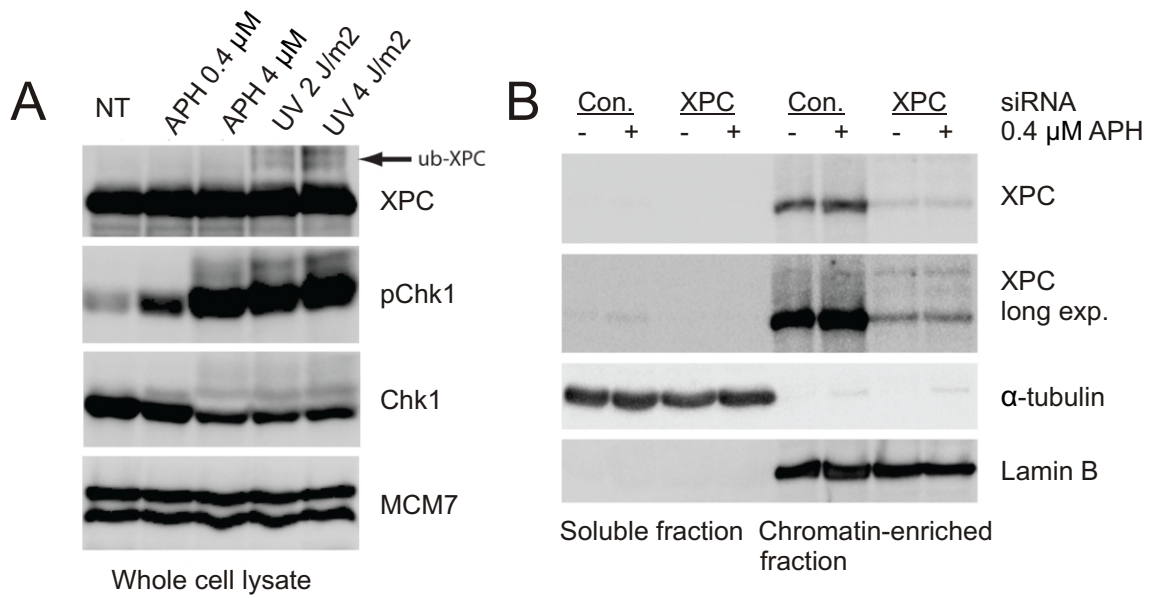


Figure S-2 XPC does not undergo ubiquitination upon APH treatment

A) U-2-OS cells were treated with aphidicolin at a concentration of 0.4 μ M or 4 μ M for 24h, then subjected to whole cell lysis with 1x Laemmli Sample Buffer. Whole cell lysates were also prepared from U-2-OS cells harvested 1h after UV-irradiation at a dose of 2 J/m² or 4 J/m². Samples were analyzed by Western blotting.

B) U-2-OS cells were transfected with siXPC (SMARTpool) or control siRNA. Two days after transfection, cells were treated with 0.4 μ M aphidicolin for 24h, then subjected to biochemical cell fractionation⁴¹. Samples were analyzed by Western blotting.

Figure S-3

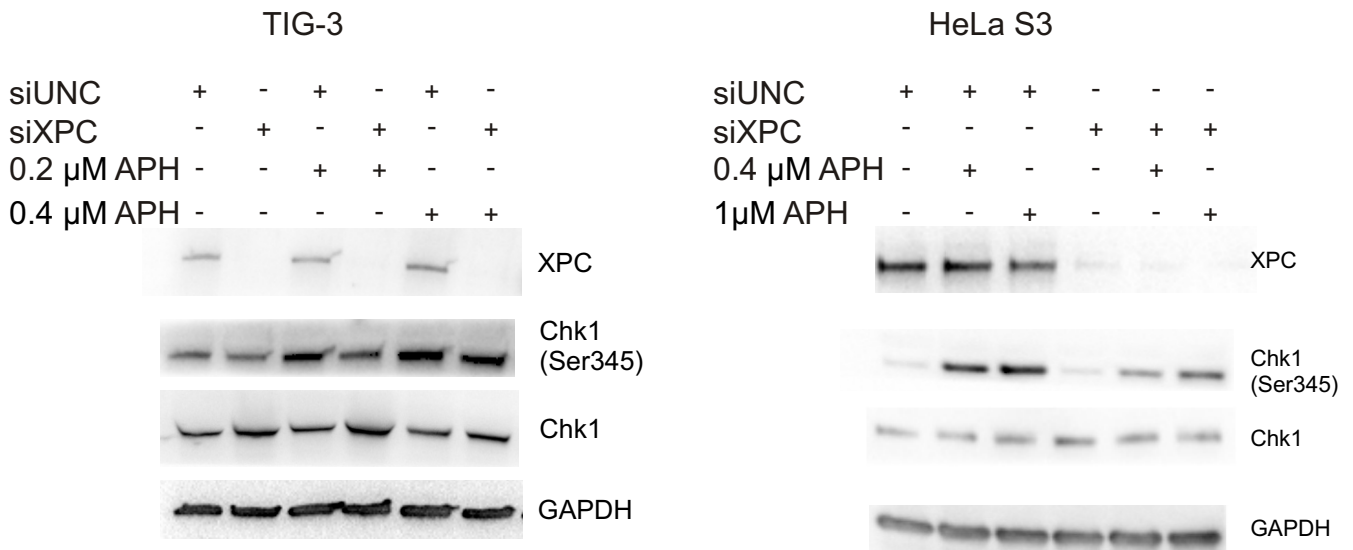
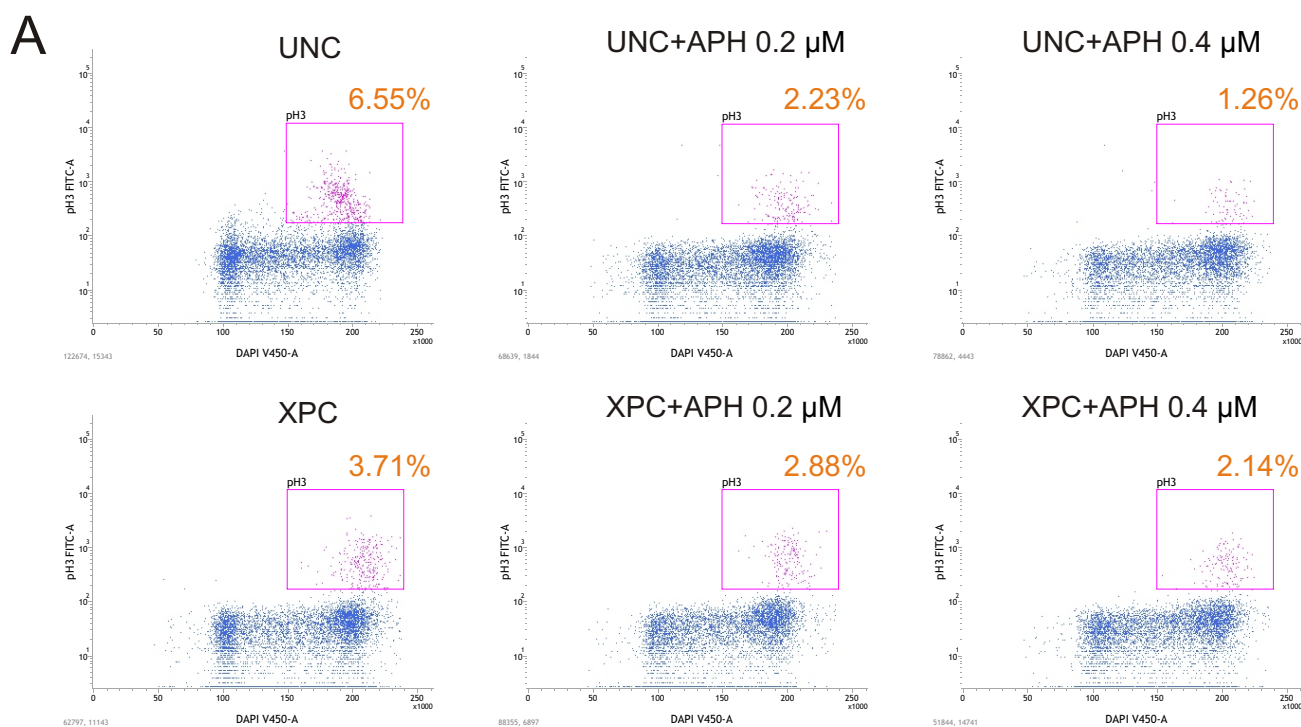


Figure S-3 Checkpoint response in XPC KD TIG-3 and HeLa S3:

Western blot analysis of impaired phosphorylation of Chk1(Ser345) in TIG-3 and HeLa S3 cells

Figure S-4



B

% of pH3+	U-2-OS	HeLa S3	TIG-3
UNC	6.55	3.06	13.14
XPC	3.71	3.23	8.40
UNC+APH 0.2	2.23	1.25	3.31
XPC+APH 0.2	2.88	1.63	3.80
UNC+APH 0.4	1.26	1.68	2.26
XPC+APH 0.4	2.14	2.11	2.28

Figure S-4 Mitotic indexes (MI):

A) Illustrative images of FACS analysis of pH3 positive cells; U-2-OS cell line

B) Summary table of % of pH3 positive cells; U-2-OS, TIG-3 and HeLa S3 cell lines

S-5

Figure S-5

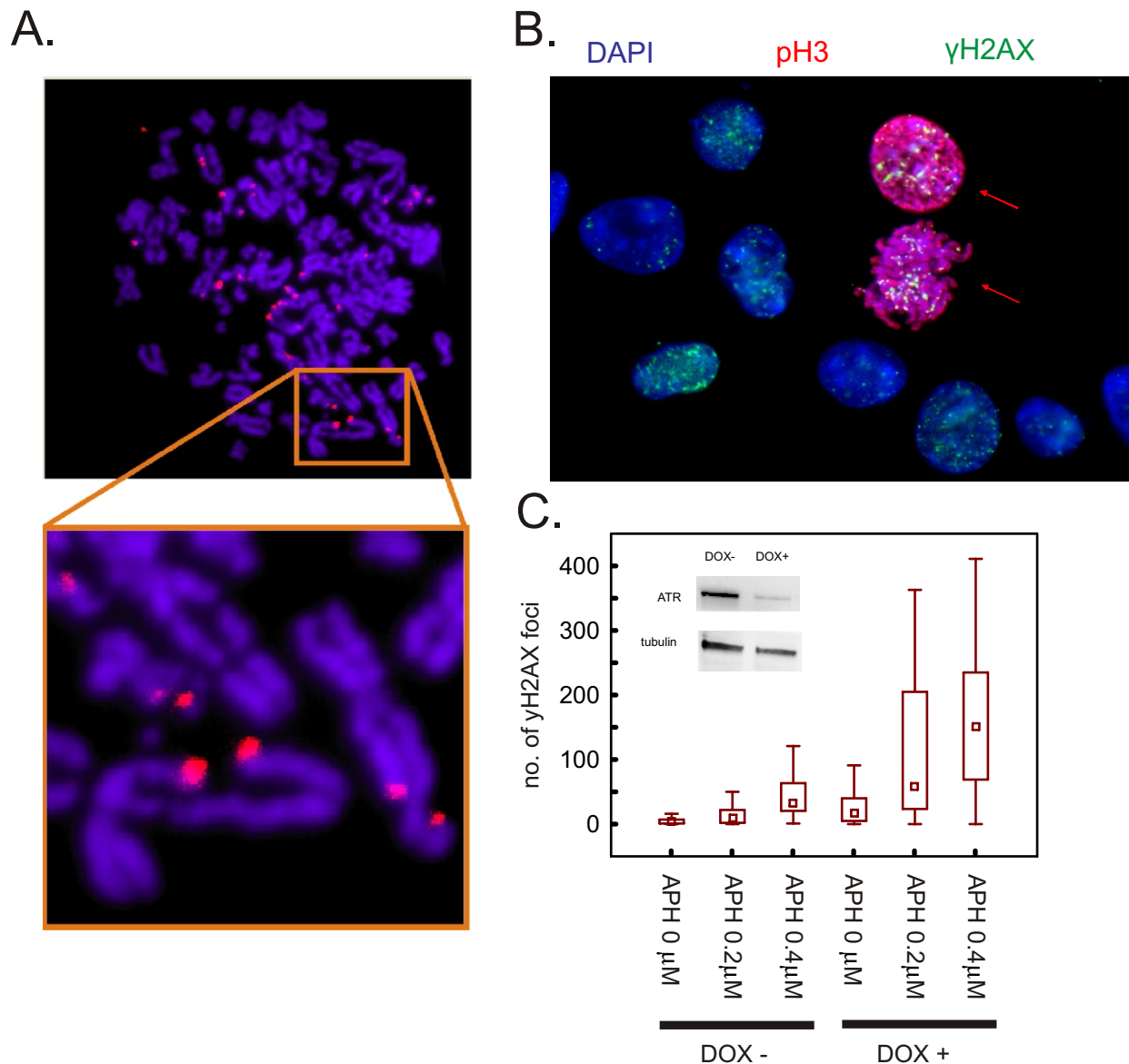


Figure S-5 Automated evaluation of γH2AX foci within mitotic cells:

A) Detection of γH2AX foci at chromosomal breaks in metaphases.

B) Automated quantification process based on co-staining of pH3 (a marker of mitosis - red arrows) that highlight mitotic spreads for software recognition. The number of γH2AX foci was counted within the mitosis and analysed by custom made software.

C) The quantification of γH2AX foci in mitotic cells. Only in cells positive for pH3 staining γH2AX foci were scored. The cells were treated with indicated concentrations of APH for 24h. U-2-OS shATR cell line (doxycycline inducible) was used.

Figure S-6

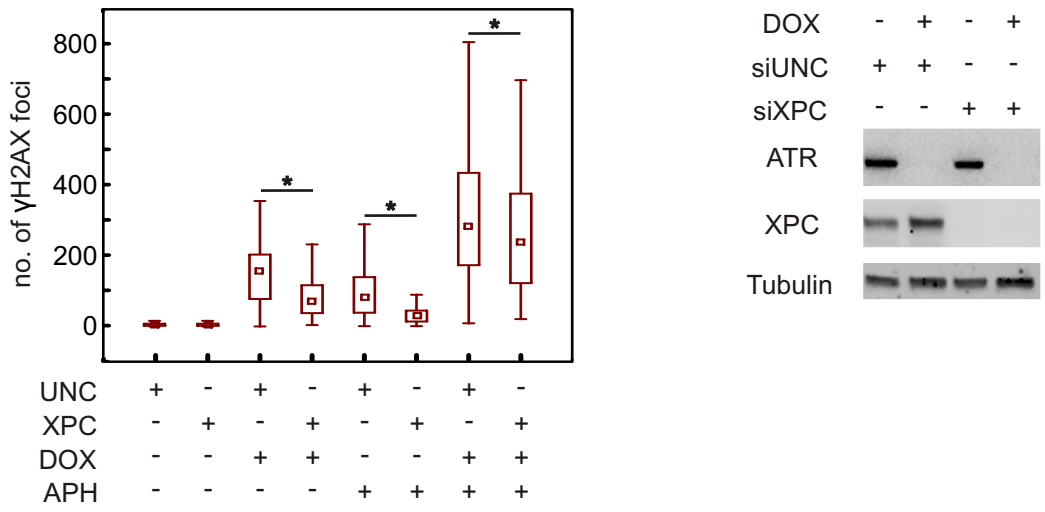


Figure S-6 Detection of γ H2AX foci in U-2-OS shATR cells co-depleted for XPC and ATR: XPC silencing decreases mitosis associated γ H2AX signal also in ATR deficient cells under normal condition and after replication stress suggesting upstream XPC role in replication stress checkpoint response.

Table S-1

Time (min)	Solvent phase A (%)	Solvent phase B (%)
0	98	2
3	92	8
80	82	18
125	72	28
135	68	32
148	55	45
157	35	65
160	15	85
165	15	85
168	98	2
185	98	2

Table S-1 Gradient used for separation of peptide during nLC-MSMS: All changes in 185 min. gradient were done in linear mode.

Settings of MS analyser (nESI-Q-TOF maXis):

Source (capillary voltage 1750 V, dry gas 1.5 L/min, dry temperature 180 °C); MS/MS mode (auto MS/MS, 5 precursor ions, switch threshold from MS to MSMS mode 1,000 counts, active exclusion after 2 spectra for 18 s, excluded mass range of precursors m/z 50-350); Mass range m/z 50-2,500 with MS time acquisition 1 s, and MS/MS time acquisition 0.62-0 ms according to precursor intensity

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI



Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

**Studium interakce nukleových kyselin a proteinů
pomocí afinitní chromatografie**

Autoreferát disertace k získání vědecké hodnosti doktor

Mgr. Lucie Béresová

Olomouc 2017

Tato disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu oboru Biochemie P1406 Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období 2008-2017 (2014-2016 přerušeno). Školícím pracovištěm bylo Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci, Šlechtitelů 27, Olomouc 783 71, ČR.

Uchazeč:

Mgr. Lucie Béresová

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci, Šlechtitelů 27, Olomouc 783 71, ČR.

Ústav molekulární a translační medicíny, Laboratoř integrity genomu, Lékařská fakulta UP v Olomouci, Hněvotínská 5, Olomouc 779 00, ČR.

Školitel:

Mgr. René Lenobel, Ph.D.

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci, Šlechtitelů 27, Olomouc 783 71, ČR.

Konzultant:

Mgr. Martin Mistrík, Ph.D.

Ústav molekulární a translační medicíny, Laboratoř integrity genomu, Lékařská fakulta UP v Olomouci, Hněvotínská 5, Olomouc 779 00, ČR.

Oponenti:

Prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, ČR.

Doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.

Ústav molekulární a translační medicíny, Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, Hněvotínská 5, Olomouc 779 00, ČR.

Obhajoba se koná dne před komisí pro obhajoby disertačních prací v oboru biochemie v místnostiPřírodovědecké fakulty UP v Olomouci-Holici, Šlechtitelů 27. S disertační prací je možno se seznámit v knihovně biologických oborů PřF UP v Olomouci-Holici.

doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
předsedkyně oborové rady doktorského studijního programu Biochemie

Obsah

1	Souhrn	5
2	Summary	6
3	Cíle práce	7
4	Teoretický úvod	8
4.1	DNA-afinitní chromatografie ve studiu interakce DNA a proteinů	8
4.1.1	Konstrukce DNA afinitní matrice	8
4.1.2	DNA-afinitní chromatografie	9
4.2	Identifikace DNA vazebných proteinů pomocí kvantitativní proteomiky a MS	10
4.3	Replikační stres a běžná fragilní místa	11
5	Metody	14
5.1	Návrh specifického a kontrolního DNA ligandu	14
5.2	Konstrukce afinitní matrice	15
5.3	Kultivace buněčných kultur	16
5.4	Příprava buněčného lyzátu a FRA16D-fragment afinitní chromatografie	17
5.5	SDS-PAGE	18
5.6	Proteolytické štěpení proteinů v gelu	18
5.7	Příprava vzorků pro MS analýzu	18
5.8	Analýza peptidů pomocí nLC-MS/MS	19
5.9	Zpracování MS dat a jejich vyhodnocení	20
5.10	Imunofluorescenční barvení vzorků.....	20
5.11	Analýza mitotických buněk - detekce chromozomálního poškození pomocí γ H2AX proteinu	21
5.12	Imunofluorescenční detekce proteinů buněčné odpovědi na poškození DNA	21
5.13	Western blot	22
5.14	Určení mitotického indexu pomocí průtokové cytometrie.....	22
6	Komentované výsledky a diskuze	23
6.1	Experimentální strategie k identifikaci proteinů interagujících s BFM.....	23
6.2	Identifikace proteinů obohacených na ligandu FRA16D-fragment	25
6.3	Studium role XPC proteinu v zachování stability fragilních míst.....	26
6.4	Úloha XPC proteinu v regulaci proteinů buněčné odpovědi na RS	27
7	Závěr	28
8	Seznam zkratk	30
9	Seznam literatury	31
10	Přehled publikační činnosti	36

1 Souhrn

DNA-afinitní chromatografie je jednou z metod studia vzájemných interakcí nukleových kyselin s proteiny. Tato metoda je principiálně založena na afinitě proteinu ke konkrétní nukleotidové sekvenci případně struktuře nukleové kyseliny. Vhodným způsobem ukotvení této sekvence k pevnému nosiči lze zkonstruovat DNA-afinitní matici a získat tak účinný nástroj k izolaci konkrétního proteinu případně celého proteomu. Ve spojení s metodami kvantitativní proteomiky a hmotnostní spektrometrie (MS) představuje DNA-afinitní chromatografie dostatečně účinnou a citlivou metodou pro izolaci a následnou identifikaci DNA vazebných proteinů. Tato disertační práce se věnuje použití metody DNA-afinitní chromatografie v izolaci a identifikaci proteinů hrajících roli v buněčných procesech replikace a zachování stability fragilních míst DNA. Literární rešerše poskytuje souhrn dosavadních metod studia vzájemných interakcí nukleových kyselin s proteiny pomocí DNA a RNA afinitní chromatografie. Probrány jsou klíčové kroky konstrukce specifické afinitní matrice, experimentální přístupy samotného provedení DNA/RNA-afinitní chromatografie a také identifikace a kvantifikace specificky vázaných proteinů pomocí metod kvantitativní proteomiky a hmotnostní spektrometrie. Součástí je také kapitola věnována replikačnímu stresu a fragilním místům DNA, která přibližuje problematiku poškození DNA a jejich opravných mechanismů souvisejících s experimentální částí práce.

V této práci byla aplikována metoda DNA-afinitní chromatografie v kombinaci s kvantitativní proteomikou a MS jako nástroj izolace a identifikace proteinů interagujících s fragilními místy DNA. Pro izolaci proteinů vázajících se k těmto místům byl navržen specifický DNA-afinitní ligand napodobující sekundární strukturu fragilního místa FRA16D a také kontrolní ligand se stabilní lineární strukturou. Oba ligandy byly modifikovány na 5'konci biotinem a následně imobilizovány k magnetickým částicím pokrytým streptavidinem. S takto zhotovenými maticemi, specifickou a kontrolní, byla provedena DNA-afinitní chromatografie. K DNA afinitní purifikaci byly použity extrakty proteinů z jader pocházejících z buněk kultivovaných za normálních podmínek a z buněk vystavených replikačnímu stresu působením aphidicolinu. Kombinací DNA-afinitní chromatografie, metody relativní kvantifikace proteinů (izotopového značení proteinů v buňkách - SILAC) a MS byly identifikovány proteiny specificky vázané k ligandu FRA16D-fragment za normálních kultivačních podmínek i po působení aphidicolinu. Identifikováno bylo několik nových kandidátních proteinů, ze kterých

byl zvolen a detailně charakterizován XPC protein. Přínosem předkládané práce je nejen odhalení nové biologické funkce proteinu XPC během replikačním stresu a v zachování stability fragilních míst, ale také unikátní přístup návrhu strukturně specifického ligandu FRA16D-fragment, který ve spojení s DNA-afinitní chromatografií a MS umožnil izolaci a následnou identifikaci zajímavých proteinů, jejichž role v zachování stability fragilních míst může být dále zkoumána pomocí molekulárně-biologických metod.

2 Summary

DNA affinity chromatography is one of the methods used for study of nucleic acid-protein interactions. It is based on the affinity of the protein to the specific sequence of nucleotides or specific DNA structure. Immobilization of this specific sequence to the solid phase allows the construction of DNA affinity resin convenient for isolation of specific binding protein or whole proteome. DNA affinity chromatography in combination with quantitative proteomics and mass spectrometry (MS) is an efficient and sensitive tool for isolation and subsequent identification of DNA binding proteins. This thesis explores the usage of DNA affinity chromatography for isolation and identification of proteins with potential role in biological processes such a replication and maintenance of fragile sites. Survey of literature provides general knowledge of current methods for study of interactions of nucleic acids and proteins using DNA affinity chromatography. Key parameters in the purification of DNA binding proteins such as construction of specific DNA affinity resin, experimental workflow of DNA affinity chromatography and subsequent methods for identification and quantification of DNA binding proteins by quantitative proteomics and mass spectrometry are described. The chapter about replication stress and fragile sites explains consequences of replication stress and DNA damage response pathways which are connected to the experimental part of the thesis.

In this thesis the DNA affinity chromatography in combination with quantitative proteomics and MS was used as a powerful tool for isolation and subsequent identification of proteins interacting with fragile sites. For the isolation of fragile sites' binding proteins we designed a specific DNA affinity ligand mimicking part of the secondary structure of fragile site FRA16D and also a control ligand with stable linear structure. Both ligands were modified at the 5' end by biotin and immobilized to the magnetic beads covered by streptavidin. These affinity resins, specific FRA16D-fragment and control, were used for DNA affinity chromatography. The extracts of nuclear proteins from cells cultivated under normal growth conditions and cells cultivated upon replication stress induced by aphidicolin were used for DNA affinity

purification. DNA affinity chromatography coupled with a method of relative quantification of proteins (isotope labeling of proteins in cells - SILAC) and MS identified proteins specifically enriched at the FRA16D-fragment upon normal conditions and upon aphidicolin treatment. We identified several new protein candidates from which the XPC protein was chosen for further characterization.

The importance of this thesis is not only in the evaluation of new biological role of XPC protein in replication stress and maintenance of fragile site stability, but also in the unique experimental set-up of design of the structural specific FRA16D-fragment ligand. In combination with DNA affinity chromatography and MS, it allows identification of interesting proteins, which role in maintenance of fragile sites could be further explored by methods of molecular biology.

3 Cíle práce

- Zpracování literární rešerše zadané tematiky a její shrnutí ve formě přehledového článku
- Zavedení metody DNA-afinitní chromatografie pro izolaci proteinů interagujících s fragilním místem FRA16D.
- Identifikace a kvantifikace FRA16D vazebných proteinů kombinací metod kvantitativní proteomiky a MS
- Ověření biologické role FRA16D-fragment vazebných proteinů v zachování stability fragilních míst pomocí molekulárně-biologických metod.

4 Teoretický úvod

Vzájemné vazby proteinů s DNA jsou založeny na afinitě vazebných domén proteinů k specifické sekvenci případně struktuře nukleové kyseliny. Tyto vazby umožňují regulaci životně důležitých procesů a jejich kaskádovité interakce, které se vzájemně doplňují, jsou podstatou zachování integrity genomu. Studium interakcí nukleových kyselin a proteinů tak umožňuje objasnit mechanismy podílející se na regulaci významných biologických procesů jako je transkripce, replikace a oprava poškozené DNA a tím také napomáhá odhalit podstatu vzniku řady onemocnění a způsobu jejich možné terapie.

4.1 DNA-afinitní chromatografie ve studiu interakce DNA a proteinů

Jeden ze způsobů studia vzájemných interakcí proteinů a DNA je afinitní chromatografie. Tato metoda je principiálně založena na afinitě proteinu k specifické sekvenci případně struktuře DNA, která je imobilizována k pevnému nosiči. V současné době dosáhla DNA-afinitní chromatografie značné obliby a to především díky rozvoji metod identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. V kombinaci s metodami kvantitativní proteomiky a MS je DNA afinitní chromatografie významným dostatečně citlivým a selektivním nástrojem k izolaci a identifikaci DNA vazebných proteinů.

Pro správné provedení DNA-afinitní chromatografie je zásadním krokem volba specifického ligandu a konstrukce afinitní matrice vhodné k izolaci proteinu případně celého proteomu z komplexní proteinové směsi. Dalšími významnými kroky jsou samotné provedení DNA afinitní purifikace a následná analýza DNA vazebných proteinů pomocí MS.

4.1.1 Konstrukce DNA afinitní matrice

Nejdůležitějšími částmi pro konstrukci DNA afinitní matrice je volba a návrh specifického afinitního ligandu, jeho syntéza a imobilizace k vhodně zvolené matici.

Návrh DNA ligandu může vycházet z již známé informace o specifické sekvenci, která je rozpoznávána konkrétním proteinem anebo lze získat *in silico* predikci na základě informací o struktuře proteinů a jejich vazebných vlastnostech dostupných v databázích (Matys et al., 2003; Teixeira et al., 2006). Pro izolaci konkrétního proteinu např. transkripčního faktoru může být volen kratší sekvenčně specifický DNA ligand, ke kterému má daný protein afinitu. Řada

proteinů však interaguje s DNA na základě kaskádovité vazby dalších proteinů k vzdálenějším regulačním oblastem DNA a proto je k izolaci celého proteinového komplexu vhodné zvolit jako ligand delší úsek DNA (Babayeva et al., 2012; Jiang et al., 2006; Mittler et al., 2009). Kromě sekvenčně specifických ligandů lze pro afinitní purifikaci použít i ligandy strukturně specifické. Řada proteinů rozpoznává charakteristické sekundární struktury nukleových kyselin jako je Z-DNA, G-kvadruplexy, vnitřní smyčky a vlásenky (Fishel et al., 1988; Gao et al., 2015).

Nezbytným požadavkem pro správnou identifikaci DNA vazebných proteinů je volba kontrolního ligandu. Tento ligand by měl být co nejvíce podobný specifickému avšak bez specifického místa, jehož vazebné proteiny hledáme. Jedná se většinou o oligonukleotid obsahující mutovanou nebo jinak pozměněnou specifickou sekvenci. V případě, že sledujeme proteiny rozpoznávající specifickou strukturu DNA, jako kontrolní volíme strukturně odlišný, většinou lineární ligand (Gao et al., 2015; Himeda et al., 2004; Mittler et al., 2009).

Imobilizace DNA afinitního ligandu je prováděna na základě vazby mezi řetězcem DNA oligonukleotidu a funkčními skupinami vhodně zvolené pevné fáze. Vznikající vazby mohou být nekovalentního i kovalentního charakteru (Cavalieri a Carroll, 1970; Jia a Jarrett, 2015; Litman, 1968). V současné době je nejčastějším způsobem imobilizace založená na biospecifické vazbě mezi biotinem-streptavidinem. DNA ligand je již během své syntézy modifikován biotinem, což umožňuje jeho následnou vazbu k magnetickým částicím pokrytým streptavidinem (Himeda et al., 2004; Hubner et al., 2015; Mittler et al., 2009).

4.1.2 DNA-afinitní chromatografie

Samotný průběh DNA-afinitní purifikace zahrnuje několik důležitých kroků jako je příprava vzorku, inkubace afinitní matrice se vzorkem, promývání matrice, eluce DNA vazebných proteinů a přípravu eluátu pro následnou MS analýzu.

Vstupním materiálem je většinou buněčný lyzát živočišného, rostlinného nebo bakteriálního původu. Jedná se o velice komplexní směs, kde se cílové proteiny vyskytují ve velmi malém množství a jsou maskovány přítomností abundantních proteinů. Důležitým krokem je tedy příprava vzorku před samotnou afinitní purifikací. Jedním z možných postupů je frakcionace pomocí iontové výměnné chromatografie a testování jednotlivých frakcí na vazebnou aktivitu např. gelovou retardační analýzou. K samotné DNA afinitní purifikaci je pak možné použít

pouze konkrétní aktivní frakci (O'Neill et al., 1999; Yaneva a Tempst, 2003). Dalšími způsoby je preinkubace lyzátu se samotnou maticí nebo s maticí obsahující mutovanou nebo jinou nespecifickou sekvenci oligonukleotidu (Dobretsova et al., 2008; Meng et al., 2006).

Zásadním krokem je inkubace DNA afinitní matrice se vzorkem. Důležitý je obsah solí a iontů přítomných ve vazebném pufru zvolený tak, aby co nejlépe odrážel fyziologické prostředí interakce NK a proteinů. Vysoká koncentrace solí zamezuje vzniku nespecifických vazeb, ale také může snižovat možnost tvorby vazeb specifických (Yaneva a Tempst, 2003).

Následujícím krokem je promývání afinitní matrice, které slouží k odstranění nenavázaných nebo nespecificky vázaných proteinů. K tomuto účelu může být zvolen systém pufrů se zvyšující se koncentrací solí a detergentů. Vhodný je také přídavek tzv. kompetitorů. Jako kompetitory označujeme DNA molekuly, které neobsahují specifické vazebné místo a jejich přídavek do vazebného i promývacího pufru umožňuje vyvázání nespecificky vázaných proteinů (Meng et al., 2006; Yaneva a Tempst, 2003)

Eluce proteinů je posledním krokem DNA afinitní purifikace. Lze ji provést opět systémem pufrů s různou koncentrací solí, detergenty nebo rovnou pomocí vzorkovacího pufru pro elektroforetické dělení proteinů (Byrum et al., 2012; Scheibe et al., 2013a). Eluci lze provést také štěpením proteinů přímo na promyté afinitní matici (Hubner et al., 2015; Mittler et al., 2009) nebo v případě streptavidinových částic vytěsnit DNA ligand značený desthbiotinem pomocí biotinu, který vykazuje vyšší afinitu k streptavidinu (Déjardin a Kingston, 2009; Hirsch et al., 2002).

4.2 Identifikace DNA vazebných proteinů pomocí kvantitativní proteomiky a MS

K identifikaci DNA vazebných proteinů získaných izolací pomocí DNA-afinitní chromatografie se nejčastěji používají dva typy instrumentálního uspořádání hmotnostního spektrometru. První zahrnuje ionizaci analytu pomocí MALDI a to většinou ve spojení s analyzátozem doby letu iontů MALDI-TOF (z angl. matrix assisted laser desorption ionization-time of flight) (Bose et al., 2006; López de Silanes et al., 2010). Druhý způsob identifikace určený především k analýze složitějších směsí je ionizace elektrosprejem v kombinaci a tandemovou hmotnostní spektrometrií ESI-MS/MS (z angl. electrospray ionization) (Harris et al., 2006; Mittler et al., 2009; Scheibe et al., 2013).

Samotná identifikace proteinů je principiálně založena na získání informace o molekulové hmotnosti analyzovaných peptidů případně informace o jejich aminokyselinové sekvenci. Tyto poznatky jsou následně porovnávány s teoretickými hodnotami získanými *in silico* analýzou proteinů dostupných v databázi, čímž dochází k identifikaci proteinu (Keller et al., 2002; Perkins et al., 1999).

Aplikace metod kvantitativní proteomiky umožňuje srovnání proteinů vázaných k specifické DNA afinitní matici a kontrolnímu DNA ligandu a tím odlišení proteinů vázaných nespecificky ať už k samotnému DNA řetězci anebo pomocnému nosiči. Toto srovnání je umožněno díky izotopovému značení proteinů, které lze provádět metabolickou anebo chemickou cestou. Metabolické značení SILAC (z angl. stable isotope labeling of amino acids in cell culture) je založeno na inkorporaci aminokyselin s různým obsahem izotopů prvků C^{13} a N^{15} do proteinů během proteosyntézy buněčné kultury (Ong a Mann, 2006). Chemické značení probíhá na úrovni proteinů i peptidů a jeho podstatou je vazba chemických značek („mass tags“), které mají shodné chemicko-fyzikální vlastnosti, ale liší se molekulovou hmotností díky různému obsahu izotopů prvků (Choe et al., 2007; Gygi et al., 1999).

Různé značení proteinů/peptidů získaných elucí ze specifické afinitní matrice a kontrolního ligandu umožňuje jejich smíchání v poměru 1:1 a společnou analýzu pomocí MS. Informace o kvantitativním zastoupení proteinů v původních vzorcích je získáno na základě porovnání MS intenzit nebo ploch charakteristických iontů, a to buď prekursorových iontů peptidů v „survey“ MS spektru anebo reportérových iontů v MS/MS spektrech získaných fragmentací prekursorového iontu v kolizní cele. Výslednou hodnotou je tedy poměr udávající zastoupení daného proteinu na specifické vs. kontrolní DNA sekvenci. Tento způsob vyhodnocení tedy umožňuje určit proteiny obohacené na specifické afinitní matici a zároveň odlišuje nespecificky vázané proteiny, které jsou v obou vzorcích zastoupeny ve stejném množství (Hubner et al., 2015; Mittler et al., 2009).

4.3 Replikační stres a běžná fragilní místa

Replikační stres (RS) je považován za příčinu zvýšené genetické nestability rakovinných buněk a počátek tumorigeneze případně senescence (Burrell et al., 2013; Flach et al., 2014). Jako RS označujeme děje probíhající na replikační vidličce, které vedou ke zpomalení nebo zastavení replikace DNA případně kolapsu replikační vidličky. Vnějších i vnitřních příčin RS může být celá řada. Může se jednat o nedostatek jednotlivých komponent replikace případně strukturní

bariéry znesnadňující její průběh (Groth et al., 2007; Letessier et al., 2011a; Poli et al., 2012; Toledo et al., 2013).

Hlavním proteinem zodpovědným za regulaci mechanismů odehrávajících se na replikační vidličce během RS je ATR (z angl. ataxia-telangiectasia RAD3-related) kináza patřící do rodiny fosfatidylinositol-3-kináz. Jedná se o protein, který fosforylací (aminokyselinového motivu serinu a/nebo treoninu za nimiž následuje glutamin) svých substrátů reguluje dráhy buněčné odpovědi na poškození DNA (Matsuoka et al., 2007; O'Neill et al., 2000).

ATR kináza aktivuje kontrolní a opravné mechanismy a zodpovídá za kompletní replikaci DNA během S fáze buněčného cyklu a přechod buňky do mitózy. Působením replikačního stresu ATR zpomaluje replikaci, spouští kontrolní mechanismy a zástavu buněčného cyklu, podílí se na stabilizaci DNA a případném restartu replikace (Dimitrova a Gilbert, 2000; Lopes et al., 2001). Mechanismus aktivace ATR je zahájen označením volné ssDNA vznikající na replikační vidličce pomocí proteinu RPA. RPA je dále rozpoznáván ATR interagujícím proteinem ATRIP a dochází ke vzniku heterodimeru ATR/ATRIP (Cortez et al., 2001). Aktivovaná ATR kináza dále fosforyluje své substráty, z nichž nejvýznamnější je kináza Chk1, a dochází tak k aktivaci homologní rekombinace (HR) a kontrolního bodu buněčného cyklu G2/M (Sørensen et al., 2005). ATR kináza rozpoznává a stabilizuje také ssDNA vznikající v oblastech běžných fragilních míst, která jsou působením RS náchylná k tvorbě těžce replikovatelných sekundárních struktur a ke vzniku DNA poškození.

Běžná fragilní místa (BFM) jsou specifické úseky DNA, u nichž vlivem replikačního stresu dochází k poškození viditelnému jako mezery a zlomy na metafázích chromozomech (Glover et al., 1984). Tento jev detekce poškození v místě chromozomu se obecně označuje jako exprese fragilního místa. BFM jsou spojována s chromosomálními aberacemi, jako jsou delece a translokace (Arlt et al., 2006). Jedná se také o místa, kde může docházet k amplifikaci onkogenů a integraci viru do genomu (Coquelle et al., 1997; Thorland et al., 2003).

Molekulární analýzou těchto míst bylo odhaleno několik základních charakteristik, které mohou být příčinou jejich nestability/fragility. Nestabilita BFM může být způsobena jejich strukturními vlastnostmi. Bylo prokázáno, že se jedná o velmi dlouhé oblasti genomu bohaté na A-T repetice. Tyto oblasti se zároveň vyznačují vysokou DNA flexibilitou, která zapříčiní vznik superhelikální struktury před replikační vidličkou a zamezí tak činnosti topoizomeráz a snadnému postupu replikačního komplexu (Gardiner, 1995; Mishmar et al., 1998). Druhá teorie se opírá o fakt, že se jedná o oblasti chudé na replikační počátky, což může mít za

následek nekompletní replikaci (Cayrou et al., 2010; Letessier et al., 2011). Příčinou fragility může být také kolize replikace a transkripce na jednom templátu DNA a to zejména u BFM, které obsahují dlouhé geny (>800kb) a nedokončí transkripce před replikací. Tato situace způsobí, že dojde k setkání replikace a transkripce na jednom DNA templátu a dojde ke vzniku RNA:DNA hybridních molekul tzv. R-loops, které vedou k nestabilitě fragilních míst (Helmrich et al., 2011)

Látka indukující expresi většiny fragilních míst je aphidicolin (APH). Jedná se o tetracyklinový diterpenoid izolovaný z houby *Nigrosphora sphaerica*. APH působí inhibičně na DNA polymerázu α , δ a ϵ v menších koncentracích způsobuje zpomalení nikoliv zastavení DNA replikace (Glover et al., 1984; Mrasek et al., 2010). Během tohoto procesu dochází k stálému rozvolňování DNA dvoušroubovice pomocí DNA helikázy a hromadění ssDNA, která tak vytváří stabilní těžce replikovatelné sekundární struktury náchylné k poškození (Zlotorynski et al., 2003).

Byla identifikována celá řada proteinů podílejících se na zachování stability BFM. Mezi tyto proteiny patří ATR kináza a její substráty Chk1 (Durkin et al., 2006), BRCA1 (Turner et al., 2002), WRN (Pirzio et al., 2008), FANCD2 (Howlett et al., 2005) apod. Nejčastějším způsobem potvrzení role proteinů v zachování stability fragilních míst je příprava buněčné linie s funkčním deficitem studovaného proteinu a detekce chromozomálních zlomů bez a s indukci RS. Studium exprese BFM (přítomnost zlomu, mezery nebo zúžení v chromozomu) lze provést na základě cytogenetického pozorování fragilního místa, které je rozpoznáno na základě chromozomálního pruhování nebo metodou fluorescenční in situ hybridizace (Pirzio et al., 2008).

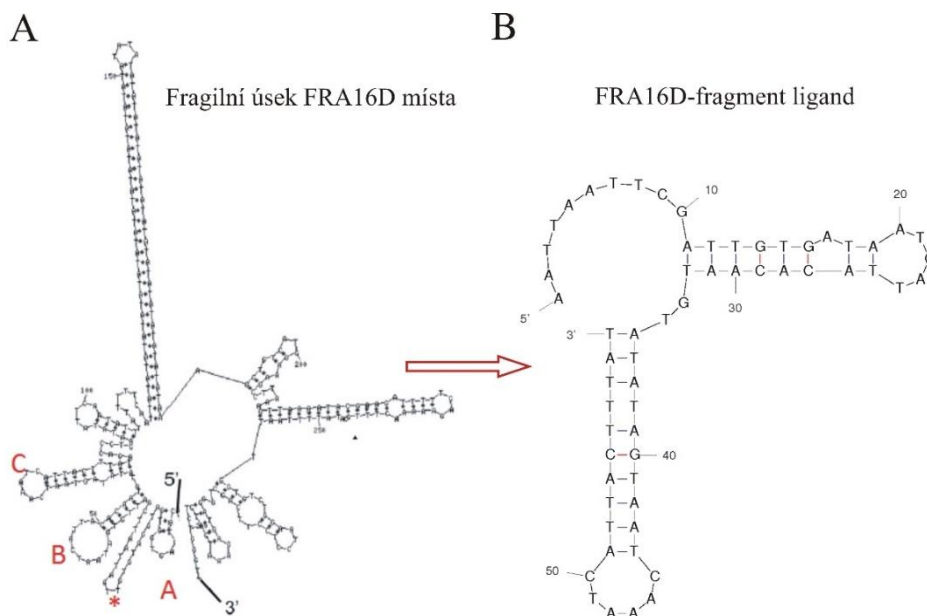
Metoda DNA-afinitní chromatografie ve spojení s kvantitativní proteomikou a MS nebyla dosud ve studiu proteinů zodpovědných za zachování stability BFM aplikována.

5 Metody

5.1 Návrh specifického a kontrolního DNA ligandu

Návrh specifického ligandu pro izolaci proteinů vázajících se k sekundární struktuře fragilního místa FRA16D a *in silico* predikce lineárního kontrolního ligandu byla provedena ve spolupráci s Dr. Jiřím Vollerem a detailní postup práce je vysvětlen v jedné z prvoautorských publikací (Beresova et al., 2016).

Návrh specifického ligandu, sekundární struktury fragilního místa FRA16D, vycházel z již publikované sekvence fragilního úseku tohoto místa Obr. č. 1A (Zhang and Freudenreich, 2007). Pro syntézu ligandu byla vybrána strukturně variabilnější část sekvence, vlásenka B, C a část označená hvězdičkou Obr. č. 1B. Prvních 9 pozic z 5' konce vybraného úseku bylo nahrazeno cytosinem a slouží jako linker. Analýzou v programu Mfold (Zuker, 2003) bylo ověřeno, že navržená sekvence 68-mer (5'-3') CCC CCC CCC GAT TGT GAT AAT CAT TAC ACA ATG TAT ATA GTA ATC AAA TCA TTA CTT TAT vytváří strukturu, která je v podstatě stejná jako struktura, kterou vytváří odpovídající část celé sekvence fragilního místa FRA16D. Na rozdíl od plné sekvence má nejstabilnější forma navržené sekvence spárované 2 další nukleotidové páry v oku vlásenky B. Vzhledem k tomu, že tyto dva páry jsou odděleny od dvouvláknové části vlásenky, lze očekávat, že toto párování nebude příliš stabilní. Analýza v Mfold programu probíhala s nastavením parametrů, které odpovídaly experimentálním podmínkám námi provedené DNA-afinitní purifikace (150 mM Cl⁻, 4°C, 1 mM Mg²⁺).



(převzato z: Zhang a Freudenreich 2007)

Obr. č. 1: Struktura specifického afinitního ligandu DNA. Finální struktura FRA16D-fragment ligandu použitého pro afinitní purifikaci FRA16D vazebných proteinů B) vycházející ze známé sekundární struktury fragilního místa FRA16D A).

5.2 Konstrukce afinitní matrice

1 mg magnetických částic SIMAG-streptavidine (Chemicell) byl převeden do 1,5 ml mikrozkušavky a promyt 3x1 ml citrátového pufru (150 mM NaCl, 15 mM Na₃C₆H₅O₇, pH 7). K částicím bylo přidáno 0,5 ml citrátového pufru a 200 pmol biotinem značených DNA oligonukleotidů. Imobilizace probíhala po dobu 15 minut při laboratorní teplotě za mírného míchání na rotační třepačce. Následovalo pomývání částic 3x1 ml citrátového pufru k odstranění nenavázaných DNA oligonukleotidů.

Zhotovená DNA-afinitní matrice byla následně promyta 2x 1 ml vazebného pufru (25 mM HEPES, 150 mM NaCl a 1 mM MgCl₂). Po druhém promytí matrice následovala inkubace s 1 ml vazebného pufru při 4°C po dobu 15 minut za mírného míchání na rotační třepačce. Takto připravená matrice byla ponechána v lednici při 4°C a okamžitě použita pro následnou afinitní purifikaci.

5.3 Kultivace buněčných kultur

Pro tuto práci byly použity buněčné linie: HeLa S3 (ATCC) epiteliální buňky karcinomu děložního čípku, U2OS (ATCC) buněčná linie izolovaná z lidského osteosarkomu, TIG-3 (ATCC) primární linie plicních fibroblastů. Tyto kultury byly kultivovány v DMEM mediu se stabilním glutaminem a 4,5 g/l glukózy (Invitrogen), doplněném o 10% fetální sérum a 1% penicilin/streptomycin. Kultivace byla prováděna v inkubátoru s 5% CO₂ při 37°C.

U stabilně transfekované U2OS buněčné linie byla exprese shRNA namířená proti proteinu ATR indukována přidavkem doxycyklinu 1 µg/ml po dobu 4 dní před plánovaným experimentem. Selektce stabilně transfekovaných buněk byla prováděna pomocí puromycinu 1 µg/ml a blastocidinu 5 µg/ml.

Metabolické značení proteinů (SILAC):

HeLa S3 buněčná linie byla kultivována v RPMI 1640 mediu původně prostém na přítomnost aminokyselin lysinu a argininu, doplněném o 10% dialyzované fetální sérum a 1% penicilin/streptomycin. Buněčná linie byla rozdělena na dvě pasáže, z nichž jedna byla podrobena metabolickému značení proteinů a to přidavkem L- (U-¹³C⁶, ¹⁵N⁴) argininu a L-(U-¹³C⁶, ¹⁵N²) lysinu (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) do kultivačního media (linie dále označována jako „heavy“) a druhá část buněk byla kultivována s přidavkem argininu a lysinu s přirozeně se vyskytujícími izotopy prvků (linie dále označována jako „light“).

Ošetření buněk aphidicolinem:

Replikační stress byl indukován přidavkem aphidicolinu v koncentracích 0,2-0,8 µM (v závislosti na typu experimentu) a to po dobu 24 hodin.

Transfekce pomocí siRNA:

Transfekce byla provedena na 6 cm Petriho misce s konfluencí buněčné kultury 60-80% pomocí lipofectaminu RNAiMAX (Invitrogen) a komerčně dostupné směsi siRNA proti XPC proteinu (siXPC SMART pool (Dharmacon, M-016040-01-0010)), anebo kontrolní siRNA (Dharmacon, D-001220-01-05). Do dvou mikrozkušavek bylo napipetováno 400 µl OPTI-MEM roztoku (Invitrogen). Do jedné zkumavky bylo přidáno 8 µl lipofectaminu a do druhé 8 µl 20 µM siRNA. Po 5 minutách inkubace byly obě mikrozkušavky smíchány a za občasného promíchání inkubovány 30 minut. Takto připravený transfekční roztok byl přidán k buněčné kultuře inkubované v 3 ml media bez antibiotik. Transfekce probíhala v inkubátoru po dobu 6

hodin. Poté bylo medium s transfekčním roztokem odstraněno a přidáno 5 ml kompletního DMEM media. Úspěšnost transfekce byla ověřena western blotem.

5.4 Příprava buněčného lyzátu a FRA16D-fragment afinitní chromatografie

HeLa S3 „heavy“ a „light“ buněčné linie byly kultivovány za normálních podmínek a za podmínek způsobujících replikační stres tj. s přídatkem 0,4 μ M aphidicolinu po dobu 24 h anebo 0,5% DMSO.

Prvními kroky FRA16D-fragment afinitní chromatografie byla izolace jaderných proteinů, která byla provedena pomocí komerčně dostupného kitu NEP-PER nuclear and cytoplasmatic extraction kit (Thermo Scientific) a kvantifikace získaných proteinů pomocí Bradfordovy metody (Biorad).

1 mg „heavy“ jaderného lyzátu byl přidán do 1 ml vazebného pufru k FRA16D-fragment afinitní matici a poté byla provedena inkubace (umožňující vzájemnou interakci FRA16D-fragment ligandu s proteiny) po dobu 1 hodiny při 4°C za pomalého míchání na rotační třepače. Následovalo promytí matrice vazebným pufrům 5x 1 ml k odstranění nenavázaných proteinů a eluce proteinů vázaných k FRA16D-fragment afinitní matici. Eluce vázaných proteinů byla provedena přímo do vzorkovacího pufru pro elektroforetické dělení a to tak, že 25 μ l vzorkovacího pufru bylo napipetováno k magnetickým částicím a 10 minut při 95°C intenzivně třepáno. Po proběhlé eluci byl vzorkovací pufr obsahující vazebné proteiny pečlivě odpipetován od magnetických částic. Stejný postup byl proveden také se stejným množstvím „light“ jaderných proteinů inkubovaných s maticí s kontrolním DNA ligandem. Tento experiment je dále v textu označován jako „forward“.

Při druhém opakování tohoto experimentu bylo značení jaderných proteinů přidávajících se k matici obráceno. „Light“ jaderné proteiny byly inkubovány s FRA16D-fragment afinitní maticí a „heavy“ jaderné proteiny s kontrolní DNA maticí. Tento experiment je dále v textu označován jako „reverse“.

Jednotlivé eluáty s FRA16D-fragment afinitní matrice a matrice s kontrolním DNA ligandem byly smíchány v poměru 1:1 a dále zpracovány pro následnou MS analýzu.

DNA-afinitní chromatografie určená k izolaci FRA16D vazebných proteinů byla nejprve provedena s jadernými proteiny pocházejícími s buněk kultivovaných za normálních podmínek, a poté s proteiny z buněk vystavených replikačnímu stresu.

5.5 SDS-PAGE

Jednotlivé eluce proteinů s FRA16D-fragment afinitní matrice a kontrolní matrice smíchané v poměru 1:1 byly separovány pomocí elektroforetického dělení v polyakrylamidovém gelu (4-15% BIS-TRIS SDS-PAGE (Biorad)). Po separaci byl gel obarven pomocí roztoku Commassie Brilliant blue a oblasti detekovaných proteinů rozděleny na 13 částí, u nichž bylo provedeno proteolytické štěpení proteinů.

5.6 Proteolytické štěpení proteinů v gelu

Proteolytické štěpení proteinů v gelu bylo provedeno dle již publikovaného metodického postupu (Sebela et al., 2006; Shevchenko et al., 2006). Jednotlivé části gelu obsahující separované proteiny byly přeneseny do 1,5 ml mikrozkušavky rozkrájeny na malé kousky a za intenzivního třepání v termomixeru (1000 rpm, 15 minut, 25°C) odbarveny přidavkem odbarvovacího roztoku (50% (v/v) acetonitril (ACN)/100 mM NH₄HCO₃). Odbarvovací roztok byl od gelových kousků odstraněn a gelové kousky byly následně dehydratovány přidavkem 100% ACN tzv. shrinking. Po dostatečné dehydrataci byly gelové kousky vysušeny ve vakuu.

Následovala redukce pomocí redukčního činidla (10 mM dithiothreitol/ 100 mM NH₄CO₃) po dobu 30 minut při 56°C v termomixeru. Po redukci byl opět proveden shrinking gelových kousků následovaný alkylací proteinů přidavkem alkylačního činidla (55 mM iodoacetamid /100 mM NH₄CO₃) po dobu 20 minut ve tmě. Po proběhlé alkylaci byl roztok nahrazen deionizovanou vodou a gelové kousky promyty třepáním v termomixeru (1000 rpm, 15 minut, 25°C). Poté následoval opět shrinking gelových kousků.

Samotné enzymatické štěpení proteinů probíhalo po přidání štěpícího pufru (20 ng/μl trypsinu ve 20 mM NH₄CO₃/1 mM CaCl₂) přes noc při 37°C.

5.7 Příprava vzorků pro MS analýzu

Po proběhlém proteolytickém štěpení byla provedena extrakce peptidů přidavkem 2x 100μl extrakčního pufru (30% (v/v) ACN/5% (v/v) kyselina mravenčí (FA)). Získané roztoky s extrahovanými peptidy byly odpařeny na vakuové centrifugační odparce a rozpuštěny v 50 μl

5% (v/v) FA. Získané peptidové směsi jsou přečištěny pomocí špiček nebo kolonek plněných C18 reverzní fází a připraveny k MS analýze (Rappsilber et al., 2007).

StageTip špičky byly naplněny C18 reverzní fází a umístěny do otvoru ve víčku 1,5 ml mikrokumavky. Jednotlivé mobilní fáze procházely přes C18 reverzní fázi na základě odstředivé síly vznikající při centrifugaci. Reverzní fáze byla aktivována přidavkem 40 μ l isopropanolu (2000 rpm, 5 minut) a ekvilibrována 2x 40 μ l 5% (v/v) FA (1500 rpm, 10 minut). Špička byla umístěna do nové 1,5 ml mikrokumavky a následovalo nanesení vzorku (1000 rpm, 15 minut). Po průchodu vzorku C18 fází bylo provedeno její promytí a to 2x 40 μ l 5% (v/v) FA (1500 rpm, 10 minut). Následovala eluce peptidů do nové 0,5 ml mikrokumavky pomocí 2x 40 μ l 50% (v/v) metanolu s 2% (v/v) FA (1000 rpm, 10 minut). Roztoky s přečištěnými peptidy byly odpařeny na rotační vakuové odparce a rozpuštěny v 0,5% FA před samotnou MS analýzou.

5.8 Analýza peptidů pomocí nLC-MS/MS

Analýza peptidových vzorků byla provedena pomocí nanokapalinové chromatografie (nanoEASY-nLC System, Thermo Fisher Scientific) ve spojení s UHR-Q-TOF maXis systémem vybaveným iontovým zdrojem nanoESI (Bruker Daltonik). Jednotlivé vzorky byly nastříknuty v objemu 5 μ l na předkolonu (2 cm x 75 μ m plněnou 5 μ m částicemi ReproSil-Pur C18-AQ serbentem), kde byl vzorek zakoncentrován a následně separován na analytické koloně (15 cm x 75 μ m plněné 3 μ m částicemi ReproSil-Pur C18-AQ sorbentu). Separace probíhala 185 minutovou gradientovou elucí s průtokem 200 nl/minutu. Gradient byl tvořen různým poměrem mobilní fáze A: 0,4% (v/v) FA a B: 0,4% (v/v) FA v 80% (v/v) ACN.

Při analýze byly ionty tříděny v MS modu v rozsahu m/z 50-2,500 Da za 1s. MS/MS data byla pořízena v rozsahu m/z 50-350 Da pro 5 nejintenzivnějších prekurzorových iontů s nábojem ≥ 2 . Prekurzorové ionty skenované v MS/MS modu byly vyloučeny s další fragmentace po dobu 18s.

Nastavení iontového zdroje: napětí kapiláry 1750 V, průtok sušícího plynu 1,5 l/minutu, teplota sušení 180°C.

5.9 Zpracování MS dat a jejich vyhodnocení

Data získaná MS analýzou byla vyhodnocena softwarem Data Analysis 4.2 SPI (Bruker Daltonik). Získané XML soubory dat obsahující prekurzory a jejich fragmentace byly dále zpracovány pomocí serveru Mascot v2.2.7 (Matrix Science) vyhledáváním proti UniProt databázi (20150107, 89706 seq; www.uniprot.org) doplněné o informace o přítomných kontaminantech jako keratiny, trypsin použitý k proteolytickému štěpení, hovězí sérový albumin a také o reverzní sekvence všech lidských proteinů pro stanovení false discovery rate (FDR). Parametry pro vyhledávání v Mascot serveru byly následující: tolerance MS módu ± 25 ppm a v MS/MS módu ± 0.05 Da, proteolytický enzym-trypsin, jedno vynechané štěpení, fixní modifikace karbamidometylace cysteinu, jako variabilní modifikace pak byla určena oxidace methioninu, N-terminalní acetylace a značení peptidů $^{13}\text{C}(6)^{15}\text{N}(2)$ lysinem a $^{13}\text{C}(6)^{15}\text{N}(4)$ argininem.

Proteiny identifikované prohledáváním pomocí Mascot serveru byly dále zpracovány v ProteinScape v2.1 programu dle následujících parametrů: Pro identifikaci proteinu bylo požadována přítomnost minimálně dvou peptidů se skóre ≥ 15 a FDR 5%. Pro kvantifikaci proteinu pak bylo třeba minimálně 3 peptidových párů daného proteinu.

Relativní poměry proteinů identifikovaných v „forward“ a „reverse“ experimentu byly logaritmicky transformovány \log_2 a vyneseny proti sobě do grafů. Dle normálního rozdělení hodnot jednotlivých poměrů proteinů byly jako signifikantní ($p < 0,01$) určeny proteiny s hodnotou poměru větší jak 2.58σ (Oppermann et al., 2009). Tyto proteiny se vyskytují v pravém horním rohu grafu a mohou být označovány za proteiny specificky se vážající k FRA16D-fragment ligandu.

5.10 Imunofluorescenční barvení vzorků

Buňky byly fixovány 10% formalínem po dobu 15 minut. Následovala permeabilizace přidávkem 0,5% Triton X v PBS po dobu 5 min. Vzorky byly blokovány roztokem 1% BSA v PBS po dobu 20 minut na vertikální třepačce. Po blokaci byly přidány primární protilátky a inkubovány přes noc při 4°C v lednici. Po promytí roztokem PBS s 1% Tween 20 byly přidány sekundární protilátky a následovala inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě. DNA byla obarvena pomocí roztoku Hoechst 33342 (Invitrogen) v PBS $5 \mu\text{g/ml}$.

5.11 Analýza mitotických buněk - detekce chromozomálního poškození pomocí γ H2AX proteinu

Transfekovaná buněčná linie byla vysazena na 24 jamkovou destičku a ošetřena pomocí 0,4 μ M APH anebo 0,5% DMSO po dobu 24h. Poté byly vzorky fixovány a barveny systémem protilátek. Primárními protilátkami pH3 (pSer10, Milipore, 6-570, 1:1000) a γ H2AX (pSer139, Santa Cruze 07-146, 1:500). Sekundární protilátky proti myší Alexa Fluor 488 (A11001, Invitrogen, 1:1000) a králičí Alexa Fluor 568 (A11036, Invitrogen 1:1000).

Snímky byly pořízeny pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu (Zeiss Cell Observer Spining disk konfokální mikroskop). Destička byla umístěna na posuvný stolek mikroskopu a jednotlivé pozice v jamkách automaticky skenovány s rozlišením 10x. Na základě pH3 pozitivitu byly vyselektovány mitotické buňky, v nichž byly detailně (rozlišení 63x) detekovány γ H2AX fokusy. Analýza γ H2AX fokusů v nejméně 150 mitózách byla provedena pomocí MatLab programu, softwarem navrženým Dr. Tomášem Fürstem. Každý experiment byl proveden minimálně ve třech biologických opakováních.

5.12 Imunofluorescenční detekce proteinů buněčné odpovědi na poškození DNA

Transfekovaná buněčná linie byla vysazena na 24 jamkovou destičku a ošetřena pomocí 0,2 - 0,4 μ M APH anebo 0,5% DMSO po dobu 24h. Poté byly buňky fixovány a obarveny systémem protilátek.

Detekce 53BP1 bodies v G1 buněčné populaci: 53BP1 (Santa Cruz, 500x), cyklin A (Leica, 50x), sekundární protilátky Alexa Fluor 488 (A11001, Invitrogen, 1:1000) a Alexa Fluor 568 (A11036, Invitrogen 1:1000). Snímky byly pořízeny pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu BX71 (Olympus) a vyhodnoceny ScanR softwarem (Olympus). Jednotlivé buňky byly rozpoznány na základě barvení roztokem Hoechst 33342. Na základě detekce intenzity cyclin A proteinu byly odlišeny S/G2 buňky (cyclin A pozitivní) a cyclin A negativní G1 populace. Pouze v cyclin A negativních buňkách byl detekován počet fokusů 53BP1 proteinu tzv. 53BP1 bodies.

Při přípravě vzorku k barvení ATR (Santa Cruz, sc-22760, 1:500), ATRIP (Cell Signaling, 2737, 1:250) proteinů předcházela preextrakce vzorku (10mM PIPES, 300 mM sacharóza,

1,5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,5% Triton X, inhibitory proteáz a fosfatáz inkubace 20 minut na ledu) samotné fixaci. Během analýzy byly buňky rozpoznány na základě barvení roztokem Hoechst 33342. Intenzita signálu ATR a ATRIP proteinu reflektuje množství proteinu vázaného k chromatinu. Každý experiment byl proveden minimálně ve třech biologických opakováních.

5.13 Western blot

Elektroforetické separace vzorků byla provedena v 4-15% SDS-PAGE gradientovém gelu (Biorad), (20 mA 90 minut). Po separaci byl gel přenesen na nitrocelulosovou membránu pomocí semi-dry western blotu (150 mA 90 minut). Membrána byla blokována v 5% mléku po dobu 1 h. Primární protilátky byly inkubovány přes noc při 4°C, sekundární protilátka značená křenovou peroxidázou při laboratorní teplotě 1 hodinu. Detekce proteinu byla provedena pomocí chemiluminiscenčního kitu ECL (Thermo Scientific).

Použité primární protilátky: XPC (Novus Biological, NB100-477, 1:1000), pChk1 (Ser345, Cell Signalling, 2348, 1:500), Chk1 (Santa Cruz, sc-8408, 1:500), GAPDH (GeneTex, GTX30666, 1:2000), MCM7 (Santa Cruz, sc-65469, 1:100). Sekundární protilátky proti myší protilátce (GE-Healthcare, NA931V, 1:1000), proti králičí protilátce (GE-Healthcare, NA934V, 1:1000).

5.14 Určení mitotického indexu pomocí průtokové cytometrie

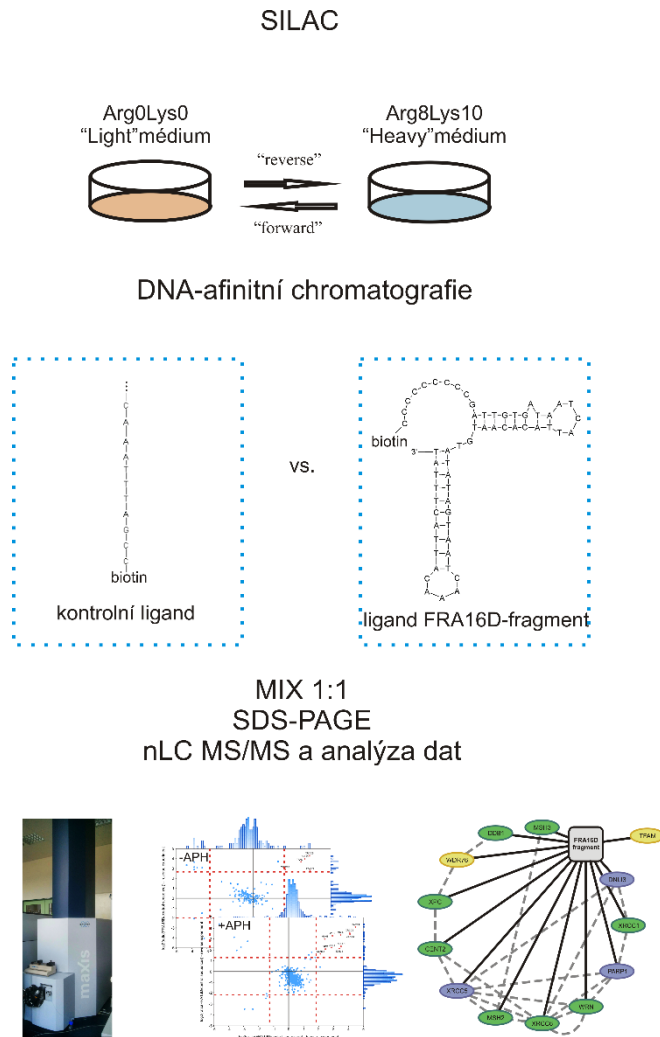
Transfekované buněčné linie byly vysazeny na 6 cm Petriho misky a ošetřeny 0,2 μM APH, 0,4 μM APH, anebo 0,5% DMSO po dobu 24 h. 6 h před fixací buněk byl přidán nocodazol ve výsledné koncentraci 100 ng/ml. Buňky byly trypsinizovány, fixovány studeným 10% formalínem po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Následovala permeabilizace 0,5% Tritonem X 5 minut. Vzorky byly obarveny primární protilátkou na detekci pH3 (pSer10, Milipore, 6-570, 1:1000) 1 h při laboratorní teplotě. Poté následovalo barvení sekundární protilátkou (Alexa Fluor 488, Invitrogen A11034, 1:1000) taktéž 1h při laboratorní teplotě. Buňky byly centrifugovány a resuspendovány v roztoku PBS s 2% fetálního telecího séra a s přídatkem 0,5 ug/ml DAPI. Následovala analýza pomocí průtokového cytometru (BD FACSVerser).

6 Komentované výsledky a diskuze

6.1 Experimentální strategie k identifikaci proteinů interagujících s BFM

Jeden z hlavních požadavků pro izolaci a následnou identifikaci proteinů interagujících s BFM byla konstrukce specifické a také kontrolní afinitní matrice. Hlavním požadavkem při návrhu specifického afinitního ligandu bylo získat strukturu, která bude představovat oblast BFM během RS, a tedy znázorní stabilních sekundární strukturu, která představuje pro buňku bariéru znesnadňující průběh replikace. Jako předloha pro návrh ligandu byla zvolena část fragilního místa FRA16D (Zhang a Freudenreich, 2007). Z tohoto místa byl vybrán strukturně nejvariabilnější úsek (FRA16D-fragment) a pomocí Mfold programu, který umožňuje analýzu strukturních vlastností DNA a RNA molekul, bylo ověřeno zachování sekundární struktury tohoto místa během experimentálních podmínek námi provedené DNA-afinitní chromatografie (Zuker, 2003). Dalším krokem byl návrh kontrolního DNA ligandu, který by spolu s aplikací metody relativní kvantifikace SILAC umožnil identifikovat a odlišit proteiny vázané k specifickému DNA ligandu. Hlavním požadavky kladené na kontrolní ligand bylo zachování stabilní lineární struktury během experimentálních podmínek DNA-afinitní chromatografie a absence promotorových oblastí. DNA afinitní ligandy byly během komerční syntézy modifikovány na 5'-konci biotinem, což umožnilo jejich následnou imobilizaci k magnetickým částicím pokrytým streptavidinem.

Samotná DNA afinitní chromatografie byla provedena paralelně na specifické (FRA16D-fragment) a kontrolní afinitní matici s jadernými proteiny získanými z buněk (HeLa S3) kultivovaných za normálních podmínek, a následně z buněk vystavených RS indukovanému pomocí 0,4 μM APH po dobu 24 hodin. Každý z experimentů (bez a s indukovaným RS) byl proveden ve dvou replikátech tzv. forward a reverse, během kterých bylo vyměněno SILAC značení proteinů vkládaných na specifickou a kontrolní matici Obr. č. 2.



Obr. č. 2: Schéma experimentální strategie izolace a následné identifikace proteinů interagujících s FRA16D-fragment afinitním ligandem. Buněčná kultura byla kultivována v „heavy“ a „light“ SILAC mediu. DNA-afinitní chromatografie byla provedena paralelně na DNA afinitní matici obsahující specifický ligand FRA16D-fragment a DNA afinitní matici s kontrolním ligandem. Jednotlivé eluáty, ze specifické a kontrolní matrice, byly smíchány 1:1 a podrobeny elektroforetické separaci. Následovalo proteolytické štěpení proteinů v gelu a analýza peptidů pomocí nLC MS/MS. Proteiny obohacené na specifické FRA16D matici byly vyhodnoceny aplikací metody relativní kvantifikace SILAC. Experiment byl proveden ve dvou replikátech tzv. forward a reverse, během kterých bylo vyměněno SILAC značení proteinů vkládaných na specifickou a kontrolní matici.

6.2 Identifikace proteinů obohacených na ligandu FRA16D-fragment

Identifikace proteinů probíhala na základě analýzy fragmentačních spekter pomocí programu ProteinScape s využitím vyhodnocovacího algoritmu Mascot ve spojení s databází UniProt. Na základě stanovených podmínek pro identifikaci proteinů tj. identifikace minimálně 2 peptidů daného proteinu s hodnotou score >15 a FDR 5% byl získán seznam proteinů obohacených na FRA16D-fragment a kontrolní matici. Pro následnou bioinformatickou analýzu, relativní kvantifikaci proteinů, byly vybrány pouze ty proteiny, u nichž bylo možné nalézt 3 peptidové páry

V prvním experimentu DNA-afinitní chromatografie provedené s jadernými proteiny buněk, které nebyly vystaveny RS bylo identifikováno celkem 282 proteinů, z nichž 228 bylo kvantifikováno a 150 se vyskytlo v obou provedených replikátech (forward i reverse).

V druhém experimentu DNA-afinitní chromatografie provedené s jadernými proteiny buněk, které byly vystaveny působení 0,4 μ M APH po dobu 24 h jsme získali 655 proteinů, z nichž 559 vyhovovalo stanoveným podmínkám kvantifikace a 410 se nacházelo v obou replikátech.

Celkem jsme získali 13 proteinů signifikantně obohacených na ligandu FRA16D-fragment. Z toho 3 proteiny (PARP-1, XRCC5, DNLI3) jsou společné pro oba experimenty, 2 proteiny (WDR76, TFAM) jsou přítomny pouze v experimentu bez indukce RS a zbylých 8 proteinů (WRN, XRCC1, XPC, MSH2, MSH3, Centrin-2, DDB1, XRCC6) je obohaceno na ligandu FRA16D-fragment po ovlivnění buněk pomocí APH.

Na základě literatury bylo zjištěno, že téměř polovina těchto proteinů (DDB1, XPC, Centrin-2, XRCC1, LIG3) kooperuje v jedné opravné dráze a to globální genomové-NER (Global Genome-NER, GG-NER) (Noussipikel, 2009). Souvislost XPC proteinu a stejně tak celé dráhy GG-NER s fragilními místy nebyla dosud ověřována, a proto byl XPC protein, její hlavní iniciátor, vybrán k následné charakterizaci. Biologická role XPC proteinu v RS a zachování stability fragilních míst byla ověřována pomocí molekulárně-biologických metod.

6.3 Studium role XPC proteinu v zachování stability fragilních míst

Jednou z možností detekce chromozomálního poškození v oblasti BFM je identifikace dvouvláknových DNA zlomů pomocí markeru poškození, fosforylovaného histonu H2AX (γ H2AX) (Glover et al., 1984; Rogakou et al., 1998). Princip metody spočívá v detekci buněk na základě pH3 mitotického markeru a následné detekci fokusů γ H2AX proteinu pouze v mitotických buňkách.

Pomocí interferenční siRNA jsme provedli specifické snížení exprese XPC genu na úrovni mRNA tzv. knock-down (KD) v U2OS buněčné linii a sledovali vliv na expresi fragilních míst v mitotických buňkách bez a s působením 0,4 μ M APH po dobu 24 hodin. Působením RS dochází v XPC KD U2OS buněčné linii k poklesu γ H2AX fokusů v mitotických buňkách ve srovnání s kontrolní XPC proficientní linií. Snížení počtu γ H2AX fokusů v mitotických XPC KD buňkách po indukci RS lze vysvětlit dvěma způsoby. V prvním případě by ztráta XPC proteinu představovala značnou genomickou nestabilitu, která by vedla k aktivaci G2/M kontrolního bodu buněčného cyklu, a tím zastavení buněčného cyklu a znemožnění vstupu buňky do mitózy, což by se projevilo následnou absencí poškození (γ H2AX fokusů) v mitotických buňkách. V druhém případě by deficit XPC mohl vést ke snížení signalizace DNA poškození a/nebo snížení aktivace opravných drah, a tím i detekce poškození v mitóze pomocí γ H2AX proteinu.

Hlavní kinázou v regulaci buněčné odpovědi na poškození vznikající během RS je ATR kináza, jejíž deficit způsobuje expresi fragilních míst a detekci γ H2AX fokusů v mitotických buňkách (Casper et al., 2002). Použitím U2OS buněčné linie s doxycyklin indukovatelnou shRNA proti ATR proteinu jsme sledovali změnu exprese fragilních míst detekci γ H2AX v mitotických buňkách ATR deficientní linie a v mitotických buňkách se společnou deficiencí ATR a XPC proteinu. Výsledkem bylo opět snížení detekce γ H2AX fokusů v mitotických buňkách s ATR/XPC KD oproti samotnému ATR KD.

Na základě těchto výsledků, snížení přítomnosti fokusů γ H2AX v mitotických buňkách v U2OS buněčné linii a U2OS shATR linii se společným ATR/XPC KD, se můžeme domnívat, že XPC protein hraje roli v rozpoznání replikačních bariér v oblastech fragilních míst během RS, kdy spouští signální dráhu buněčné odpovědi. Při XPC KD tak nedochází k rozpoznání a označení replikačních problémů a aktivaci příslušných kontrolních mechanismů.

V oblastech fragilních míst může vlivem APH docházet k nekompletní replikaci DNA a vzniku tzv. replikačních intermediátů. Tyto replikační intermediáty nerozpoznané kontrolními mechanismy buňky unikají do mitózy, kde se stávají potencionálním zdrojem DNA poškození. Takové DNA poškození je pozorovatelné až v následující G1 buněčné populaci, kde je detekovatelné pomocí fokusů 53BP1 proteinu tzv. 53BP1 bodies a označené tak pro případnou opravu (Lukas et al., 2011). Ověření, zda při XPC deficienci dochází ke vzniku nekompletně replikované DNA a přenosu DNA poškození do další buněčné generace bylo provedeno detekcí 53BP1 bodies v cyklin A negativních (G1) XPC KD U2OS buňkách vystavených působení 0,4 μ M APH po dobu 24 h. Zvýšená detekce hladiny 53BP1 bodies v G1 populaci buněk potvrdila předpokládanou hypotézu vzniku replikačních intermediátů v XPC deficientní U2OS buněčné linii.

6.4 Úloha XPC proteinu v regulaci proteinů buněčné odpovědi na RS

V další fázi experimentů jsme se zaměřili na ověření vlivu XPC proteinu na regulaci proteinů buněčné odpovědi na RS tzn. regulaci ATR-Chk1 signální dráhy buněčné odpovědi. Pomocí imunofluorescenční mikroskopie byl pozorován snížený jaderný signál pro detekci proteinu ATR a ATRIP v XPC deficientní linii. Stejně tak imunodetekce fosforylace hlavního efektoru ATR kinázy, Chk1 (Ser345), taktéž potvrdila sníženou aktivaci. Oba výsledky jednoznačně potvrzují předpoklad porušení ATR/ATRIP-Chk1 signální dráhy buněčné odpovědi na RS.

Důsledkem porušení funkce kontrolních bodů buněčného cyklu je také únik poškozených buněk do mitózy. Měřením mitotického indexu (MI) buněk vystavených působení 0,2 μ M a 0,4 μ M APH po dobu 24 h byl zjištěn zvýšený počet mitotických buněk v XPC KD buněčné linii oproti kontrolním XPC proficientním buňkám. Stejného výsledku tj. snížení fosforylace Chk1 kinázy v XPC KD buňkách působením APH a zvýšení MI vlivem RS bylo dosaženo také v dalších testovaných liniích HeLa S3 a TIG-3. Na druhou stranu zvýšený výskyt 53BP1 bodies v G1 XPC KD buněčné populaci TIG-3 a HeLa S3 linie nebyl vlivem APH pozorován. Příčinou může být rozdílné biologického pozadí jednotlivých linií, u nichž mohla manifestace DNA poškození způsobená XPC deficiencí vyústit k eliminaci defektních buněk například apoptózou.

Na základě získaných dat můžeme předpokládat, že XPC protein rozpoznává těžce replikovatelné bariéry vznikající v oblasti BFM působením APH a spouští signalizaci a aktivaci ATR/ATRIP-ChK1 dráhy buněčné odpovědi.

7 Závěr

V této práci byla optimalizována a aplikována metoda DNA-afinitní chromatografie, které v kombinaci s metodou kvantitativní proteomiky SILAC a MS umožnila izolovat a následně identifikovat proteiny interagující s fragilními místy DNA.

Konstrukce specifické a kontrolní afinitní matrice byla provedena na základě *in silico* návrhu DNA ligandů. Specifický DNA afinitní ligand (FRA16D-fragment) byl zhotoven na základě již známé sekvence fragilního místa FRA16D, jehož vybraná část byla testována v Mfold programu a tím ověřena, zda zachovává stabilní sekundární strukturu během experimentálních podmínek DNA-afinitní chromatografie. Jako kontrolní ligand byla navržena sekvence oligonukleotidu se stabilní lineární strukturou. Oba DNA ligandy byly během komerční syntézy modifikovány biotinem, což umožnilo jejich následnou vazbu k streptavidinem pokrytým magnetickým částicím.

DNA afinitní purifikace byla provedena paralelně na specifické a kontrolní matici a to nejprve s lyzáty buněk kultivovaných za normálních podmínek, následně z buněk vystavených působení RS. Aplikací kvantitativní metody SILAC a MS analýzy byly identifikovány proteiny obohacené na ligandu FRA16D-fragment.

K identifikovaným proteinům patří proteiny WRN a MSH2, jejichž funkce v zachování stability fragilních míst již byla publikována. Ostatní identifikované proteiny představují potenciální kandidáty vhodné pro další charakterizaci a ověření jejich role v zachování stability BFM. Vzhledem k tomu, že více jak polovina těchto proteinů se účastní jedné opravné dráhy DNA a to GG-NER, XPC protein, její hlavní iniciátor, byl vybrán k podrobné charakterizaci pomocí molekulárně biologických metod.

Na základě získaných výsledků jsme dospěli k hypotéze, že XPC proteinu hraje roli v zachování stability fragilních míst a také v buněčné odpovědi na RS. Zjistili jsme, že XPC deficientní buňky vykazují sníženou aktivaci buněčné odpovědi na RS, která vede k zvýšení nestability genomu. Předpokládáme, že XPC protein rozpoznává replikační bariéry vznikající

v oblastech BFM působením RS a aktivuje tak kontrolní a opravné mechanismy. XPC deficientní buňky vykazují porušení aktivace ATR/ATRIP-Chk1 signální dráhy, což vyústí v únik buněk s nekompletně replikovanou DNA do mitózy. Osud takto poškozených buněk závisí na biologickém pozadí konkrétní buněčné linie a schopnosti její odpovědi na poškození DNA. V U2OS buněčné linii je toto poškození přeneseno do další buněčné generace, kde jsou vznikající dvouvláknové zlomy DNA viditelné jako fokusy 53BP1 bodies. U dalších testovaných liniích jako je TIG-3 a HeLa S3 se XPC deficiencie projevuje taktéž snížením ATR/ATRIP-Chk1 signální dráhy buněčné odpovědi na RS, avšak buňky s nekompletně replikovanou DNA nepřechází do další buněčné generace a jsou pravděpodobně eliminovány apoptózou. Tato možnost je v souladu s teorií, že BFM místa fungují jako senzory pro eliminaci buněk s nestabilním genetickým materiálem, čímž slouží jako ochranná bariéra před vznikem tumorigeneze.

Vědeckým přínosem předkládané práce je nejen unikátní použití strukturně specifického DNA afinitního ligandu FRA16D-fragment, který ve spojení s metodami kvantitativní proteomiky umožnil izolaci a následnou identifikaci XPC proteinu, ale také odhalení nové biologické role XPC proteinu v RS a zachování stability fragilních míst.

Výsledky disertační práce jsou součástí publikace vydané v recenzovaném zahraničním časopise *Journal of Proteome Research* a to pod názvem „Role of DNA repair factor xeroderma pigmentosum protein group C in response to replication stress as revealed by DNA fragile site affinity chromatography and quantitative proteomics“.

8 Seznam zkratek

ACN	acetonitril
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated kinase
APH	aphidicolin
ATR	Ataxia-telangiectasia RAD3-related kinase
ATRIP	Ataxia-telangiectasia RAD3-related interaction protein
BFM	běžná fragilní místa
BRCA1	Breast cancer-1 protein
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
DDB1	DNA vazebný protein 1 (z ang. DNA binding protein 1)
FA	kyselina mravenčí (z angl. formic acid)
FANCD2	Fanconi anemia protein 2
FDR	false discovery rate
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FRA16D	fragilní místo FRA16D
GG-NER	globální genomová excizní reparace nukleotidů (z angl. global genome nucleotide excision repair)
Chk1	checkpoint kinase 1
Chk2	checkpoint kinase 2
IF	imunofluorescence
LIG3	Ligase 3
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
MSH2	Mismatch repair protein 2
MSH3	Mismatch repair protein 3
MI	mitotický index
NK	nukleové kyseliny
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SILAC	izotopové značení proteinů v buněčné kultuře (z angl. stable isotope labeling of amino acids in cell culture)
WDR76	WD repeat domain 76

WWOX	WW domain containing oxidoreductase
WRN	Werner helicase
XPC	Xeroderma pigmentosum complementing protein C
XRCC1	X-ray repair cross-complementing group protein 1
XRCC6	X-ray repair cross-complementing group protein 6
53BP1	53-vazebný protein 1 (z angl. 53-binding protein 1)
γ H2AX	fosforylovaný histon H2AX

9 Seznam literatury

Arlt, M.F., Durkin, S.G., Ragland, R.L., and Glover, T.W. (2006). Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA Repair* 5, 1126–1135.

Babayeva, N.D., Baranovskaya, O.I., and Tahirov, T.H. (2012). Structural basis of Ets1 cooperative binding to widely separated sites on promoter DNA. *PloS One* 7, e33698.

Bose, S.K., Sengupta, T.K., Bandyopadhyay, S., and Spicer, E.K. (2006). Identification of Ebp1 as a component of cytoplasmic bcl-2 mRNP (messenger ribonucleoprotein particle) complexes. *Biochem. J.* 396, 99–107.

Burrell, R.A., McClelland, S.E., Endesfelder, D., Groth, P., Weller, M.-C., Shaikh, N., Domingo, E., Kanu, N., Dewhurst, S.M., Gronroos, E., et al. (2013). Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* 494, 492–496.

Byrum, S.D., Raman, A., Taverna, S.D., and Tackett, A.J. (2012). ChAP-MS: a method for identification of proteins and histone posttranslational modifications at a single genomic locus. *Cell Rep.* 2, 198–205.

Casper, A.M., Nghiem, P., Arlt, M.F., and Glover, T.W. (2002). ATR regulates fragile site stability. *Cell* 111, 779–789.

Cavalieri, L.F., and Carroll, E. (1970). A DNA-acrylamide gel column for analyzing proteins that bind to DNA. I. DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 67, 807–812.

Cayrou, C., Coulombe, P., and Méchali, M. (2010). Programming DNA replication origins and chromosome organization. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 18, 137–145.

Choe, L., D’Ascenzo, M., Relkin, N.R., Pappin, D., Ross, P., Williamson, B., Guertin, S., Pribil, P., and Lee, K.H. (2007). 8-plex quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein

expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer's disease. *Proteomics* 7, 3651–3660.

Coquelle, A., Pipiras, E., Toledo, F., Buttin, G., and Debatisse, M. (1997). Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell* 89, 215–225.

Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294, 1713–1716.

Déjardin, J., and Kingston, R.E. (2009). Purification of proteins associated with specific genomic Loci. *Cell* 136, 175–186.

Dimitrova, D.S., and Gilbert, D.M. (2000). Temporally coordinated assembly and disassembly of replication factories in the absence of DNA synthesis. *Nat. Cell Biol.* 2, 686–694.

Dobretsova, A., Johnson, J.W., Jones, R.C., Edmondson, R.D., and Wight, P.A. (2008). Proteomic analysis of nuclear factors binding to an intronic enhancer in the myelin proteolipid protein gene. *J. Neurochem.* 105, 1979–1995.

Durkin, S.G., Arlt, M.F., Howlett, N.G., and Glover, T.W. (2006). Depletion of CHK1, but not CHK2, induces chromosomal instability and breaks at common fragile sites. *Oncogene* 25, 4381–4388.

Fishel, R.A., Detmer, K., and Rich, A. (1988). Identification of homologous pairing and strand-exchange activity from a human tumor cell line based on Z-DNA affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 36–40.

Flach, J., Bakker, S.T., Mohrin, M., Conroy, P.C., Pietras, E.M., Reynaud, D., Alvarez, S., Diolaiti, M.E., Ugarte, F., Forsberg, E.C., et al. (2014). Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. *Nature* 512, 198–202.

Gao, J., Zybaylov, B.L., Byrd, A.K., Griffin, W.C., Chib, S., Mackintosh, S.G., Tackett, A.J., and Raney, K.D. (2015). Yeast transcription co-activator Sub1 and its human homolog PC4 preferentially bind to G-quadruplex DNA. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 51, 7242–7244.

Gardiner, K. (1995). Human genome organization. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 315–322.

Glover, T.W., Berger, C., Coyle, J., and Echo, B. (1984). DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum. Genet.* 67, 136–142.

Groth, A., Rocha, W., Verreault, A., and Almouzni, G. (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128, 721–733.

Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., and Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 17, 994–999.

Harris, D., Zhang, Z., Chaubey, B., and Pandey, V.N. (2006). Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 5, 1006–1018.

- Helmrich, A., Ballarino, M., and Tora, L. (2011). Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Mol. Cell* 44, 966–977.
- Himeda, C.L., Ranish, J.A., Angello, J.C., Maire, P., Aebersold, R., and Hauschka, S.D. (2004). Quantitative proteomic identification of six4 as the trex-binding factor in the muscle creatine kinase enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2132–2143.
- Hirsch, J.D., Eslamizar, L., Filanoski, B.J., Malekzadeh, N., Haugland, R.P., Beechem, J.M., and Haugland, R.P. (2002). Easily reversible desthiobiotin binding to streptavidin, avidin, and other biotin-binding proteins: uses for protein labeling, detection, and isolation. *Anal. Biochem.* 308, 343–357.
- Howlett, N.G., Taniguchi, T., Durkin, S.G., D’Andrea, A.D., and Glover, T.W. (2005). The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Hum. Mol. Genet.* 14, 693–701.
- Hubner, N.C., Nguyen, L.N., Hornig, N.C., and Stunnenberg, H.G. (2015). A quantitative proteomics tool to identify DNA-protein interactions in primary cells or blood. *J. Proteome Res.* 14, 1315–1329.
- Jia, Y., and Jarrett, H.W. (2015). Method for trapping affinity chromatography of transcription factors using aldehyde-hydrazide coupling to agarose. *Anal. Biochem.* 482, 1–6.
- Jiang, D., Moxley, R.A., and Jarrett, H.W. (2006). Promoter trapping of c-jun promoter-binding transcription factors. *J. Chromatogr. A* 1133, 83–94.
- Keller, A., Nesvizhskii, A.I., Kolker, E., and Aebersold, R. (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem.* 74, 5383–5392.
- Letessier, A., Millot, G.A., Koundrioukoff, S., Lachagès, A.-M., Vogt, N., Hansen, R.S., Malfoy, B., Brison, O., and Debatisse, M. (2011a). Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* 470, 120–123.
- Litman, R.M. (1968). A deoxyribonucleic acid polymerase from *Micrococcus luteus* (*Micrococcus lysodeikticus*) isolated on deoxyribonucleic acid-cellulose. *J. Biol. Chem.* 243, 6222–6233.
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C.S., and Foiani, M. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* 412, 557–561.
- López de Silanes, I., Stagno d’Alcontres, M., and Blasco, M.A. (2010). TERRA transcripts are bound by a complex array of RNA-binding proteins. *Nat. Commun.* 1, 33.
- Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R.S., Grøfte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J., et al. (2011). 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 243–253.

- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., et al. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160–1166.
- Matys, V., Fricke, E., Geffers, R., Gössling, E., Haubrock, M., Hehl, R., Hornischer, K., Karas, D., Kel, A.E., Kel-Margoulis, O.V., et al. (2003). TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res.* 31, 374–378.
- Meng, Z., Camalier, C.E., Lucas, D.A., Veenstra, T.D., Beck, G.R., and Conrads, T.P. (2006). Probing early growth response 1 interacting proteins at the active promoter in osteoblast cells using oligoprecipitation and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 5, 1931–1939.
- Mishmar, D., Rahat, A., Scherer, S.W., Nyakatura, G., Hinzmann, B., Kohwi, Y., Mandel-Gutfroind, Y., Lee, J.R., Drescher, B., Sas, D.E., et al. (1998). Molecular characterization of a common fragile site (FRA7H) on human chromosome 7 by the cloning of a simian virus 40 integration site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8141–8146.
- Mittler, G., Butter, F., and Mann, M. (2009). A SILAC-based DNA protein interaction screen that identifies candidate binding proteins to functional DNA elements. *Genome Res.* 19, 284–293.
- Mrasek, K., Schoder, C., Teichmann, A.-C., Behr, K., Franze, B., Wilhelm, K., Blaurock, N., Claussen, U., Liehr, T., and Weise, A. (2010). Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. *Int. J. Oncol.* 36, 929–940.
- Nouspikel, T. (2009). DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 994–1009.
- O’Neill, D., Yang, J., Erdjument-Bromage, H., Bornschlegel, K., Tempst, P., and Bank, A. (1999). Tissue-specific and developmental stage-specific DNA binding by a mammalian SWI/SNF complex associated with human fetal-to-adult globin gene switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 349–354.
- O’Neill, T., Dwyer, A.J., Ziv, Y., Chan, D.W., Lees-Miller, S.P., Abraham, R.H., Lai, J.H., Hill, D., Shiloh, Y., Cantley, L.C., et al. (2000). Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM. *J. Biol. Chem.* 275, 22719–22727.
- Ong, S.-E., and Mann, M. (2006). A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat. Protoc.* 1, 2650–2660.
- Oppermann, F.S., Gnad, F., Olsen, J.V., Hornberger, R., Greff, Z., Kéri, G., Mann, M., and Daub, H. (2009). Large-scale proteomics analysis of the human kinome. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 8, 1751–1764.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., and Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551–3567.
- Pirzio, L.M., Pichierri, P., Bignami, M., and Franchitto, A. (2008). Werner syndrome helicase activity is essential in maintaining fragile site stability. *J. Cell Biol.* 180, 305–314.

- Poli, J., Tsaponina, O., Crabbé, L., Keszthelyi, A., Pantesco, V., Chabes, A., Lengronne, A., and Pasero, P. (2012). dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *EMBO J.* *31*, 883–894.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* *273*, 5858–5868.
- Scheibe, M., Arnoult, N., Kappei, D., Buchholz, F., Decottignies, A., Butter, F., and Mann, M. (2013a). Quantitative interaction screen of telomeric repeat-containing RNA reveals novel TERRA regulators. *Genome Res.* *23*, 2149–2157.
- Scheibe, M., Arnoult, N., Kappei, D., Buchholz, F., Decottignies, A., Butter, F., and Mann, M. (2013b). . *Genome Res.* *23*, 2149–2157.
- Sebela, M., Stosová, T. 'ána, Havlis, J., Wielsch, N., Thomas, H., Zdráhal, Z., and Shevchenko, A. (2006). Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* *6*, 2959–2963.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., and Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* *1*, 2856–2860.
- Sørensen, C.S., Hansen, L.T., Dziegielewska, J., Syljuåsen, R.G., Lundin, C., Bartek, J., and Helleday, T. (2005). The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat. Cell Biol.* *7*, 195–201.
- Teixeira, M.C., Monteiro, P., Jain, P., Tenreiro, S., Fernandes, A.R., Mira, N.P., Alenquer, M., Freitas, A.T., Oliveira, A.L., and Sá-Correia, I. (2006). The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *34*, D446–451.
- Thorland, E.C., Myers, S.L., Gostout, B.S., and Smith, D.I. (2003). Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* *22*, 1225–1237.
- Toledo, L.I., Altmeyer, M., Rask, M.-B., Lukas, C., Larsen, D.H., Povlsen, L.K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J., and Lukas, J. (2013). ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* *155*, 1088–1103.
- Turner, B.C., Ottey, M., Zimonjic, D.B., Potoczek, M., Hauck, W.W., Pequignot, E., Keck-Waggoner, C.L., Sevignani, C., Aldaz, C.M., McCue, P.A., et al. (2002). The fragile histidine triad/common chromosome fragile site 3B locus and repair-deficient cancers. *Cancer Res.* *62*, 4054–4060.
- Yaneva, M., and Tempst, P. (2003). Affinity capture of specific DNA-binding proteins for mass spectrometric identification. *Anal. Chem.* *75*, 6437–6448.
- Zhang, H., and Freudenreich, C.H. (2007). An AT-rich sequence in human common fragile site FRA16D causes fork stalling and chromosome breakage in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* *27*, 367–379.

Zlotorynski, E., Rahat, A., Skaug, J., Ben-Porat, N., Ozeri, E., Hershberg, R., Levi, A., Scherer, S.W., Margalit, H., and Kerem, B. (2003). Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7143–7151.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406–3415.

10 Přehled publikační činnosti

Seznam publikací:

Beresova L., Vesela E., Chamrad I., Voller J., Yamada M., Furst T., Lenobel R., Chroma K., Gursky J., Krizova K., Mistrik M., Bartek J.: Role of DNA repair factor Xeroderma pigmentosum protein group C in response to replication stress as revealed by DNA fragile site affinity chromatography and quantitative proteomics. *Journal of Proteome Research* 2016, 15, 4505-4517.

Beresova L. a Lenobel R. Pokročilé metody studia vzájemných interakcí proteinů s DNA. *Chemické Listy* 2017, 111, 136-141.

Chamrad I., Simersky R., **Beresova L.**, Strnad M., Sebel M., Lenobel R.: Proteomic identification of candidate sequence of wheat cytokinin-binding protein 1. *Journal of Plant Growth Regulators* 2014, 33, 896-902.

Konferenční příspěvky:

Beresova L., Vesela E., Chamrad I., Voller J., Yamada M., Furst T., Lenobel R., Chroma K., Gursky J., Krizova K., Mistrik M., Bartek J.: DNA affinity chromatography combined with quantitative proteomics revealed role of XPC protein in replication stress and common fragile site stability. XII Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, November 30-December 1 2016, Olomouc, ČR. Poster

Mistrik M., **Beresova L.**, Vesela E., Lenobel R., Chamrad I., Voller J., Yamada M., Furst T., Chroma K., Gursky J., Bartek J.: Replication obstacles formed within common fragile sites under replication stress are targeted by the global genomic nucleotide excision repair pathway. XII Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, November 30-December 1 2016, Olomouc, ČR. Prezentace Dr. Mistrík

Beresova L., Vesela E., Mistrik M., Voller J., Yamada M., Chamrad I., Lenobel R., Bartek J.: Molecular insight into XPC role in replication stress and common fragile site stability. XI. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, December 2-3 2015, Olomouc, ČR. Prezentace Mgr. Vesela

Chamrad I., Klaskova J., Simersky R., **Svehlova L.**, Lenobel R.: Establishment of advanced proteomic techniques for the study of cytokinin-binding protein 1. 3rd Central and Eastern European Proteomic Conference, October 6-9, 2009, Budapešt, Maďarsko. Poster

Klaskova J., Chamrad I., Simersky R., **Svehlova L.**, Sebela M., Spichal L., Lenobel R., Strnad M.: Dynamic of a wheat cytokinin-binding protein during seed germination. 20th International Conference on Plant Growth Substances, June 28-July 2, 2010, Taragona, Španělsko. Poster

Svehlova L., Chamrad I., Simersky R., Mistrik M., Voller J., Lenobel R.: Studying of DNA-Protein interactions by proteomic approaches. Conference: Nová léčiva závažných lidských onemocnění; Kouty nad Desnou 29.-31. May 2011, ČR. Prezentace

Simersky R., Chamrad I., **Svehlova L.**, Mik V., Strnad M., Lenobel R.: Compound-centric chemical proteomics as a tool for the identification of plant hormone interactors. Proteomic Forum 2011, April 2-7, 2011, Berlín, Německo. Poster

Svehlova L., Chamrad I., Simerský R., Mik V., Veselá E., Strnad M., Lenobel R.: Labeling of peptides on the solid phase as an improvement of the original GIST approach. Proteomic forum 2011, April 2-7, 2011, Berlín, Německo. Poster