

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Jan Moštěk

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Základní přístupy analýzy proteinů
v buněčných lyzátech a jejich aplikace pro
analýzu vybraných proteinů metabolismu
a oprav DNA**

Bakalářská práce

Jan Moštěk

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: RNDr. Karel Koberna, CSc

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Jan Moštěk

Název práce: Základní přístupy analýzy proteinů v buněčných lyzátech a jejich aplikace pro analýzu vybraných proteinů metabolismu a oprav DNA

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: RNDr. Karel Koberna, CSc

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčová slova: elektroforéza, Western Blot, Dot Blot, ELISA, opravy DNA, BER, DNA glykosylázy, UNG

Počet stran: 76

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Souhrn

Předkládaná práce poskytuje přehled o často používaných technikách proteinové detekce a současně se zabývá optimalizací techniky western blotů a dot blotů pro analýzu některých jaderných proteinů, především uracilových DNA glykosyláz, které hrají zásadní roli při opravách DNA pomocí bázové excizní opravy. Vedle toho byla testována nově vyvinutá technika stanovení aktivity uracilových DNA glykosyláz. Součástí práce je i přehled základních mechanismů oprav DNA se zaměřením na opravy prováděné systémem bázové excizní opravy.

Výsledky experimentální části ukázaly, že technologie dot blotů není, na rozdíl od technologie western blotů, vhodná pro detekci uracilových DNA glykosyláz. Současně tyto výsledky silně indikují, že testovaná, nově vyvinutá, technologie pro stanovení uracilových DNA glykosyláz je významně citlivější než technologie western blotů. Zatímco technologie western blotů vyžadovala nanášku přibližně 5 μg celkového proteinu, v případě stanovení aktivity uracilových DNA glykosyláz bylo pro spolehlivou analýzu vyžadováno celkově asi 100 ng proteinu.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Jan Moštěk

Title: The basic approaches of protein analysis in cellular lysates and their application of chosen proteins of DNA metabolism and repair

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: RNDr. Karel Koberna, CSc

The year of presentation: 2020

Keywords: electrophoresis, Western Blot, Dot Blot, ELISA, DNA repair, BER, DNA glycosylase, UNG

Number of pages: 76

Number of appendices: 0

Language: Czech

Summary

The thesis presented provides overview of frequently used methods for protein detection and simultaneously, it deals with the optimization of western blot and dot blot techniques for the analysis of the selected nuclear proteins, particularly uracil DNA glycosylases that play an essential role in the base excision repair. Further, a newly developed method for the determination of the activity of uracil DNA glycosylases was tested. The thesis also includes a review of basic DNA repair mechanisms with the focus on the base excision repair.

The results of the experimental part show that unlike the western blot, the dot blot technique is not suitable for the detection of uracil DNA glycosylases. Concurrently, the results strongly indicate that the tested, newly developed, approach for the determination of the activity of uracil DNA glycosylases is significantly more sensitive than the western blot technology. While the western blot method required the application of 5 µg of the total protein, only 100 ng of the total protein was necessary for the reliable analysis in the case of the determination of the activity of uracil DNA glycosylases.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Karla Koberny, CSc. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

Jan Moštěk

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému vedoucímu práce, RNDr. Karlu Kobernovi, CSc., za odborné vedení a konzultace při hodnocení výsledků. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Anně Ligasové, PhD. za seznámení s laboratorními zásadami a postupy a Monice Masopustové za pomoc při laboratorní činnosti. Tato práce byla podpořena projektem Ministerstva zdravotnictví ČR č. 15-31604A.

Obsah

Bibliografické údaje	i
Souhrn	i
Bibliographical identification.....	ii
Summary	ii
Seznam symbolů a zkratk.....	vii
Seznam obrázků	viii
Seznam tabulek	ix
Seznam grafů.....	x
1 Úvod.....	1
2 Cíle práce	2
3 Literární přehled.....	3
3.1 Western blot	3
3.1.1 Příprava vzorku a extrakce proteinů.....	3
3.1.2 Stanovení koncentrace proteinů	5
3.1.3 Elektroforetická separace	7
3.1.4 Přenos proteinů z gelu na membránu	8
3.1.5 Blokování membrány	9
3.1.6 Vazba protilátek	9
3.1.7 Detekce signálu a jeho vyhodnocení.....	10
3.1.8 Dot blot.....	10
3.2 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	11
3.2.1 Přímá ELISA	11
3.2.2 Nepřímá ELISA.....	12
3.2.3 Sendvičová ELISA.....	12
3.2.4 Kompetitivní ELISA	13
3.3 Opravné mechanismy DNA	14
3.3.1 Bázová excisní oprava.....	14
3.3.2 Další mechanismy oprav DNA.....	16
3.3.2.1 Přímá oprava DNA.....	16
3.3.2.2 Oprava chybného párování.....	17
3.3.2.3 Nukleotidová excisní oprava.....	17
3.3.2.4 Oprava homologní rekombinací.....	18
3.3.2.5 Oprava spojováním nehomologních konců.....	19
4 Materiál a metody.....	22
4.1 Biologický materiál	22
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	22

4.2.1	Použité chemikálie	22
4.2.2	Použité soupravy	24
4.2.3	Použité roztoky a jejich příprava.....	24
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	28
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	29
4.4.1	Příprava buněčných extraktů	29
4.4.2	Měření koncentrace proteinů pomocí BCA assay	32
4.4.3	Denaturující polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)	32
4.4.4	Western blot	33
4.4.5	Dot blot.....	34
4.4.6	Příprava magnetických částic pro studium DNA glykosylázové aktivity	34
4.4.7	Analýza DNA glykosylázové aktivity.....	35
5	Výsledky	36
5.1	Příprava buněčných extraktů a měření koncentrace celkových proteinů v různých liniích ..	36
5.2	Western blot	37
5.3	Dot blot.....	46
5.4	Studium DNA glykosylázové aktivity	48
6	Diskuze.....	52
7	Závěr	56
8	Literatura	57

Seznam symbolů a zkratek

AGT	O ⁶ -alkylguanin-DNA alkyltransferáza
a-EJ	Alternativní spojování konců
APS	Peroxodisíran amonný
β-ME	β-merkptoethanol
BCA	Bicinchoninová kyselina
BER	Bázová excisní oprava
BSA	Hovězí sérový albumin
CCD	Charge-coupled device
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNA-PKcs	Katalytická podjednotka DNA dependentní protein kinázy
Dot-Iba	Dot imunovazebná analýza
dRP	Deoxyribosofosfát
DSB	Dvouvláknové poškození DNA
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Etylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	Enzymová imunoanalýza
GG-NER	Globální genomová NER
HRR	Oprava homologní rekombinací
LP-BER	Long-patch bázová excisní oprava
MMR	Oprava chybného párování bází
NER	Nukleotidová excisní oprava
NHEJ	Spojování nehomologních konců
PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza
PMSF	Fenylmetylsulfonyl fluorid
PNKP	Polynukleotidová kináza/fosfatáza
PUA	3'-α,β-nesaturovaný aldehyd
RIPA	Radioimunoprecipitační analýza
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Polyakrylamidová elektroforéza za přítomnosti dodecylsírany sodného
SP-BER	Short-patch bázová excisní oprava
ssDNA	Jednovláknová DNA
TC-NER	Nukleotidová excizní oprava spjatá s transkripcí
TDP1	Tyrosyl-DNA fosfodiesteráza 1
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
UNG	Uracil DNA N-glykosyláza
WB	Western blot

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma provedení western blotu.....	4
Obrázek 2: Přímá ELISA proti antigenu.....	12
Obrázek 3: Nepřímá ELISA.....	12
Obrázek 4: Nepřímá sendvičová ELISA.....	13
Obrázek 5: Přímá kompetitivní ELISA.....	13
Obrázek 6: Schéma báze excisní opravy.....	15
Obrázek 7: Obecné schéma opravy chybného párování bází	17
Obrázek 8: Obecné schéma nukleotidvé excisní opravy	18
Obrázek 9: Obecné schéma opravy homologní rekombinací	19
Obrázek 10: Schéma opravy spojováním nehomologních konců.....	20
Obrázek 11: Western blot analýza proteinů β -aktinu a proteinu RPA-32 v celobuněčných extraktech buněčné linie HeLa.	38
Obrázek 12: Western blot analýza proteinů MBD4, UNG2, TDG a SMUG1 v celobuněčných extraktech linií HeLa, NCI, 143 B, 143B TK a V79	39
Obrázek 13: Western blot analýza proteinů MBD4, RPA-32, TDG, UNG2, SMUG1, NTH1, CDD a DCTD buněčné linie HeLa.....	41
Obrázek 14: Western blot analýza proteinů MBD4, NTH1, TDG a SMUG1 buněčné linie HeLa	43
Obrázek 15: Western blot analýza proteinů MBD4, NTH1 a RPA-32 v jaderném a celobuněčném extraktu buněčné linie HeLa.....	44
Obrázek 16: Dot blot analýza β -aktinu buněčné linie HeLa za použití celobuněčných extraktů	46
Obrázek 17: Dot blot analýza proteinu RPA-32 buněčných linií HeLa, NCI-H2009 (NCI), 143 B, 143B TK a V79 v celobuněčných extraktech	47
Obrázek 18: Western blot analýza proteinu UNG2 buněčné linie HeLa v jaderných extraktech připravených homogenizací a graf s výsledky stanovení uracil DNA glykosylační aktivity těchto extraktů.	51

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled kolorimetrických metod stanovení koncentrace proteinů.....	6
Tabulka 2: Seznam použitých chemikálií	23
Tabulka 3: Použité oligonukleotidy	24
Tabulka 4: Seznam použitých komerčně dodávaných pracovních souprav	24
Tabulka 5: Použitá ředění protilátek	27
Tabulka 6: Koncentrace celkových proteinů v celobuněčných extraktech u buněčných linií HeLa, NCI, 143 B, 143B TK, V79 za použití RIPA lyzačního roztoku	36
Tabulka 7: Koncentrace celkových proteinů v buněčných extraktech u buněčné linie HeLa po použití homogenizátoru (H) zmrazování kapalným dusíkem (N) a pomocí roztoku s obsahem Tritonu X-100 (T).....	37
Tabulka 8: Relativní intenzita signálu z western blot analýzy proteinů MBD4, UNG2, TDG a SMUG1 z obrázku 12	39
Tabulka 9: Relativní intenzita signálu z western blot analýzy proteinů MBD4, UNG2, TDG, SMUG1, RPA-32, NTH1, CDD a DCTD z obrázku 13.....	42
Tabulka 10: Relativní intenzita signálu z western blot analýzy proteinů MBD4, NTH1, TDG a SMUG1 z obrázku 14	43
Tabulka 11: Relativní intenzita signálu detekovaných proteinů MBD4, NTH1 a RPA-32 z obrázku 15.....	45
Tabulka 12: Relativní intenzita signálu β -aktinu detekovaná dot blot analýzou z obrázku 16	46
Tabulka 13: Relativní intenzita signálu proteinu RPA-32 detekovaná dot blot analýzou z obrázku 17.....	47
Tabulka 14: Relativní intenzita signálu proteinu NTH1 buněčné linie HeLa detekovaná dot blot analýzou v jaderných extraktech připravených pomocí homogenizace a vysoké iontové síly nebo RIPA roztokem nebo v celobuněčných extraktech připravených RIPA lyzačním roztokem	48

Seznam grafů

Graf 1: Příklad stanovení uracilové DNA glykosylační aktivity v cytoplasmatickém a jaderném extraktu buněčné linie HeLa za použití homogenizace pomocí homogenizátoru nebo lyzačního roztoku s Tritonem.....	49
Graf 2: Příklad stanovení uracilové DNA glykosylační aktivity v cytoplasmatickém a jaderném extraktu buněčných linií HeLa, NCI a A549.....	50

1 Úvod

Opravy DNA umožňují věrné uchování genetické informace a brání navození patologických stavů buněk. Jedním z velmi důležitých opravných mechanismů je básová excizní oprava (BER). BER zajišťuje opravu poškozených bází nebo bází, které byly nesprávně zařazeny v průběhu replikace. Proces básové excizní opravy vyžaduje souhru mnoha proteinů. Studium proteinů zúčastněných v básové excizní opravě je důležité nejen z hlediska objasnění jejich funkce v průběhu oprav DNA, ale i pro pochopení patologických jevů spojených s opravami DNA. Pro jejich studium jsou využívány jak metody běžně používané v proteomických analýzách, tak metody speciálně určené pro analýzu proteinů podílejících se na BER.

V předkládané práci jsem se v přehledové části zabýval problematikou analýzy proteinů pomocí western blotu, dot blotu a ELISA, a postavením BER v opravných mechanismech DNA. V experimentální části jsem optimalizoval přípravu buněčných extraktů pro metodu western blotu, optimalizoval metodu western blotu i dot blotu pro detekci proteinů účastnících se básové excizní opravy a testoval nově vyvinutou metodu pro stanovení glykosylační aktivity v extraktech.

2 Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše na téma: Často používané techniky detekce proteinů, jejich porovnání a použití.
2. Vypracování literární rešerše na téma: Role báze excizní opravy v opravných systémech buňky.
3. Optimalizace přípravy buněčných extraktů pro metodu western blotu.
4. Optimalizace metody western blotu i dot blotu pro detekci vybraných proteinů účastnících se báze excizní opravy.
5. Testování nově vyvinuté metody pro analýzu uracilové DNA glykosylační aktivity.

3 Literární přehled

3.1 Western blot

Western blot (WB), někdy také nazývaný immunoblotting, případně protein blotting, je technika, pomocí níž lze stanovovat poměrná množství specifických proteinů (semi-kvantitativně), určovat jejich přibližnou velikost, či sledovat post-translační změny proteinů.

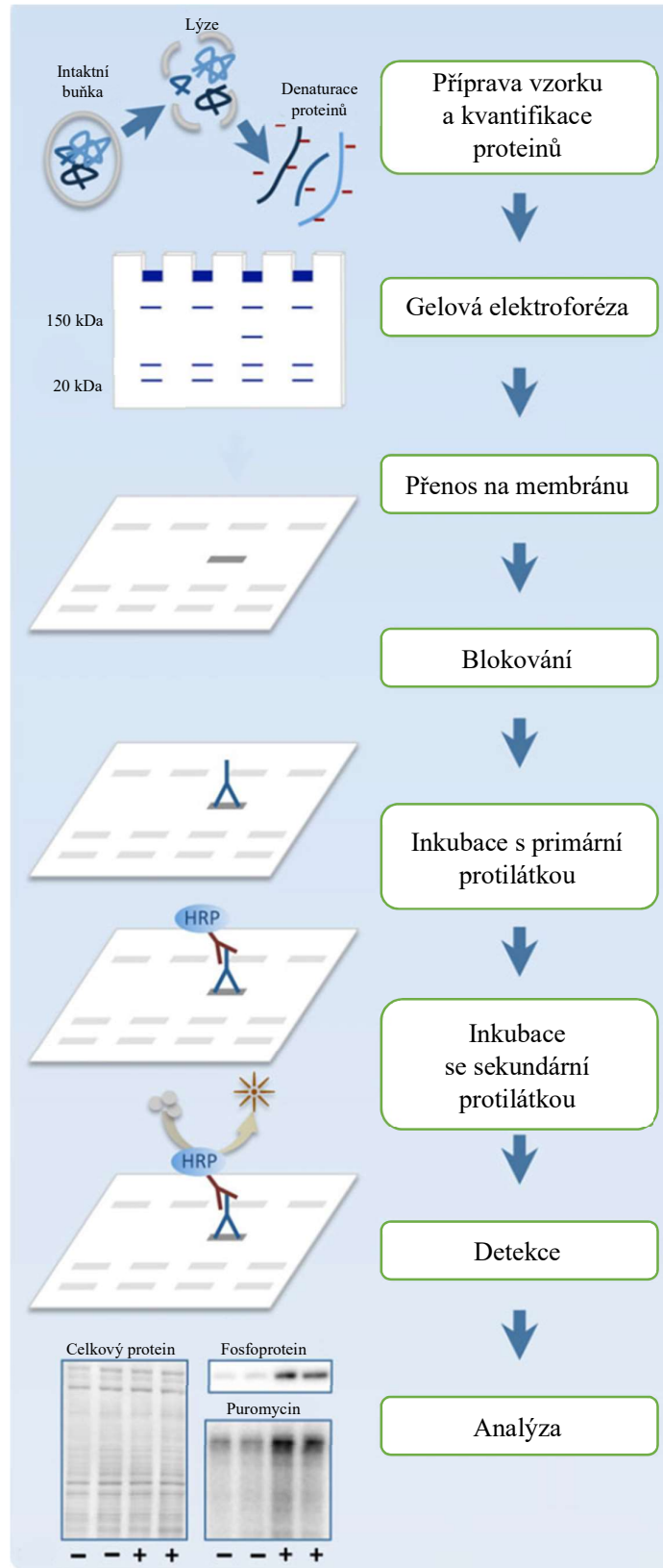
Western blot zahrnuje několik kroků. Jedná se zpravidla o (i) extrakci proteinů z tkání nebo buněk; (ii) stanovení koncentrace veškerých proteinů ve vzorku; (iii) elektroforetickou separaci proteinů; (iv) přenos proteinů z gelu na membránu; (v) blokování membrány; (vi) reakci se specifickými protilátkami rozeznávajícími tyto proteiny; (vii) reakci se sekundární protilátkou s navázanou značkou (například chemiluminiscenční nebo fluorescenční); (viii) detekci signálu a (ix) vyhodnocení získaných dat (Bass *et al.*, 2017). Obecné schéma procedury je znázorněno na obrázku 1.

3.1.1 Příprava vzorku a extrakce proteinů

Sledované proteiny mohou být připraveny z různých typů vzorků. Typickým vzorkem jsou tkáně či kultivované buňky. Používané techniky extrakce proteinů jsou založeny na mechanickém nebo chemickém působení (Grabski, 2009), přičemž nezbytným předpokladem je narušení buněčné membrány, v případě rostlinných pletiv i buněčné stěny. Zvolený způsob extrakce vzorku by měl zohledňovat, jaký protein bude studován, zda pochází z rostlinných nebo živočišných buněk, o jaký druh tkáně nebo pletiva se jedná a kde je v buňce lokalizován (Holden *et Horton*, 2009; Laing *et Christeller*, 2004).

Speciálními přístupy je možné získat i extrakty z buněčných organel. Použitá technika a úspěšnost separace zpravidla závisí na velikosti a tvaru organel, jejich hustotě a povrchovém náboji. V průběhu izolace organel je nutné kontrolovat, zda zvolený postup skutečně vede k izolaci požadovaných organel. Pro izolaci organel se zpravidla používají různé druhy centrifugace, gelová filtrace nebo gelová elektroforéza (Castle, 2001).

Ačkoli pro každý studovaný protein existuje optimální postup extrakce včetně lyzačního roztoku, nejběžnějším přístupem je použití extrakce pomocí lyzačních roztoků s obsahem solí ($0\text{--}1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), neiontových detergentů ($0,1\text{--}2 \%$), iontových detergentů ($0,01\text{--}0,5 \%$), dvojmocných kationtů ($0\text{--}10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a etylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA, $0\text{--}5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) při pH 6–9 (Harlow *et Lane*, 1988).



Obrázek 1: Schéma provedení western blotu (převzato a upraveno z Bass *et al.*, 2017).

Běžnou součástí lyzačních pufrů jsou rovněž redukční činidla. Příkladem je dithiotreitol (DTT) nebo β -merkaptoetanol (β -ME). Jejich úlohou je redukce disulfidických vazeb mezi cysteinovými zbytky a denaturace proteinů (Bass *et al.*, 2017).

Neiontové detergenty rozrušují lipid-lipidové, lipid-proteinové a protein-proteinové vazby bez významného vlivu na denaturaci proteinů. Do této skupiny patří např. Triton X-100, Nonidet P-40 nebo Tween 20. Iontové detergenty denaturují proteiny, přičemž se k nim nekovalentně váží. Inkubace buněk s těmito detergenty vede zpravidla k úplné lýze buněk. Typickým příkladem iontových detergentů je dodecylsírán sodný (SDS) a deoxycholát sodný (Rosenberg, 2005).

Další součástí lyzačních roztoků jsou různé inhibitory proteáz, případně fosfatáz. Jejich úlohou je zabránit degradaci nebo modifikaci proteinů (Bass *et al.*, 2017).

Správné pH roztoků je udržováno pomocí vhodných pufrů. Nejčastěji se používají pufrы obsahující Tris, HEPES, fosforečnany nebo glycin. Jednotlivé pufrы lze rovněž různé kombinovat, aby se pokrylo širší spektrum pH. Při jejich výběru je nutné zohlednit možné interakce jak mezi vlastními činidly, tak i s ostatními látkami a extrahovanými složkami (Stoll *et Blanchard*, 2009).

3.1.2 Stanovení koncentrace proteinů

Pro porovnání množství proteinů mezi různými vzorky je nutné nanést stejná množství celkových proteinů. Ty se však obvykle obsahem proteinů liší. Proto se provádí kvantifikace proteinů ve vzorku. Existuje několik metod pro stanovení množství proteinů ve vzorku.

Zřejmě nejjednodušší metoda spočívá na stanovení koncentrace proteinů v extraktu pomocí UV absorpance. Metoda využívá absorpaci UV světla při 280 nm aminokyselinami s aromatickým jádrem (tyrosin, tryptofan, fenylalanin), či disulfidickými můstky. Metoda je vhodná především pro purifikované stejnorodé směsi proteinů. V ostatních případech poskytuje nespolehlivé výsledky (Desjardins *et al.*, 2009).

Pro stanovení koncentrace proteinů jsou nejčastěji používány kolorimetrické metody. Ty jsou založeny na reakci činidla s proteiny, která je doprovázena změnou barvy roztoku. Barevná změna je následně kvantifikována a data jsou porovnána s kalibrační křivkou roztoků obsahujících proteiny o známé koncentraci. I v těchto případech výsledky závisí na obsahu různých proteinů, nicméně díky skutečnosti, že se zpravidla analyzují směsi různých proteinů, dochází k částečné eliminaci chyb (Peterson, 1983). V tabulce 1 jsou shrnuty jednotlivé metody spolu s jejich interferenčními látkami.

Tabulka 1: Přehled kolorimetrických metod stanovení koncentrace proteinů.
 „BCA“ = bicinchoninová kyselina.

Metoda	Rozsah měření	Princip metody	Interference
Biuret	5–160 mg·ml ⁻¹	Redukce měďnatých iontů na měďné peptidovou vazbou v alkalickém prostředí (Biuretova reakce)	Lipidy, dextran, chelatační činidla a mnoho dalších
Lowry	1–1500 μg·ml ⁻¹	Biuretova reakce + reakce tyrosinu a tryptofanu s folinovým činidlem	Detergenty, chelatační činidla, thioly
BCA	20–2000 μg·ml ⁻¹	Biuretova reakce spjatá s chelatací pomocí BCA	Redukující cukry, chelatační činidla, thioly
Bradford	100–2000 μg·ml ⁻¹	Adsorpce barviva na protein	Surfaktanty

První kolorimetrická metoda ke kvantifikaci proteinů ve vzorku byla vyvinuta již roku 1914 E. Rieglerem, který využil tzv. biuretovou reakci. Reakce využívá redukce měďnatých iontů peptidovou vazbou v alkalickém prostředí za vzniku měďných iontů a světla modře až fialově zbarveného roztoku s absorpčním maximem při 540 nm. Intenzita zbarvení roztoku je přímo úměrná množství peptidových vazeb v roztoku. Metoda je vhodná pro stanovení koncentrace u koncentrovaných roztoků proteinů (pracovní rozpětí je 5–160 mg·ml⁻¹). S metodou však interferuje velká skupina chelatačních činidel (např. EDTA nebo citrát) (Krohn, 2002).

Rovněž tzv. Lowryho metoda využívá pro kvantifikaci proteinů biuretovou reakci. V prvním kroku jsou měďnaté ionty v alkalickém prostředí redukovány na měďné iony. Ve druhém kroku je k roztoku přidáno Folin-Ciocalteovo činidlo obsahující kyselinu fosfowolframovou a fosfomolybdenovou. To vede k oxidaci měďných iontů na ionty měďnaté a vytvoření molybdenové modři. Vedle toho přispívají k tvorbě molybdenové modře postranní zbytky tyrosinu a tryptofanu v proteinech. Výsledkem uvedených reakcí je změna barvy roztoku na sytě modrou. Metoda je vhodná pro měření koncentrací proteinů v rozsahu 0,001 až 1,5 mg·ml⁻¹. Absorbance roztoku se měří při 750 nm. Nevýhodou tohoto způsobu stanovení proteinů je jeho citlivost na pH roztoku. Optimální je alkalické prostředí s pH = 10–10,5. Navíc zbarvení roztoku, je ovlivněno zastoupením jednotlivých aminokyselin, a proto není přímo úměrné koncentraci proteinů (Lowry *et al.*, 1951). Další nevýhodou je interference s detergenty či dalšími látkami, které se mohou vyskytovat v biologických materiálech (Lovrien *et Matulis*, 2001).

Další metoda, která rovněž využívá biuretovou reakci a tvorbu atomů jednomocné mědi je metoda založená na bicinchoninové kyselině (BCA). Namísto Folin-Ciocalteova činidla využívá sodnou sůl kyseliny bicinchoninové, která chelatuje měďné ionty. V zásaditém prostředí reaguje v poměru 2:1 s měďnými ionty, přičemž vzniká fialově zbarvený komplex s absorpčním maximem při 582 nm. Metoda je vhodná pro měření koncentrace proteinů v rozsahu 0,02 až 2 mg·ml⁻¹. Protokol je náchylný na přítomnost redukujících cukrů a chelatačních látek. Optimální pH metody je 11,25 (Smith, 1985).

Dalším přístupem pro kvantifikaci proteinů je Bradfordova metoda. Ta využívá vazbu Coomassie Brilliant Blue G-250 na proteiny. Použité barvivo má 2 formy: červenou a modrou. Po navázání původně červené formy na protein dochází ke změně na modrou formu a ke změně absorpčního maxima z 365 nm na 595 nm. Metoda je 4× senzitivnější než Lowryho metoda, ale dochází při ní k nežádoucím interakcím v silně alkalickém prostředí a za přítomnosti velkého množství detergentů (> 1 %) (Bradford, 1976).

Jak je patrné, vhodnou metodu pro kvantifikaci jen nutné vybrat na základě znalostí látek obsažených v lyzačním roztoku. Na druhou stranu je možné použít speciální separační metody k odstranění nežádoucích, interferujících látek (Lovrien *et* Matulis, 2001). To však vede k prodloužení procedur.

Firma Thermo Fisher Scientific (2012) uvádí na svých stránkách seznam interferujících látek s kolorimetrickými metodami a jejich limitní koncentrace pro správné stanovení koncentrace proteinů v lyzátech.

3.1.3 Elektroforetická separace

Nejběžněji jsou proteiny v lyzátech separovány pomocí SDS polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE). Před vlastní elektroforetickou separací jsou vzorky ošetřeny redukčním činidlem (např. β-ME) a SDS. Působením redukčního činidla dochází k rozrušení disulfidických vazeb mezi jednotlivými podjednotkami proteinu nebo uvnitř samotného řetězce aminokyselin. SDS proteiny denaturuje za vzniku jejich lineární struktury a současně jim uděluje záporný náboj. Tento náboj je přímo úměrný velikosti proteinu. Vzorky jsou před nanesením krátce (2–5 min) zahřáty při teplotě 95–100 °C. Tím je zvýšena efektivita denaturace proteinů a také efektivita vazby SDS na proteiny (Smith, B. J., 1984).

Separace probíhá zpravidla v polyakrylamidovém gelu. Polyakrylamidový gel je tvořen akrylamidem a N,N'-metylenbisakrylamidem. Pro efektivní polymeraci akrylamidových gelů je do roztoku akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu přidáván peroxodisíran amonný (APS), vytvářející reaktivní radikály, a N,N,N',N'-tetrametyletylen diamin (TEMED) stabilizující tyto

radikály (Rosenberg, 2005). Při polymeraci se vytváří separační síť. Velikost pórů v síti závisí na koncentraci akrylamidu. Po nanesení vzorků na gel a použitím vhodného roztoku umožňujícího pohyb iontů, negativně nabitě proteiny putují akrylamidovým sítím ke kladně nabitě elektrodě. Proteiny se dělí podle velikosti. Rychlost pohybu proteinů je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti (Weber *et* Osborn, 1969). K separaci se používá konstantní napětí. Optimální napětí k separaci proteinů se nachází v rozmezí 10–20 V na centimetr délky gelu. Příliš vysoké napětí může způsobit zahřívání gelu a deformace proužků. Nízké napětí prodlužuje dobu separace a umožňuje tak difuzi proteinů v gelu (Bio-Rad, 2019a; Yang *et* Mahmood, 2012).

Pro vznik ostře ohraničených proužků odpovídající jednotlivým proteinům na konci separace se používá diskontinuální systém, ve kterém se nacházejí 2 rozdílné typy gelů: ostřicí a separační. Ostřicí gel se skládá z akrylamidu o nižší koncentraci (3–5 %). Hodnota pH je okolo 6,8. V tomto gelu dochází ke koncentraci proteinů na rozhraní se separačním gelem. Proteiny se tak dostávají do podobné výchozí pozice před vlastní separací. Separační gel obsahuje zpravidla mezi 5–20 % akrylamid. pH je voleno kolem hodnoty 8,8. Tento gel slouží k vlastnímu rozdělení proteinů. Ke zvýšení rozlišení je možné použít gel obsahující gradient akrylamidu (Rosenberg, 2005).

Vedle popsaného způsobu separace, existují další možnosti. Příkladem je použití nativní elektroforézy bez denaturačních a redukčních činidel. Výhodou je práce s nativními proteiny, nicméně různé modifikace proteinů ovlivňují jejich pohyb v elektrickém poli, a tudíž je nutná optimalizace pro konkrétní vzorky (Arndt *et al.*, 2012).

3.1.4 Přenos proteinů z gelu na membránu

Po elektroforetické separaci proteinů jsou proteiny přeneseny pomocí elektrického proudu na membránu, na které je lze snadněji detekovat. Ve srovnání s gelem membrána poskytuje zvýšenou odolnost při manipulaci (Towbin *et al.*, 1979).

I když lze k přenosu použít prostou difuzi nebo vakuum, použití elektrického proudu je výhodné z hlediska kombinace vysoké rychlosti a účinnosti. Podle sestavení aparatury a způsobu imerze transferové sestavy, lze rozlišit dva typy přenosu: „wet blotting“ (tankový způsob přenosu) a „semi-dry blotting“ (polosuchý způsob přenosu) (Kurien *et al.*, 2011).

V případě „wet blottingu“ jsou jak gel, tak membrána ponořeny v transferovém roztoku. Sestava je umístěna vertikálně. Gel je umístěn blíže k záporné elektrodě (katodě) a membrána se nachází mezi gelem a anodou. Tento druh elektrotransferu je náročnější na množství

transferového roztoku a je pomalejší. Nicméně pokud je potřeba zachovat vysoké rozlišení proužků, je „wet blotting“ lepší volbou (GE Healthcare Life Sciences, 2014).

„Semi-dry blotting“ využívá k transferu podobné uspořádání transferové sestavy s tím rozdílem, že filtrační papíry, gel a membrána jsou v transferovém roztoku pouze navlhčeny. K přenosu dochází v horizontální poloze. Tento druh přenosu je méně časově náročný, má menší spotřebu roztoku, ale není tak efektivní (GE Healthcare Life Sciences, 2014).

Mezi nejpoužívanější druhy membrán patří nitrocelulósová, nylonová a polyvinyliden difluoridová membrána. Základní požadavky na membrány jsou: vysoká vazebná kapacita, snadná manipulace, efektivní uchování imobilizovaných molekul a kompatibilita s detekčními metodami. Interakce proteinů s membránami jsou nekovalentní, ale způsob interference není zcela znám (Kurien *et al.*, 2011).

Úspěšnost transferu je vhodné ověřit nescifickým barvením proteinů na membráně. Lze tak rovněž ověřit, zda nanáška proteinů u jednotlivých vzorků byla přibližně stejná. Nejčastěji používané přístupy využívají barvení pomocí Ponceau S, Coomassie Brilliant Blue R-250, amidovou černí 10B nebo koloidním zlatem. Ponceau S i amidová černí jsou relativně málo sensitivní (limit detekce je přibližně 50 ng proteinů). Přesto jsou více používané než barvením koloidním zlatem s detekčním limitem okolo 2 ng. Důvodem je výrazně nižší doba barvení a snadnější vymytí (Yonan *et al.*, 2005).

3.1.5 Blokování membrány

Blokování membrány snižuje nescifické interakce protilátek s membránou a spočívá v inkubaci s proteiny. Nejčastěji se používají relativně levné a dostupné proteiny. Příkladem je vysušené mléko nebo hovězí sérový albumin (BSA). Blokace snižuje možnost navázání protilátky na membránu, čímž dochází ke snížení pozadí. Výsledné proužky jsou tak ostřejší a výraznější (Jensen, 2012). Ačkoli je mléko levnější a dostupnější, BSA může poskytovat lepší výsledky jak ve smyslu snížení šumu, tak zvýšení citlivosti (Yang *et al.*, 2012).

3.1.6 Vazba protilátek

Studované proteiny jsou zpravidla detekovány pomocí protilátek. Detekční systémy jsou zpravidla založeny na nepřímé imunodetekci spočívající v použití dvou protilátek. Nejprve je membrána s přenesenými proteiny inkubována s tzv. primární protilátkou, která je specifická vůči studovanému antigenu. Při výběru protilátky je důležité brát ohled na to, zda je epitop reagující s protilátkou součástí nativní konformace proteinu, nebo zda je protilátka specifická vůči denaturovanému proteinu (Bass *et al.*, 2017). Následuje inkubace s tzv. sekundární protilátkou, která je specifická vůči primární protilátce. Sekundární protilátky jsou značeny

například fluorescenčně nebo enzymaticky. Jednodušší variantou je použití systému jediné značené protilátky reagující přímo s detekovaným proteinem. V tomto případě se jedná o tzv. přímou imunodetekci. Výhodou nepřímé imunodetekce je zesílení signálu ve srovnání s přímou imunodetekcí (Bass *et al.*, 2017). Nezávisle na použitém systému mohou být protilátky značeny také např. částicemi zlata nebo pomocí radioaktivních prvků (Kurien *et Scofield*, 2006).

WB umožňuje alespoň částečně ověřit specifitu protilátek. Je však nutno brát ohled na podmínky, za kterých jsou protilátky schopny vázat antigen, jelikož epitop může zahrnovat konformační strukturu proteinu, která se denurací rozpadne (Kurien *et al.*, 2011).

3.1.7 Detekce signálu a jeho vyhodnocení

Jak již bylo uvedeno, je k dispozici několik způsobů značení protilátek. Různé způsoby značení zpravidla vyžadují odlišné detekční strategie.

Např. radioaktivně značené protilátky se detekují pomocí radiosenzitivního filmu nebo scintilátoru. U protilátek konjugovaných s enzymy dochází zpravidla ke vzniku barevných produktů nebo produktů emitujících světelné záření. Protilátky nesoucí kovové částice např. zlato vytvářejí barevné produkty (Kurien *et Scofield*, 2006). Detekce pomocí protilátek značených fluoroforem probíhá pomocí snímání jejich fluorescence. Díky odlišným excitačním a emisním vlastnostem jednotlivých fluoroforů lze detekovat více antigenů na jediné membráně. Takové vícenásobné značení umožňuje přesnější a efektivnější vyhodnocení blotů (GE Healthcare Life Sciences, 2014).

WB umožňuje přibližně stanovit velikost proteinu na základě proběhlé elektroforetické separace a následným porovnáním polohy proteinu vůči poloze velikostních standardů (markerů). Pokud se na membráně nachází více vzorků, lze vzájemně porovnat množství obsaženého proteinu v daném vzorku. Pro přesnější odhad je ověřována stejnorodost nanášky a transferu pomocí detekce tzv. „house-keeping“ proteinů (proteiny, které se v buňkách/vzorcích vyskytují v relativně stejném množství) a porovnání jejich signálů na téže membráně. Pomocí WB však nelze zpravidla spolehlivě stanovit absolutní množství proteinu, protože míra signálu není lineární s jeho koncentrací (Heidebrecht *et al.*, 2009).

3.1.8 Dot blot

Dot blot neboli Dot-Immunobinding assay (Dot-Iba) je modifikací western blotu. Jedná se o metodu, kdy jsou vzorky přímo nanášeny na nosič (např. nitrocelulózovou membránu). Stejně jako u WB, nespecifická místa musí být vyblokována z hlediska dalších reakcí inertním proteinem. Poté následuje inkubace s primární protilátkou, na kterou se dále váže značená

sekundární protilátka. Celý protokol může být proveden během 6 hodin a to díky vynechání elektroseparačního kroku. Výhodou Dot-Iba je, že se nepoužívají relativně drahé chemikálie nutné pro elektroforetickou separaci. Typická je rovněž nižší spotřeba vzorků (Prasad *et al.*, 1989; Surendran *et al.*, 2015). Významnou nevýhodou je však skutečnost, že nelze jednoduše ověřit, zda signál pochází z vazby protilátky na studovaný antigen nebo je důsledkem vazby na jiný protein. Typická je rovněž nižší citlivost (Ni *et al.*, 2016).

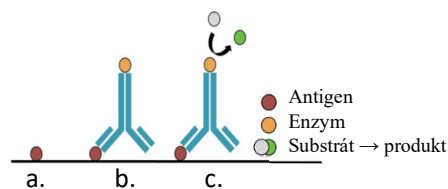
3.2 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

ELISA byla vyvinuta Engvallem, Perlmannem a Van Weemem, Schuursem jako alternativa radioaktivní imunoanalýzy. Jedná se o imunochemickou metodu založenou na vysoce specifických reakcích mezi protilátkou a antigenem. Signál je produkován enzymem katalyzujícím proměnu substrátu na barevný produkt. Metoda slouží k detekci a kvantifikaci různých antigenů (Aydin, 2015).

V praxi jsou nejčastěji používány dva typy metod enzymatických imunoanalýz: homogenní a heterogenní. V případě homogenní analýzy jsou smíchány protilátka i antigen společně bez nutnosti ukotvení. Některá z těchto molekul nese enzym, jehož aktivita je pozměněna po vazbě antigenu a protilátky. Aktivita enzymu může tak být sledována přímo ve vzorku bez nutnosti promývání. Tento typ se používá především při stanovení látek v malých množstvích (např. terapeutických léků). V případě heterogenní analýzy jsou protilátka nebo antigen ukotveny na pevný nosič z různých polymerních materiálů (např. na povrchu mikrotitrační destičky) (Aydin, 2015; O'Kennedy *et al.*, 1990). Heterogenní typ imunoanalýzy je mnohem častější. Nejčastěji používané varianty heterogenní ELISA jsou popsány v následujících částech.

3.2.1 Přímá ELISA

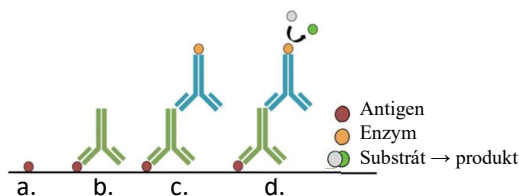
U přímé ELISA jsou na povrch nosiče zpravidla ukotveny antigeny ze vzorku. Poté jsou neobsazená místa na nosiči vyblokována pomocí nereaktivního proteinu (např. BSA), čímž se sníží nespecifická vazba použitých protilátek na stěnu nosiče. Následně je přidán roztok obsahující protilátku proti antigenu, která nese enzym. Po promytí, přidání substrátu, inkubaci a terminaci reakce vhodným činidlem je změřen signál (viz obrázek 2). Obdobou je přímá ELISA proti protilátce. V tomto případě je na nosič nanášena protilátka ze vzorku, která je následně detekována vazbou s antigenem značeným enzymem (Shah *et Maghsoudlou*, 2016).



Obrázek 2: Přímá ELISA proti antigenu. Antigen je navázán na pevný nosič (a.), poté dochází k vazbě enzymově značené protilátky na antigen (b.). Na závěr je substrát enzymaticky přeměněn na chromogenní produkt (c.) (převzato a upraveno ze Shah *et* Maghsoudlou, 2016).

3.2.2 Nepřímá ELISA

U nepřímé ELISA je navázán antigen na pevný nosič. Následně jsou neobsazená místa vyblokována nereaktivním proteinem, a studovaný antigen je pak inkubován s primární protilátkou. Následuje reakce se značenou sekundární protilátkou. Po krátké inkubaci se substrátem je reakce zastavena vhodným činidlem a změřen signál (viz obrázek 3). Výhodou nepřímé ELISA je možnost amplifikace signálu, a tudíž dosažení vyšší senzitivity. Nevýhodou je možná nespecifická vazba sekundární protilátky na povrch nosiče (Shah *et* Maghsoudlou, 2016).

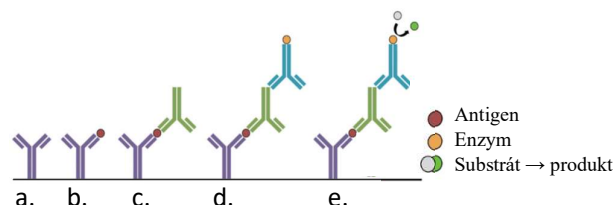


Obrázek 3: Nepřímá ELISA. Antigen je navázán na pevný nosič (a.). Následně je antigen detekován primární protilátkou (b.). Poté dochází k vazbě enzymově značené protilátky na primární protilátku (c.). Na závěr je substrát enzymaticky přeměněn na chromogenní produkt (d.) (převzato a upraveno ze Shah *et* Maghsoudlou, 2016).

3.2.3 Sendvičová ELISA

Sendvičová ELISA je metoda široce používána v klinické diagnostice, pro analýzu vzorků potravin nebo v proteomice jako microarray (Osmekhina *et al.*, 2010). Metoda využívá antigeny se dvěma epitopy. Principem je inkubace antigenu se specifickou protilátkou, která je ukotvena na pevném nosiči. Po promytí, kdy dojde k odstranění nenasazených antigenů, se vzorky inkubují s druhou protilátkou. Ta může nést enzym (přímá sendvičová ELISA) nebo není nijak značena (nepřímá sendvičová ELISA). Ve druhém případě jsou pak vzorky inkubovány se třetí protilátkou nesoucí enzym. V dalším kroku se k připraveným vzorkům přidá substrát. Reakce enzymu se substrátem vede ke vzniku signálu, který je následně změřen (viz obrázek 4) (Crowther, 2009). Oproti předešlým metodám je výhodou sendvičové ELISA

vyvázání pouze hledaného antigenu ze vzorku a rovněž vyšší specifita z důvodu detekce dvou epitopů na antigenu (Osmekhina *et al.*, 2010).

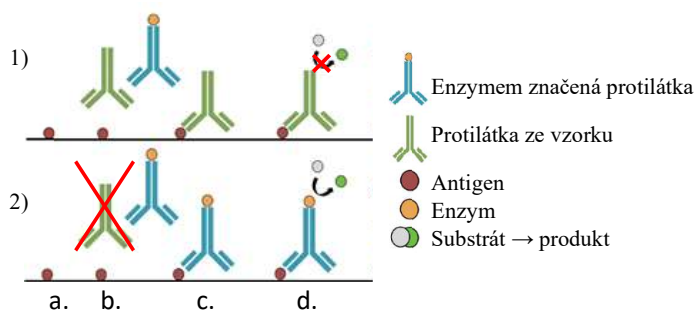


Obrázek 4: Nepřímá sendvičová ELISA. Protilátka je navázána na pevný nosič (a.). Ze vzorku je následně vyvázán antigen (b.). Následuje vazba druhé protilátky na antigen (c.). Poté dochází k vazbě enzymově značené protilátky na druhou protilátku (d.). Na závěr je substrát enzymaticky přeměněn na chromogenní produkt (e.) (převzato a upraveno ze Shah *et Maghsoudlou*, 2016).

3.2.4 Kompetitivní ELISA

U kompetitivní ELISA je na pevný nosič ukotven specifický antigen, který je rozeznáván analyzovanou protilátkou. Po navázání na nosič a promytí, se přidá analyzovaný vzorek spolu s protilátkou nesoucí enzym. Pokud vzorek obsahuje protilátku reagující s ukotveným antigenem, tato protilátka soupeří se značenou protilátkou o vazbu na ukotveném antigenu. Čím více protilátky vzorek obsahuje, tím více se jí váže na antigen, a tím méně se naváže enzymem značené protilátky. Oproti předešlým metodám je detekovaný signál slabší, čím více studovaného proteinu vzorek obsahuje. Obdobně lze detekovat antigen ve vzorku (obrázek 5) (Aydin, 2015).

Kompetitivní ELISA se často používá k analýze malých antigenů, které nemají více epitopů. Senzitivita metody je však relativně nízká (Shah *et Maghsoudlou*, 2016).



Obrázek 5: Přímá kompetitivní ELISA v případě přítomnosti (1) nebo nepřítomnosti (2) protilátky reagující s antigenem v testovaném vzorku. Antigen je navázán na pevný nosič (a.). Je přidán vzorek spolu s protilátkou značenou enzymem (b). V případě, že je ve vzorku přítomna protilátka reagující s antigenem, soupeří tato protilátky o vazbu na antigenu se značenou protilátkou (1c.). Pokud se na antigen naváže neznačená protilátka ze vzorku, nedochází k přeměně substrátu (1d.). V případě, že je přidán vzorek neobsahující protilátku, která reaguje s antigenem, enzymem značená protilátka se efektivně váže na antigen (2c.). Následně dochází k přeměně substrátu na barevný produkt (2d.) (převzato a upraveno ze Crowther, 2009).

3.3 Opravné mechanismy DNA

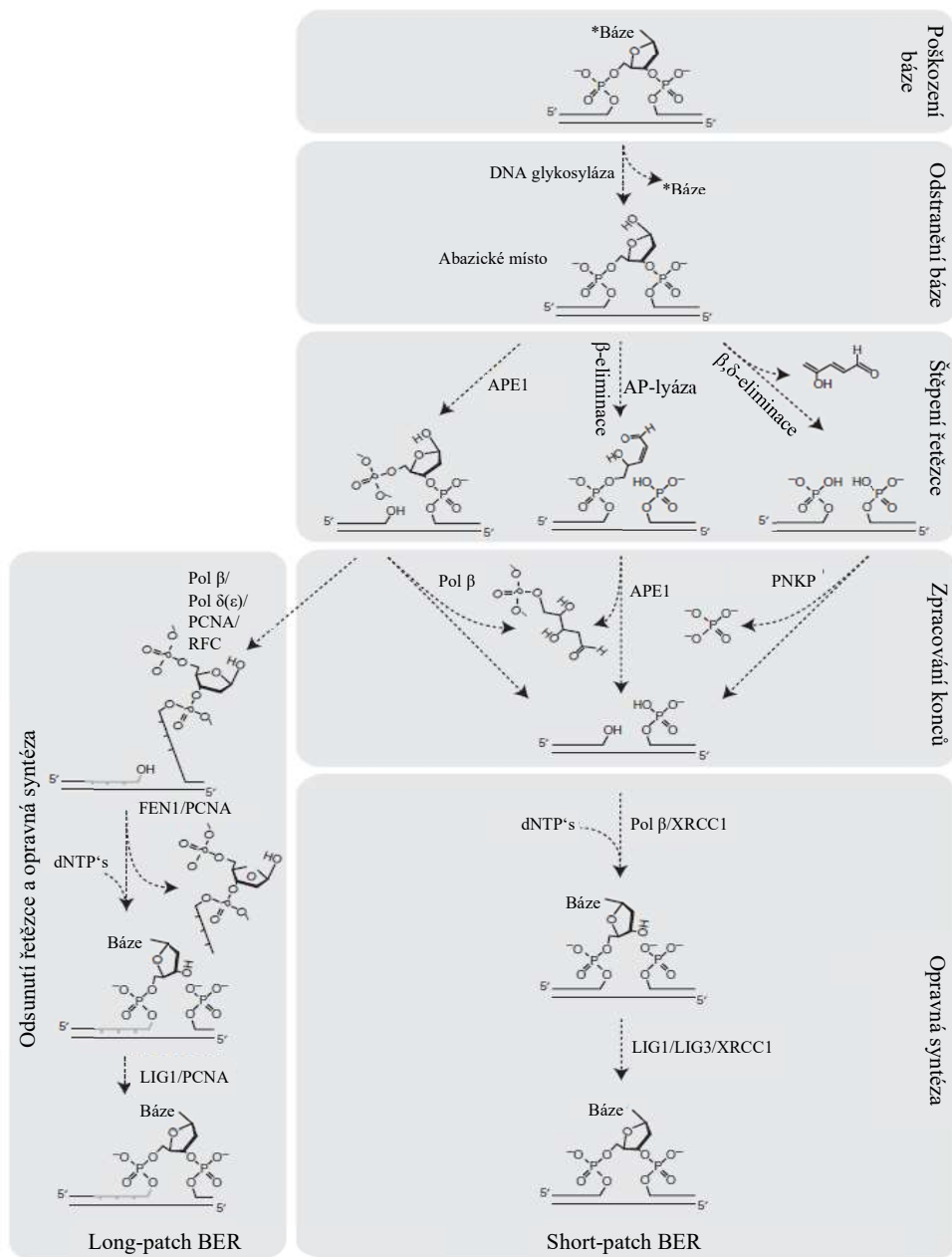
Buněčná DNA (deoxyribonukleová kyselina) je neustále vystavována buněčným metabolitům a exogenním faktorům, které ji mohou modifikovat ve smyslu jednoduchých změn (na úrovni jednotlivých nukleotidů) nebo ve formě složitějších změn, kdy dochází k modifikaci většího úseku DNA (např. translokace). Dalším faktorem, který vede ke změnám genetické informace je samotná replikace DNA. Neopravené změny mohou způsobit smrt jednobuněčných organismů nebo degenerativní změny v mnohobuněčných organismech (a ve výsledku mohou rovněž způsobit smrt organismu). Odhaduje se, že během jediného dne musí buňka opravit asi 20 000 poškození (Barnes *et* Lindahl, 2004).

Opravy DNA lze rozdělit do 6 základních kategorií: bázovou excisní opravu, přímou opravu, opravu chybného párování, nukleotidovou excisní opravu, opravu homologní rekombinací a opravu spojováním nehomologních konců. Jednotlivé opravné mechanismy se však navzájem prolínají, doplňují a v případě potřeby může jeden mechanismus zastoupit jiný (Cox, 2001; Hakem, 2008; Zhou *et al.*, 2001).

3.3.1 Bázová excisní oprava

Bázová excisní oprava (BER) opravuje jednonukleotidové léze DNA, které výrazně nemění její strukturu. Na jejich vzniku se podílí např. reaktivní kyslíkové radikály, různé oxidační a alkylační agens, a také zařazení chybné báze během replikace DNA. Rovněž může docházet k samovolnému odloučení dusíkaté báze. Vedle těchto faktorů, mohou být změny v DNA vyvolány i ionizujícím zářením (Emmanouil, 2011).

Schéma bázové excisní opravy je na obrázku 6. V prvním kroku je poškozená báze odstraněna z DNA pomocí DNA glykosyláz, které štěpí *N*-glykosidickou vazbu mezi bázi a deoxyribózou za vzniku tzv. abazického místa (AP-místo) (Kow, 1994). Následný postup závisí na DNA glykosyláze, která se účastní opravy. DNA glykosylázy se rozdělují na dva typy: monofunkční a bifunkční. Působením monofunkčních DNA glykosyláz je po odštěpení poškozené dusíkaté báze vytvořeno přerušení na 5' konci opravovaného nukleotidu pomocí APE1 lyázy. Tím je vytvořen 3' konec s hydroxylovou skupinou a 5' konec s deoxyribosofosfátem (dRP). dRP je odstraněn pomocí DNA polymerázy β . Tato polymeráza rovněž zaplňuje vzniklou mezeru novým nukleotidem. Poslední krok je katalyzován ligázou III za asistence proteinu XRCC1, která odstraní přerušení v opravovaném řetězci DNA. Bifunkční DNA glykosylázy odstraní chybnou bázi a současně štěpí fosfodiesterovou vazbu na 3' konci opravovaného nukleotidu. To vede buď k β nebo β,δ -eliminaci a k vytvoření přerušení v DNA.



Obrázek 6: Schéma báze excisní opravy (BER). Vlevo je znázorněna konečná fáze LP-BER, vpravo pak jednotlivé cesty SP-BER. (převzato a upraveno ze Krokan *et* Bjørås, 2013).

3'- α,β -nesaturovaný aldehyd (PUA), který vzniká jako produkt β -eliminace, může být následně odstraněn fosfodiesterázovou aktivitou enzymu APE1. V případě, že bifunkční DNA glykosyláza využívá mechanismus β,δ -eliminace, vytvořená fosfátová skupina na 3' konci je odstraněna polynukleotidovou kinázou/fosfatázou (PNKP). Jak APE1, tak PNKP zanechávají na 3' konci hydroxylovou skupinu, což dovoluje následné zaplnění mezery pomocí DNA polymerázy β a ligaci pomocí ligázy III a XRCC1. Toto schéma opravy se nazývá tzv. „short-patch“ BER (SP-BER). V některých případech klastrovaných oxidativních poškození je použita

tzv. „long-patch“ BER (LP-BER). V tomto případě se na opravě podílejí rovněž enzymy běžně provádějící replikaci DNA. Jedná se o proteiny: DNA polymeráza δ a/nebo ϵ , FEN1, PCNA a DNA ligáza I (Whitaker *et al.*, 2017).

Eukaryotické DNA glykosylázy jsou díky zachovanému enzymatickému jádru podobné prokaryotickým. Obsahují však speciální aminokyselinové sekvence na C- a N- koncích, které enzymům udělují subcellulární lokalizaci a umožňují interakci s ostatními proteiny. Příkladem je Uracil DNA N-glykosyláza (UNG), kdy alternativním použitím promotoru a alternativním sestřihem transkriptu *UNG* genu vznikají dvě formy: UNG1 - mitochondriální forma a UNG2 - jaderná forma (Schormann *et al.*, 2014).

Všechny savčí DNA glykosylázy štěpící uracil v DNA jsou monofunkční. Příkladem je právě UNG (homolog Ung u *E. coli*), která štěpí uracil obsažený v DNA řetězci. Ten vzniká buď deaminací cytosinu nebo chybným zařazením některou z DNA polymeráz. Naopak většina DNA glykosyláz štěpící oxidované báze jsou bifunkční. Jak již bylo uvedeno, bifunkční DNA glykosylázy mohou mít β -lyázovou nebo β,δ -lyázovou aktivitu (Krokan *et Bjørås*, 2013). Příkladem proteinu s β -lyázovou aktivitou, je DNA glykosyláza NTH1. Tato glykosyláza odstraňuje širokou škálu oxidovaných pyrimidinových bází (Aspinwall *et al.*, 1997). Příkladem DNA glykosylázy s β,δ -lyázovou aktivitou je glykosyláza NEIL1, která také štěpí převážně oxidované pyrimidinové báze. (Grin *et al.*, 2010).

U prokaryotických buněk je mechanismus opravy stejný. Opravy se však účastní méně proteinů (Kow, 1994).

3.3.2 Další mechanismy oprav DNA

3.3.2.1 Přímá oprava DNA

Přímou opravu DNA zabezpečuje několik skupin enzymů. Jednou z nich jsou enzymy patřící do skupiny fotolyáz. Fotolyázy se účastní fotoreaktivace a štěpí například cyklobutanpyrimidinové dimery a (6-4) fotoprodukty indukované UV zářením. Fotolyázy se nachází jak u prokaryotických, tak eukaryotických buněk, nicméně u placentálů nebyly nalezeny (Sancar, G. B., 1990; Sancar, A., 2003; Sancar, A. *et al.*, 2004).

Příkladem enzymu, který se účastní přímých oprav DNA, je O⁶-alkylguanin-DNA alkyltransferáza (AGT). Tento enzym odstraňuje alkylové zbytky vázané na O⁶ guaninu a O⁴ tyminu. (Pegg *et al.*, 1995). K alkylování O⁶ guaninu a O⁴ tyminu může dojít endogenně metylací nebo exogenně různými vnějšími vlivy. AGT se nachází u všech typů buněk (Daniels *et al.*, 2000; Kanugula *et Pegg*, 2003).

Z dalších poškození jsou pomocí přímých oprav opravovány například N¹-metyladenin a N³-metylcytosin a to oxidativní dealkylací pomocí dioxygenáz (např. AlkB u *E. coli* nebo ALKBH1–8 u lidí) (Sedgwick *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2013; Fedeles *et al.*, 2015).

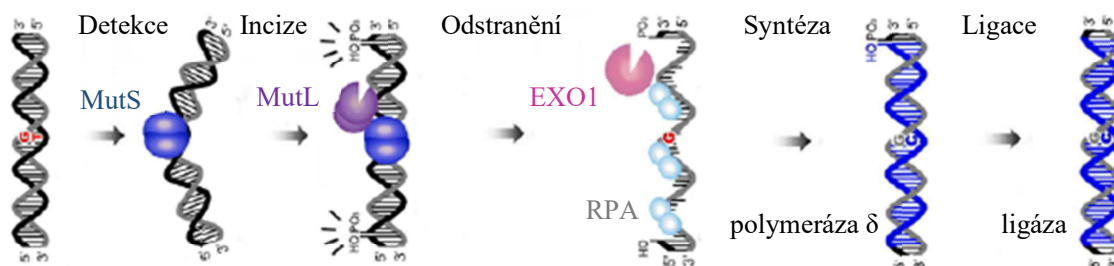
3.3.2.2 Oprava chybného párování

Oprava chybného párování (MMR) je opravný mechanismus, který opravuje chybně zařazené báze v DNA. Jedná se většinou o chybné zařazení bází DNA polymerázou během replikace (např. polymerázou δ nebo ϵ) (Kunz *et al.*, 2009).

Existují dva typy MMR. U obou typů jsou substrátem nově syntetizované chybně spárované úseky DNA (Fukui, 2010).

U prvního typu, který se vyskytuje pouze u některých prokaryotických buněk, je rozpoznávána chybná báze nebo sekundární struktura DNA v nově vznikajícím nemetylovaném řetězci a odstraněna pomocí MutS a MutL proteinů. Dochází ke štěpení řetězce v oblasti chybné báze, která je odštěpena z řetězce exonukleázou. Chybějící část je dosyntetizována pomocí DNA polymerázy III a přerušení odstraněno pomocí DNA ligázy. Obecně se tento typ MMR nazývá metylací řízená MMR (Fukui, 2010).

U druhého typu, který se vyskytuje u eukaryotických buněk, je signálem pro rozlišení nově syntetizovaného řetězce od starého pravděpodobně asymetricky nanesený PCNA u vedoucího řetězce nebo přerušení u opoždujícího se řetězce. K rozpoznání chybně zařazené báze dochází MutS proteiny. Chybná báze je odštěpena za účasti MutL proteinu a exonukleázy I. Chybějící část DNA je pak doplněna DNA polymerázou δ a přerušení v řetězci DNA je zaceleno ligázou I (Liu *et al.*, 2017). Obecné schéma průběhu MMR lze vidět na obrázku 7.



Obrázek 7: Obecné schéma opravy chybného párování bází (MMR) (převzato a upraveno ze Storici, 2011).

3.3.2.3 Nukleotidová excisní oprava

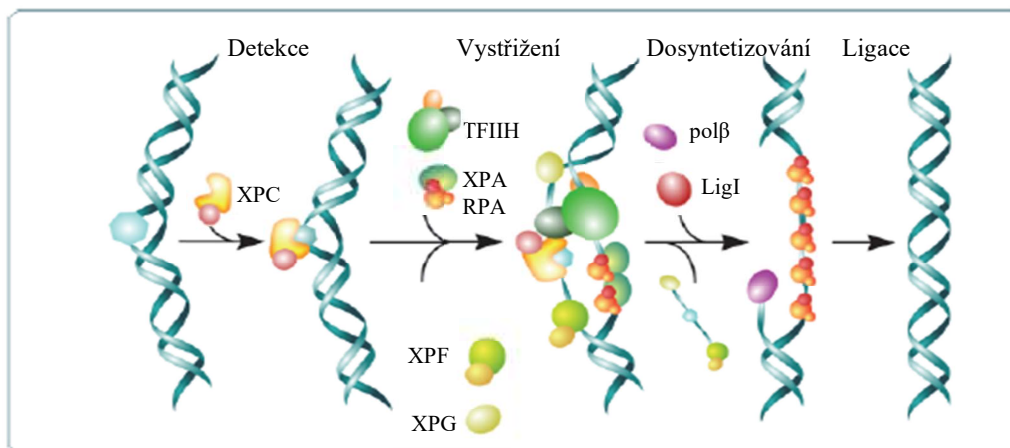
Nukleotidová excisní oprava (NER) je vícekrokový proces, který slouží k odstranění převážně rozsáhlých poškození DNA. Tato poškození mohou vzniknout mnoha způsoby (UV indukované poškození, mutagenní činidla nebo vazbou proteinů na DNA). Díky široké škále substrátů opravovaných NER se předpokládá, že pro aktivaci NER je důležitá spíše změna

struktury v cukrfosfátové kostře DNA způsobená poškozením než přesná chemická struktura (Sancar, A. *et al.*, 2004).

Průběh NER lze rozdělit do 3 kroků (viz obrázek 8): V prvním kroku je rozpoznáno poškozené místo, následně dochází k rozštěpení řetězce pomocí endonukleázové aktivity, a to po obou stranách poškozeného místa a k uvolnění vystřiženého segmentu. Ve druhém kroku je syntetizována chybějící část řetězce pomocí DNA polymerázy. Ve třetím kroku je oprava dokončena ligázou, která odstraňuje přerušení v opravovaném řetězci (Sancar, A. *et Reardon*, 2004).

Ačkoli je obecné schéma NER u prokaryotických i eukaryotických buněk stejné, některé kroky se liší. Zatímco u prokaryotických buněk je vystřižený úsek, obsahující poškození DNA, dlouhý 12-13 bazí (Kisker *et al.*, 2013), u eukaryotických buněk je tento úsek dlouhý 25-30 nukleotidů (Prakash *et Prakash*, 2000).

Rovněž je odlišný průběh NER během transkripce a mimo transkripční aktivitu buňky. Proto lze rozdělit NER na globální genomovou NER (GG-NER), která využívá speciálních enzymů a NER spjatou s transkripcí (TC-NER), kde je poškozené místo detekováno RNA polymerázou během transkripce. Ta následně rekrutuje do poškozeného místa opravné enzymy. TC-NER však může probíhat pouze na transkribovaném vlákně DNA (Hakem, 2008).



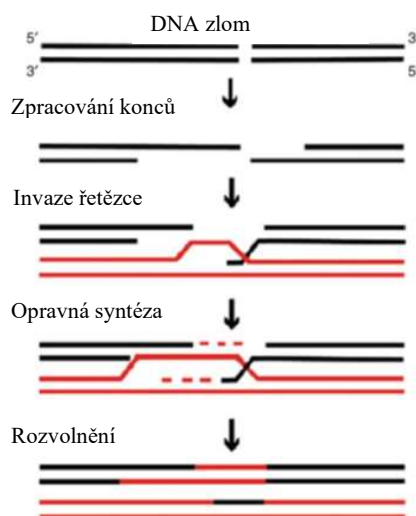
Obrázek 8: Obecné schéma nukleotidové excisní opravy (NER). Chyba je detekována komplexem XPC. Léze je stabilizována pomocí TFIIH a XPA za přítomnosti RPA. Poškozená část řetězce je odstraněna pomocí endonukleáz XPG a XPF. Nový řetězec je syntetizován DNA polymerázou β a přerušení zaceleno ligázou I (převzato a upraveno ze Storici, 2011).

3.3.2.4 Oprava homologní rekombinací

Oprava homologní rekombinací (HRR) je jeden ze dvou mechanismů účastnících se opravy dvouvláknových zlomů (DSB). Systém je založen na nalezení homologie v jiné molekule DNA. Homologní molekuly DNA lze nalézt v homologním chromosomu nebo sesterské chromatidě. Preferovanější cestou je oprava podle sesterské chromatidy chromozomu.

Proto je HRR přednostně omezena na S a G2 fázi buněčného cyklu (Storici, 2011). Schéma HRR je na obrázku 9.

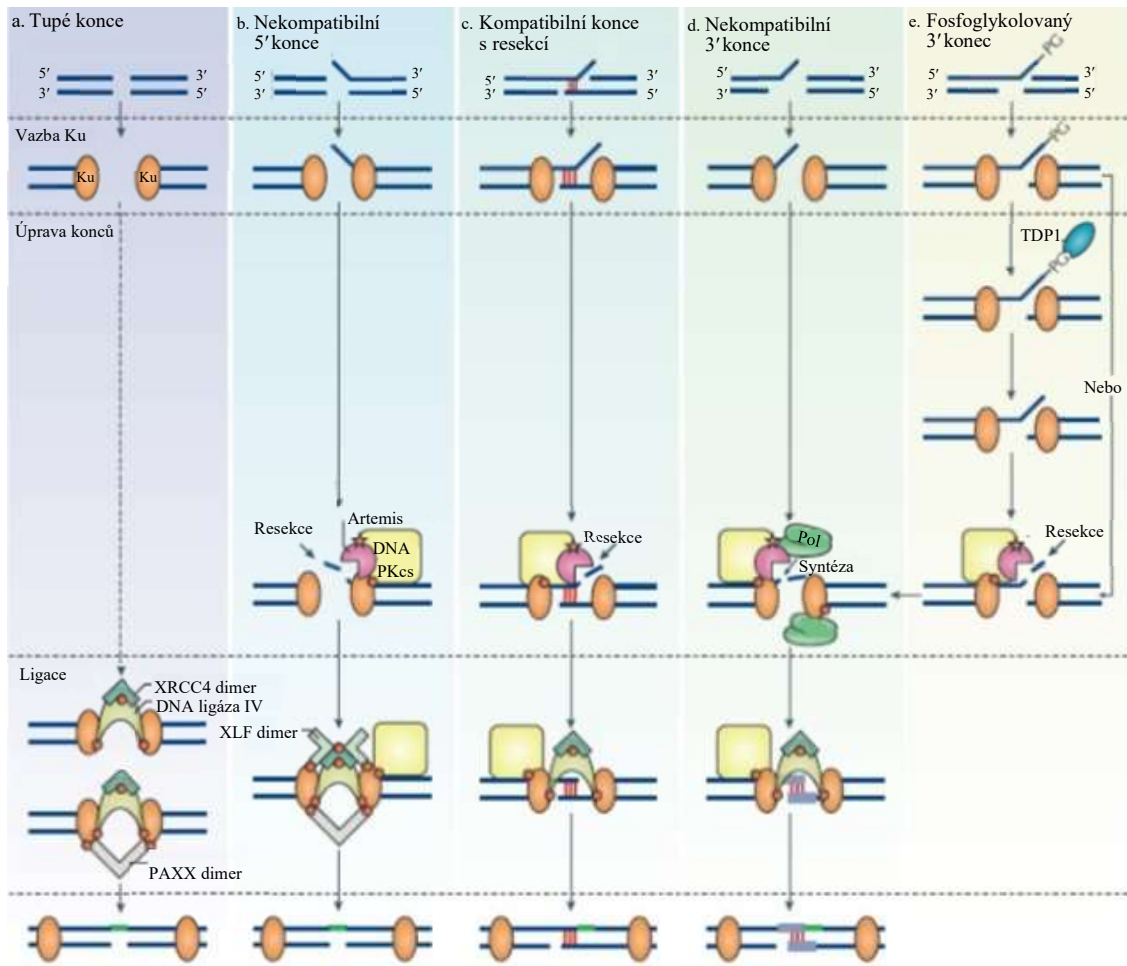
DSB mohou vznikat přímou indukcí různými chemickými látkami, ozářením ionizujícím zářením nebo UV zářením. Vznik DSB mohou vyvolat i vnitrobuněčné vlivy (např. reaktivní kyslíkové radikály), které způsobí poškození DNA a následný kolaps replikační vidlice během replikace (Negritto, 2010).



Obrázek 9: Obecné schéma opravy homologní rekombinací (HRR) (převzato ze Thacker, 2011).

3.3.2.5 Oprava spojováním nehomologních konců

Oprava spojováním nehomologních konců (NHEJ) využívá přímé ligace tupých konců nebo existence mikrohomologních sekvencí (do 4 nukleotidů), které umožňují dočasnou synapsi přesahujících konců DNA a následné spojení řetězců. Tvorba tupých konců nebo mikrohomologií (do 4 nukleotidů) je zprostředkována prodlužováním nebo zkracováním některého z vláken. Štěpení zprostředkovává endonukleáza Artemis, která musí být aktivována katalytickou podjednotkou DNA dependentní protein kinázy (DNA-PKcs). Prodlužování 3' konce nezávisle na řetězci je zprostředkováno DNA polymerázou μ . Po vytvoření synapse je chybějící část řetězce syntetizována DNA polymerázou λ a přerušení odstraněno DNA ligázou IV (viz obrázek 10). Touto cestou však dochází ke ztrátě genetické informace, která byla obsažena v poškozeném místě (Brissett *et Doherty*, 2009; Chang *et al.*, 2017).



Obrázek 10: Schéma opravy spojováním nehomologních konců (NHEJ). DSB jsou rozpoznány proteinem Ku. Endonukleázová aktivita Artemis je zprostředkována pomocí katalytické podjednotky DNA dependentní protein kinázy (DNA-PKcs). (a) Tupé konce jsou přednostně opravovány přímou ligací bez předchozí úpravy (pomocí XRCC4 a DNA ligázy IV, někdy také s pomocí proteinu PAXX). (b) Nekompatibilní 5' konce jsou štěpeny Artemis a DNA-PKcs. Ligace je zprostředkována stejně jako u tupých konců za pomoci proteinu XLF. (c) U kompatibilních konců dochází k vazbě komplementárních míst a odštěpení přesahujících konců pomocí Artemis a DNA-PKcs. (d) Nekompatibilní 3' konce jsou zpracovány endonukleázou Artemis a polymerázou jsou přidány nukleotidy na 3' konce za vytvoření mikrohomologie. (e) Fosfoglykolovaný konec může být odštěpen tyrosyl DNA fosfodiesterázou 1 (TDP1) nebo odštěpením části řetězce endonukleázou Artemis (převzato a upraveno ze Chang *et al.*, 2017).

Eukaryotický systém NHEJ využívá oproti prokaryotické NHEJ mnohem více proteinů a celý opravný systém je složitější (polymerázovou, nukleázovou a fosfatázovou funkci prokaryotické DNA ligázy zprostředkovává velké množství proteinů). Nicméně schéma průběhu NHEJ je velmi podobné. U savců je NHEJ hlavním mechanismem opravy DSB. NHEJ je také využíváno během tzv. V(D)J rekombinace (dochází k ní při maturaci B i T lymfocytů) (Chang *et al.*, 2017).

V případě, že systém NHEJ není kompletní, existují alternativní způsoby nahrazující NHEJ. Jedná se o alternativní spojování konců (a-EJ) a tzv. „single strand annealing“ (SSA). Tyto opravné mechanismy vyžadují delší homologickou sekvenci. Oprava je zprostředkována jinými proteiny než se děje u NHEJ. Nicméně, stejně jako u NHEJ, dochází ke ztrátě genetické informace (nukleotidů) (Chang *et al.*, 2017).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Pro experimenty byly použity následující buněčné linie: HeLa (karcinomové buňky z děložního čípku, dar od Dr. Davida Staňka, Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha), 143B (osteosarkom, Sigma Aldrich), 143B PML BK TK (osteosarkom, buňky stabilně exprimující virovou tymidin kinázu, American Culture Tissue Collection), NCI-H2009 (plicní karcinom, dar od doc. Mariána Hajdúcha, Univerzita Palackého, Olomouc), A549 (plicní karcinom, dar od doc. Mariána Hajdúcha, Univerzita Palackého, Olomouc) a V79 (transformované diploidní plicní buňky z křečka, Sigma Aldrich).

Buněčné linie byly kultivovány v kultivačních lahvích nebo Petriho miskách při 37 °C, v 5% atmosféře CO₂ v inkubátoru Thermo Scientific Steri Cycle. Linie HeLa, V79 a NCI-H2009 (NCI) byly kultivovány v Dulbecově modifikovaném Eaglově médiu (DMEM, Gibco) s přídatkem 3,7 g·l⁻¹ hydrogenuhličitanu sodného. Linie 143B byla kultivována v DMEM s přídatkem 48,8 μmol·l⁻¹ BrdU a přídatkem 3,7 g·l⁻¹ hydrogenuhličitanu sodného. Linie 143B PML BK TK (143B TK) byla kultivována v DMEM s přídatkem 3,7 g·l⁻¹ hydrogenuhličitanu sodného a HAT (0,1 mmol·l⁻¹ hypoxantin, 400 nmol·l⁻¹ aminopterin a 0,16 mmol·l⁻¹ dT, Sigma Aldrich), linie A549 byla kultivována v médiu F12K (Sigma Aldrich) s přídatkem 1,5 g·l⁻¹ hydrogenuhličitanu sodného. Do všech médií bylo přidáno fetální hovězí sérum (Gibco) v konečné koncentraci 10 % a gentamicin (Lek Pharmaceuticals) v konečné koncentraci 50 μg·ml⁻¹. U linie 143B TK bylo týden před experimentem DMEM médium s HAT vyměněno za médium bez HAT. Linie 143B TK byla získána transfekcí linie 143B vektorem obsahujícím pML1 plazmid, sekvenci z BK viru a gen *hsv1* TK virové tymidin kinázy. Transfekovaná linie 143B TK stabilně exprimuje virovou tymidin kinázu (Milanesi *et al.*, 1984).

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

Seznam použitých chemikálií je uveden v tabulce 2. Tabulka 3 obsahuje seznam použitých oligonukleotidů, které byly připraveny firmou Generi Biotech.

Tabulka 2: Seznam použitých chemikálií.

Chemikálie	Výrobce	Katalogové číslo
2-merkaptoetanol	Merck	805740
Azid sodný $\geq 99,9\%$	Sigma Aldrich	71290
Bromfenolová modř	Sigma Aldrich	B0126
BSA	Sigma Aldrich	A7906
CaCl ₂	Lach Ner	30974
Coomassie brilliant blue R250	Sigma Aldrich	27816
Deoxycholát sodný	Sigma Aldrich	30970
Dithiotreitol (100 mmol·l ⁻¹)	Promega	P1171
EDTA (99,4–100,6%)	Sigma Aldrich	E9884
Etanol	Merck	100983
Fenylmetansulfonyl fluorid (PMSF) ($\geq 99,0\%$)	Sigma Aldrich	78830
Glycin ($\geq 99,0\%$)	Sigma Aldrich	G7126
HCl (35%)	Lach Ner	10033-A35
Isopropylalkohol	Sigma Aldrich	I9516
Kapalný dusík		
KCl ($\geq 99,5\%$)	Sigma Aldrich	60130
KH ₂ PO ₄	Serva	26887
Kyselina octová ($\geq 99,85\%$)	Sigma Aldrich	537020
Luminata Forte	Merck	WBLUF0500
Metanol	Merck	106007
MgCl ₂	Lach Ner	30390
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Merck	106580
NaCl ($> 99,0\%$)	Sigma Aldrich	S9888
NaF ($\geq 99\%$)	Sigma Aldrich	S7920
Nanolink streptavidinem pokryté magnetické částice (10 mg·ml ⁻¹)	Solulink	M-1002-050
NaOH (98–100,5%)	Sigma Aldrich	06203
Peroxodisíran amonný	Serva	13375
Ponceau S	Sigma Aldrich	P3504
Precision Plus Protein Dual Color standards	Bio-Rad	1610374
Primární protilátka proti β -aktinu	Sigma Aldrich	A2228
Primární protilátka proti CDD (D-5)	Santa Cruz	sc-365292
Primární protilátka proti DCTD (F-9)	Santa Cruz	sc-376659
Primární protilátka proti MBD4 (A-8)	Santa Cruz	sc-365974
Primární protilátka proti NTH1	Abcam	ab70726
Primární protilátka proti RPA-32	Abcam	ab2175

Pokračování tabulky 2

Chemikálie	Výrobce	Katalogové číslo
Primární protilátka proti SMUG1 (A-1)	Santa Cruz	sc-514343
Primární protilátka proti TDG	Abcam	ab167641
Primární protilátka proti UNG2	Pierce	PA5-34551
SDS ($\geq 98,5\%$)	Sigma Aldrich	L3771
Sekundární protilátka proti myši značená peroxidázou	Jackson Immuno Research Lab	115-035-146
Sekundární protilátka proti králíkovi značená peroxidázou	Jackson Immuno Research Lab	711-035-152
Směs proteázových inhibitorů	Sigma Aldrich	P2714
Sušené mléko	Santa Cruz	sc-2325
TEMED ($\geq 99,0\%$)	Sigma Aldrich	87689
Triton X-100	Sigma Aldrich	X100
Trizma base $>99,9\%$	Sigma Aldrich	T6066
Tween® 20	Sigma Aldrich	P9416

Tabulka 3: Použité oligonukleotidy.

Oligonukleotid	Sekvence (orientace 5' → 3')
Kotvící řetězec	Biotin-CGCCTACAGCAGCGCCAAATTCTTAAGTGC-FAM
Řetězec B _U	TTTAAGAAUTCACG-BHQ1
Řetězec B _T	TTTAAGAATTCACG-BHQ1

4.2.2 Použité soupravy

V tabulce 4 jsou uvedeny použité soupravy.

Tabulka 4: Seznam použitých komerčně dodávaných pracovních souprav.

Souprava	Výrobce	Katalogové číslo
Pierce BCA Protein Assay Kit	Pierce	23227
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit	Bio-Rad	1610183

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

Zásobní a pracovní roztoky:

- 0,5mol·l⁻¹ EDTA (pH 8,0) ve vodě: 29,23 g EDTA bylo přidáno ke 150 ml deionizované vody, pH bylo upraveno pomocí 1mol·l⁻¹ roztoku NaOH na hodnotu 8,0. Po rozpuštění EDTA byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 200 ml.

- 0,5mol·l⁻¹ Tris (pH 6,8) ve vodě: 6,06 g Trizma base bylo přidáno k 60 ml deionizované vody, pH bylo upraveno pomocí 1mol·l⁻¹ roztoku HCl na hodnotu 6,8. Po rozpuštění Trizma base byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 100 ml.
- 10% APS ve vodě: 1 g peroxidisíranu amonného bylo rozpuštěno v 8 ml deionizované vody. Po rozpuštění byl objem doplněn deionizovanou vodou na 10 ml.
- 100mmol·l⁻¹ PMSF v etanolu: 0,1741 g PMSF bylo rozpuštěno v 10 ml etanolu.
- 10× PBS: 80 g NaCl, 2,0 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ a 2,4 g KH₂PO₄ bylo přidáno k 300 ml deionizované vody. Po rozpuštění látek byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 1000 ml. Před použitím byl roztok naředěn deionizovanou vodou na pracovní koncentraci 1x.
- 1mol·l⁻¹ KCl ve vodě: 74,55 g KCl bylo přidáno k 900 ml deionizované vody. Po rozpuštění KCl byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 1000 ml.
- 1mol·l⁻¹ NaCl ve vodě: 58,44 g NaCl bylo přidáno k 900 ml deionizované vody. Po rozpuštění NaCl byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 1000 ml.
- 1mol·l⁻¹ NaOH ve vodě: 40 g NaOH bylo přidáno k 350 ml deionizované vody. Po rozpuštění NaOH byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 1000 ml.
- 1mol·l⁻¹ Tris (pH 7,5) ve vodě: 121,14 g Trizma base bylo přidáno k 800 ml deionizované vody a pH bylo upraveno pomocí 1mol·l⁻¹ roztoku HCl na hodnotu 7,5. Po rozpuštění Trizma base byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 1000 ml.
- 1mol·l⁻¹ Tris (pH 8,0) ve vodě: 121,14 g Trizma base bylo přidáno k 800 ml deionizované vody a pH bylo upraveno pomocí 1mol·l⁻¹ roztoku HCl na hodnotu 8,0. Po rozpuštění Trizma base byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 1000 ml.
- 3mol·l⁻¹ KCl ve vodě: 111,825 g KCl bylo přidáno k 250 ml deionizované vody. Po rozpuštění KCl byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 500 ml.
- Roztok A (promývací roztok): bylo smícháno 500 μl 1mol·l⁻¹ Tris (pH 7,5), 500 μl 1mol·l⁻¹ KCl a 49 ml deionizované H₂O.
- Roztok 0,25% bromfenolové modři ve vodě: 25 mg bromfenolové modři bylo rozpuštěno v 10 ml deionizované vody.
- Roztok směsi proteázových inhibitorů: prášek byl rozpuštěn v 80 ml deionizované H₂O. Po rozpuštění byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 100 ml.

Roztoky pro přípravu buněčných extraktů:

- Lyzační roztok s Tritonem: 20 μl $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 7,5), 20 μl $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, 2 μl $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, 200 μl roztoku směsi proteázových inhibitorů a 200 μl Tritonu X-100 bylo přidáno k 1,5 ml deionizované vody. Po promíchání byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 2 ml.
- Lyzační roztok RIPA (radioimunoprecipitační analýza): 15 ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 1 ml Tritonu X-100, 0,5 g deoxycholátu sodného, 0,1 g SDS, 0,5 ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 8,0), 1 ml $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PMSF, 0,021 g NaF bylo přidáno k 50 ml deionizované vody. Po rozpuštění a promíchání byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 90 ml. Těsně před použitím bylo přidáno 10 ml roztoku směsi proteázových inhibitorů.
- 5 \times Laemliho vzorkový pufr (LSB): bylo smícháno 3,75 ml $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 6,8), 4,5 ml glycerolu, 0,5 g SDS, 0,5 ml 0,25% bromfenolové modře a 1,25 ml 2-merkaptioetanolu. 5 \times LSB byl přidán ke vzorku v poměru 1:4.
- Roztok B (hypotonický lyzační roztok): 200 μl $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 7,5), 200 μl $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, 20 μl $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA a 2 ml roztoku směsi proteázových inhibitorů bylo přidáno k 15 ml deionizované vody. Po promíchání byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 20 ml.
- Roztok C (roztok pro extrakci jaderných proteinů): 10 μl $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 7,5), 166,7 μl $3\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, 1 μl $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA a 100 μl roztoku směsi proteázových inhibitorů bylo přidáno k 500 μl deionizované vody. Po promíchání byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 1 ml.

Roztoky pro western blot:

- 10 \times TBSA: 24,2 g Trizma base a 80 g NaCl bylo přidáno k 800 ml deionizované vody a pH bylo upraveno pomocí $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku HCl na hodnotu 7,6. Po rozpuštění byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 1000 ml. Před použitím byl roztok naředěn deionizovanou vodou na pracovní koncentraci 1 \times .
- 10 \times TGS: 30 g Trizma base, 144 g glycinu a 10 g SDS bylo přidáno k 500 ml deionizované vody. Po promíchání byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 1000 ml. Před použitím byl roztok naředěn deionizovanou vodou na pracovní koncentraci 1 \times .
- Barvicí roztok Ponceau S: 1,25 g Ponceau S a 2,5 ml kyseliny ledové octové bylo přidáno k 200 ml deionizované vody. Po rozpuštění byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 250 ml.

- Barvicí roztok Coomassie Blue: 6 mg Coomassie brilliant blue R250 a 10 ml kyseliny octové bylo přidáno k 50 ml deionizované vody. Po rozpuštění a promíchání byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 100 ml.
- Blokovací roztok A (BRA): 1 g mléka nebo BSA byl rozpuštěn ve 20 ml TBS/TA.
- Fixační roztok: bylo smícháno 25 ml isopropylalkoholu, 10 ml kyseliny octové a 65 ml deionizované H₂O.
- Roztok primární protilátky: 0,15 g mléka nebo BSA a 1,5 µl Tween® 20 bylo přidáno ke 2 ml 1× TBSA. Po rozpuštění a promíchání byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 3 ml 1× TBSA. Použitá ředění protilátek jsou uvedeny v tabulce 5:

Tabulka 5: Použitá ředění protilátek.

Primární protilátka proti	Ředění
β-aktin	1:1000
CDD	1:1000
DCTD	1:1000
MBD4	1:1000
NTH1	1:500
RPA-32	1:1000
SMUG1 (A-1)	1:500
TDG	1:500
UNG2	1:1000

- Roztok sekundární protilátky: 1 g mléka nebo BSA byl přidán ke 20 ml TBS/TA a rozpuštěn. Před použitím byla přidána specifická protilátka proti protilátce primární v poměru 1:10000.
- Roztok TBS/TA: k 1000 ml 1× TBSA byl přidán 1 ml Tween® 20 a roztok byl promíchán.
- Transferový roztok A (TRA): 6 g Trizma base, 28,8 g glycinu a 400 ml metanolu bylo přidáno k 1000 ml deionizované vody. Po rozpuštění byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 2000 ml.

Roztoky pro dot blot:

- Blokovací roztok B (BRB): 1 g BSA byl rozpuštěn ve 20 ml roztoku TBS/TB.
- Roztok TBSB: 10 ml 1mol·l⁻¹ Tris (pH 7,5), 75 ml 1mol·l⁻¹ NaCl bylo přidáno ke 400 ml deionizované vody. Po promíchání byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 500 ml.
- Roztok TBS/TB: 150 µl Tween® 20 bylo přidáno k 300 ml TBSB roztoku a roztok byl promíchán.

- Transferový roztok B (TRB): 0,3 g Trizma base, 1,44 g glycinu a 10 ml metanolu bylo přidáno k 60 ml deionizované vody. Po rozpuštění a promíchání byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 100 ml.

Roztoky pro studium DNA glykosylázové aktivity:

- Roztok D: 500 μl $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 7,5), 100 μl $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA a 5 ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl bylo přidáno k 20 ml deionizované vody. Po smíchání byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 50 ml.
- Roztok E (Roztok pro přípravu magnetických částic s oligonukleotidy): 0,5 g BSA, 12,5 ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 7,5), 75 ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 250 μl Tween® 20 a 0,1 g azidu sodného bylo přidáno ke 200 ml deionizované vody. Po rozpuštění a promíchání byl roztok doplněn deionizovanou vodou do 500 ml.
- Roztok F: bylo smícháno 500 μl $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 7,5), 100 μl $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA a 49,4 ml deionizované vody.
- Roztok komplementárního oligonukleotidu B_T: bylo přidáno 25 μl $0,1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ komplementárního oligonukleotidu s tyminem (řetězce B_T) ke 475 μl roztoku F.
- Roztok komplementárního oligonukleotidu B_U: bylo přidáno 25 μl $0,1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ komplementárního oligonukleotidu s uracilem (řetězce B_U) ke 475 μl roztoku F.
- Roztok s biotinylovaným kotvícím oligonukleotidem: 25 μl $0,1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ kotvícího oligonukleotidu a 2,5 μl $0,1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ oligonukleotidu s Cy5 bylo přidáno k 500 μl deionizované vody, po smíchání byl roztok doplněn roztokem F do 1 ml.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Aparatura k nanášení gelů Dual Gel Caster (Hofer)
- Centrifuga Microspin 12 (Biosan)
- Čtečka destiček Infinite M200 Pro (Tecan)
- Digestor PurAir P5-24XT (Air Science)
- Digitální sonikátor 450 (Branson)
- Douncerův homogenizátor (Sigma Aldrich)
- Hlubokomrazící box Innova U725 (New Brunswick)
- Inkubátor Thermo Scientific Steri Cycle 150 (Thermo Fisher Scientific)

- Laboratorní třepačka Mixer Lab Dancer Vortex (IKA)
- Magnetická míchačka ARE (Velp)
- Mikroskop IX81 s CCD kamerou Hamamatsu Orca II (Olympus)
- Mraznička LGv 5010 (Liebherr)
- Odsávačka F-40 (Fazzini)
- pH metr XS pH 8 (Giorgio-Bormac)
- Sada mikropipet (Gilson)
- Separátor magnetických částic Unitrap
- Souprava na dot blot DHM-48 (Scie-Plas)
- Temperovaná třepačka Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Termoblok MD-02N (Major Science)
- Transferová nádoba TE22 (Hofer)
- Třepačka PMR-30 (Grant-Bio)
- Váhy 770 (Kern)
- Vertikální elektroforetická komora SE 260 (Hofer)
- Výrobník ledu NTF SL70 - A (FrigoPro)
- Zdroj stejnosměrného elektrického proudu EV200 (Consort)
- Zobrazovací systém ChemiDoc MP (Bio-Rad)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Příprava buněčných extraktů

Veškeré experimenty přípravy extraktů probíhaly ve 3 opakováních. V následující části jsou popsány jednotlivé použité metody přípravy extraktů.

Příprava celobuněčných extraktů pomocí RIPA lyzačního roztoku:

Buňky byly kultivovány buď v 75 cm² kultivační láhvi (dále láhvi), nebo v Petriho misce o průměru 10 cm (dále misce). Přibližný počet buněk byl stanoven pomocí mikroskopu vybaveného CCD kamerou. Bylo nasnímáno 10 snímků, přičemž velikost snímku byla 57,2 μm². Následně byl manuálně určen počet buněk na každém snímku a vypočítán průměrný počet buněk připadající na jeden snímek. Přibližný počet buněk v kultivační nádobě byl vypočten podle následujícího vzorce: $P = \frac{a}{b} \times c$, kde P označuje celkový počet buněk, a průměrný počet buněk na snímku, b plochu snímku a c plochu kultivační nádoby. Kultivační

médium bylo odsáto a byl přidán ledově chladný roztok 1× PBS. 1× PBS bylo nahrazeno ledově chladným lyzačním roztokem RIPA. Bylo použito 0,1–0,2 ml roztoku RIPA na 1 milion buněk. Buňky byly seškrábány buněčnou škrabkou a suspenze byla přemístěna do nové zkumavky o objemu 2 ml. Vzorek byl inkubován 30 minut na ledu a následně centrifugován 10 minut při 14000 rpm a 4 °C. Supernatant byl přemístěn do nové zkumavky o objemu 2 ml.

V některých případech byl vzorek před centrifugací sonikován digitálním sonikátorem po dobu 10 minut s hodnotou amplitudy 20 %, s periodou sonikace 30 s a intervalem sonikace 30 s (maximální výkon sonikátoru byl 200 W). Během sonikace byl vzorek udržován v ledové lázni. Následně byl vzorek centrifugován 10 minut při 14000 rpm a 4 °C. Supernatant byl přenesen do nové zkumavky o objemu 2 ml.

V některých experimentech byl ke vzorku přidán Laemmliho vzorkový pufr v poměru 1:4. Následně byl vzorek rozsuspendován opakovaným pipetováním.

Vzorky byly před použitím uskladněny v mrazícím boxu (-80 °C).

Příprava jaderných extraktů pomocí lyzačního roztoku RIPA:

Buňky byly kultivovány v Petriho miskách. Z misek bylo odsáto médium a buňky byly 3× promyty roztokem 1× PBS. Následně byly buňky promyty 10 ml ledově chladného roztoku A. Roztok A byl odsát a ke vzorkům byly přidány 2 ml vychlazeného roztoku B. Misky byly inkubovány 20 minut na ledu a následně byly buňky seškrábány buněčnou škrabkou. Buněčná suspenze byla přemístěna do homogenizátoru. Vzorek byl homogenizován pomocí Douncerova homogenizátoru a následně přemístěn do nové vychlazené zkumavky o objemu 2 ml. Vzorek byl centrifugován po dobu 10 minut při 4 °C a 12400 × g. Po centrifugaci byl supernatant přemístěn do nové zkumavky o objemu 2 ml (cytoplasmatický extrakt). Pelet byl rozsuspendován ve 200 µl lyzačního roztoku RIPA a inkubován 40 minut na ledu. V průběhu inkubace byl vzorek každých 10 minut promíchán po dobu 10 sekund na laboratorní třepačce. Poté byl vzorek centrifugován po dobu 20 minut při 4 °C a 12400 × g. Supernatant byl přemístěn do nové zkumavky o objemu 2 ml (jaderný extrakt). Vzorky byly uskladněny v mrazícím boxu (-80 °C).

Příprava cytoplasmatických a jaderných extraktů pomocí homogenizátoru:

Buňky byly kultivovány v Petriho miskách. Z misek bylo odsáto médium a buňky byly 3× promyty roztokem 1× PBS. Poté byly buňky promyty 10 ml ledově chladného roztoku A. Roztok A byl odsát a ke vzorkům byly přidány 2 ml vychlazeného roztoku B. Misky byly inkubovány 20 minut na ledu a buňky byly seškrábány buněčnou škrabkou. Buněčná suspenze byla přemístěna do homogenizátoru. Vzorek byl homogenizován pomocí Douncerova homogenizátoru a následně přemístěn do nové vychlazené zkumavky o objemu 2 ml. Vzorek

byl centrifugován po dobu 10 minut při 4 °C a 12400 × g. Po centrifugaci byl supernatant odebrán a přenesen do nové vychlazené zkumavky o objemu 2 ml (tato frakce je dále označována jako cytoplasmatický extrakt). Pelet byl rozsuspendován ve 100 µl roztoku B. Ke vzorku bylo přidáno 400 µl roztoku C. Vzorek byl inkubován 40 minut na ledu. V průběhu inkubace byl vzorek každých 10 minut promíchán po dobu 10 sekund na laboratorní třepačce. Poté byl vzorek centrifugován po dobu 20 minut při 4 °C a 12400 × g. Supernatant byl přemístěn do nové zkumavky o objemu 2 ml (dále je tato frakce označována jako jaderný extrakt). Vzorky byly uskladněny v mrazících boxu (-80 °C).

Příprava cytoplasmatických a jaderných extraktů s využitím kapalného dusíku:

Buňky byly kultivovány v Petriho miskách. Z misek bylo odsáto médium a buňky byly 3× promyty roztokem 1× PBS a následně byly promyty ledovým roztokem A. Po odsátí roztoku A byly přidány 2 ml roztoku B a miska byla ponořena až po okraj do kapalného dusíku na dobu 2 minut. Následně byla miska vyjmuta a položena na laboratorní stůl, kde byla ponechána do úplného rozmrazení. Mrazící/rozmrazovací cyklus byl zopakován ještě 2×. Po konečném rozmrazení byly zbytky buněk seškrábány buněčnou škrabkou a suspenze byla přemístěna do nové vychlazené zkumavky o objemu 2 ml. Vzorek byl centrifugován 5 minut při 4 °C a 12400 × g. Supernatant byl přenesen do nové zkumavky o objemu 2 ml (cytoplasmatický extrakt). Pelet byl rozsuspendován ve 100 µl roztoku B. Ke vzorku bylo přidáno 400 µl roztoku C. Vzorek byl inkubován 40 minut na ledu. V průběhu inkubace byl vzorek každých 10 minut promíchán po dobu 10 sekund na laboratorní třepačce. Poté byl vzorek centrifugován po dobu 20 minut při 4 °C a 12400 × g. Supernatant byl přemístěn do nové zkumavky o objemu 2 ml (dále je tato frakce označována jako jaderný extrakt). Vzorky byly uskladněny v mrazícím boxu (-80 °C).

Příprava cytoplasmatických a jaderných extraktů pomocí lyzačního roztoku s Tritonem:

Buňky byly kultivovány v Petriho miskách. Z misek bylo odsáto médium, buňky byly 3× promyty roztokem 1× PBS a následně byly promyty 10 ml ledově chladným roztokem A. Po odsátí bylo ke vzorkům přidáno 1,8 ml vychlazeného roztoku B. Misky byly inkubovány 20 minut na ledu. Po inkubaci bylo do roztoku pipetou přidáno 0,2 ml lyzačního roztoku s Tritonem, opakovaným pipetováním byl roztok promíchán a buňky byly inkubovány 5 minut na ledu. Buňky byly seškrábány buněčnou škrabkou a suspenze byla přemístěna do nové vychlazené zkumavky o objemu 2 ml. Vzorek byl centrifugován po dobu 10 minut při 4 °C a 12400 × g. Supernatant byl přemístěn do nové zkumavky o objemu 2 ml (cytoplasmatický extrakt). Pelet byl rozsuspendován ve 100 µl roztoku B. Ke vzorku bylo přidáno 400 µl roztoku C. Vzorek byl inkubován 40 minut na ledu. V průběhu inkubace byl vzorek každých

10 minut promíchán po dobu 10 sekund na laboratorní třepačce. Poté byl vzorek centrifugován po dobu 20 minut při 4 °C a 12400 × g. Supernatant byl přemístěn do nové zkumavky o objemu 2 ml (dále je tato frakce označována jako jaderný extrakt). Vzorky byly uskladněny v mrazícím boxu (-80 °C).

4.4.2 Měření koncentrace proteinů pomocí BCA assay

Koncentrace proteinů v extraktech byla stanovena pomocí soupravy Pierce BCA Protein Assay Kit. Bylo postupováno podle pokynů výrobce. Ze zásobního roztoku byly připraveny koncentrační řady BSA. Ředění bylo pomocí roztoku, který byl použit pro přípravu analyzovaných extraktů. Koncentrační řada obsahovala 9 rozdílných koncentrací BSA. Do jamek mikrotitrační destičky byla nanášena koncentrační řada ve 3 opakováních (25 µl roztoku do každé jamky). Spolu s koncentrační řadou byly na destičku nanášeny i studované vzorky. Jaderné extrakty byly ředěny 1:1 roztokem použitým pro přípravu analyzovaného extraktu. Cytoplasmatické extrakty nebyly ředěny. Do jamek bylo přidáno 200 µl pracovního roztoku. Poté byla destička přikryta a vložena do temperované třepačky a vzorky byly třepány 30 sekund při 300 rpm. Následně byly vzorky inkubovány 30 minut při 37 °C. Měření signálu vzorků proběhlo ve čtečce destiček. Pro vyhodnocení byl použit program Excell. Koncentrace proteinů byla přepočítána na 1 milion lyzovaných buněk.

4.4.3 Denaturující polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

Pro SDS-PAGE byla použita vertikální elektroforetická komora SE 260 s polyakrylamidovými gely o tloušťce 0,75 mm. K přípravě gelů (zaostřovacího a separačního) byla použita aparatura k nanášení gelů Dual Gel Caster a souprava TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit. Bylo postupováno podle návodu výrobce.

Gel byl přenesen do elektroforetické komory a komory s gelem byly zality 1× TGS roztokem. Pro elektroforetickou separaci bylo použito 5 nebo 10 µg proteinů. Jednotlivé vzorky připravených extraktů byly naředěny na uvedené koncentrace roztokem, který byl použit k jejich přípravě. Ke vzorkům byl přidán Laemmliho vzorkový pufr v poměru 1:4. Po promíchání na laboratorní třepačce byl vzorek umístěn do termobloku a denaturován při 95 °C po dobu 10 minut. Vzorek byl centrifugován 3 s a po ochlazení na pokojovou teplotu byl nanášen na gel. Spolu se vzorky byly do samostatné jamky nanášeny 3 µl standardu relativní molekulové hmotnosti (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards)

Elektroforetická separace probíhala 10 minut při 100 V. Následně bylo napětí zvýšeno na 120 V. Separace byla ukončena v okamžiku, kdy indikační proužek bromfenolové modři

dosáhl vzdálenosti 0,5 cm od spodního okraje gelu (přibližně po 110 minutách). Po ukončení separace byla aparatura rozebrána, vyjmut gel a byl oddělen zaostřovací gel.

4.4.4 Western blot

Transfer elektroforeticky separovaných proteinů probíhal v transferové nádobě Hoefer TE22 („wet blotting“). Nádoba byla naplněna vychlazeným roztokem TRA. Nitrocelulózová membrána s velikostí pórů 0,2 μm byla aktivována ponořením do roztoku TRA na dobu 5–10 minut. Před sestavením blotovacího sendviče byly jednotlivé části ponořeny do roztoku TRA na dobu 5 minut. Při sestavení sendviče se postupovalo podle pokynů výrobce. Nejprve byla do kazety vložena houba o tloušťce 3 mm, poté blotovací papír, na něj byla přiložena membrána, následoval separační gel, blotovací papír a 6 mm silná houba.

Kazeta byla vložena do transferové nádoby tak, aby membrána byla mezi gelem a anodou. Nádoba byla naplněna roztokem TRA až po rysku. Přenos probíhal při konstantním napětí 75 V po dobu 60 minut. Roztok byl udržován v mírném pohybu pomocí magnetického míchadla na magnetické míchače.

Po ukončení přenosu byla aparatura rozebrána, membrána vyňata a promyta v 1 \times roztoku TBSA po dobu 1 minuty. Membrána a v některých případech i gel byly reverzibilně obarveny proteinovými barvivou. Membrána byla inkubována v roztoku barviva Ponceau S po dobu 10 minut. Gel byl nejprve inkubován s fixačním roztokem po dobu 45 minut, a následně s barvicím roztokem Commassie blue po dobu 30 minut. Membrána byla odbarvena ponořením do roztoku TBS/TA, kde byla ponechána až do úplného odbarvení. Pokud není uvedeno jinak, blokace membrány byla provedena v BRA s BSA po dobu 60 minut. Promytí membrány po blokaci proběhlo v roztoku TBS/TA za stálého míchání. Roztok byl v průběhu promývání 2 \times vyměněn. Celková doba promývání byla 15 minut. Následně byla provedena inkubace se 3 ml roztoku primární protilátky. Inkubace byla provedena po dobu cca 16 hodin v uzavíratelném igelitovém sáčku. Vzorky byly po celou dobu inkubace třepány při 4 °C. Další den byla membrána ze sáčku vyňata a promyta v roztoku TBS/TA. Celková doba promývání v roztoku TBS/TA byla 15 minut. V průběhu této doby byl roztok 2 \times vyměněn. Po promytí byla membrána inkubována při pokojové teplotě s 20 ml roztoku sekundární protilátky po dobu jedné hodiny. Membrána byla následně promyta v roztoku TBS/TA. Celková doba promývání byla 20 minut a roztok byl v průběhu 3 \times vyměněn. Inkubace probíhala za stálého třepání. Po inkubaci byla membrána převrstvena 2 ml Luminata Forte a snímána CCD kamerou na přístroji ChemiDoc. Pokud není uvedeno jinak, vyhodnocení proběhlo pomocí programu ImageLab. Velikost proteinů byla porovnávána s databází The UniProt Consortium (2019).

Veškeré experimenty byly provedeny ve třech opakováních a odečtené hodnoty byly zprůměrovány.

4.4.5 Dot blot

Membrána spolu s jedním až třemi filtračními papíry byla na 5–10 minut ponořena do TRB a vložena do soupravy na dot blot. Nepoužité jamky byly utěsněny těsnicí membránou. Souprava byla připojena k odsávacímu zařízení a jednotlivé jamky byly naplněny 150 μ l TBS/TB roztoku. Roztok byl odsát a do jamek byly nanесeny jednotlivé vzorky. Pokud není uvedeno jinak, bylo do jamky nanесeno 15 μ g celkového proteinu. Objem jednotlivých vzorků byl upraven pomocí roztoku TBSB nebo TRB na 150 μ l. Odsávání bylo odpojeno. Vzorky byly inkubovány po dobu 60 minut. Následně bylo připojeno odsávací zařízení a zbytkové objemy byly odsáty. Jamky byly 3 \times promyty 150 μ l TBS/TB roztoku (roztok byl po nanесení ihned odsát). Blokace jednotlivých jamek probíhala ve 150 μ l BRB po dobu 60 minut. Přebytek roztoku byl odsát. Jamky byly 3 \times promyty 150 μ l TBS/TB roztoku (po nanесení byl roztok ihned odsát). Do jamek bylo nanесeno 100 μ l roztoku primární protilátky. Inkubace probíhala po dobu 60 minut. Následně byl přebytek roztoku s protilátkou odsát a jamky byly 3 \times promyty 150 μ l roztoku TBS/TB (po nanесení byl roztok ihned odsát). Následně bylo do jamek přidáno 100 μ l roztoku sekundární protilátky. Po 60 minutách byl přebytek roztoku s protilátkou odsát a jamky byly 3 \times promyty 150 μ l roztoku TBS/TB (po nanесení byl roztok ihned odsát). Membrána byla vyjmuta a promyta 2 \times v roztoku TBSB. Po promytí byla membrána převrstvena 2 ml Luminata Forte a snímána CCD kamerou na přístroji ChemiDoc. Vyhodnocení blotu proběhlo pomocí programu ImageJ.

4.4.6 Příprava magnetických částic pro studium DNA glykosylázové aktivity

Magnetické částice pro studium DNA glykosylázové aktivity byly připraveny ve dvou krocích. Nejprve byly streptavidinem pokryté magnetické částice (1 μ m, Nanolink Streptavidin Magnetic Bead) inkubovány s kotvícími oligonukleotidem obsahujícím na 5' konci karboxyfluorescein (FAM). Následně byly takto připravené magnetické částice inkubovány s párujícím oligonukleotidem obsahujícím na 3' konci zhasěč fluorescence BHQ1. Tento druhý řetězec obsahoval nebo neobsahoval ve svém řetězci uracil. V průběhu přípravy byl nejprve do zkumavky o objemu 2 ml přidán 1 ml roztoku E a k němu byl přidán 1 mg magnetických částic. Částice byly rozmíchány a separovány pomocí separátoru magnetických částic Unitrap. Po 2 minutách byl roztok odsát.

Zkumavky byly následně vyjmuty ze separátoru a k magnetickým částicím byl přidán 1 ml roztoku E, roztok byl promíchán a částice byly separovány na magnetickém separátoru. Tento postup byl opakován ještě 2×.

Po magnetické separaci byl roztok pomocí pipety odstraněn a byl přidán 1 ml roztoku s biotinylovaným kotvicím oligonukleotidem obsahující karboxyfluorescein (FAM, viz tabulka 3) a biotinylovaný fluorochrom Cy5. Zkumavka byla inkubována po dobu 1 hodiny na třepačce (300 rpm) při pokojové teplotě. Připravený roztok s konjugovanými magnetickými částicemi byl rozdělen po 0,5 ml do dvou zkumavek o objemu 2 ml. Zkumavky byly umístěny na magnetický separátor.

Po separaci byl roztok odstraněn pipetou. K částicím byl přidán 1 ml roztoku E. Roztok byl promíchán a částice byly separovány na magnetickém separátoru. Tento postup byl opakován ještě 2×.

Po odsátí roztoku pipetou bylo do jedné mikrozkušavky přidáno 500 µl roztoku komplementárního oligonukleotidu B_U, a do druhé mikrozkušavky 500 µl roztoku komplementárního oligonukleotidu B_T. Částice byly inkubovány na třepačce (300 rpm) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Připravené částice byly skladovány při 4 °C.

4.4.7 Analýza DNA glykosylázové aktivity

10 µl připraveného roztoku magnetických částic s navázaným kotvicím oligonukleotidem a komplementárním řetězcem B_T nebo B_U obsahující uracil bylo přidáno k 1 ml roztoku D a částice byly separovány na magnetickém separátoru. Po 2 minutách byl roztok odebrán a následně byl přidán 1 ml roztoku D. Tento postup byl opakován ještě 2×, aniž by došlo k rozsuspendování částic. Studované vzorky byly zředěny roztokem E tak, aby obsahovaly 2 µg celkových proteinů v jednom ml roztoku.

Do jamek 384 jamkové destičky bylo přidáno 50 µl zředěných magnetických částic s oligonukleotidy (alespoň 3 jamky obsahovaly částice s navázaným komplementárním řetězcem B_U a 3 jamky částice s navázaným komplementárním řetězcem B_T). Následně bylo k částicím přidáno 50 µl zředěného vzorku (celkem 100 ng celkového proteinu). Signál FAM a Cy5 byl snímán pomocí čtečky destiček každé 2 nebo 4 minuty. Hodnoty signálu FAM byly vyděleny signálem Cy5. Signál FAM byl excitován při vlnové délce v rozmezí 483–493 nm a snímán při emisní vlnové délce v rozmezí 510–530 nm. Signál Cy5 byl excitován při vlnové délce v rozmezí 625–635 nm a snímán při emisní vlnové délce v rozmezí 670–690 nm.

5 Výsledky

5.1 Příprava buněčných extraktů a měření koncentrace celkových proteinů v různých liniích

Jako základní metoda přípravy buněčných extraktů pro stanovení množství vybraných DNA glykosyláz byla použita metoda založená na extrakci proteinů z buněk pomocí lyzačního roztoku RIPA. Tato metoda představuje běžný přístup pro následnou analýzu proteinů pomocí elektroforetické separace a blotů. Množství použitého lyzačního roztoku bylo stanoveno na základě počtu buněk v kultivační nádobě. Počet buněk byl odhadnut na základě mikroskopických dat. Bylo použito 0,1 ml roztoku RIPA na cca 1 milion buněk. Celkové množství proteinů v extraktech bylo určeno pomocí kitu založeném na biuretové reakci a následné interakci se sodnou solí kyseliny bicinchoninové (BCA metoda). Koncentrace proteinů byla vypočtena z absorpance vzorků měřené při vlnové délce 562 nm. Přibližná koncentrace sledovaných proteinů byla určena výpočtem z rovnice kalibrační křivky pro známé koncentrace BSA. Vyhodnocení proběhlo v programu Excel 2016.

Byly připraveny extrakty z buněčných linií HeLa, NCI, 143 B, 143B TK a V79. V následující tabulce (tabulka 6) jsou uvedeny zjištěné koncentrace celkových proteinů v přepočtu na 1 milion buněk.

Tabulka 6: Koncentrace celkových proteinů v celobuněčných extraktech u buněčných linií HeLa, NCI, 143 B, 143B TK a V79 za použití RIPA lyzačního roztoku. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka.

Buněčná linie	Množství proteinů na 1 mil. buněk [μ g]
HeLa	231,22 \pm 2,4 %
NCI	223,80 \pm 3,6 %
143 B	185,43 \pm 1,4 %
143B TK	210,53 \pm 4,1 %
V79	157,81 \pm 2,1 %

Nejvyšší koncentrace proteinů byla naměřena u buněčné linie HeLa. Naopak nejnižší hodnota koncentrace byla zjištěna v extraktech z buněčné linie V79. Jelikož extrakty připravené pomocí RIPA roztoku nejsou vhodné pro stanovování enzymatické aktivity z důvodu přítomnosti denaturačních činidel, a součástí práce bylo i testování metody pro stanovení aktivity uracilových DNA glykosyláz, byly testovány alternativní přístupy pro přípravu extraktů.

Jednalo se o následující tři přístupy přípravy extraktů: (i) homogenizace pomocí Douncerova homogenizátoru (H); (ii) cyklické zmrazování a rozmrazování buněčné kultury v kapalném dusíku (N); (iii) použití roztoku s přídavkem Tritonu X-100 (T). Byly připraveny cytoplasmatické a jaderné extrakty. Zjištěné koncentrace proteinů jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Koncentrace celkových proteinů v buněčných extraktech u buněčné linie HeLa po použití homogenizátoru (H), zmrazování kapalným dusíkem (N) a pomocí roztoku s obsahem Tritonu X-100 (T). Cytoplasmatický extrakt je označen jako „cyt“, jaderný extrakt jako „nuk“. Hodnota koncentrace je uvedena jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka.

Extrakt	Množství proteinů na 1 milion buněk [μ g]
H_cyt	151,98 \pm 4,5 %
N_cyt	202,09 \pm 6,7 %
T_cyt	207,27 \pm 5,8 %
H_nuk	13,37 \pm 2,3 %
N_nuk	15,59 \pm 4,7 %
T_nuk	16,99 \pm 1,2 %

Nejvyšší množství proteinů bylo získáno extrakcí pomocí roztoku s přídavkem Tritonu X-100 (jak v cytoplasmatickém, tak jaderném extraktu). Druhá nejvyšší koncentrace byla naměřena v případě cyklického zmrazování/rozmrazování. Nejmenší výtěžek proteinů byl při použití homogenizační techniky pomocí Douncerova homogenizátoru.

Z výsledků je patrné, že příprava extraktů pomocí homogenizátoru poskytuje z použitých metod nejvyšší množství proteinů v obou extraktech. Současně je zjevné, že veškeré metody poskytly přibližně 10 \times méně proteinů v jaderných extraktech než v cytoplasmatických extraktech (viz tabulka 7). Ačkoli z testovaných metod byla nejúčinnější extrakce pomocí RIPA roztoku, jeho denaturační účinky omezují použití extraktů pro sledování DNA glykosylázové aktivity. Z nedenaturačních přístupů bylo nejefektivnější použití roztoku s Tritonem X-100. Tento přístup však nedovoluje jednoduše odstranit detergent ze získaných lyzátů a je proto méně vhodný pro následné analýzy enzymatických aktivit než další nedenaturační testované přístupy.

5.2 Western blot

V průběhu optimalizace metody western blotu byly detekovány vybrané DNA glykosylázy pomocí protilátek proti MBD4, UNG2, TDG, SMUG1 a NTH1. Jako kontrolní proteiny ke studiu optimalizace sloužily tyto proteiny: β -aktin a jaderný protein RPA. Protein

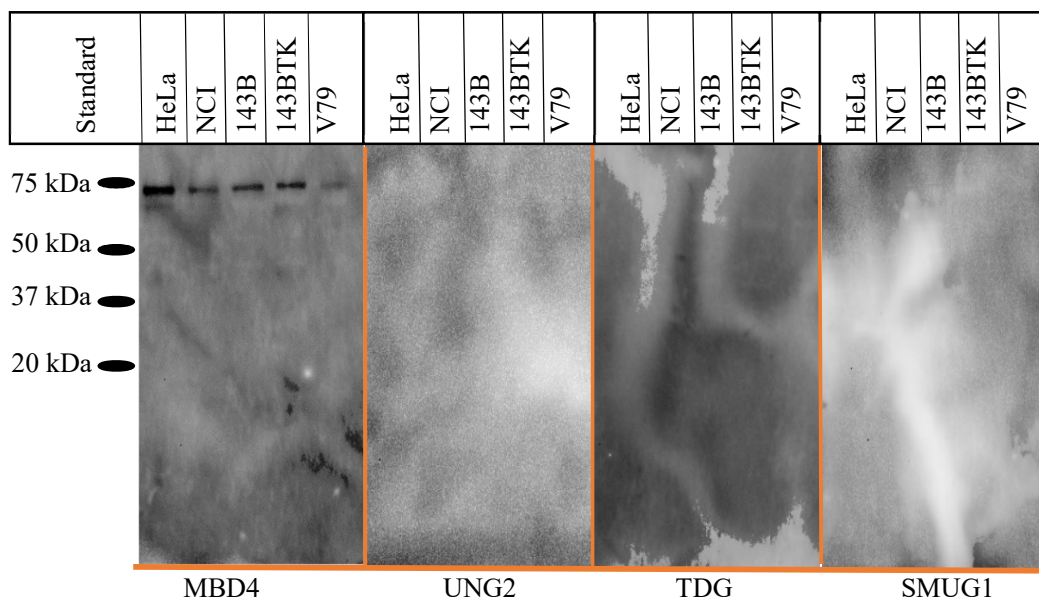
RPA se skládá ze 3 rozdílných podjednotek (Chen *et al.* Wold, 2014), přičemž použitá protilátka byla namířena proti podjednotce o velikosti 32 kDa. Vedle toho byly v některých experimentech rovněž použity protilátky proti proteinům účastnících se deaminace cytosinu. Jednalo se o proteiny CDD a DCTD. U těchto deamináz se předpokládá, že jsou převážně lokalizovány v cytoplasmě.

Nejprve byla provedena analýza pomocí protilátek proti β -aktinu a proteinu RPA-32 v celobuněčných extraktech HeLa buněk připravených pomocí RIPA lyzačního roztoku (obrázek 11). Na gel bylo naneseno 10 μ g proteinů. Pro blokování nespecifických interakcí bylo v experimentu použito 5% mléko. Western blot analýza poskytla jasné proužky s minimálním pozadím.



Obrázek 11: Western blot analýza β -aktinu a proteinu RPA-32 v celobuněčných extraktech buněčné linie HeLa.

V následném experimentu byla provedena analýza proteinů MBD4, UNG2, TDG a SMUG1 v celobuněčných extraktech z buněčných linií HeLa, NCI, 143 B, 143B TK a V79, které byly připraveny pomocí RIPA roztoku. Nanáška proteinů byla 10 μ g. Koncentrace použitých protilátek jsou uvedeny v tabulce 4. Pro blokování nespecifických interakcí bylo použito 5% mléko. Snímky z western blot analýzy těchto proteinů jsou na obrázku 12. Vyhodnocení proužků probíhalo v programu ImageJ stanovením intenzity signálu na ploše 312 pixelů v centrální oblasti proužku. Průměrné hodnoty relativní intenzity vypočtené ze 3 měření jsou uvedeny v tabulce 8.



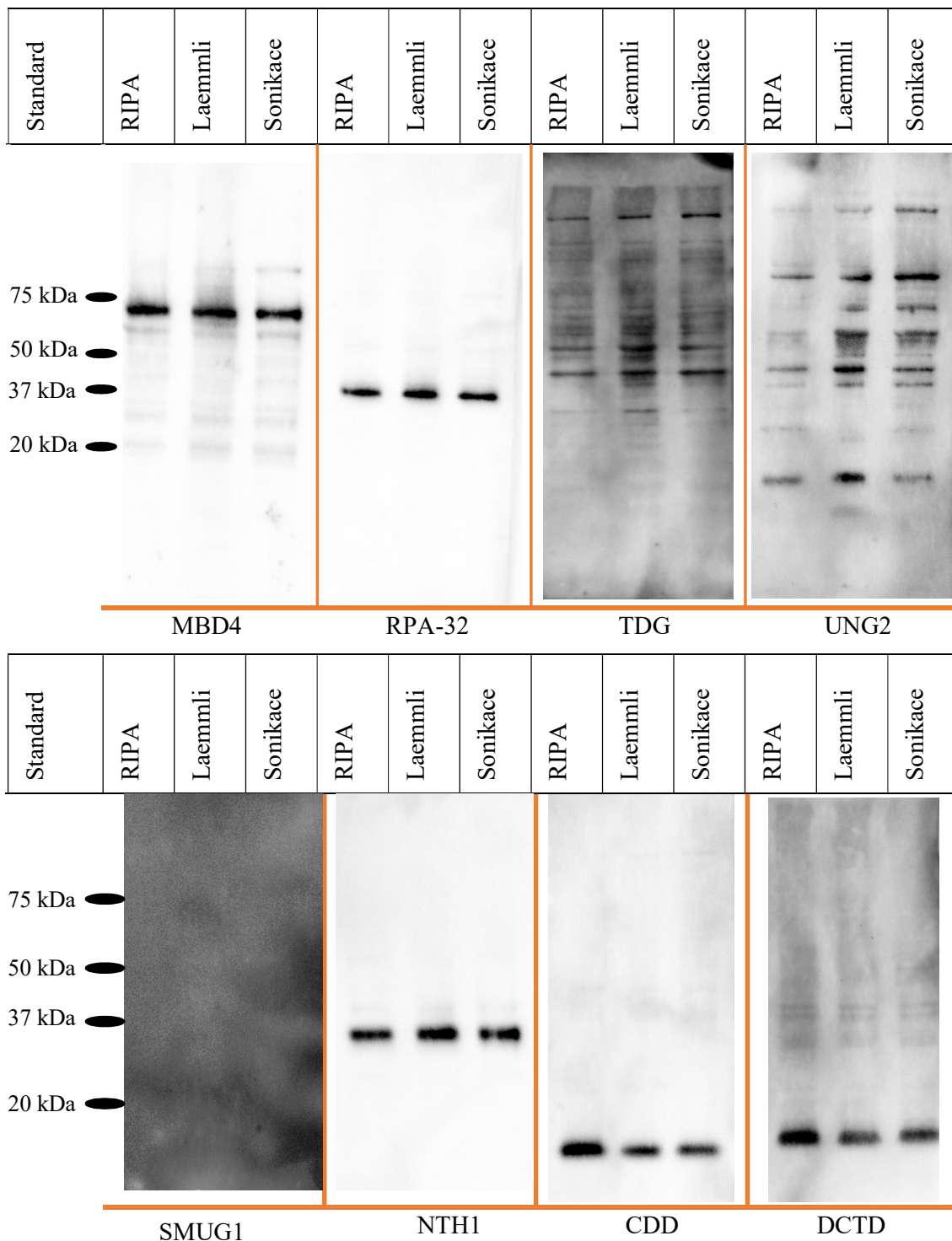
Obrázek 12: Western blot analýza proteinů MBD4, UNG2, TDG a SMUG1 v celobuněčných extraktech linií HeLa, NCI, 143 B, 143B TK a V79. Pro extrakci proteinů byl použit RIPA roztok. Standard relativních molekulových hmotností je společně pro všechny snímky vlevo.

Tabulka 8: Relativní intenzita signálu z western blot analýzy proteinů MBD4, UNG2, TDG a SMUG1 z obrázku 12 a dvou dalších opakování. „NA“ znamená nepřítomnost signálu v oblasti odpovídající molekulové hmotnosti detekovaného proteinu. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka.

Protein	Buněčná linie				
	HeLa	NCI	143 B	143B TK	V79
MBD4	1,00 \pm 0,00	0,20 \pm 0,07	0,22 \pm 0,03	0,24 \pm 0,07	0,14 \pm 0,08
UNG2	NA	NA	NA	NA	NA
TDG	NA	NA	NA	NA	NA
SMUG1	NA	NA	NA	NA	NA

Z obrázku 12 je patrné, že protilátkami proti UNG2, TDG a SMUG1 nebyly detekovány žádné proužky, které by odpovídaly detekovaným proteinům. Jednou z příčin mohla být interakce protilátek s proteiny mléka obsaženého v již zmíněných roztocích nebo nedostatečná extrakce jaderných proteinů. Pomocí protilátek proti proteinu MBD4 byly u všech linií detekovány proužky přibližně v oblasti odpovídající 70 kDa, což odpovídá velikosti proteinu MBD4 (předpokládaná velikost cca 70 kDa). Nejvyšší intenzita signálu byla detekována u buněčné linie HeLa, nejnižší pak u transformovaných plicních buněk křečka (V79). Relativně nízký poměr signál/pozadí zapříčinil zhoršenou analýzu těchto proužků. Z tohoto důvodu bylo testováno použití BSA namísto mléka a rovněž další protokoly založené na RIPA roztoku.

Kromě proteinů z obrázku 12 a proteinu RPA-32 byly v dalším experimentu analyzovány i proteiny NTH1, CDD a DCTD. Byly použity tyto způsoby přípravy celobuněčných extraktů: (i) pomocí samotného RIPA lyzačního roztoku; (ii) za použití RIPA roztoku s přídavkem Laemmliho pufru; (iii) pomocí RIPA roztoku s následnou sonikací. Na gel bylo nanášeno 10 µg proteinů. V případě vzorku s Laemmliho pufrům byla nanáška pouze orientační (objem vzorku byl stejný jako u vzorku připraveného pouze pomocí RIPA roztoku). Důvodem je přítomnost 2-merkaptoetanolu a bromfenolové modři, které interagují s BCA stanovením koncentrace proteinů. Pro blokování bylo použito BSA. Výsledek western blot analýzy je na obrázku 13. Relativní hodnoty intenzity signálu jsou uvedeny v tabulce 9. V případě výskytu mnohočetných výrazných proužků nebyla intenzita signálu určena.



Obrázek 13: Western blot analýza proteinů MBD4, RPA-32, TDG, UNG2, SMUG1, NTH1, CDD a DCTD buněčné linie HeLa, za použití rozdílných přístupů při přípravě celobuněčných extraktů: (i) použití pouze RIPA lyzačního roztoku (RIPA); (ii) za použití RIPA roztoku s přidavkem Laemmlího pufru (Laemmlí); (iii) za použití RIPA roztoku s následnou sonikací (sonikace). Vlevo je uvedena poloha proužků standardu.

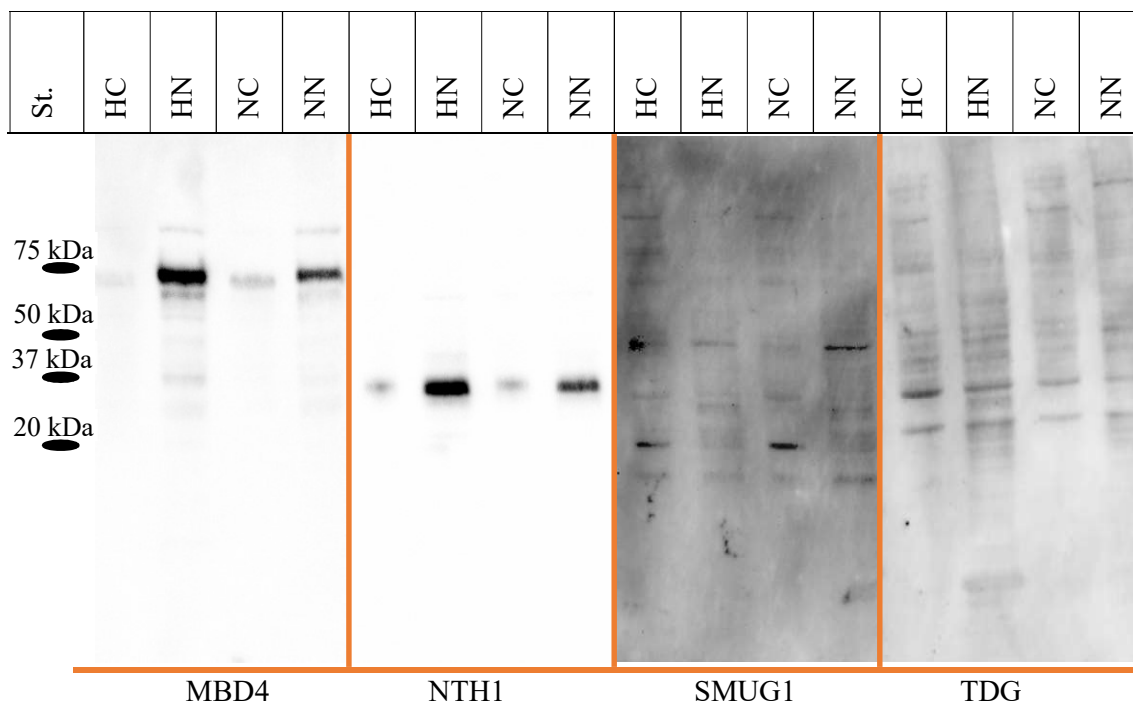
Tabulka 9: Normované relativní intenzity signálu z western blot analýzy proteinů MBD4, UNG2, TDG, SMUG1, RPA-32, NTH1, CDD a DCTD z obrázku 13. Příprava celobuněčných extraktů byla pomocí třech různých přístupů: (i) použití pouze RIPA lyzačního roztoku (RIPA); (ii) za použití RIPA roztoku s přidavkem Laemmliho pufru (Laemmli); (iii) za použití RIPA roztoku s následnou sonikací (sonikace). „NA“ znamená nemožnost identifikace proteinu na základě získaných dat. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Hodnota 1,00 = hodnota signálu za použití RIPA pufru.

Protein	Metoda		
	RIPA	Laemmli	Sonikace
MBD4	1,00 ± 0,00	1,25 ± 0,12	0,90 ± 0,07
RPA-32	1,00 ± 0,00	1,32 ± 0,09	1,10 ± 0,12
TDG	NA	NA	NA
UNG2	NA	NA	NA
SMUG1	NA	NA	NA
NTH1	1,00 ± 0,00	1,34 ± 0,10	1,18 ± 0,06
CDD	1,00 ± 0,00	0,50 ± 0,03	0,49 ± 0,09
DCTD	1,00 ± 0,00	0,70 ± 0,12	0,70 ± 0,04

Z obrázku 13 je patrné, že u proteinů MBD4 (předpokládaná velikost 70 kDa), RPA-32 (očekávaná velikost 32 kDa), NTH1 (očekávaná velikost 35 kDa), CDD (očekávaná velikost 18 kDa) a DCTD (předpokládaná velikost 20 kDa) byl detekován signál v oblasti membrány, která odpovídá jejich velikosti. Porovnání intenzity proužků jednotlivých proteinů je uvedeno v tabulce 9. U proteinů MBD4, RPA-32 a NTH1 byl nejvyšší signál u vzorků s Laemmliho pufrům. V porovnání s obrázkem 12 je kontrast detekovaných proužků u proteinu MBD4 výraznější, což je pravděpodobně důsledek použití BSA místo mléka. U proteinů CDD a DCTD byl nejvyšší signál ve vzorku při použití samotného RIPA lyzačního roztoku. Výrazný pokles signálu byl detekován ve zbylých dvou vzorcích. U proteinů TDG (očekávaná velikost 46 kDa) a UNG2 (s předpokládanou velikostí 35 kDa) byly detekovány mnohočetné proužky, což naznačuje nespecifickou vazbu protilátek. U proteinu SMUG1 (očekávaná velikost 30 kDa) nebyl detekován žádný proužek.

V následujícím experimentu byly použity cytoplazmatické a jaderné extrakty připravené pomocí kapalného dusíku nebo pomocí Douncerova homogenizátoru. Tyto extrakty jsou plně kompatibilní s analýzou DNA glykosylační aktivity. Byla provedena analýza proteinů MBD4, NTH1, SMUG1 a TDG za pomoci western blotu. Nanášeno bylo 5 µg proteinů (obrázek 14). Hodnoty relativní intenzity signálu jsou uvedeny v tabulce 10. Protilátka proti UNG2 nebyla testována, protože výsledky ukázaly, že snížení exprese této glykosylázy

založené na siRNA technologii nevedlo ke změně výšky signálu v odpovídající oblasti blotu (viz dále).



Obrázek 14: Western blot analýza proteinů MBD4, NTH1, TDG a SMUG1 buněčné linie HeLa za použití homogenizátoru (HC – cytoplasmatický extrakt, HN – jaderný extrakt) a za použití kapalného dusíku (NC – cytoplasmatický extrakt, NN – jaderný extrakt) k přípravě extraktů. Vlevo je uvedena poloha proužků standardu (St.).

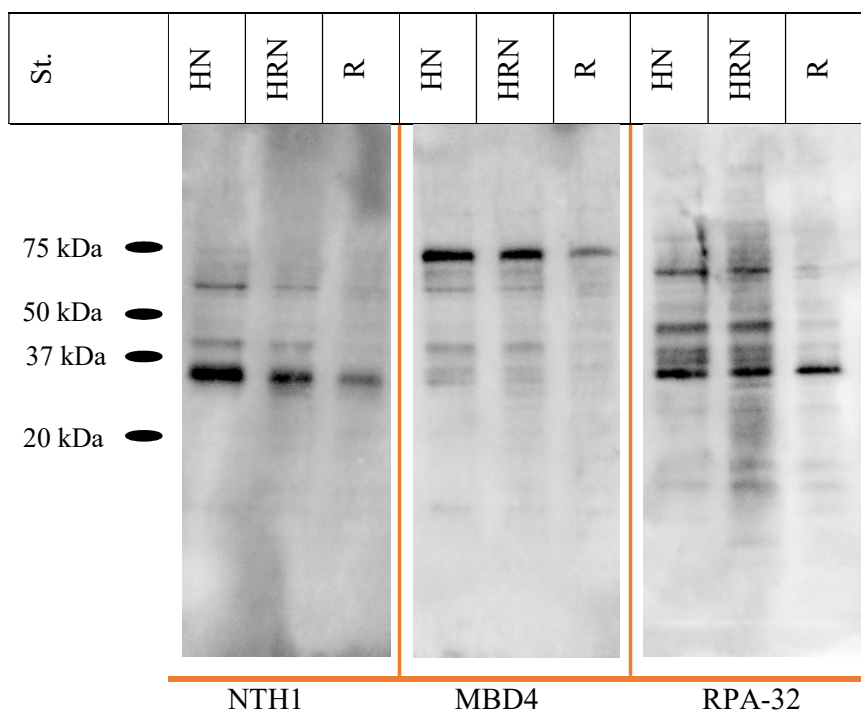
Tabulka 10: Normovaná relativní intenzita signálu z western blot analýzy proteinů MBD4, NTH1, SMUG1 a TDG z obrázku 14 a dalších dvou opakování. „NA“ znamená nepřítomnost signálu v oblasti blotu odpovídající molekulové hmotnosti detekovaného proteinu. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Hodnota 1,00 = hodnota signálu v jaderném extraktu za použití homogenizátoru.

Metoda	Extrakt			
	Homogenizátor		Zmrazování/rozmrazování	
	Cytoplasma	Jádro	Cytoplasma	Jádro
MBD4	0,03 \pm 0,01	1,00 \pm 0,00	0,09 \pm 0,02	0,38 \pm 0,06
NTH1	0,08 \pm 0,03	1,00 \pm 0,00	0,09 \pm 0,03	0,43 \pm 0,07
SMUG1	NA	NA	NA	NA
TDG	NA	NA	NA	NA

Z obrázku 14 je patrné, že pomocí protilátek proti MBD4 a NTH1 byl detekován nejsilnější signál v oblasti membrány, která odpovídala očekávané molekulové hmotnosti. U obou proteinů byl signál v jaderných extraktech výrazně vyšší než v cytoplasmatických

extraktech. Současně byl signál ve vzorcích připravených pomocí homogenizátoru vyšší než v případě zmrazování. Vyšší signál v jaderných extraktech pravděpodobně souvisel s jadernou lokalizací uvedených proteinů. Naopak protilátky proti TDG a SMUG1 reagovaly s celou řadou proteinů a neumožňovaly detekci proteinu TDG respektive SMUG1.

V následujícím experimentu byla western blot analýzou porovnávána extrakce vybraných DNA glykosyláz v jaderných a celobuněčných extraktech. Jaderné extrakty byly připraveny pomocí homogenizátoru a následně ovlivněny pufovaným roztokem o vysoké iontové síle nebo RIPA roztokem. Celobuněčné extrakty byly připraveny pomocí RIPA roztoku. Sledovány byly proteiny NTH1, MBD4 a RPA-32. Na gel bylo nanášeno 5 μ g proteinů. Výsledek western blot analýzy je na obrázku 15. Relativní hodnoty intenzity signálu jsou uvedeny v tabulce 11.



Obrázek 15: Western blot analýza proteinů MBD4, NTH1 a RPA-32 v jaderném extraktu buněčné linie HeLa připraveného za použití homogenizátoru a vysoké iontové síly (HN – jaderný extrakt), pomocí homogenizátoru a RIPA roztoku (HRN – jaderný extrakt) a v celobuněčném extraktu připraveného pomocí RIPA lyzačního roztoku (R – celobuněčný extrakt). Vlevo je uvedena poloha proužků standardu (St.).

Tabulka 11: Normovaná relativní intenzita signálu detekovaných proteinů MBD4, NTH1 a RPA-32 z obrázku 15 v jaderném a celobuněčném extraktu buněčné linie HeLa, za použití homogenizátoru a vysoké iontové síly, kombinace homogenizace pomocí homogenizátoru a RIPA roztoku a RIPA lyzačního roztoku. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze tří opakování \pm směrodatná odchylka. Hodnota 1,00 = hodnota signálu v jaderném extraktu za použití homogenizátoru a vysoké iontové síly.

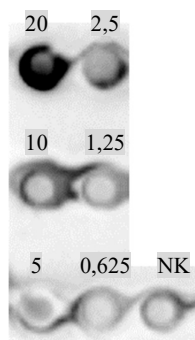
Metoda	Extrakt		
	Iontová síla	Kombinace	RIPA roztok
Protein	Jádro	Jádro	Celobuněčný
NTH1	1,00 \pm 0,00	0,52 \pm 0,02	0,24 \pm 0,06
MBD4	1,00 \pm 0,00	0,74 \pm 0,09	0,21 \pm 0,09
RPA-32	1,00 \pm 0,00	0,96 \pm 0,03	0,97 \pm 0,05

Z obrázku 15 a tabulky 11 je zřejmé, že nejvyšší intenzita signálu u proteinů NTH1 a MBD4 (jaderné proteiny) byla detekována v jaderných extraktech získaných pomocí homogenizátoru a vysoké iontové síly. Protein RPA-32 poskytl přibližně stejný signál ve všech extraktech. Všechny proteiny byly detekovány v oblasti očekávané molekulové hmotnosti.

Western blot analýza je relativně citlivá metoda. Pro abundantní proteiny jako jsou např. β -aktin nebo RPA-32 je tato metoda dostatečně citlivá. Nicméně v případě nízké exprimovaných proteinů poskytla tato metoda sníženou kvalitu detekce. Současně výsledky ukázaly, že přinejmenším u některých proteinů lze zvýšit poměr signál/pozadí použitím BSA místo mléka. Metoda je závislá na specifitě a afinitě použitých protilátek (viz obrázek 13 a 14). V tomto ohledu u testovaných proteinů SMUG1, TDG a UNG2 nebyl detekován žádný signál z důvodu nízké afinity protilátky nebo byl signál lokalizován ve více oblastech, což bylo pravděpodobně způsobeno nespecifickou vazbou protilátky. Současně výsledky ukázaly, že ze dvou testovaných technologií dovolujících získat cytoplazmatické a jaderné extrakty je pro testované DNA glykosylázy vhodnější technologie založená na použití homogenizátoru než na opakovaném zmrazování a rozmrazování. Obě technologie navíc nevyžadují použití denaturačních činidel, a tudíž představují vhodnou variantu pro studie zaměřené na enzymatickou aktivitu studovaných proteinů. Současně bylo zjevné, že v případě studia jaderných proteinů poskytují jaderné extrakty obecně vyšší signál než celobuněčné extrakty. Jedná se zřejmě o důsledek extrakce velkého množství různých proteinů v celobuněčných extraktech oproti jaderným extraktům, čímž při nanesení konstantního množství proteinu na gel dochází k zakoncentrování jaderných proteinů v jaderných extraktech. Proto celobuněčné extrakty nejsou vhodné k western blot analýze jaderných DNA glykosyláz.

5.3 Dot blot

Kromě western blotu byla testována i metoda dot blotu. Jedná se o metodu, která je méně časově náročná. Díky menším nanáškám protilátek a práci s menšími objemy roztoků je tato metoda rovněž levnější. Zařízení pro dot blot bylo pořízeno v průběhu bakalářské práce a v jejím průběhu optimalizováno. Jako zásadní se ukázalo dostatečné těsnění jamek. Pro utěsnění byl použit filtrační papír. Pro optimalizaci byla použita protilátka proti β -aktinu. Na obrázku 16 je výsledek dot blot analýzy buněčné linie HeLa. Byly použity celobuněčné extrakty připravené pomocí RIPA roztoku, které se lišily různým množstvím naneseného proteinu. Jednalo se o 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 nebo 20 μg proteinu. Vzorky byly ředěny roztokem TBSB. U negativní kontroly nebyl přidán vzorek. Pro utěsnění jamek byl použit jeden filtrační papír. Intenzita signálu byla měřena ve všech případech ve středové oblasti jamky o poloměru 1 mm (viz tabulka 12).



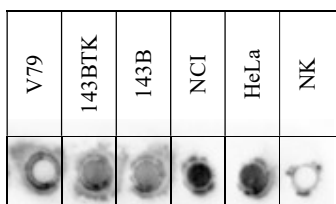
Obrázek 16: Dot blot analýza β -aktinu u buněčné linie HeLa za použití celobuněčných extraktů připravených pomocí RIPA roztoku. Číselné hodnoty odpovídají množství naneseného celkového proteinu v μg . Vzorek označený jako „NK“ neobsahoval vzorek (negativní kontrola). K utěsnění jamek byl použit jeden filtrační papír.

Tabulka 12: Relativní intenzita signálu β -aktinu detekovaná dot blot analýzou z obrázku 16 při různých množstvích naneseného proteinu. „NK“ = negativní kontrola. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Hodnota 1,00 = hodnota signálu v roztoku s 20 μg proteinu.

Nanáška [μg]	20	10	5	2,5	1,25	0,625	NK
Relativní intenzita signálu	1,00 \pm 0,00	0,27 \pm 0,02	0,26 \pm 0,04	0,30 \pm 0,05	0,24 \pm 0,05	0,23 \pm 0,03	0,24 \pm 0,04

Z obrázku 16 a tabulky 12 je zřejmé, že nejintenzivnější signál byl změřen u vzorku s 20 µg proteinu. V dalších vzorcích se velikost signálu pohybovala na úrovni negativní kontroly.

Z důvodu nedostatečné těsnosti jamek byly v následující analýze použity 3 filtrační papíry k utěsnění jamek. Byl analyzován protein RPA-32 v celobuněčných extraktech připravených pomocí RIPA lyzačního roztoku z buněčných linií HeLa, NCI, 143 B, 143B TK a V79. Bylo nanášeno 15 µg proteinu na jamku a objemy jednotlivých vzorků byly upraveny pomocí roztoku TBSB. Spolu se vzorky byla nanášena negativní kontrola bez vzorku. Výsledky jsou shrnuty na obrázku 17 a v tabulce 13. Intenzita signálu byla měřena ve všech případech ve středové oblasti jamky o poloměru 1 mm.



Obrázek 17: Dot blot analýza proteinu RPA-32 u buněčných linií HeLa, NCI, 143 B, 143B TK a V79 v celobuněčných extraktech připravených pomocí RIPA roztoku. „NK“ = negativní kontrola.

Tabulka 13: Relativní intenzita signálu proteinu RPA-32 z dot blot analýzy z obrázku 17. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Hodnota 1,00 = hodnota signálu v extraktu z buněčné linie NCI.

	V79	143B TK	143 B	NCI	HeLa	NK
Relativní intenzita signálu	0,15 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,24 ± 0,01	1,00 ± 0,00	0,94 ± 0,21	0,15 ± 0,01

V případě buněčné linie V79 byla hodnota detekovaného signálu stejná jako v případě negativní kontroly (0,11). Důvodem může být skutečnost, že se jedná o křeččí buňky, přičemž primární protilátka je namířena proti lidskému proteinu. Nejvyšší signál byl zjištěn u linie NCI. Druhý nevyšší signál vykazovala buněčná linie HeLa. Naopak nejslabší signál vykazovala linie 143 B a 143B TK (0,17 a 0,21). Podobný obsah proteinu RPA-32 u těchto dvou linií je v souladu s očekáváním. Jedná se totiž o rodičovskou linii (143 B) a dceřinou linii (143B TK), které se liší pouze přítomností virové tymidin kinázy. I přes mírné snížení úniku vzorků do sousedních jamek neustále docházelo k úniku vzorků a kontaminaci jamek sousedních. Další experimenty

ukázaly, že ani další zvýšení počtu filtračních papírů nevede ke snížení úniku vzorků. Jelikož použití dvou papírů poskytlo stejné výsledky jako 3 filtrační papíry, v dalších experimentech byly používány pro utěsnění dva filtrační papíry.

V následném experimentu byl detekován protein NTH1 v jaderných extraktech buněčné linie HeLa připravených pomocí homogenizátoru s následnou extrakcí jaderných proteinů roztokem s vysokou iontovou silou nebo RIPA lyzačním roztokem. Celobuněčné extrakty byly připraveny pomocí RIPA lyzačního roztoku. Roztoky byly naředěny na požadovaný objem pomocí roztoku TRB. Do jedné jamky nebyl nanesen vzorek. Tato jamka sloužila jako negativní kontrola. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14: Relativní intenzita signálu proteinu NTH1 buněčné linie HeLa z dot blot analýzy jaderných extraktů připravených pomocí homogenizace a vysoké iontové síly (HN) nebo pomocí homogenizace a RIPA roztokem (HRN) nebo v celobuněčných extraktech připravených RIPA lyzačním roztokem (R). „NK“ = negativní kontrola. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Hodnota 1,00 = hodnota signálu v jaderném extraktu za použití homogenizátoru a vysoké iontové síly.

Vzorek	NK	HN	HRN	R
Relativní intenzita signálu	0,90 \pm 0,12	1,00 \pm 0,00	0,89 \pm 0,7	0,88 \pm 0,9

Z tabulky 14 lze vidět, že nebyl detekován signifikantní signál. Signál detekovaný u všech vzorků byl přibližně stejný jako v kontrolním vzorku. Podobné výsledky poskytla analýza signálu u proteinu MBD4.

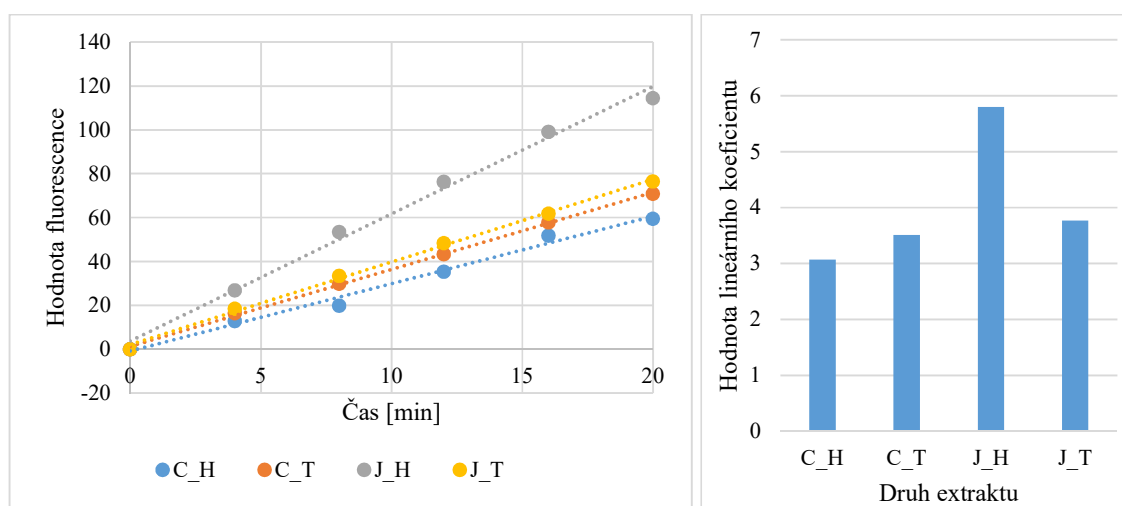
Použitím blotovací aparatury Scie-Plas docházelo ke vzájemné kontaminaci vzorků z důvodu nedostatečné těsnosti jamek. Vedle toho tato aparatura neumožňovala použití standardní multikanálové pipety, čímž byla omezena manipulace a docházelo k časovým prodlevám. Z výsledků je patrné, že technika dot blotu je daleko méně citlivá ve srovnání s western blotem a je nevhodná pro detekci DNA glykosyláz.

5.4 Studium DNA glykosylázové aktivity

V této části práce byla studována citlivost vyvíjené technologie pro stanovení aktivity uracilových DNA glykosyláz. Technologie je založena na dvojřetězcových oligonukleotidových sekvencích, které jsou ukotveny na magnetických částicích o průměru kolem 1 μ m. Tyto oligonukleotidy obsahují v jednom svém řetězci fluorochrom a ve druhém zhášeč fluorescence. Oligonukleotid s fluorochromem je ukotven pomocí biotinové kotvy

k magnetickým částicím prostřednictvím streptavidinu. Komplementární oligonukleotid se zhášecem fluorescence obsahuje místo tyminu uracil. V kontrolních experimentech byl použit oligonukleotid bez této modifikace. Po odštěpení uracilu DNA glykosylázami, dochází k destabilizaci párování oligonukleotidů a k oddálení fluorochromu od zhášecce. Nárůst fluorescence je tudíž přímo úměrný aktivitě DNA glykosyláz. V případě kontrolního experimentu s oligonukleotidem obsahujícím tymin nedochází k destabilizaci párování oligonukleotidů a tudíž ani k nárůstu fluorescence.

Pro přípravu extraktů byly použity dva přístupy: pomocí homogenizátoru a pomocí roztoku s Tritonem X-100. Protokol založený na použití Tritonu X-100 byl testován z důvodu jednoduchosti provedení. Navíc tento protokol nevyžadoval speciální vybavení. V grafu 1 je zobrazena závislost fluorescence na čase u takto připravených vzorků.

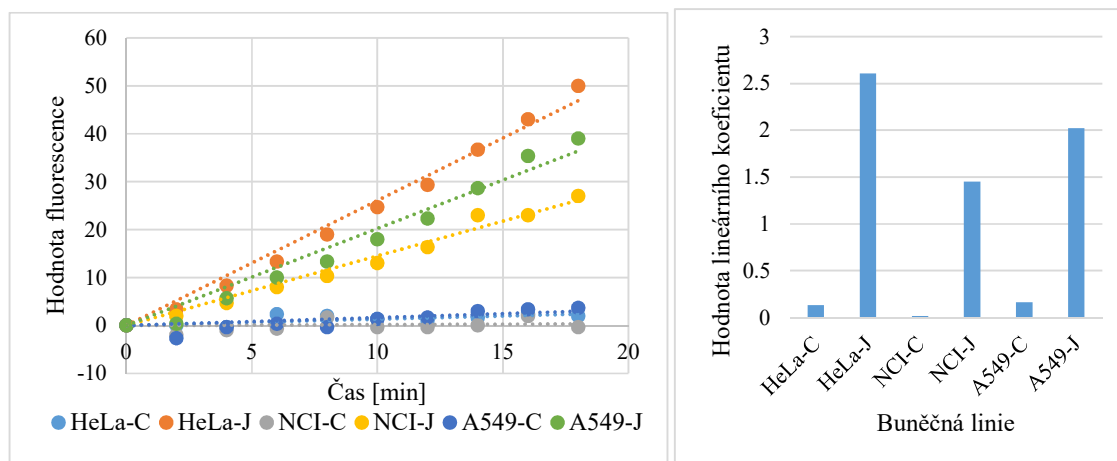


Graf 1: Příklad stanovení uracilové DNA glykosylační aktivity v cytoplasmatickém (C) a jaderném (J) extraktu buněčné linie HeLa za použití homogenizace pomocí homogenizátoru (H) nebo lyzačního roztoku s Tritonem X-100 (T). Hodnoty signálu v jednotlivých bodech grafu byly získány odečtením hodnoty signálu pro oligonukleotid obsahující tymin od hodnoty signálu pro oligonukleotid obsahující uracil.

Nejrychlejší růst fluorescence byl pozorován u jaderného extraktu připraveného pomocí homogenizátoru. Hodnota lineárního koeficientu byla rovna cca 5,8. V ostatních případech byly hodnoty lineárních koeficientů rovny nebo nižší než 3,8, a to včetně jaderného extraktu připraveného pomocí Tritonu X-100. Tyto výsledky potvrdily předpoklad, že přítomnost Tritonu X-100 může vést i přes vyšší obsah proteinů k inhibici glykosylázové aktivity. Navíc obdržené výsledky naznačily, že část v jádře vázaných DNA glykosyláz může být v případě použití Tritonu X-100 uvolněna do cytoplasmatické frakce. Experimenty provedené Dr. Kobernou dále ukázaly, že v případě, že se použijí extrakty připravené pomocí

opakovaného zamrazování/rozmrazování, je aktivita DNA glykosyláz rovněž výrazně nižší než v případě extraktů připravených pomocí homogenizátoru.

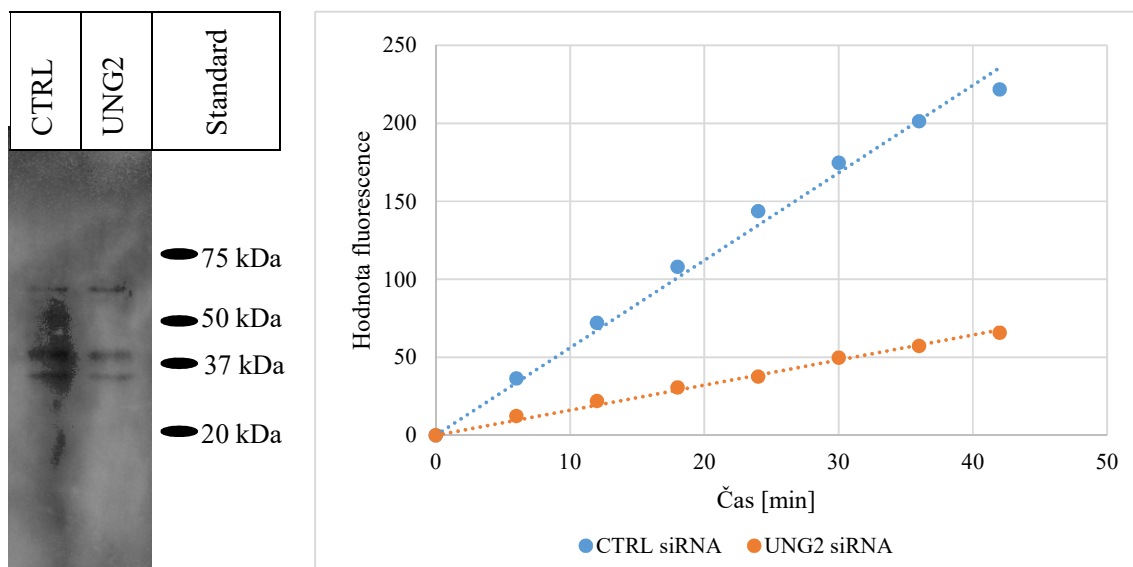
Další experimenty již byly prováděny pouze s extrakty, které byly připraveny pomocí homogenizátoru s následnou extrakcí jaderných proteinů pufovaným roztokem s vysokou iontovou silou. V grafu 2 je znázorněna rychlost nárůstu fluorescence v jaderných a cytoplasmatických extraktech z buněčných linií HeLa, NCI a A549.



Graf 2: Příklad stanovení uracilové DNA glykosylační aktivity v cytoplasmatickém (C) a jaderném (J) extraktu buněčných linií HeLa, NCI a A549. Hodnoty signálu v jednotlivých bodech grafu byly získány odečtením hodnoty signálu pro oligonukleotid obsahující tymin od hodnoty signálu pro oligonukleotid obsahující uracil.

Nejvyšší DNA glykosylázová aktivita byla zjištěna v jaderných extraktech buněčné linie HeLa, následovala linie A549 a nejnižší signál byl naměřen u buněčné linie NCI.

Technologie pro stanovení uracilové DNA glykosylační aktivity byla rovněž použita pro analýzu specifity protilátky namířené proti UNG2. V tomto experimentu byla provedena western blot analýza jaderných extraktů se sníženou expresí proteinu UNG2. Exprese byla snížena pomocí siRNA. Extrakty z ovlivněných a rovněž extrakty z neovlivněných buněk byly připraveny Dr. Ligasovou. Vzorky byly připraveny pomocí Douncerova homogenizátoru. Snížená exprese proteinu UNG2 byla ověřena stanovením uracil DNA glykosylázové aktivity. Na gel bylo naneseno 5 µg proteinů. Výsledky western blot analýzy i stanovení glykosylázové aktivity v extraktech jsou na obrázku 18.



Obrázek 18: Western blot analýza proteinu UNG2 buněčné linie HeLa v jaderných extraktech připravených homogenizací (vlevo, CTRL – kontrolní vzorky, UNG2 – vzorky se sníženou expresí UNG2) a graf s výsledky stanovení uracil DNA glykosylační aktivity v jaderných extraktech (vpravo).

Western blot analýza ukázala podobný signál jak v kontrolních, tak i experimentálních vzorcích se sníženou aktivitou UNG2. Tyto výsledky silně indikovaly, že tato protilátka poskytuje signál v nespecifických oblastech blotu.

Z výsledků je patrné, že aktivita DNA glykosyláz štěpících uracil je významně vyšší v jaderném extraktu. To plně odpovídá lokalizaci daných proteinů vzhledem k jejich funkci (jak je popisuje The UniProt Consortium, 2019). Současně je zjevné, že ačkoli extrakty připravené pomocí Tritonu X-100 obsahovaly vyšší koncentrace proteinů než extrakty připravené pomocí homogenizátoru (tabulka 7), naměřená aktivita uracilových DNA glykosyláz byla vyšší v případě použití homogenizátoru. Výsledky analýzy extraktů se sníženou expresí UNG2 navíc ukázaly, že použitá protilátka proti UNG2 neposkytuje specifické značení za použití western blotů.

6 Diskuze

Jedním z cílů experimentální části předkládané bakalářské práce byla optimalizace přípravy buněčných extraktů pro metodu western blotu. V rámci tohoto cíle došlo k optimalizaci přípravy extraktů pro detekci proteinů účastnících se bázové excizní opravy. Výsledky ukázaly, že optimální volbou pro přípravu buněčných extraktů je metoda založená na homogenizaci pomocí homogenizátoru, a to i přes okolnost, že další testované metody poskytly vyšší proteinové výtěžky. Všechny testované technologie, s výjimkou technologie založené na RIPA pufru, umožňovaly získat odděleně cytoplazmatické a jaderné proteiny. V případě použití technologie založené na přítomnosti neiontového detergentu Tritonu X-100 došlo ke snížení aktivity DNA glykosyláz. Tento efekt je pravděpodobně závislý na druhu analyzovaného proteinu. Perna *et al.* (2017) demonstrovali zvýšenou stabilitu i aktivitu lipázy v přítomnosti Tritonu. Výsledky bakalářské práce ukázaly, že přítomnost tohoto detergentu pravděpodobně vedla k částečné extrakci DNA glykosyláz z jaderné frakce a jejich přechodu do cytoplazmatické frakce. Proto tato technologie nebyla zahrnuta do analýzy extraktů pomocí western a dot blotů. Na druhou stranu tato technologie je rychlá a v případě jiných proteinů může představovat výhodnou variantu přípravy extraktů. Je však nutné pečlivé testování.

V případě použití cyklického zmrazování a rozmrazování pro přípravu cytoplazmatických a jaderných extraktů byl signál z western blot analýzy nižší než v extraktech připravených pomocí homogenizátoru. Nevýhodou této technologie je rovněž relativně vyšší časová náročnost a nutnost použití tekutého dusíku. Alternativou může být použití kombinace suchého ledu s etanolem, jak popisují Johnson *et Hecht* (1994). Nicméně opětovným zmrazováním a rozmrazováním může docházet k postupné degradaci proteinů (Cao *et al.*, 2003), což je v souladu s pozorováním nižší aktivity uracilových DNA glykosyláz v takto připravených extraktech ve srovnání s extrakty připravenými za pomoci homogenizátoru. Z hlediska materiálové náročnosti je nejjednodušší technologie založená na použití Tritonu X-100, která může být vhodnou alternativou v případech, kdy je vyžadována analýza cytoplazmatických proteinů nebo proteinů pevně vázaných v jaderné frakci. Homogenizační technika pomocí Dounceho homogenizátoru sice vyžaduje použití speciálního zařízení, nicméně je rychlá a nevyžaduje přítomnost denaturujících činidel, což umožňuje zachovat aktivitu enzymů (Griffin *et al.*, 2015). Navíc použitý homogenizátor je levný a extrahuje kromě intaktních jader také mitochondrie (Dounce, 1955). Tato technologie nejlépe z použitých metod separuje proteiny cytoplasmy od jaderných proteinů (spolu s proteiny mitochondrií, což nebylo v této práci ověřeno). Navíc nevyžaduje odstranění nežádoucích činidel před vlastním

stanovením DNA glykosylázové aktivity. Zachovaná aktivita uracilových DNA glykosyláz a dostatečná separace jaderných proteinů homogenizační technikou tak převažují nad nedostatečnou celkovou extrakcí proteinů. Cytoplasmatické extrakty obsahovaly ve všech případech výrazně vyšší koncentrace proteinů než jaderné extrakty. Jednalo se až o cca 10× vyšší koncentrace proteinů v cytoplasmatické frakci. Ačkoli celobuněčné extrakty získané pomocí RIPA lyzačního roztoku poskytly celkově vysoké výtěžky proteinů, z důvodu obsahu denaturačních složek nebylo možné tyto vzorky použít ke studiu DNA glykosylační aktivity (Abcam, 2019). Alternativu by mohla představovat extrakce jaderných proteinů pomocí centrifugace v hustotním gradientu sacharózy (Komatsu, 2006). Metoda je ale mnohem více časově a instrumentálně náročná než homogenizační technika. Navíc výsledky western blot analýzy prokázaly relativně spolehlivou separaci jaderných proteinů od proteinů cytoplasmatických. Nebyla však ověřena schopnost extrakce histonových proteinů, jak popisuje Komatsu (2006).

V průběhu optimalizace podmínek western blot analýzy bylo zjištěno, že pro detekci většiny studovaných proteinů je výhodné použít pro blokování membrány namísto mléka BSA. Stejně tak uvádí Yang *et* Mahmood (2012). Použití BSA vedlo ke zvýšení poměru mezi signálem a pozadím. Použité protilátky spolehlivě detekovaly proteiny β -aktin, RPA-32, MBD4, NTH1, CDD a DCTD. U proteinů SMUG1, TDG a UNG2 nebyl detekován žádný signál z důvodu nízké afinity protilátky nebo byl signál lokalizován ve více oblastech, což bylo zjevně způsobeno nespecifickou vazbou protilátky (Bio-Rad, 2019b). Současně bylo patrné, že pro analýzu testovaných DNA glykosyláz pomocí western blotu je výhodnější použít jaderné extrakty. Díky jejich převážně jaderné lokalizaci (jak popisuje The UniProt Consortium, 2019) se jedná o očekávaný výsledek. Domena *et* Mosbaugh (1985) ukázali, že některé DNA glykosylázy se vyskytují také v mitochondriích. Ačkoli mitochondriální formy mohou přispívat k nesprávným výsledkům měření glykosylační aktivity, byl jejich vliv snížen přípravou jaderných extraktů.

Vedle toho bylo porovnáno použití dot blotu pro uvedené detekce s použitím western blotu. Výsledky ukázaly, že tato metoda umožňuje analyzovat proteiny, které se v buňkách vyskytují ve vysokém počtu kopií. Příkladem je protein RPA-32. Pro méně početné proteiny, jako je např. NTH1, tato metoda není vhodná. Použitá komerční aparatura navíc nedovolovala dostatečně utěsnit jednotlivé jamky. V tomto ohledu i Saint-Jean *et al.* (2003) uvádějí, že metoda dot blotů je relativně levná, časově nenáročná, ovšem ve srovnání s jinými metodami není příliš citlivá. Dalším problémem techniky dot blotů je nutnost použití vysoce specifických

protilátek, a proto je pro spolehlivé vyhodnocení výsledků dot blotu nevyhnutelné znát specifitu protilátek (Renart *et al.*, 1996).

Jako poslední byla testována nově vyvinutá metoda pro stanovení DNA glykosylační aktivity uracilových DNA glykosyláz. Jedná se o metodu založenou na dvojřetězcových oligonukleotidech nesoucí v jednom řetězci fluorescenční molekulu a ve druhém zhášecí fluorescence. Využití oligonukleotidových sond pro stanovení DNA glykosylázové aktivity popsali Maksimenko *et al.* (2004). Popsaná metoda byla založena na jednořetězcové DNA (ssDNA) nesoucí na jednom konci fluorescenční molekulu a na druhém zhášecí fluorescence. Díky vhodnému sekvenčnímu uspořádání molekula ssDNA vytváří smyčku a krátký dvojřetězcový párující úsek na jehož koncích se do těsné blízkosti dostává fluorescenční molekula a zhášecí fluorescence. To vede k potlačení fluorescence fluorochromu. V párující oblasti je obsaženo několik uracilů. V přítomnosti aktivní uracilové DNA glykosylázy dochází k odštěpení uracilů a destabilizaci párujících oblastí, k oddálení fluorochromu od zhášecí a postupnému nárůstu fluorescence. Tato metoda je vhodná pro stanovení uracilové DNA glykosylační aktivity v jednoduchých směsích obsahující analyzovanou glykosylázu, ovšem je zcela nevhodná pro jaderné extrakty připravené pomocí homogenizátoru (Koberna *et al.*, nepublikované výsledky).

Nově vyvinutá metoda pracuje s magnetickými částicemi, na kterých je ukotven krátký dvojřetězcový oligonukleotid. Ten obsahuje na sousedících koncích molekulu fluorochromu a zhášecí fluorescence. V řetězci je současně obsažen jeden uracil. Obecně je možné použít i více uracilů nebo jiný modifikovaný nukleotid. V přítomnosti aktivní uracilové DNA glykosylázy dochází k odštěpení uracilu, disociaci řetězců oligonukleotidu a nárůstu fluorescence. Metoda byla použita pro analýzu uracilových DNA glykosyláz v jaderných a cytoplazmatických extraktech. Tato metoda jasně ukázala, že v jádrech je daleko vyšší aktivita uracilových DNA glykosyláz než v cytoplazmě.

Ve srovnání s western blot metodou je testovaná, nově vyvinutá metoda mnohem méně časově náročná. Samotná příprava magnetických částic vyžaduje přibližně 30–60 minut a analýza aktivity dalších 30–60 minut včetně měření. Analýza pomocí western blotu vyžaduje přibližně 30 hodin. I když existují protokoly na provedení western blot analýzy bez elektroseparačního kroku za 1 hodinu (jak uvádí např. GenScript, 2019 na svých stránkách), stále je nově vyvinutá metoda stejně rychlá nebo i rychlejší. Spotřeba vzorku u nově vyvinuté metody činila 100 ng proteinů, spotřeba u western blot analýzy činila 5 µg, což je 50× více. Nově vyvinutá metoda je tedy výrazně citlivější a to i přes fakt, že nově vyvinutá technologie stanovuje celkovou uracilovou DNA glykosylační aktivitu. Ta je totiž podle různých zdrojů

pravděpodobně dominantně zajišťována pomocí UNG2 (Nilsen *et al.*, 2000). V případě potřeby je možné inhibovat aktivitu vybraných glykosyláz pomocí specifických metod a zjistit celkový příspěvek vybrané DNA glykosylázy k této aktivitě. Vhodnou záměnou uracilu je možné tuto technologii rovněž přizpůsobit pro potřeby analýzy jiných glykosyláz. Každopádně western blot analýza a nově vyvinutá technologie poskytují odlišná data, která se mohou vzájemně doplňovat, avšak nikoli vzájemně nahrazovat. Příkladem vhodné kombinace zmíněných metod je analýza specificity protilátky namířené proti UNG2. Ačkoli tato protilátka detekuje na western blotu několik oblastí včetně oblasti možného výskytu UNG2, výsledky ukázaly, že protilátka proti UNG2 není dostatečně specifická. V případě snížené exprese UNG2 pomocí specifické siRNA došlo k dramatickému poklesu uracilové DNA glykosylační aktivity v jaderném extraktu, avšak nikoli ke změně intenzity signálu poskytovaném použitou protilátkou na western blotu.

7 Závěr

Předkládaná bakalářská práce obsahuje dvě základní části: teoretickou a praktickou část.

V rámci teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše zabývající se western blotem, jeho modifikací - dot blotem a metodou ELISA. Tato část rovněž zahrnuje přehled současných znalostí o postavení bázové excisní opravě v opravných systémech buňky a jejich vzájemné srovnání.

V praktické části byla optimalizována technika pro přípravu buněčných extraktů k následné analýze uracilových DNA glykosyláz pomocí metody western blotu a nově vyvinuté metody, která umožňuje stanovit jejich aktivitu. Získaná data mimo jiné ukázala, že optimálním přístupem je detekce těchto proteinů v jaderných extraktech buněk připravených pomocí Douncerova homogenizátoru.

Současně byla optimalizována metoda western blotu pro analýzu proteinů bázové excisní opravy. Vedle western blotu byla testována metoda dot blotu pro analýzu uracilových DNA glykosyláz. Výsledky ukázaly, že tato technika není vhodná pro tento typ proteinů, pravděpodobně z důvodu jejich nízké exprese.

Součástí bakalářské práce bylo i testování nově vyvinuté metody pro analýzu uracilové DNA glykosylázové aktivity. Obdržené výsledky ukázaly, že se jedná o velice rychlou technologii vhodnou i pro rozsáhlá testování mnoha vzorků. Výsledky je možné získat v průběhu 2 hodin a citlivost je přibližně 50× vyšší, než je citlivost western blotu.

8 Literatura

- Abcam. (2019). *Tissue and cell preparation for ELISAs and activity assays*. | [online] [navštíveno 10.5.2019]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/protocols/tissue-and-cell-preparation-for-elisas-and-cellular-assays>.
- Arndt, C., Koristka, S., Bartsch, H., et Bachmann, M. (2012). Native Polyacrylamide Gels. In B. T. Kurien et R. H. Scofield (Ed.), *Protein Electrophoresis* (Roč. 869, s. 49–53).
- Aspinwall, R., Rothwell, D. G., Roldan-Arjona, T., Anselmino, C., Ward, C. J., Cheadle, J. P., Sampson, J. R., Lindahl, T., Harris, P. C., et Hickson, I. D. (1997). Cloning and characterization of a functional human homolog of Escherichia coli endonuclease III. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(1), 109–114.
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15.
- Barnes, D. E., et Lindahl, T. (2004). Repair and Genetic Consequences of Endogenous DNA Base Damage in Mammalian Cells. *Annual Review of Genetics*, 38(1), 445–476.
- Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., et Atherton, P. J. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 27(1), 4–25.
- Bio-Rad. (2019a). *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. [online] [navštíveno 10.4.2019]. Dostupné z: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf.
- Bio-Rad. (2019b). *Western Blot Troubleshooting: Unusual or Unexpected Bands*. | [online] [navštíveno 9.5.2019]. Dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/western-blot-unusual-unexpected-bands-western-blotting.html>.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brissett, N. C., et Doherty, A. J. (2009). Repairing DNA double-strand breaks by the prokaryotic non-homologous end-joining pathway. *Biochemical Society Transactions*, 37(3), 539–545.
- Cao, E., Chen, Y., Cui, Z., et Foster, P. R. (2003). Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(6), 684–690.
- Castle, J. D. (2001). Overview of cell fractionation. *Current Protocols in Cell Biology*, Chapter 3, Unit 3.1.
- Cox, M. M. (2001). Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Annual Review of Genetics*, 35, 53–82.
- Crowther, J. R. (2009). *The ELISA Guidebook*.
- Daniels, D. S., Mol, C. D., Arvai, A. S., Kanugula, S., Pegg, A. E., et Tainer, J. A. (2000). Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding. *The EMBO Journal*, 19(7), 1719–1730.
- Desjardins, P., Hansen, J. B., et Allen, M. (2009). Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop 2000c spectrophotometer. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (33).
- Domena, J. D., et Mosbaugh, D. W. (1985). Purification of nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylase from rat liver. Identification of two distinct subcellular forms. *Biochemistry*, 24(25), 7320–7328.

- Dounce, A. L. (1955). A method for isolating intact mitochondria and nuclei from the same homogenate, and the influence of mitochondrial destruction on the properties of cell nuclei. *The Journal of Cell Biology*, 1(2), 139–153.
- Emmanouil, C. (2011). *Base Excision Repair Pathways*. INTECH Open Access Publisher.
- Fedeles, B. I., Singh, V., Delaney, J. C., Li, D., et Essigmann, J. M. (2015). The AlkB Family of Fe(II)/ α -Ketoglutarate-dependent Dioxygenases: Repairing Nucleic Acid Alkylation Damage and Beyond. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(34), 20734–20742.
- Fukui, K. (2010). DNA Mismatch Repair in Eukaryotes and Bacteria. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, 1–16.
- GE Healthcare Life Sciences. (2014). *Western blotting. Principles and methods*. 28-9998-97. *GE Healthcare Handbooks*. 192.
- GenScript. (2019). *GenScript*. | [online] [navštíveno 25. 4. 2019] Dostupné z: https://www.genscript.com/western_tech.html.
- Grabski, A. C. (2009). Advances in preparation of biological extracts for protein purification. *Methods in Enzymology*, 463, 285–303.
- Griffin, P., Sexton, A., Macneill, L., Iizuka, Y., Lee, M. K., et Bazzaro, M. (2015). Method for Measuring the Activity of Deubiquitinating Enzymes in Cell Lines and Tissue Samples. *Journal of Visualized Experiments*, (99), 52784.
- Grin, I. R., Dianov, G. L., et Zharkov, D. O. (2010). The role of mammalian NEIL1 protein in the repair of 8-oxo-7,8-dihydroadenine in DNA. *FEBS Letters*, 584(8), 1553–1557.
- Hakem, R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *The EMBO Journal*, 27(4), 589–605.
- Harlow E., et Lane E. (1988). Immunoprecipitation. In *Antibodies: a laboratory manual* (s. 231). New York.

- Heidebrecht, F., Heidebrecht, A., Schulz, I., Behrens, S.-E., et Bader, A. (2009). Improved semiquantitative Western blot technique with increased quantification range. *Journal of Immunological Methods*, 345(1–2), 40–48.
- Holden, P., et Horton, W. A. (2009). Crude subcellular fractionation of cultured mammalian cell lines. *BMC Research Notes*, 2, 243.
- Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N., et Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(8), 495–506.
- Chen, R., et Wold, M. S. (2014). Replication protein A: Single-stranded DNA's first responder. *BioEssays*, 36(12), 1156–1161.
- Jensen, E. C. (2012). The Basics of Western Blotting. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 295(3), 369–371.
- Johnson, B. H., et Hecht, M. H. (1994). Recombinant proteins can be isolated from E. coli cells by repeated cycles of freezing and thawing. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, 12(13), 1357–1360.
- Kanugula, S., et Pegg, A. E. (2003). Alkylation damage repair protein O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase from the hyperthermophiles *Aquifex aeolicus* and *Archaeoglobus fulgidus*. *Biochemical Journal*, 375(Pt 2), 449–455.
- Kisker, C., Kuper, J., et Van Houten, B. (2013). Prokaryotic Nucleotide Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), a012591–a012591.
- Komatsu, S. (2006). Extraction of Nuclear Proteins. In M. Valerie, D. Catherine, Z. Michel, et T. Hervé, *Plant Proteomics* (Roč. 355, s. 73–78).
- Kow, Y. W. (1994). Base Excision Repair in E. Coli? An Overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 726(1 DNA Damage), 178–180.

- Krohn, R. I. (2002). The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. *Current Protocols in Cell Biology*, 15(1), A.3H.1-A.3H.28.
- Krokan, H. E., et Bjørås, M. (2013). Base Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4).
- Kunz, C., Saito, Y., et Schär, P. (2009). DNA Repair in Mammalian Cells: Mismatched repair: variations on a theme. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), 1021–1038.
- Kurien, B., et Scofield, R. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283–293.
- Kurien, B. T., Dorri, Y., Dillon, S., Dsouza, A., et Scofield, R. H. (2011). An overview of Western blotting for determining antibody specificities for immunohistochemistry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 717, 55–67.
- Laing, W., et Christeller, J. (2004). Extraction of proteins from plant tissues. *Current Protocols in Protein Science, Chapter 4, Unit 4.7*.
- Liu, D., Keijzers, G., et Rasmussen, L. J. (2017). DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 773, 174–187.
- Lovrien, R., et Matulis, D. (2001). Assays for Total Protein. In *Current Protocols in Protein Science*.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., et Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Maksimenko, A., Ishchenko, A. A., Sanz, G., Laval, J., Elder, R. H., et Saparbaev, M. K. (2004). A molecular beacon assay for measuring base excision repair activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(1), 240–246.
- Negritto, M. C. (2010). Repairing Double-Strand DNA Breaks. *Nature Education*, 3(9), 26.
- Ni, D., Xu, P., et Gallagher, S. (2016). Immunoblotting and Immunodetection: Immunoblotting and Immunodetection. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D.

- D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, et K. Struhl (Ed.), *Current Protocols in Molecular Biology* (s. 10.8.1-10.8.37).
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1008s114>
- Nilsen, H., Rosewell, I., Robins, P., Skjelbred, C. F., Andersen, S., Slupphaug, G., Daly, G., Krokan, H. E., Lindahl, T., et Barnes, D. E. (2000). Uracil-DNA Glycosylase (UNG) - Deficient Mice Reveal a Primary Role of the Enzyme during DNA Replication. *Molecular Cell*, 5(6), 1059–1065.
- O’Kennedy, R., Byrne, M., O’Fagain, C., et Berns, G. (1990). Experimental section. *Biochemical Education*, 18(3), 136–140.
- Osmekhina, E., Neubauer, A., Klinzing, K., Myllyharju, J., et Neubauer, P. (2010). Sandwich ELISA for quantitative detection of human collagen prolyl 4-hydroxylase. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 48.
- Pegg, A. E., Dolan, M. E., et Moschel, R. C. (1995). Structure, Function, and Inhibition of O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Roč. 51, s. 167–223).
- Perna, R. F., Tiosso, P. C., Sgobi, L. M., Vieira, A. M. S., Vieira, M. F., Tardioli, P. W., Soares, C. M. F., et Zanin, G. M. (2017). Effects of Triton X-100 and PEG on the Catalytic Properties and Thermal Stability of Lipase from Free and Immobilized on Glyoxyl-Agarose. *The Open Biochemistry Journal*, 11(1), 66–76.
- Peterson, G. L. (1983). Determination of total protein. *Methods in Enzymology*, 91, 95–119.
- Prakash, S., et Prakash, L. (2000). Nucleotide excision repair in yeast. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 451(1–2), 13–24.
- Prasad, S., Thraves, P., Kanai, Y., Smulson, M., et Dritschilo, A. (1989). A dot-blot method for screening polyclonal and monoclonal antisera to poly(ADP-ribose). *Journal of Immunological Methods*, 116(1), 79–85.

- Renart, J., Behrens, M. M., Fernández-Renart, M., et Martinez, J. L. (1996).
IMMUNOBLOTTING TECHNIQUES. In *Immunoassay* (s. 537–554).
- Rosenberg, I. M. (2005). *Protein analysis and purification: benchtop techniques* (2nd ed).
Boston: Birkhäuser.
- Saint-Jean, S. R., Borrego, J. J., et Perez-Prieto, S. I. (2003). Infectious Pancreatic Necrosis
Virus: Biology, Pathogenesis, and Diagnostic Methods. In *Advances in Virus
Research* (Roč. 62, s. 113–165).
- Sancar, A. (2003). Structure and Function of DNA Photolyase and Cryptochrome Blue-Light
Photoreceptors. *Chemical Reviews*, 103(6), 2203–2238.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kaçmaz, K., et Linn, S. (2004). Molecular
mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual
Review of Biochemistry*, 73, 39–85.
- Sancar, A., et Reardon, J. T. (2004). Nucleotide Excision Repair in E. Coli and Man. In *DNA
Repair and Replication: Roč. 69. Advances in Protein Chemistry* (s. 43–71).
- Sancar, G. B. (1990). DNA photolyases: Physical properties, action mechanism, and roles in
dark repair. *Mutation Research/DNA Repair*, 236(2–3), 147–160.
- Sedgwick, B., Bates, P., Paik, J., Jacobs, S., et Lindahl, T. (2007). Repair of alkylated DNA:
Recent advances. *DNA Repair*, 6(4), 429–442.
- Shah, K., et Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the
basics. *British Journal of Hospital Medicine*, 77(7), C98–C101.
- Schormann, N., Ricciardi, R., et Chattopadhyay, D. (2014). Uracil-DNA glycosylases-
Structural and functional perspectives on an essential family of DNA repair enzymes:
Uracil-DNA Glycosylases. *Protein Science*, 23(12), 1667–1685.
- Smith, B. J. (1984). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In J. M. Walker,
Proteins (Roč. 1, s. 41–56).

- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., et Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85.
- Stoll, V. S., et Blanchard, J. S. (2009). Buffers: principles and practice. *Methods in Enzymology*, 463, 43–56.
- Storici, F. (2011). *DNA Repair - On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors*.
- Surendran, S., Mathai, A., et Radhakrishnan, V. V. (2015). Dot-Immunobinding Assay (Dot-Iba). In B. T. Kurien et R. H. Scofield (Ed.), *Western Blotting* (Roč. 1312, s. 105–108).
- Thacker, J. (2011). Homologous Recombination Repair. In M. Schwab (Ed.), *Encyclopedia of Cancer* (s. 1725–1729).
- The UniProt Consortium. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D506–D515.
- Thermo Fisher Scientific. (2012). *Protein assay compatibility table* | [online] [navštíveno 27. 10. 2018]. Dostupné z: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0068-Protein-assay-compatibility.pdf>.
- Towbin, H., Staehelin, T., et Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354.
- Weber, K., et Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(16), 4406–4412.

Whitaker, A. M., Schaich, M. A., Smith, M. R., Flynn, T. S., *et* Freudenthal, B. D. (2017).

Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 22, 1493–1522.

Yang, P.-C., *et* Mahmood, T. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting.

North American Journal of Medical Sciences, 4(9), 429.

Yi, C., *et* He, C. (2013). DNA Repair by Reversal of DNA Damage. *Cold Spring Harbor*

Perspectives in Biology, 5(1).

Yonan, C. R., Duong, P. T., *et* Chang, F. N. (2005). High-efficiency staining of proteins on

different blot membranes. *Analytical Biochemistry*, 338(1), 159–161.

Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S. H., *et* Prives, C. (2001). A role for p53 in base excision repair.

The EMBO Journal, 20(4), 914–923.