

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Katedra biochemie



Studijní program: Biochemie

Lucia Soláriková

Zapojení receptorů spřažených s G proteiny v regulaci odpovědi na poškození DNA

The involvement of G protein-coupled receptors in the regulation of DNA damage response

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Konzultanti: RNDr. Zdeňka Drastichová, Ph.D., Mgr. Radek Indra, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

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

V Praze dne

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc.. Také bych ráda poděkovala mé konzultace RNDr. Zdeňce Drastichové, Ph.D. za pomoc při praktických experimentech v laboratoři a taky za oporu a cenné rady při psaní práce. V neposlední řadě chci poděkovat mému příteli, bez kterého bych tuto práci nese-psala a taky mé rodině, která mě podporovala v průběhu celého studia.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá úlohou receptorů spřažených s G proteiny (GPCR) v regulaci reakce na poškození DNA (DDR). DNA je neustále vystavena působení různých faktorů, které ji mohou poškodit, a účinná oprava tohoto poškození je klíčová pro zachování buněčné integrity a prevenci mutací, které mohou vést ke vzniku rakoviny. GPCR jsou velkou rodinou receptorů na povrchu buněk, které regulují řadu fyziologických procesů prostřednictvím signalizace zprostředkované G proteiny. Tato práce zkoumá, jak může aktivace TRH receptoru (TRH-R), který patří mezi GPCR, ovlivnit proces opravy DNA a jaké jsou potenciální mechanismy, kterými mohou tyto receptory modulovat DDR.

V praktické části této bakalářské práce jsme se zaměřili na komplexy proteinu 53bp1 s jeho vazebnými partnery (především MDC1 a NBS1) po aktivaci TRH receptorů a sníženého množství β -arrestinu 2. Pro tento cíl bylo nezbytné optimalizovat postupy frakcionace a imunoprecipitace a ověřit účinnost transfekce pomocí siRNA proti β -arrestinu 2. Stanovených cílů jsme dosáhli použitím různých biochemických a molekulárně-biologických metod. Při frakcionaci nám jako kontrola účinnosti rozdělení buněčných kompartmentů sloužila detekce proteinů pomocí 1D-elektroforézy a imunoblotu. Protein-proteinové interakce byly sledovány pomocí metod jako ko-immunoprecipitace a imunoblot.

V této práci jsme úspěšně získali jadernou frakci z GH1 buněk, optimalizovali podmínky imunoprecipitace a ověřili účinnost transfekce pomocí siRNA proti β -arrestinu 2. Byly sledovány interakce 53bp1 s MDC1 a NBS1 a interakce mezi NBS1 a MDC1. Byl identifikován komplex 53bp1 s MDC1 a komplex NBS1 s MDC1, což naznačuje, že protein MDC1 tvoří s 53bp1 a NBS1 dva oddělené komplexy. Zvýšený imunesignál byl detekován po působení TRH jak v kontrolních, tak i transfekovaných buňkách. Podobný účinek byl sledován po působení taltirelinu pouze v kontrolních buňkách. Aktivace TRH receptoru by tedy za určitých podmínek mohla hrát roli v reakci na poškození DNA. Avšak změna ve fosforylaci H2AX po ovlivnění taltirelinem nebyla pozorována. Budoucí výzkum by se mohl zaměřit na pozorování účinku ligandů TRH receptoru při různém buněčném množství β -arrestinu 2 na fosforylaci H2AX. Pro detekci komplexů proteinu 53bp1 by mohla být použita metoda imunofluorescence pro potvrzení získaných výsledků. Tyto nové poznatky by mohly vyjasnit, zda aktivace TRH receptoru může ovlivnit odpověď na poškození DNA a její opravu.

Klíčová slova

GPCR, β -arrestin 2, oprava poškození DNA, 53bp1

Abstract

This thesis focuses on the role of G protein coupled receptors (GPCRs) in the regulation of the DNA damage response (DDR). DNA is constantly exposed to various factors that can damage it, and effective repair of this damage is crucial for maintaining cellular integrity and preventing mutations that can lead to cancer. GPCRs are a large family of cell surface receptors that regulate a variety of physiological processes through G protein-mediated signaling. This work investigates how activation of the TRH receptor (TRH-R), a member of the GPCR family, can affect the DNA repair process and the potential mechanisms by which these receptors can modulate DDR.

In the practical part of this thesis, we focused on the complexes formed by the 53bp1 protein with its binding partners (mainly MDC1 and NBS1) upon activation of TRH receptors and reduced amounts of β -arrestin 2. For this goal, it was necessary to optimize the procedures of fractionation and immunoprecipitation and to verify the efficiency of transfection using siRNA against β -arrestin 2. We achieved the set goals by using various biochemical and molecular biological methods. During fractionation, the detection of proteins using 1D-electrophoresis and immunoblotting served us as a check for the efficient division of cell compartments. Protein-protein interactions were monitored using methods such as co-immunoprecipitation and immunoblot.

In this work, we successfully obtained the nuclear fraction from GH1 cells, optimized the immunoprecipitation conditions and also verified the transfection efficiency using siRNA against β -arrestin 2. The interactions of 53bp1 with MDC1 and NBS1 and the interactions between MDC1 and NBS1 were identified, suggesting that the MDC1 protein forms two separate complexes with 53bp1 and NBS. An increased immunosignal was detected upon TRH treatment in both control and transfected cells. A similar effects was observed after treatment with taltirelin only in control cells. Thus, TRH receptor activation under certain conditions could play a role in the DNA damage response. However, a change in H2AX phosphorylation after treatment with taltirelin was not observed. Future research could focus on observing the effect of TRH receptor ligands at different cellular amounts of β -arrestin 2 on H2AX phosphorylation. For the detection of 53bp1 protein complexes, the immunofluorescence method could be used to confirm the obtained results. These new findings could clarify whether TRH receptor activation can influence the DNA damage response and repair.

Keywords

GPCR, β -arrestin 2, DNA damage repair, 53bp1

Obsah

1. Úvod	11
2. Literární přehled	12
2.1. Receptory spřažené s G proteiny	12
2.1.1. Aktivační mechanismy univerzálního signálního proteinu	13
2.1.2. Dělení GPCR	14
2.1.3. Tyroliberinový receptor (TRH receptor).....	14
2.2. G proteiny	14
2.2.1. Signalizační dráhy	15
2.2.2. Aktivace receptorů a signálních drah	16
2.2.3. Role β -arrestinů v metabolismu a buněčných procesech	18
2.3. Poškození DNA.....	19
2.3.1. Faktory poškození DNA	19
2.3.2. Typy poškození DNA	20
2.3.2.1. Přerušeni jednoho vlákna (SSB).....	20
2.3.2.2. Dvouřetězcové zlomy (DSB)	20
2.3.2.3. Modifikace bází.....	20
2.3.2.4. Pyrimidinové dimery.....	20
2.3.2.5. Zesíťování.....	20
2.3.2.6. Objemné adukty.....	21
2.3.2.7. Abazická místa (AP místa)	21
2.3.2.8. Chyby párování	21
2.3.3. Regulátory poškození DNA	21
2.4. Oprava poškození DNA	22
2.4.1. Opravné mechanismy poškozené DNA	23
2.4.1.1. Oprava excizí bází (BER) (base excision repair).....	23
2.4.1.2. Oprava excizí nukleotidů (NER) (nucleotide excision repair)	23
2.4.1.3. Oprava chybného párování (MMR) (mismatch excision repair).....	23
2.4.1.4. Homologní rekombinace (HR) (Homologous recombination).....	24
2.4.1.5. Nehomologické spájení konců (NHEJ) (Non-homologous end joining).....	25
2.5. 53bp1.....	25
2.5.2. Klinický význam	26
2.5.3. Terapeutické důsledky	26
3. Cíle	27
4. Materiál a metody	28
4.1. Použité chemikálie.....	28

4.2. Pufry a roztoky	31
4.3. Použité přístroje.....	31
4.4. Použité metody.....	32
4.4.1. Kultivace buněk	32
4.4.2. siRNA interference.....	33
4.4.3. Stanovení proteinů bicinchoninovou metodou	33
4.4.4. Jednokroková frakcionace v lyzačním pufru NP-40	34
4.4.5. Dvoukroková frakcionace s použitím nižších otáček	34
4.4.6. Dvoukroková frakcionace s použitím vysokých otáček	34
4.4.7. SDS elektroforéza	35
4.4.8. Western blot.....	35
4.4.9. Ko-imunoprecipitace	36
4.4.10. Hmotnostní spektrometrie ve spojení s nanoprůtokovou kapalinovou chromatografií (nLC-MS)	37
5. Výsledky	39
5.1. Fosfoproteomická analýza	39
5.2. Frakcionace.....	41
5.2.1. Jednokroková frakcionace v lyzačním pufru NP-40	41
5.2.1.1. Stanovení proteinů bicinchoninovou metodou.....	41
5.2.1.2. Stanovení účinnosti jednokrokové frakcionace v lyzačním pufru NP-40	42
5.2.3. Stanovení účinnosti dvoukrokové frakcionace s použitím nižších otáček	43
5.2.4. Stanovení účinnosti dvoukrokové frakcionace s použitím vysokých otáček	44
5.3. Optimalizace podmínek imunoprecipitace	47
5.3.1. Imunoprecipitace s použitím denaturující eluce	47
5.3.2. Imunoprecipitace s použitím nedenaturující eluce.....	48
5.4. Ověření účinnosti transfekce pomocí siRNA proti β -arrestinu 2	48
5.5. Identifikace komplexů s 53bp1 po aktivaci TRH receptorů a sníženého množství β -arrestinu 2	49
5.5.1. Interakce mezi 53bp1 a MDC1 a mezi 53bp1 a NBS1	50
5.5.2. Interakce mezi NBS1 a MDC1	50
5.5.3. Interakce mezi 53bp1 a MDC1 v buňkách se sníženým množstvím β -arrestinu 2	51
5.5.4. Negativní a pozitivní kontrola imunoprecipitace.....	52
5.5.5. Detekce γ -H2AX.....	52
5.6. Mikroskopická analýza GH1 buněk po ovlivnění taltirelinem, temozolomidem a DMSO.....	53
6. Diskuse.....	56
7. Závěr.....	60
8. Seznam použité literatury.....	61

Seznam použitých zkratek a symbolů

β 2AR – β 2-adrenergní receptor

AAS – antibiotický antimykotický roztok (z angl. antibiotic antimycotic solution)

AC – adenylátcyklasa

Ac-Bis – směs akrylamidu a bis-akrylamidu

AP místa – abazická místa

APS – peroxidisíran amonný

ATM – mutovaná ataxie-telangiektasie (z angl. mutated ataxia-telangiectasia)

ATR – ATM a RAD3 související

BCA – hydrát disodné soli kyseliny bicinchoninové

BER – oprava excizí bází (z angl. base excision repair)

BS³ – bissulfosukcinimidylsuberát

BSA – hovězí sérový albumín (z angl. bovine serum albumin)

cAMP – cyklický adenosin 3',5'-monofosfát

CEB – cytosolární extrakční pufr (z angl. cytosol extraction buffer)

CNS – centrální nervová soustava

DAG – diacylglycerol

DDR – odpověď na poškození DNA (z angl. DNA damage response)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)

DNA-PKcs – katalytická podjednotka DNA-dependentní proteinkinasa (z angl. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)

DTT – dithiotreitol

DMSO – dimethylsulfoxid

DSB – dvojláknové zlomy (z angl. Double-strand break)

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

FBS – fetální hovězí sérum (z angl. fetal bovine serum)

G protein-HDP – heterotrimerní disociační komplex G proteinu

GDP – guanosindifosfát

GPCR – receptory spřažené s G proteiny (z angl. G protein-coupled receptor)

GTP – guanosintrifosfát

H3K27ac – acetylovaný H3K27

H3K27me3 – trimethylovaný H3K27

HEPES – kyselina N'-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2 ethansulfonová

HR – homologní rekombinace (z angl. homologous recombination)

IP₃ – inositol 1,4,5,-trifosfát

LDH – laktátdehydrogenasa

MAPK – mitogenem aktivované proteinkinasy

MMR – opravy chybných bází (z angl. mismatch excision repair)

NEB – nukleární extrakční pufr (z angl. nuclear extraction buffer)

NER – oprava excizí nukleotidů (z angl. nucleotide excision repair)

NHEJ – nehomologní spojování konců (z angl. Non-homologous end joining)

NP-40 – Nonidet P-40

PKA – proteinkinasa A

PBS – fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)

PI3K – fosfoinositid 3-kinasa

PLC – fosfolipasa C

PLC β – fosfolipasa C β

siRNA – malá interferující ribonukleová kyselina, případně umlčující ribonukleová kyselina (z angl. small interfering/silencing ribonucleic acid)

SDS – dodecylsulfát sodný

SLB – vzorkový pufr (z angl. Laemmli sample buffer)

SSB – jednovláknové zlomy/přerušení jednoho vlákna (z angl. single strand break)

ssDNA – jednořetězcové DNA (z angl. single-stranded DNA)

TBS – fyziologický roztok pufrovaný Tris-pufrem

TEMED – tetramethylethyldiamin

TRH – tyrotropin uvolňující hormon/tyroliberin (z angl. thyrotropin releasing hormone)

UV záření – ultrafialové záření

1. Úvod

V posledních desetiletích vědci dosáhli významného pokroku v pochopení procesů, které zajišťují integritu genetické informace v buňkách. DNA je neustále vystavena různým faktorům, které ji mohou poškodit – ať už jde o vlivy vnějšího prostředí, jako je UV záření a chemické látky, nebo o vnitřní procesy, jako je replikace a metabolické aktivity. Pro organismus je zásadní, aby byl schopen takové poškození odhalit a účinně opravit, a zabránit tak mutacím, které by mohly vést k zániku buněk nebo vzniku rakoviny.

V této souvislosti se do popředí dostává výzkum mechanismů opravy DNA, známých jako DDR, které zahrnují širokou škálu signálních drah a proteinových komplexů. Zatímco tradiční opravné mechanismy jsou dobře prozkoumány, roste vědecký zájem o pochopení úlohy receptorů spřažených s G proteiny (GPCR) v tomto procesu. GPCR tvoří jednu z největších skupin receptorů na povrchu buněk a jsou známy svou úlohou při regulaci řady fyziologických funkcí prostřednictvím signalizace zprostředkované G proteiny. Jejich zapojení do procesů opravy DNA je však relativně novou a fascinující cestou výzkumu. Cílem této bakalářské práce je zjistit, jak může aktivace GPCR ovlivnit opravu poškozené DNA a jaké jsou potenciální mechanismy, kterými mohou tyto receptory modulovat DDR.

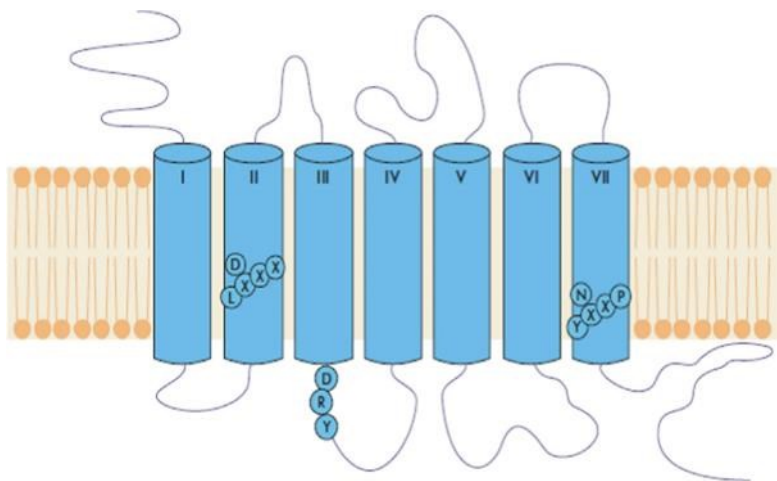
2. Literární přehled

2.1. Receptory spřažené s G proteiny

Receptory spřažené s G proteiny (GPCR) jsou nejvíc studované receptory jak u lidí, tak i u jiných dalších druhů¹. Je známo, že existuje více jak 800 lidských GPCR². V posledních dvou desetiletích došlo k významnému poznání a pochopení GPCR. Jsou taky největší rodinou membránových receptorů používaných jako léčebné cíle pro schválené ale i nové léky¹. Je to hlavně kvůli tomu, že receptory spřažené s G proteiny sehrávají ústřední roli ve fyziologii mnoha organismů a mají schopnost regulovat různé procesy³. GPCR jsou vybaveny obrovským množstvím vazebných míst, která jsou na povrchu buněk snadno přístupná pro xenobiotika¹. V důsledku jejich funkce v buněčné fyziologii a biochemii sehrávají důležitou roli jak v buněčné biologii, tak v použití léků na léčbu široké škály lidských nemocí³. Víme, že GPCR se podílejí na celé řadě onemocnění, včetně poruch CNS, zánětlivých onemocnění, jako je revmatoidní artritida a Crohnova choroba, a také metabolických a nádorových onemocnění¹.

GPCR interagují s různými molekulami malé velikosti. Mnohé z těchto molekul se v současnosti používají k léčbě nemocí a tvoří tak přibližně polovinu ze všech léčiv³. Právě proto, že GPCR interagují s malými molekulami, nebyly tyto receptory zahrnuty při léčbě pomocí protilátek. Jedinečné farmakokinetické a farmakodynamické profily protilátek z nich učinily přesvědčivou alternativu k cílené terapii malými molekulami. Protilátky nemají snadný vstup do CNS, což umožňuje selektivní zacílení na periferní receptory. Současné trendy v objevování léčiv nyní se zaměřují na syntézu terapeutických protilátek, které cílí na GPCR s velkými extracelulárními doménami vázajícími substrát, přičemž extracelulární domény fungují jako vazebné místo pro protilátku⁴. Rozpoznání úlohy GPCR v různých fyziologických a patofyziologických procesech pomohlo identifikovat terapeutické oblasti, v nichž by GPCR mohly být využity jako vhodné cíle pro léčiva na bázi protilátek¹.

Rodina GPCR je největší známou třídou receptorů na povrchu buněk, jejíž členové mají strukturu sedmi transmembránových domén s extracelulárním N-koncem a cytoplazmatickým C-koncem⁵ (Obr. č. 2.1.). Členové této rodiny sedmi α -helikálních transmembránových proteinů přenášejí extracelulární signály a regulují intracelulární druhé posly prostřednictvím asociace s heterotrimerními G proteiny, adenylátcyklasou, cAMP a proteinkinasami³.



Obrázek č. 2.1. Schematické znázornění GPCR zobrazující 7 helixů, spojovací smyčky a některé konzervované aminokyselinové motivy. Převzato¹

Hlavní funkcí GPCR je přenos extracelulárních signálů a regulace intracelulárních druhých posílů prostřednictvím asociace s heterotrimerními G proteiny a jejich následnými efektoři^{3, 5}. GPCR se podílejí na rozpoznávání extracelulárních posílů, přenosu signálů do cytosolu a zprostředkování buněčných odpovědí nezbytných pro normální fyziologické funkce organismů. Vazba nejrůznějších molekul (ligandů) na receptory vede k interakci GPCR s G proteiny, které následně aktivují následné efektoři GPCR drah, jako je adenylátcyklasa (AC) a fosfolipasa C β (PLC β), které regulují mnoho různých fyziologických procesů³.

Signální dráhy receptorů spřažených s G proteiny a jejich následných efektorů, které řídí buněčnou signalizaci, transdukcii a fyziologické procesy v organismech, byly zkoumány na základě velkého množství výzkumných dat. Byly studovány receptorové systémy v hmyzu, hlísticích, potkanech a další organismech, stejně jako v buněčných liniích odvozených od člověka a laboratorních zvířat. Bylo odhaleno, že regulační dráhy GPCR hrají klíčovou roli v buněčné signalizaci regulující důležité buněčné funkce včetně buněčné proliferace, přežívání, diferenciace, migrace, degradace extracelulární matrix, angiogeneze, metastazování, rakoviny a dalších. Následné efektoři mnoha signálních drah byly identifikovány jako potenciální cíle pro vývoj nových léčiv využívaných pro prevenci a léčbu onemocnění v lidské populaci³.

2.1.1. Aktivační mechanismy univerzálního signálního proteinu

Když tyto transmembránové proteiny detekují extracelulární agonistické molekuly, přenášejí signály do nitra buňky prostřednictvím G proteinů uvnitř buňky. Receptor je pak postupně fosforylován, aby se utlumila další signalizace. Fosforylovaný GPCR se váže na protein arrestin a oba podléhají konformačním změnám, které vedou k aktivaci buněčných procesů závislých na arrestinu⁶.

Arrestiny byly poprvé objeveny ve zrakovém systému, kde vážou a inaktivují GPCR citlivý na světlo, zvaný rhodopsin. Do této kategorie spadá β -arrestin 1 a β -arrestin 2. Nyní je známo, že jsou téměř univerzálními regulátory signalizace GPCR. Vazba arrestinů na GPCR

se zvyšuje fosforylací cytoplazmatického konce – receptoru. Mnoho modelů vazby a aktivace arrestinů zdůrazňuje jeho interakci s touto oblastí receptoru⁶.

Od 90. let 20. století je známo, že se arrestiny vážou také na dalších intracelulárních místech některých GPCR, včetně intracelulárních smyček (GPCR mají tři intracelulární smyčky, které spojují sousední transmembránové oblasti receptoru). Strukturální a biofyzikální studie arrestinu vázaného na rhodopsin v posledních letech jasně ukázaly, že arrestin se váže na fosforylované zbytky v C terminusu i na jádrovou doménu receptoru, která zahrnuje intracelulární smyčky 2 (IL2) a 3 (IL3). Jak tyto interakce vedou k aktivaci arrestinu a následné signalizaci, nebylo jasné⁶.

2.1.2. Dělení GPCR

Databáze GPCrdB (gpcrdB.org) je informační systém, který shromažďuje heterogenní údaje o jednotlivých třídách GPCR, včetně sekvenčních údajů, vazebných konstant ligandů a údajů o mutacích. Všechny proteinové sekvence v GPCrdB jsou rozděleny především do šesti rodin: rodopsinu podobná rodina, sekretinu podobná rodina, metabotropní glutamátová rodina, rodina pro feromony, rodina cAMP receptorů a rodina Frizzled/Smoothed receptorů. Každá rodina zahrnuje několik podrodin GPCR⁵.

2.1.3 Tyroliberinový receptor (TRH receptor)

Hormon uvolňující tyrotropin (TRH), nazývaný také tyroliberin, je tripeptidový (pGlu-His-Pro-NH₂) hormon, který se podílí především na regulaci funkce hypofýzy. Jeho hlavní úlohou je udržovat homeostázu hormonů štítné žlázy regulací sekrece hormonu stimulujícího štítnou žlázu (tyrotropin, TSH)⁷. Signály TRH jsou přenášeny přes plazmatickou membránu receptory TRH, které se podílejí na přeměně extracelulární vazby ligandu na intracelulární signalizaci⁸. Receptory TRH patří do nadrodiny GPCR a taky jsou členem podrodiny rhodopsin/ β -adrenergických receptorů GPCR⁹. Zapojení určitých intracelulárních signálních kaskád spuštěných TRH receptory může záviset na konkrétních experimentálních podmínkách. Mimo jiné, β -arrestiny jako klíčové regulátory signalizace GPCR a transportu se mohou výrazně podílet jak na přenosu signálu iniciovaného receptorem TRH, tak na desenzitizaci¹⁰. Je známo, že C-terminální konec TRH receptoru hraje důležitou roli v interakcích s β -arrestinem a také v procesu internalizace receptoru. β -arrestin se váže na fosforylovaná místa na C-konci TRH receptoru. Zdá se, že desenzitizace a internalizace receptorů je závislá na fosforylaci specifických míst v C-konci receptoru¹⁰. TRH receptor, podobně jako jiné GPCR, je rychle fosforylován a znečitlivěn po navázání agonisty¹¹. Fosforylovaný receptor přitahuje β -arrestin do plazmatické membrány, kde narušuje interakci mezi receptorem a jeho příbuzným G proteinem, čímž ukončuje signální transdukcii. TRH receptor s navázaným agonistou je poté internalizován spolu s β -arrestinem prostřednictvím klathrinových váčků a buď recyklován, nebo degradován¹⁰.

2.2. G proteiny

G proteiny jsou rodinou specializovaných proteinů, které mohou vázat nukleotidy, tj. guanointrifosfát (GTP) a guanosindifosfát (GDP); proto jsou také známé jako proteiny

vázající guaninové nukleotidy¹². Jsou to regulační proteiny, které přímo přenášejí informace z receptorů spřažených s G proteiny (GPCR) na plazmatické membráně do nitra buňky a regulují tak různé biochemické funkce¹³.

G proteiny se skládají buď z jedné podjednotky (monomerní), nebo z více podjednotek (heterotrimerní). Monomerní struktury jsou známé jako malé G proteiny/GTPasy¹⁴, zatímco heterotrimerní proteiny mají tři různé podjednotky: alfa (α), beta (β) a gama (γ)^{13, 14}. Podjednotky β a γ tvoří stabilní dimerní komplex nazývaný komplex $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$). Komplex $\beta\gamma$ je považován za jednu funkční jednotku a je připojen k plazmatické membráně pomocí lipidových kotev. V lidském genomu bylo nalezeno 16 genů pro podjednotky $G\alpha$, 5 genů pro podjednotky $G\beta$ a 13 genů pro podjednotky $G\gamma$. Různé kombinace těchto podjednotek vedou k široké škále heterotrimerních G proteinů¹⁴.

Strukturně jsou G proteiny rozpoznávány především podle svých podjednotek $G\alpha$. Na základě sekvenční a funkční podobnosti se proteiny $G\alpha$ dělí do čtyř rodin: $G\alpha_s$ (stimulační), $G\alpha_i$ (inhibiční), $G\alpha_q$ a $G\alpha_{12}$ ¹³. Lidský i myší genom obsahuje 5 genů $G\beta$ ($G\beta_1$, $G\beta_2$, $G\beta_3$, $G\beta_4$ a $G\beta_5$) a 13 genů $G\gamma$ ^{15, 16}. $G\beta_1$, $G\beta_2$, $G\beta_3$ a $G\beta_4$ mají vysokou podobnost sekvencí (mezi 80 až 90 %), zatímco $G\beta_5$ je pouze z 50 % podobný ostatním podjednotkám $G\beta$. Zatímco $G\beta_5$ se nachází hlavně v mozku, ostatní podjednotky $G\beta$ jsou exprimované v mnoha buněčných typech. Podjednotky $G\gamma$ jsou rozmanitější a sdílejí sekvenční podobnosti v rozmezí 20-80 %¹³.

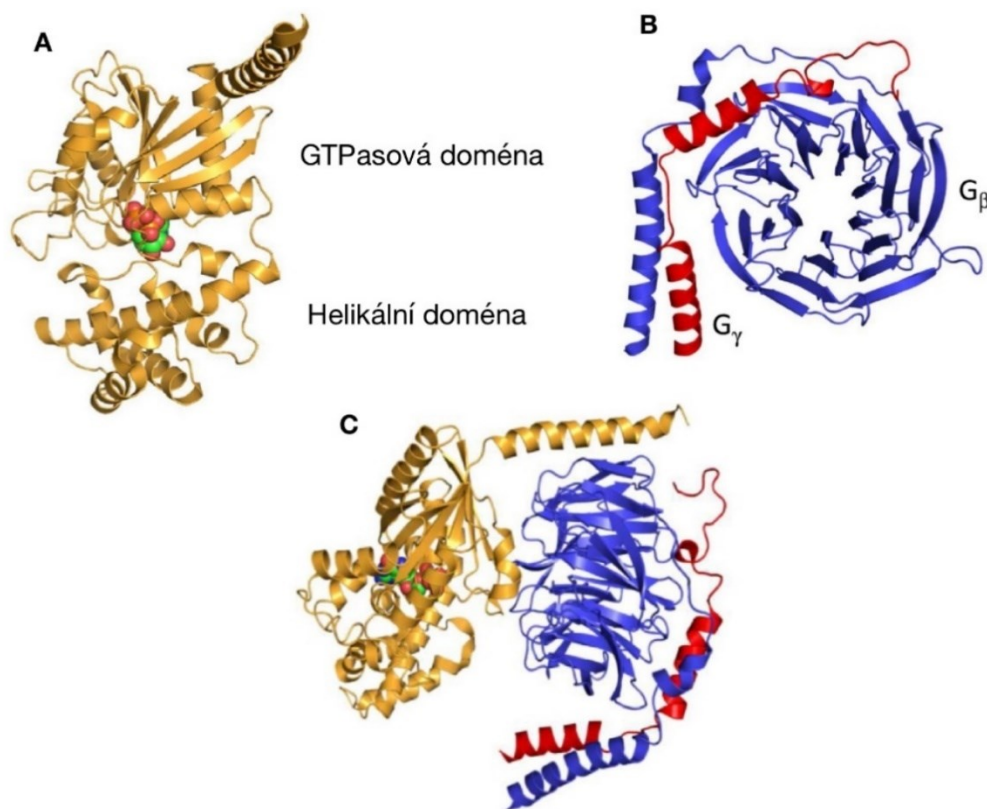
2.2.1. Signalizační dráhy

Bylo definováno několik signalizačních efektorů pro G proteiny¹³. $G\alpha_s$ stimuluje adenylcyklastu k produkci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který aktivuje proteinkinasu A (PKA) regulující buněčné odpovědi¹⁷. Naproti tomu $G\alpha_i$ inhibuje adenylcyklastu a tím snižuje produkci intracelulárního cAMP^{15, 16}. Aktivace $G\alpha_{q/11}$ stimuluje fosfolipasu C (PLC), která hydrolyzuje membránové fosfolipidy a uvolňuje inositol 1,4,5,-trifosfát (IP_3) a diacylglyceroly (DAG), což následně vede ke zvýšení intracelulární koncentrace vápníku^{18, 19, 20}. TRH receptor aktivuje $G\alpha_{q/11}$ -PLC β signalizaci¹⁰.

Kromě proteinů $G\alpha$ mohou i $G\beta\gamma$ aktivovat následné efekty. $G\beta\gamma$ může regulovat adenylcyklastu, fosfolipasu $C\beta$ a napětově řízené Ca^{2+} kanály²¹. Vzhledem k relativně vyššímu množství G proteinů rodiny $G\alpha_i$ v buňkách se předpokládá, že aktivace $G\alpha_i$ je primárním zdrojem signálních procesů zprostředkovaných $G\beta\gamma$ ¹³.

Byly vyřešeny krystalové struktury několika $G\alpha$, $G\beta\gamma$ a $G\alpha\beta\gamma$ (obr. č. 2.2.). Struktura podjednotky $G\alpha$ se skládá ze dvou domén: Ras-like GTPasa domény a α -helikální domény²² (obr. č. 2.2. A). Tyto dvě domény jsou propojeny krátkými aminokyselinovými řetězci pojmenovanými jako linker 1 a linker 2. Mezi těmito dvěma doménami se nachází hluboká šterbina, ve které je pevně vázán GDP nebo GTP. Nukleotid je tak oddělen od okolního prostředí, což vedlo k návrhu, že α -helikální doména představuje inhibiční bariéru a je vstupní bránou pro navázání GPCR nebo podjednotek $G\beta\gamma$ ^{23, 24, 25}. Struktura podjednotky $G\beta\gamma$ ukazuje, že $G\beta$ je složen do β -helixu se sedmi listy. Každý list se skládá ze čtyř vláken β -listů. N-koncový α -helikální segment $G\beta$ vytváří s podjednotkou $G\gamma$ těsnou interakci typu coiled-

coil (obr. č. 2.2. B). Krystalová struktura heterotrimeru $G\alpha\beta\gamma$ ukazuje, že obě domény $G\alpha$ interagují s různými oblastmi $G\beta$. N-koncový α -helix $G\alpha$ interaguje s jednou stranou $G\beta$ helixu. Přepínací oblast $G\alpha$ II interaguje s horní částí vrtule $G\beta$ ¹³ (obr. č. 2.2. C).



Obrázek č. 2.2. Krystalové struktury heterotrimeru G proteinu. A – struktura $G\alpha$ s dvěma doménami – GTPasovou doménou a helikální doménou (žlutá); B – dimer $G\beta\gamma$, kde modře je $G\beta$ a červeně je $G\gamma$; C – heterotrimer $G\alpha\beta\gamma$; Převzato¹³ a upraveno

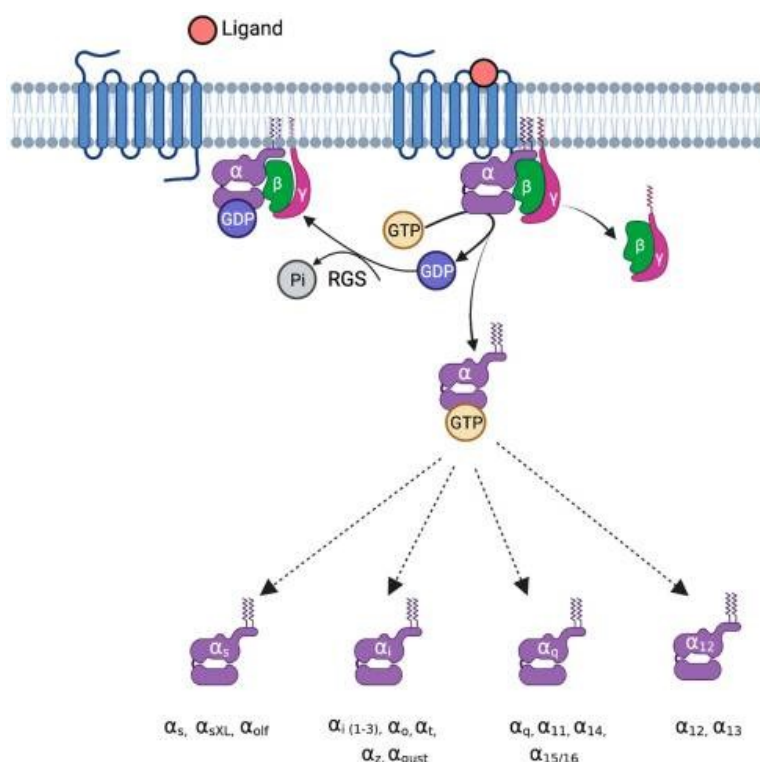
2.2.2. Aktivace receptorů a signálních drah

Vazba s exogenními nebo endogenními agonisty uvádí GPCR do aktivního konformačního stavu, který následně ovlivňuje intracelulární vazbu G proteinů nebo arrestinových proteinů^{26, 27}. Tato nadrodina receptorů sdílí sedm transmembránových (TM) šroubovicových domén (TM1 až TM7) spojených střídáním tří intracelulárních a tří extracelulárních smyček (ICL1, ECL1, ICL2, ECL2, ICL3 a ECL3). Ligandy cílené na GPCR se dělí na agonisty, parciální agonisty, inverzní agonisty a antagonisty. Agonisté vázající GPCR podporují aktivní konformaci, což následně zvyšuje signální účinek. Parciální agonisté mají nižší účinek při aktivaci receptoru. Naopak inverzní agonisté inhibují spontánní základní signalizaci tím, že stabilizují neaktivní konformaci GPCR. Antagonisté nemají žádný vliv na dynamickou rovnováhu mezi aktivní a neaktivní konformací GPCR, ale brání vazbě agonistů i inverzních agonistů¹³.

Pro interakci mezi GPCR a G proteiny bylo původně navrženo, že GPCR a G proteiny interagují srážkou. Jak GPCR, tak G proteiny volně difundují v plazmatické membráně a pouze aktivované (s agonisty vázané) GPCR se spojují s G proteiny a aktivují je²⁸. Bylo však

zjištěno, že některé GPCR a G proteiny tvoří předsestavený (nebo předvázaný) komplex v nepřítomnosti jakýchkoli ligandů^{28, 29}. Vazba agonistů aktivuje GPCR a způsobuje konformační změny v předsestaveném komplexu GPCR/G protein, což vede k aktivaci G proteinu. Předpokládá se, že struktura předsestaveného komplexu GPCR/G protein se liší od struktury aktivovaného komplexu GPCR/G protein. Kolizní vazba nebo předsestavení může vést k rozdílné kinetice aktivace G proteinu a může být základem rozdílné konstitutivní aktivity GPCR. Tyto různé způsoby interakce GPCR/G proteinu závisí na konkrétním páru GPCR/G protein. Je zapotřebí dalšího výzkumu, který by poskytl strukturální základ pro tyto různé interakce GPCR/G protein¹³.

Z funkčního hlediska funguje rodina G proteinů v buňkách jako molekulární spínače, které přenášejí signály v reakci na podněty³⁰. Protein se stává aktivním nebo neaktivním v závislosti na vazbě α podjednotky G proteinu na GTP nebo GDP. V nepřítomnosti signálu se GDP připojí k α podjednotce a vytvoří komplex G protein-HDP (heterotrimerní disociační komplex G proteinu). Když se ligand naváže na GPCR, dochází k aktivaci a konformační změně receptoru, která usnadní výměnu GDP za GTP na podjednotce $G\alpha$. Tato výměna způsobí, že podjednotka $G\alpha$ se oddělí od dimeru $G\beta\gamma$, což umožní podjednotkám $G\alpha$ -GTP i $G\beta\gamma$ interagovat s různými následnými efektoři v signální dráze a regulovat je. Po hydrolýze GTP na GDP se protein stane opět neaktivním. Tento proces je ukázaný na obr. č. 2.3. G proteiny fungují tak, že se zapínají nebo vypínají prostřednictvím interakcí signál-receptor na povrchu buňky^{13, 30}. G proteiny mají vlastní GTPasovou aktivitu a hrají dynamickou roli v buněčných procesech, jako je buněčný růst, syntéza proteinů a transport membránových vezikul³¹.



Obrázek č. 2.3. Aktivace a cyklus G proteinu. GDP je navázáno na $G\alpha$ podjednotku. Když se na GPCR naváže ligand, protein se aktivuje, což vyvolá konformační změnu a tato změna způsobí

výměnu GDP za GTP. Navázané GTP způsobí, že $G\alpha$ podjednotka se oddělí od $G\beta\gamma$. Obě tyto podjednotky tak mohou následně interagovat s efektory v signální dráze a regulovat je. Převzato³²

Je stále víc a víc důkazů, které naznačují že GPCR mohou také iniciovat signalizaci nezávislou na G proteinech a závislou na β -arrestinu³³. β -arrestin 1 a β -arrestin 2 jsou všudypřítomné cytosolické adaptorové proteiny, které byly původně objeveny pro svou inhibiční roli v signalizaci GPCR prostřednictvím signální dráhy zprostředkované G proteiny³⁴. β -arrestin 1 a 2 sdílejí ~80 % aminokyselinovou sekvenční identitu a vysoce konzervované strukturní rysy, ale představují jedinečné, stejně jako sdílené role v signalizaci a regulaci GPCR³⁵.

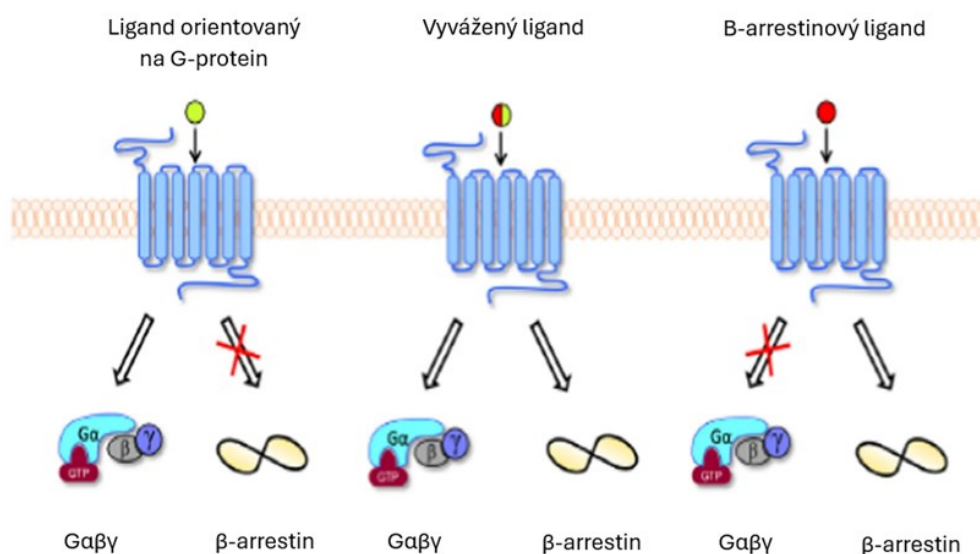
Zatímco desenzitizace receptorů vyžaduje interakci β -arrestinu s aktivovanými GPCR, β -arrestiny mohou také přenášet intracelulární signalizaci jako adaptorové proteiny^{36, 37}. Bylo například prokázáno, že β -arrestiny tvoří signální lešení pro mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK), jako jsou extracelulární signální kinasy (ERK) a c-Jun N-terminální kinasa 3 (JNK3), na endosomech s internalizovanými GPCR. Následně bylo zjištěno, že β -arrestiny podporují některé z těchto drah, i když je aktivita G proteinu vypnuta³³. Jinými slovy, je možné identifikovat agonisty, kteří mohou selektivně aktivovat buď signalizaci závislou na G proteinech nebo signalizaci závislou na β -arrestinech. Takoví agonisté, kteří mohou selektivně aktivovat jednu nebo druhou signální dráhu, se označují jako „upřednostňující agonisté“ a tento jev selektivní aktivace se nazývá „upřednostňující agonismus“ (angl. biased agonism)³⁸. Na rozdíl od signálních drah zprostředkovaných G proteiny, které jsou přechodné a rychlé, je dráha zprostředkovaná β -arrestinem často trvalá a pomalá^{38, 39, 40}.

2.2.3. Role β -arrestinů v metabolismu a buněčných procesech

β -arrestin 1 a β -arrestin 2 jsou exprimovány v různých tkáních a jsou zapojeny do mnoha signálních drah GPCR, které regulují buněčné reakce. Signalizace β -arrestinů slouží k mnoha účelům; může modulovat aktivitu několika buněčných signálních proteinů, jako jsou PI3K a AKT, c-Src, MAPK, cAMP fosfodiesterasa, kalmodulin, proteinové fosfatasy, ubikvitinové ligasy, deubikvitinační enzymy a mnoho dalších^{37, 41, 42}.

β -arrestiny jsou primárně spojovány s internalizací a degradací GPCR^{43, 44}. β -arrestiny tvoří lešení pro širokou škálu signálních komplexů spojených se signálními kaskádami GPCR, které mohou probíhat paralelně s drahami GPCR/G protein/efektor⁴⁵. Následně bylo prokázáno, že β -arrestiny vážou širokou škálu kinas, např. ubikvitinové ligasy E3, fosfodiesterasy a transkripční faktory^{37, 41, 42, 46}. Nedávno se ukázalo, že aktivace β -arrestinů prostřednictvím β 2-adrenergního receptoru (β 2AR) vede ke zvýšenému poškození DNA, degradaci p53 a podpoře apoptózy^{47, 48}. Tyto údaje naznačují, že pokud by aktivace β 2AR mohla být vychýlena tak, aby signalizovala přes dráhy mimo β -arrestin, mohla by být podpořena oprava poškození DNA. Implicitně se ukázalo, že s další složitostí signalizačních repertoárů GPCR jsou tyto mechanismy transdukce GPCR usnadněny a specifikovány tvorbou stabilních multiproteinových komplexů s receptorem^{49, 50}. Lidské β -arrestiny tvoří malou rodinu cytosolických proteinů, které byly původně studovány pro svou roli v desenzitizaci GPCR a intracelulárním přenosu. Navzdory tomuto skromnému začátku se β -

arrestiny (β -arrestin 1 (ARRB1) a β -arrestin 2 (ARRB2)) ukázaly jako klíčové regulátory mnoha signálních drah zapojených do stárnutí. Tím, že β -arrestiny působí jako buněčné lešení, které propojuje důležité entity signálních drah s GPCR, mohou vykonávat homeostatickou a na ligandy reagující alostatickou kontrolu mezibuněčných metabolických dějů⁵¹. Pokud jde o přímou vazbu na signalizaci zprostředkovanou β -arrestiny a dráhy poškození/opravy DNA, první práce naznačily, že stimulace β 2-adrenergního receptoru (β 2AR) podporuje defosforylaci β -arrestinu 2 a jeho potlačení aktivace nukleární faktor κ B (NF- κ B). Aktivace NF- κ B v reakci na poškození DNA vyvolané UV zářením je nezbytná pro udržení účinné DDR reakce⁴⁸.



Obrázek č. 2.4. Signalizace pro G protein nebo β -arrestinovou dráhu po aktivaci receptorů spřažených s G proteiny na základě typu ligandu. Převzato¹ a upraveno

2.3. Poškození DNA

2.3.1. Faktory poškození DNA

Na to, aby mohli živé organismy správně fungovat, je zapotřebí udržet informace uložené v genomu. Tyto informace uložené v DNA jsou za běžných podmínek relativně stabilní a bezpečně ukryté, avšak integrita DNA je neustále narušovaná různými faktory. Tyto faktory můžeme rozdělit na endogenní a exogenní^{52, 53, 54}.

Endogenní faktory zahrnují vnitřní procesy, které mohou DNA poškodit. Jsou to tedy zdroje poškození DNA, které mají původ v buňce. Je to např. tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) při normálním buněčném metabolismu (vedlejší produkty zejména mitochondriálního dýchání), chyby při replikaci DNA a spontánní chemické reakce, jako je např. depurinace (ztráta purinových bází z páteře DNA) nebo deaminace (přeměna cytosinu na uracil, adeninu na hypoxantin nebo guaninu na xantin). Tyto procesy mohou vést k různým

typům poškození DNA, jako jsou jednořetězcové zlomy, oxidační poškození bází a vznik abnormálních bází^{52, 53, 54}.

Exogenní faktory jsou naopak vnější činitelé, kteří mohou způsobit poškození DNA. Patří sem fyzikální faktory, jako ionizující záření (vysokoenergetické záření jako rentgenové nebo gama záření), ultrafialové (UV) záření ze slunce, chemické látky (např. alkylační činidla, která přidávají alkylové skupiny k bázím DNA, což způsobuje chybné párování a přerušení řetězce, nebo interkalační činidla vkládající se mezi báze DNA a způsobující mutace), environmentální toxiny (např. polycyklické aromatické uhlovodíky) a biologické látky (některé viry a bakterie mohou vyvolat poškození DNA). Tyto faktory mohou způsobit různé typy poškození DNA, včetně dvouřetězcových zlomů, aduktů DNA a fotoproduktů jako jsou pyrimidinové dimery^{52, 53, 54}.

2.3.2. Typy poškození DNA

Poškození DNA se může vyskytovat v různých formách, z nichž každá má odlišné vlastnosti a důsledky pro buněčnou funkci. Zde jsou uvedeny základní typy poškození DNA:

2.3.2.1. Přerušení jednoho vlákna (SSB)

K přerušení dochází v jednom ze dvou vláken DNA. Způsobují to často reaktivní formy kyslíku, ionizující záření a některé chemické látky. SSB jsou zpravidla méně závažné než dvouřetězcové zlomy, lze je opravit pomocí komplementárního vlákna předlohy⁵⁵.

2.3.2.2. Dvouřetězcové zlomy (DSB)

Obě vlákna dvoušroubovice DNA jsou přerušena. Můžou být důsledkem ionizujícího záření, oxidačního stresu nebo některých chemoterapeutik. DSB jsou velmi škodlivé, jelikož mohou vést k chromozomálním přestavbám, ztrátě genetické informace, a dokonce i smrti buňky, pokud nejsou řádně opraveny⁵⁵.

2.3.2.3. Modifikace bází

Změny chemické struktury bází DNA. Dále je dělíme na oxidační poškození (způsobeno ROS), alkylace (přidání alkylových skupin k bázím, které často vede k neshodnému párování bází) a deaminace (přeměna cytosinu na uracil, adeninu na hypoxantin nebo guaninu na xantin). Modifikace bází jsou důsledkem působení některých chemických látek a UV záření⁵⁵.

2.3.2.4. Pyrimidinové dimery

Kovalentní spojení dvou sousedních pyrimidinových bází (obvykle thyminu) v řetězci DNA. Příčinou bývá UV záření ze slunce. Toto poškození způsobuje zkroucení řetězce DNA, čímž blokuje replikaci a transkripci⁵⁵.

2.3.2.5. Zesíťování

Kovalentní vazby vznikají mezi bázemi na protilehlých vláknech (interstrand crosslinks) nebo uvnitř téhož vlákna (intrastrand crosslinks). Vyvolávají je některé chemoterapeutické látky (např. cisplatina) a toxiny ze životního prostředí. Zesíťování brání oddělení vláken, které je nezbytné pro replikaci a transkripci⁵⁵.

2.3.2.6. Objemné adukty

Velké chemické skupiny se připojují k bázím DNA. Vznikají v důsledku expozice mutagenům v životním prostředí, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) obsažené v tabákovém kouři. Mohou blokovat replikaci a transkripci DNA, což vede k mutacím⁵⁵.

2.3.2.7. Abazická místa (AP místa)

Místa v DNA, kde chybí báze. Příčinou bývá spontánní hydrolyza glykosidické vazby mezi bází a sacharid-fosfátovou páteří. Pokud není AP místo opraveno, může vést k mutacím během replikace DNA⁵⁵.

2.3.2.8. Chyby párování

Nesprávné párování bází během replikace DNA. Chyby jsou způsobené polymerasami DNA. Můžou vést k mutacím, pokud nejsou opraveny systémem opravy chyb⁵⁵.

2.3.3. Regulátory poškození DNA

Následky poškození DNA jsou různorodé a nepříznivé^{56, 57}. Důsledky poškození DNA, avšak do značné míry závisí na konkrétních škodlivých látek⁵⁸. Mírné poškození DNA je možné opravit se zastavením buněčného cyklu nebo bez něj⁵⁹. Odhaduje se, že v buňce savců se průměrně každý den objeví deset až stotisíc lézí DNA⁶⁰. Rozsáhlá poškození mohou vést k buněčnému stárnutí, apoptóze a nekróze⁵⁹. Chyby replikace DNA v důsledku poškození DNA mohou způsobit nezvratné mutace. Chromozomální aberace a mutace v kódujících genech mohou vést ke karcinogenezi⁵⁷. Aby se bylo možné vyhnout závažným biologickým důsledkům poškození DNA, vyvinula se komplexní síť mechanismů dohledu nad genomem nebo procesů při odpovědi na poškození DNA. Jádrem tohoto obranného systému jsou komplementární systémy opravy DNA, které pokrývají většinu genetických poruch. Kromě přímého odstraňování poškození DNA spouštějí signalizační kaskádu, která vede ke zpomalení progresu buněčného cyklu, čímž buňky získávají více času na opravu poškození DNA před replikací nebo dělením buněk⁶⁰.

Stabilita genomu je nezbytná pro správný vývoj, zdravé stárnutí a prevenci rakoviny. Nejzávažnějším typem poškození DNA jsou dvouřetězcové zlomy DNA (DSB). DSB jsou však také nezbytné jako povinné meziprodukty během vývoje lymfocytů a zárodečných buněk a jako vedlejší produkty normální replikace DNA a reakce na environmentální podněty. Neopravené DSB vedou k zastavení buněčného cyklu a apoptóze a brání funkčnímu dozrání lymfocytů a zárodečných buněk. Nesprávná oprava DSB vede ke genomické nestabilitě, včetně delecí, amplifikací nebo chromozomálních translokací, které slouží jako základ pro onkogenní selekci⁶¹.

Hlavními regulátory DDR jsou tři proteinkinasy související s fosfoinositid-3-kinasou (PI3K): ATM kinasa (z angl. ataxia teleangiectasia mutated), ATM a RAD3-související kinasa (ATR) a katalytická podjednotka DNA-dependentní proteinkinasy (DNA-PKcs). Tyto enzymy spolu s navazujícími signálními drahami jsou v procesu DDR nezbytné. Jsou

navázány a aktivovány na místech poškozené DNA pomocí vlastních sensorových proteinových komplexů^{61, 62}.

ATM se primárně aktivuje při dvouřetězcových zlomech v DNA a je do těchto míst rekrutována komplexem MRN (Mre11/Rad50/Nbs1). Po aktivaci ATM fosforyluje několik klíčových substrátů, včetně p53 proteinu, kinasy CHK2 (z angl. check-point kinase 2) a histonu H2AX, což vede k zastavení buněčného cyklu, opravě DNA nebo apoptóze. ATM hraje klíčovou roli při udržování genomové stability a její nedostatek může vést k ataxii telangiektásii, neurodegenerativnímu onemocnění charakterizovanému cerebelární ataxií, imunitními deficity a predispozicí k rakovině^{61, 63}.

ATR je aktivována po navázání na jednovláknovou DNA (ssDNA) pokrytou replikačním proteinem A (RPA), který obvykle vzniká během replikačního stresu DNA nebo resekce DSB. Signalizace ATR vede především k aktivaci kinasy CHK1, která podporuje zastavení buněčného cyklu a opravu DNA. ATR je klíčová pro reakci na replikační stres a podílí se na několika procesech mimo DDR, jako je regulace replikace telomer a správný průběh meiózy. Mutace v ATR mohou vést k Seckelovu syndromu, poruše charakterizované zakrslostí a mikrocefalií^{61, 63}.

DNA-PKcs je ústředním hráčem v dráze NHEJ (non-homologous end joining), která je jedním z hlavních mechanismů oprav DSB. Je rekrutována k DSB heterodimerem Ku70/Ku80, kde tvoří aktivní komplex, který zpracovává a spojuje konce DNA. DNA-PKcs také interaguje s endonukleasou Artemis a usnadňuje otevírání vlásečkových struktur během V(D)J rekombinace, která je nezbytná pro vývoj imunitního systému. Deficity DNA-PKcs mohou vést k těžké kombinované imunodeficienci (SCID) a zvýšené citlivosti na ionizující záření^{63, 64}.

2.4. Oprava poškození DNA

Oprava poškozené DNA je součástí DDR⁶⁵ po detekci a signalizaci poškození⁶⁶. Účinná odpověď na poškození DNA vyžaduje koordinované zapojení mnoha faktorů. Je třeba zachovat integritu genomu a zabránit potenciálně škodlivým mutacím, které by mohly vést k poškození buněk nebo vzniku nádorů. Je důležité vytvořit základní kontext, který usnadní účinnou opravu tím, že signalizuje přítomnost lézí DNA⁶⁷.

Proces opravy lze rozdělit do pěti cest: homologní rekombinace (HR), nehomologní spojování konců (NHEJ), opravy nukleotidové excize (NER), opravy excize bází (BER) a opravy chybného párování DNA (MMR). Z těchto mechanismů se HR a NHEJ používají hlavně k opravě DSB, zatímco ostatní tři cesty excizní opravy jsou zodpovědné za poruchy spojené s jedním párem bází^{68, 69}. Je třeba poznamenat, že léze opravené pomocí HR umožňují vznik bezchybného produktu díky použití homologního templátu⁷⁰ a během HR se syntetizují pouze krátké úseky DNA⁷¹. Naopak NHEJ spojuje konce DSB bez referenčního templátu, což může být chybný model, který často způsobuje substituce, inserce a delece v místě zlomu, což vede k defektním opravným produktům^{70, 72}.

2.4.1. Opravné mechanismy poškozené DNA

2.4.1.1. Oprava excízi bází (BER) (base excision repair)

Opravuje malé, šroubovici nedeformující léze bází. Dráha BER má zásadní význam pro zachování integrity genomu tím, že opravuje běžné formy poškození DNA, způsobené oxidovanými, alkylovanými nebo deaminovanými bázemi. Jedná se o univerzální a účinný opravný mechanismus, který řeší širokou škálu poškození DNA a zajišťuje tak stabilitu a funkčnost genetického materiálu^{73, 74, 75, 76}.

Enzym DNA glykosylasa rozpoznává poškozenou bázi DNA. Pak nastává její odstranění. DNA glykosylasa rozštěpí vazbu mezi poškozenou bází a sacharid-fosfátovou páteř a zanechá apurinové/apyrimidinové místo, které je také známé jako abazické místo (AP). AP endonukleasa následně rozpozná místo AP a provede řez ve vlákne DNA, čímž vytvoří jednovláknový zlom s 3'-OH a 5'-deoxyribózofosfátovým koncem. Enzym DNA polymerasa vyplní mezeru přidáním správné báze komplementární k nepoškozenému vlákně. Enzym DNA ligasa v posledním kroku uzavře zářez v páteři DNA, čímž dokončí proces opravy^{73, 74, 75, 76}.

2.4.1.2. Oprava excízi nukleotidů (NER) (nucleotide excision repair)

NER je univerzální a robustní mechanismus opravy DNA, který odstraňuje objemné, šroubovici narušující léze, jako jsou léze způsobené UV zářením (např. dimery thyminu) a velké chemické adukty.

Nejdřív dochází k rozpoznání poškozené DNA. Jsou přítomny dvě dílčí dráhy globální genomové NER (GG-NER) a transkripčně spřažená NER (TC-NER). Globální genomová NER (GG-NER) funguje v celém genomu. Poškození je rozpoznáváno komplexem XPC-RAD23B, který identifikuje narušení šroubovice nepřímo prostřednictvím změn ve šroubovicové struktuře DNA. Transkripčně spřažená NER (TC-NER) je specifická pro prepisované vlákno aktivních genů. Je iniciována, když se RNA polymerasa II zastaví na lézi. Zastavená polymerasa je rozpoznána proteinem CSB (Cockayne Syndrome B), který pak váže CSA a další faktory. Po rozpoznání léze se do místa poškození váže komplex transkripčního faktoru IIIH (TFIIH), který zahrnuje helikasy XPB a XPD. Tyto helikasy odvíjejí DNA kolem léze a vytvářejí bublinu jednořetězcové DNA. Dvě endonukleasy, XPG a ERCC1-XPF, provedou incize na obou stranách léze. XPG řeže na 3' straně a ERCC1-XPF na 5' straně, což vede k odstranění 24-32 nukleotidů dlouhého jednořetězcového úseku DNA, který obsahuje lézi. Poškozený oligonukleotid je odstraněn a zůstane jednořetězcová mezer. Jednovláknovou mezeru vyplní DNA polymerasy δ nebo ϵ , které použijí nepoškozené vlákno jako templát. Tento proces vyžaduje také replikační protein A (RPA), který stabilizuje jednořetězcovou DNA, a proliferující buněčný jaderný antigen (PCNA), který funguje jako posuvná svorka pro polymerasu. Nakonec DNA ligasa I nebo DNA ligasa III připojí nově syntetizovanou DNA do stávajícího vlákna, čímž je oprava dokončena^{77, 78, 79}.

2.4.1.3. Oprava chybného párování (MMR) (mismatch excision repair)

MMR je vysoce konzervovaná opravná dráha DNA, která je zodpovědná za opravu chybných bází a inserce/delece smyček, k nimž dochází během replikace a rekombinace

DNA. Tento proces má zásadní význam pro udržení genomové stability a prevenci mutací. MMR je hlavním postreplicačním opravným mechanismem DNA.

Komplexy MutS (MutS α a MutS β) vyhledávají v DNA chybné páry a vážou se na místo chyby. MutS α (MSH2-MSH6) rozpoznává chyby u jednotlivých bází a malé inserční/deleční smyčky. MutS β (MSH2-MSH3) rozpoznává větší inserční/deleční smyčky. Primární komplex MutL α (MLH1-PMS2) je navázán do komplexu MutS s chybou v DNA. MutL α interaguje s proteinem posuvné svorky PCNA, který obepíná vlákno DNA a spojuje chybu s replikačním aparátem. Dalším krokem je excize části vlákna s chybou. Komplex MutL α usnadňuje navázání a aktivaci exonukleasy 1 (Exo1), která degraduje vlákno DNA od místa nařezání až po chybný úsek. Tento proces může zahrnovat jednořetězcové i dvouřetězcové excize, v závislosti od povahy chyby. Následuje resyntéza DNA. DNA polymerasa δ syntetizuje novou DNA, aby vyplnila mezeru vytvořenou exonukleasou, přičemž jako templát použije nepoškozené komplementární vlákno. Replikační protein A (RPA) během tohoto procesu stabilizuje jednořetězcovou DNA. DNA ligasa I připojí nově syntetizovanou DNA, k již existujícímu vláknu a dokončí tak proces opravy^{80, 81, 82}.

2.4.1.4. Homologní rekombinace (HR) (Homologous recombination)

HR je vysoce přesný mechanismus opravy DNA, který opravuje především dvouřetězcové zlomy (DSB) a meziřetězcové křížové vazby. Je nezbytná pro udržení stability a integrity genomu.

Komplex MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) detekuje DSB a váže kinasu ATM. Komplex MRN spolu s CtIP zahájí resekcí 5' konců v místě zlomu a vytvoří 3' převisy jednořetězcové DNA (ssDNA). Tento proces dále rozšiřují nukleasy a helikasy, jako jsou Exo1 a BLM-DNA2. ssDNA je rychle obalena replikačním proteinem A (RPA), aby se zabránilo tvorbě sekundární struktury a její degradaci. RPA je nahrazen rekombinásou RAD51 za pomoci mediátorových proteinů, jako jsou BRCA2 a RAD52, a vytváří nukleoproteinové vlákno kolem ssDNA. Vlákno RAD51-ssDNA hledá homologní sekvenci v sesterské chromatidě nebo homologním chromozomu. Jakmile je homologie nalezena, vlákno RAD51 naváže homologní duplex DNA a vytvoří vytěšňovací smyčku (D-smyčku). Tento krok usnadňují proteiny jako RAD54 a BRCA2. DNA polymerasy prodlouží 3' konec navázaného řetězce s využitím homologního templátu jako vodítka. Výsledkem této syntézy může být crossover (vytvoření Hollidayova spoje) nebo non-crossover (vzájemné nasedání závislé na syntéze, SDSA). Nově syntetizované vlákno je vytlačeno z D-smyčky a nasedá na druhý 3' převis zlomu. Syntéza DNA a ligace dokončí opravu. Hollidayův spoj může být vyřešen pomocí strukturně specifických endonukleas, jako jsou GEN1, MUS81-EME1 nebo komplex BLM-Top3 α -RMI1. Zářezy v DNA jsou uzavřeny DNA ligasou I nebo III, čímž je dokončen proces opravy a obnovena integrita DNA^{83,84,85}.

Aktivita HR proteinů je přísně regulována fosforylací, ubikvitinací a dalšími modifikacemi. Kinasy ATM a ATR hrají klíčovou roli při aktivaci a regulaci HR proteinů v reakci na poškození DNA. HR je aktivní především ve fázích S a G2 buněčného cyklu, kdy je sesterská chromatida k dispozici jako šablona pro opravu^{83, 84, 85}.

2.4.1.5. Nehomologické spájení konců (NHEJ) (Non-homologous end joining)

NHEJ je opravná dráha DNA, která je zodpovědná za opravu DSB přímou ligací přerušovaných konců DNA bez nutnosti použití homologního templátu. NHEJ je nezbytná pro udržení stability genomu, zejména v nereplikujících se buňkách, a funguje v průběhu celého buněčného cyklu.

Komplex Ku70/Ku80 se rychle váže na konce DNA v místě DSB, chrání je před degradací a zabraňuje nevhodné rekombinaci. Komplex Ku slouží jako lešení pro nasednutí dalších faktorů NHEJ. Ku70/Ku80 rekrutuje DNA-PKcs na konce DNA a vytváří holoenzym DNA-PK. Tento komplex je klíčový pro spojení, při němž se konce DNA dostávají do těsné blízkosti. Konce DNA často vyžadují zpracování, aby byly kompatibilní pro ligaci. Artemis, nukleasa aktivovaná fosforylací prostřednictvím DNA-PKcs, zkracuje převisy a odstraňuje poškozené nukleotidy. Enzymy polynukleotidová kinasová fosfatasa (PNKP), aprataxin (APTX) a tyrosyl-DNA fosfodiesterasa (TDP1) dále zpracovávají konce DNA fosforylací 5' konců a odstraňují blokující léze. Specializované DNA polymerasy μ a λ vyplňují mezery a prodlužují konce DNA, aby vytvořily konce vhodné pro ligaci. Mohou fungovat způsobem nezávislým na šabloně, díky čemuž jsou vhodné pro různé struktury konců, které se vyskytují při NHEJ. Protein XRCC4 interaguje s DNA ligasou IV, která provádí konečnou ligaci konců DNA. Faktor podobný XRCC4 (XLF) nebo Cernunnos pracuje ve spojení s XRCC4 a DNA ligasou IV a zvyšuje účinnost ligace.

Fosforylace faktorů NHEJ, zejména pomocí DNA-PKcs, reguluje jejich aktivitu a interakce. Ubikvitinace a SUMOylace rovněž hrají roli při modulaci stability a funkce složek NHEJ. NHEJ funguje v průběhu celého buněčného cyklu, ale je důležitá zejména ve fázi G1, kdy není k dispozici žádná sesterská chromatida pro HR^{86, 87, 88}.

2.5. 53bp1

53bp1 (p53-binding protein 1) je klíčový protein, který se podílí na buněčné odpovědi na poškození DNA, zejména na opravě DSB. Hraje významnou roli při udržování rovnováhy mezi výběrem cesty opravy, stabilitou genomu a správné regulaci buněčného cyklu^{89, 90}.

53bp1 hraje klíčovou roli při rozpoznávání a navazování DSB. Do poškozených míst DNA se váže prostřednictvím interakce se specifickými modifikacemi histonů, zejména H4K20me2 a γ -H2AX (fosforylovaný histon H2AX), které jsou markery poškození DNA. Tento proces navázání je zprostředkován tudorovými doménami 53bp1, které se specificky vážou na tyto modifikované histony. Po navázání vytváří 53bp1 v místech poškození jaderná ohniska, která poskytují platformu pro shromáždění dalších proteinových komplexů nezbytných pro opravu DNA⁸⁹.

53bp1 má klíčovou úlohu během opravy DNA pomocí NHEJ, která přímo spojuje poškozené konce DNA, aniž by potřebovala homologní předlohu. 53bp1 stabilizuje přerušené konce DNA a chrání je před nadměrnou resekci. Toto je nezbytný krok pro podporu NHEJ oproti HR. Interaguje s dalšími proteiny v dráze NHEJ, jako jsou Ku70/80 a DNA-PKcs, a usnadňuje tak navázání a stabilizaci těchto opravných faktorů v místech DSB^{89, 90}.

53bp1 naopak inhibuje cestu HR, což je alternativní mechanismus opravy DSB vyžadující homologní templát. Tím, že 53bp1 zabraní rozsáhlé resekci konců DNA, antagonizuje protein BRCA1, který podporuje resekci konců a HR. Takto je zajištěno, že NHEJ je preferovanou opravnou cestou, zejména ve fázi G1 buněčného cyklu, kde není k dispozici žádná sesterská chromatida pro HR. Inhibicí koncové resekce 53bp1 nepřímo řídí aktivitu HR faktorů a udržuje rovnováhu mezi NHEJ a HR^{91, 92}.

53bp1 ovlivňuje strukturu chromatinu v místech DSB, aby usnadnil opravu DNA. Interaguje s různými modifikátory chromatinu a remodelačními komplexy, čímž se DNA stává přístupnější pro opravné stroje. Tato role je pro správnou opravu DNA zásadní, protože vytváří příznivé prostředí pro navázání a působení dalších opravných proteinů⁹³.

53bp1 se podílí na aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu, což umožňuje buňkám zastavit progresi a opravit poškození DNA. V reakci na poškození DNA hraje významnou roli při aktivaci kontrolních bodů G1/S a G2/M, čímž poskytuje buňce čas na opravu před pokračováním dělení⁹⁴.

2.5.2. Klinický význam

53bp1 působí jako nádorový supresor tím, že udržuje stabilitu genomu. Ztráta nebo mutace 53bp1 může vést ke zvýšené genomové nestabilitě a vyššímu riziku vzniku rakoviny⁹⁵. Jeho antagonistický vztah s BRCA1 je zvláště důležitý u rakoviny prsu a vaječníků, kde jsou mutace BRCA1 časté. Pochopení tohoto vztahu má zásadní význam pro biologii rakoviny⁹⁶.

2.5.3. Terapeutické důsledky

Buňky nádorů s nefunkční HR, jako jsou nádory s mutacemi BRCA1/2, jsou více závislé na NHEJ. Cílení na 53bp1 u těchto nádorů může změnit rovnováhu opravných drah a potenciálně senzibilizovat buňky vůči látkám poškozujícím DNA. Díky zapojení 53bp1 do oprav DSB je také tento protein cílem pro zvýšení citlivosti nádorových buněk na radioterapii^{97, 98, 99}.

3. Cíle

Bakalářská práce byla rozdělena do čtyř částečných cílů.

1. Získat jadernou frakci z lyzátu GH1 buněk
2. Optimalizovat podmínky imunoprecipitace
3. Ověřit účinnost transfekce pomocí siRNA proti β -arrestinu 2
4. Identifikovat a kvantifikovat komplexy s 53bp1 po aktivaci TRH receptorů a sníženého množství β -arrestinu 2

4. Materiál a metody

4.1. Použité chemikálie

30% akrylamid/bis-akrylamid, Serva, Německo

β -arrestin-2 siRNA (sc-63299), Santa Cruz Biotechnology, USA

Antibiotický antimykotický roztok (AAS), Sigma-Aldrich, USA

Bissulfosukcinimidylsüberát (BS³), Thermo Fisher Scientific, USA

Bromfenolová modř, Serva, Německo

Negativní kontrolní siRNA (sc-37007), Santa Cruz Biotechnology, USA

Dimethyl sulfoxid (DMSO), Serva, Německo

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), Merck, Německo

Dithiotreitol (DTT), Sigma-Aldrich, USA

Dodecylsulfát sodný (SDS), Duchefa Biochemie, Nizozemsko

Fetální hovězí sérum (FBS), Thermo Fisher Scientific, USA

Filmy na vyvolávání, AFGA, Německo

Fosforečnan sodný (Na₃PO₄), Sigma-Aldrich, USA

GH1 buňky (CCL-82), ATCC, USA

- Živočišné buňky z potkana (*Rattus norvegicus*), epitelové buňky hypofýzy, pěstované při 37 °C a 5 % obsahu oxidu uhličitého

Glycerol, Sigma-Aldrich, USA

Glycin, Serva, Německo

Hexahydrát chloridu hořečnatého (MgCl₂·6H₂O), Serva, Německo

Hovězí sérový albumín (BSA), Sigma-Aldrich, USA

Hydrát disodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA) (D8284), Sigma-Aldrich, USA

Hydrogenfosforečnan sodný (Na₂HPO₄), Sigma-Aldrich, USA

Chlorid draselný (KCl), Lachema, Česká republika

Chlorid sodný (NaCl), Penta Chemicals, Česká republika

Imunoprecipitační souprava Dynabeads™ Protein G for Immunoprecipitation (10004D):
Invitrogen, USA

Ab vazebný pufr

Eluční pufr

Magnetické kuličky Dynabeads

Omývací pufr

Koňské sérum (H1138), Sigma-Aldrich, USA

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Serva, Německo

Kyselina N'-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2 ethansulfonová (HEPES), Serva, Německo

Lipofectamine RNAiMAX, Thermo Fisher Scientific, USA

Methanol, Serva, Německo

Médium Nutrient Mixture F-12 Ham, Sigma-Aldrich, USA

Nitrocelulózová membrána (Amersham Protran Premium 0,45 µm NC), Amersham, Německo

Nonidet P-40, Sigma-Aldrich, USA

Opti-MEM médium, Thermo Fisher Scientific, USA

Peroxodisíran amonný (APS), Serva, Německo

Precision Plus Protein™ Standards (161-0374), BIO-RAD, USA

Ponceau červeň, Merck, Německo

Sacharóza, Serva, Německo

Pentahydrát síranu mědnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Lach-Ner, Česká republika

Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder (26625), ThermoFisher, USA

Super Signal West Femto Luminol/Enhancer (34095), Thermo Fisher Scientific, USA

Super Signal West Femto Stable/Peroxide (34095), Thermo Fisher Scientific, USA

Sušené odtučněné mlíko, Nutri House, Česká republika

Tablety Compleat (25x koncentrovaný zásobní roztok ve vodě), Roche, Švýcarsko

Tablety Phosphostop (10x koncentrovaný zásobní roztok ve vodě), Roche, Švýcarsko

Taltirelin, Tocris Bioscience, UK

Temozolomid, Sigma-Aldrich, USA

Tetramethylethyldiamin (TEMED), Serva, Německo

Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Serva, Německo

Trypsin/EDTA, Sigma-Aldrich, USA

TWEEN 20, Serva, Německo

Tyrotropin uvolňující hormon (TRH) (P1319), Sigma-Aldrich, USA

Uhličitan sodný (Na_2CO_3) Sigma-Aldrich, USA

Vínan sodno-draselný, Lachema, Česká republika

Protilátky: 53bp1 (PA1-16565), Invitrogen, USA

γ -H2AX (sc-517348), Santa Cruz Biotechnology, USA

H3K27ac (4353), Cells Signaling Technology, USA

H3K27me3 (9733), Cells Signaling Technology, USA

Hexokinasal (ab-150423), Abcam, UK

LDH (sc-38781), Santa Cruz Biotechnology, USA

MDC1 (PA1-41131), Invitrogen, USA

MEK1/2 (9122), Cells Signaling Technology, USA

Na^+/K^+ -ATPasa (sc-48345), Santa Cruz Biotechnology, USA

NBS1 (sc-515069), Santa Cruz Biotechnology, USA

Chemikálie pro fosfoproteomickou analýzu

Chloroacetamid

Nanášecí pufr (2% acetonitril a 0,1% trifluoroctová kyselina v destilované vodě)

Oxid titaničitý (TiO_2)

Pufr mobilní fáze A (0,1% kyselina mravenčí v destilované vodě)

Pufr mobilní fáze B (0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu)

Tris(2-karboxyethyl)fosfin

Trypsin

4.2. Pufry a roztoky

Buněčné médium Nutrient Mixture F-12 Ham, 15 % koňské sérum, 2.5 % FBS

PBS pufr (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2.8 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4)

SLB 10 ml (4 ml 0,5 M Tris, pH 6,8; 4 ml glycerol, 0.8 g SDS, 3.1 g DTT, 8 mg bromfenolová modř, pH 6.8)

TBS pufr (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0)

4.3. Použité přístroje

Analytické váhy SBA 33; Scaltech; Německo

Stojánek DynaMag™-2, Invitrogen, USA

Tetra blotting modul; BIO RAD; USA

Centrifuga MIKRO 200R; Hettich Zentrifugen; Německo

Centrifuga UNIVERSAL 320R; Hettich Zentrifugen; Německo

Mini-PROTEAN Tetra Cell; BIO RAD; USA

Kultivační box; Sanyo, Japonsko

Kultivační láhve a destičky, Thermo Fisher Scientific; USA

Laminární box Clean Air, Schoeller Instruments; Česká republika

Magnetická míchačka RCT basic; IKA LABORATORTECHNIK; Německo

Mikroskop Dmi1; Leica Mikrosystems; Německo

Mikrocentrifuga Mini Star; VWR; USA

pH metr Seven Compact; Mettler Toledo; Švýcarsko

Předvážky KERN 572; UNIPRO-ALPHA C.S.; Česká republika

Přístroj na počítání buněk RWD C100-SE; RWD; Čína

Rotátor; FALC; Česká republika

Sonikátor UW 2070; BANDELIN Electronic; Německo

Sonikátor zdroj Sonopuls; BANDELIN Electronic; Německo

Spektrofotometr Synergy HT; BioTech; Česká republika

Třepačka Platform Shaker STR6; Stuart Scientific; UK

Třepačka IKAVORTEX 1; IKA; Německo

Ultracentrifuga Optima™ MAX – XP a rotor s fixním úhlem TLA-110, Beckman Coulter, USA

Výhřevný bloček Dri-Block® DB 2A; Techne; Francie

Vývojka Optimax

Zdroj pro elektroforézu a Western blot MP-300V; Cleaver scientific; UK

Přístrojové vybavení pro fosfoproteomickou analýzu

Krátké kolony C18 PepMap100, Thermo Fisher Scientific; USA

Nano kolony PepMap C18, Thermo Fisher Scientific; USA

Thermo Orbitrap Fusion, Thermo Fisher Scientific; USA

Použité softwary a webové databáze

Andromeda, Max Planck Institute, Martinsried, Německo

BioRender, www.biorender.com, Toronto, Canada

GraphPad Prism, Dotmatics, Boston, USA

ImageJ, National Institutes of Health a Laboratory for Optical and Computational Instrumentation

MaxQuant, Max Planck Institute, Martinsried, Německo

Perseus, Max Planck Institute, Martinsried, Německo

UniProt (www.uniprot.org)

4.4. Použité metody

4.4.1. Kultivace buněk

Pro experimenty byla použita buněčná linie GH1, odvozená od potkaních buněk hypofýzy. Buňky byly pěstovány v F-12 Ham médiu s 15% koňských sérem, 2,5% fetálním bovinním sérem a 1% AAS. Byly pasážovány pomocí roztoku trypsin/EDTA rozpuštěném v PBS v poměru 1:4. Pro kultivaci buněk byly používány plastové láhve s kultivační plochou 75 cm² anebo 12-jamkové destičky, kam bylo vždy nasazeno 5×10^5 buněk do jedné jamky. Buňky byly ovlivněny ligandy TRH receptoru, jako TRH a taltirelin, v koncentraci 1 μM po dobu 30 min. Temozolomid o koncentraci 400 μM působil po dobu 24 hod. Z důvodu rozpouštění temozolomidu v DMSO (konečná koncentrace DMSO v buněčném médiu 4%), bylo jako negativní kontrola použito působení 4% DMSO.

4.4.2. siRNA interference

Transfekce byla prováděná v 12-jamkové destičce. Do každé jamky bylo nasazeno 5×10^5 buněk. Pro přenos siRNA do buňky bylo použito činidlo Lipofectamine RNAiMAX, které bylo zředěno v Opti-MEM médiu a to smícháním 6 μl činidla Lipofectamine RNAiMAX se 100 μl Opti-MEM média. Následně byly naředěny 2 μl 10 μM siRNA se 100 μl Opti-MEM média. 100 μl naředěné siRNA bylo přidáno ke 100 μl naředěného činidla Lipofectamine RNAiMAX. Takto připravená směs byla inkubována po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 150 μl siRNA-lipidové komplexů do každé jamky s buňkami. To odpovídalo 15 pmol finální siRNA a 4,5 μl finálního Lipofectaminu RNAiMAX. Následovala inkubace buněk po dobu 24 hodin při 37 °C v 1 ml média bez séra a s tranfekční směsí. Po této inkubaci bylo přidáno do každé jamky 1 ml média s 30% koňským sérem a 5% FBS a buňky dále rostly po dobu 2 dnů, kdy byly sklizeny pro následnou analýzu.

4.4.3. Stanovení proteinů bicinchoninovou metodou

Stanovení proteinů pomocí BCA je založeno na principu, kdy peptidové vazby redukují v alkalickém prostředí měďnaté ionty Cu^{2+} na měďné iontu Cu^+ . BCA tvoří s měďnými ionty komplex s absorpčním maximem při vlnové délce 562 nm¹⁰⁰. Toto stanovení bylo použito při sklizení buněk z kultivační láhve s plochou 75 cm², kde bylo dostatečné množství buněčného lyzátu pro stanovení proteinů.

Činidlo A: 6.84 g bezvodý uhličitan sodný a 1.6 g vřivan sodno-draselný ve 100 ml destilované H₂O, pH 11,25

Činidlo B: 4 g BCA v 100 ml destilované H₂O

Činidlo C: 0.4 g pentahydrátu síranu měďnatého v 100 ml destilované H₂O

Pracovní roztok: 48% činidla B + 2% činidla C + 50% činidla A (v tomto pořadí)

Pracovní roztok byl vždy připravován čerstvý.

Byly připraveny standardní roztoky s BCA a BSA podle tabulky č. 4.1. a následně pipetovány do 96-jamkové mikrotitrační destičky v triplicátech. Následně byly vzorky 100x naředěny smícháním 5 μl vzorku se 495 μl vody. 100 μl takto připravených vzorků bylo pipetováno do mikrotitrační destičky v triplicátech. Do každé jamky (k standardům i vzorkům) bylo přidáno 100 μl pracovního roztoku. Vzorky byly zakryty, aby se zabránilo odpařování a byly inkubovány 30 minut při 60 °C. Po inkubování byl kryt odstraněn a vzorky byly změřeny na spektrofotometru Synergy HT při vlnové délce 562 nm. Množství proteinu bylo vypočteno z kalibrační křivky vyjadřující závislost absorbance na koncentraci proteinů pomocí programu Gen5.

Tabulka č. 4.1. Složení standardních roztoků s obsahem BCA a BSA

číslování standardu	BL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
μg BSA	0	0,2	0,5	1	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50
Zásobní BSA – 0,1 μg/μl (μl)	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
Zásobní BSA – 1 μg/μl (μl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
H ₂ O (μl)	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

4.4.4. Jednokroková frakcionace v lyzačním pufru NP-40

Buňky byly stočeny na centrifuze (Universal 320, Hettich) při 1800 rpm a 4 °C po dobu 10 min. Následně bylo přidáno 250 μl lyzačního pufru NP-40 (20 mM Tris-HCl, 137 nM NaCl, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, pH 8,0) obsahující inhibitor fosfatás Phosphostop a inhibitor proteás Complete. Buňky byly resuspendovány. Lýze probíhala 30 min na ledu. Po sonikaci pomocí tyčového sonikátoru (3x 10 s, při 60 % výkonu) byl lyzát centrifugován při 800 x g a 4 °C po dobu 10 minut. Supernatant představoval frakci s cytosolem. Pelet byl resuspendován v 200 μl lyzačního pufru NP-40 obsahující Phosphostop a Complete. Takto připravená směs představovala frakci obohacenou o jádra. Frakce byly po menších částech rozděleny do mikrozkušavek a byly zamrazeny v –80 °C.

4.4.5. Dvoukroková frakcionace s použitím nižších otáček

Pro tento typ frakcionace byly buňky kultivovány ve 12-jamkových destičkách, kdy každá jamka představovala jeden vzorek, který byl následně zpracováván samostatně. Pufry a postupy pro frakcionaci byly převzaty z publikace¹⁰¹. Buňky byly stočeny v mikrozkušavkách na centrifuze MIKRO 200R při 3500 rpm a 4 °C po dobu 10 minut. K peletu bylo přidáno 22,4 μl CEB pufr (10mM HEPES, 3 mM MgCl₂·6 H₂O, 14 mM KCl, 5% glycerol, 1 mM DTT, pH 7,5) s 0,2 % detergentem NP40, inhibitorem fosfatás Phosphostop a inhibitorem proteás Complete. Lýze probíhala na ledu po dobu 10 minut. Lyzát byl stočen na centrifuze MIKRO 200R při 15 000 rpm a 4 °C po dobu 5 minut. Supernatant byl odebrán a představoval frakci obohacenou o cytosol. K peletu bylo přidáno 22,4 μl NEB pufru (10 mM HEPES, 3 mM MgCl₂·6 H₂O, 400 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM DTT, pH 7,5) obsahující Phosphostop a Complete. Lýze peletu probíhala na ledu po dobu 30 minut. Lyzát byl stočen na centrifuze MIKRO 200R při 13 200 rpm a 4 °C po dobu 30 minut. Supernatant představoval frakci obohacenou o jaderné proteiny a pelet frakci s chromatinem. Frakce byly zamrazeny v –80 °C.

4.4.6. Dvoukroková frakcionace s použitím vysokých otáček

Tento postup je identický s předchozí dvoukrokovou frakcionací s výjimkou první centrifugace, kdy byla použita ultracentrifuga Optima™ MAX – XP (Beckman Coulter). Lyzát byl stočen při 86 000 x g a 4 °C po dobu 5 minut.

4.4.7. SDS elektroforéza

Použité pufrы:

Pufr 1 (1,5 M Tris, pH 8,8)

Pufr 2 (0,5 M Tris, pH 6,8)

Elektroforetický pufr (0,25 M Tris, 2 M glycin, 35 mM SDS)

SLB 10 ml (4 ml pufr 2, 4 ml glycerol, 0.8 g SDS, 3,1 g DTT, 8 mg bromfenolová modř, pH 6.8)

Elektroforetická skla byla vyčištěná pomocí ethanolu a umístěná do stojanu. První byl připravený rozdělovací gel (podle tabulky č. 4.2.), který byl po nalití do aparatury převrstvený směsí butanolu a vody (3:1). Po ztuhnutí gelu (přibližně 1 hod), byla směs butanolu a vody odmyta, gel byl propláchnut destilovanou vodou a vysušen pomocí filtračního papíru. Následně byl gel převrstven zaostřovacím gelem, který byl připraven smícháním 6 ml H₂O, 2,5 ml pufru 2, 1,3 ml 30% Ac-Bis, 90 μl 10% APS, 100 μl 10% SDS, 8 μl TEMED, do kterého byl ihned umístěn 10-jamkový hřeben. Gel polymeroval 30 minut. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byl hřeben vyjmut a gel byl umístěn do elektroforetické vany, kam byl nalit elektroforetický pufr. K jednotlivým vzorkům určeným na elektroforézu byl přidán vzorkový pufr SLB v poměru 3:1. Aby byly proteiny denaturovány, byly vzorky umístěny na 3 minuty na výhřevný bloček vyhřátý na 95°C. Do jednotlivých jamek v gelu byly vždy pipetovány 2 μl molekulárního standardu a vzorky v určeném pořadí. Vana byla zavřená elektroforetickým víkem a připojena ke zdroji elektrického napětí. Elektroforéza probíhala při 200 V po dobu 60 minut. Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut z aparatury a zaostřovací gel byl odstraněn. Gel s rozdělenými proteiny byl následně použit pro blotování.

Tabulka č. 4.2. Složení rozdělovacího gelu podle různých % gelu

	6 %	10 %	12 %
H ₂ O [ml]	10,7	8	6,7
Pufr 1 [ml]	5		
30% Ac-Bis [ml]	4	6	8
10% APS [μl]	90		
10% SDS [μl]	200		
TEMED [μl]	8		

4.4.8. Western blot

K černé části kazety pro Western blot byla umístěná porézní houba, tlustý filtrační papír, gel po elektroforéze, nitrocelulósová membrána, tlustý filtrační papír a porézní houba. Takhle připravená kazeta byla pečlivě namočená v přenosovém pufru (25 mM Tris, 190 mM glycin, 20% methanol) a uzavřena, následně byla vložena do aparatury naplněné přenosovým pufrem. Aparatura byla uzavřena víkem a připojena k elektrickému zdroji napětí. Elektropřenos probíhal při 100 V po dobu 60 minut. Po elektropřenosu byla membrána

opláchnutá vodou a obarvena pomocí Ponceau S (0,1% (w/v) v 5% kyselině octové (v/v)). Dále byla inkubovaná při pokojové teplotě 45 min na třepačce v blokovacím pufru, který byl připraven vždy čerstvý a to smícháním 1 ml TBS, 0,5 g sušeného mlíka, 10 μ l TWEEN 20 a 9 ml H₂O (množství je na jednu membránu). Následně byla membrána propláchnutá vodou a inkubovaná v ředícím pufru s primárními protilátkami (množství v tabulce č. 4.3.) přes noc při 4 °C na třepačce. Ředící pufr byl připraven smícháním 1 ml TBS, 0,1 g sušeného mlíka, 10 μ l TWEEN 20 a 9 ml H₂O (množství je na jednu membránu). Na druhý den byla membrána propláchnutá destilovanou vodou a následně proplachovaná 3x po 10 min v promývacím pufru, který byl připraven smícháním 100 ml TBS, 3 ml TWEEN 20 a 900 ml H₂O. Membrána byla inkubovaná v ředícím pufru se sekundárními protilátkami při pokojové teplotě 60 min. Následně byla membrána propláchnutá destilovanou vodou a opět proplachovaná 3x po 10 minut v promývacím pufru. Membrána byla následně připravena na vyvolání. Do mikrozkušavky byl připraven substrát na vyvolání, a to smícháním Super Signal West Femto Luminol/Enhancer a Super Signal West Femto Stable/Peroxide v poměru 1:1 (celkový objem pro jednu membránu činil 300 μ l substrátu). Substrát byl nanesen na membránu a působil 1 minutu, membrána byla následně osušená filtračním papírem a umístěná do kazety. Ve tmě byl na membránu do kazety položený fotografický film Agfa. Doba expozice se lišila podle intenzity signálu. Filmy byly následně vyvolány ve vyvolávacím přístroji Optimax. Membrány obarvené Ponceau a vyvolané filmy byly naskenovány a signály byly vyhodnoceny v programu ImageJ. Intenzity obarvení membrán pomocí Ponceau byly použity pro normalizaci Western blotů.

Tabulka č. 4.3. Ředění všech protilátek použitých při Western blotu

Protilátka	Ředění
53bp1	500x
MDC1	500x
NBS1	1000x
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	2000x
LDH	2000x
Hexokinasa 1	2000x
LDH	2000x
H3K27ac	2000x
H3K27me3	2000x

4.4.9. Ko-imunoprecipitace

Ko-imunoprecipitace byly provedeny pomocí systému magnetického stojánku pro navázání magnetických kuliček s navázaným proteinem G. Magnetické kuličky byly resuspendovány 30 sekund na vortexu. Do každé mikrozkušavky bylo přeneseno 50 μ l magnetických kuliček. Mikrozkušavky byly umístěny na magnetický stojan, po navázání kuliček na magnet byl odebrán supernatant. Mikrozkušavky byly odebrané z magnetu. Protilátky (5 nebo 2 μ g na vzorek) byly zředěny v 200 μ l Ab vazebného pufru a přidány k magnetickým kuličkám do mikrozkušavek. Směs byla promíchána na vortexu a dále inkubovaná na rotátoru 1 hodinu při pokojové teplotě. Po každém vyjmutí z rotátoru byly

vzorky na 4 sekundy stočeny na stolní mikrocentrifuze. Mikrozkumavky byly umístěny na magnet a byl odebrán supernatant. Následně byly magnetické kuličky zesíťované s primárními protilátkami použitím 5 mM BS³ v 250 µl konjugačního pufru (20 mM Na₃PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,0) po dobu 30 minut na rotátoru při pokojové teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 12,5 µl zhášecího pufru (1 M Tris, pH 7,5) a rotováním po dobu 10 minut na rotátoru. Následovalo promývání 200 µl PBS-T pufrem (137 NaCl, 2,7 mM KCl, 2,8 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, 0,02% TWEEN 20, pH 7,4). Každý vzorek lyzátu byl naředěn lyzačním NP-40 pufrem na objem 500 µl. K připraveným magnetickým kuličkám s protilátkami, byl přidán lyzát po frakcionaci, který obsahoval antigen. Takto připravené vzorky byly inkubovány 1 hod na rotátoru při pokojové teplotě. Mikrozkumavky byly umístěny na magnet, supernatant byl převeden do čistých mikrozkumavek a uschován na další analýzu. Magnetické kuličky byly promývány 3x po 200 µl omývacího pufru, mezi každým promýváním byl supernatant odstraněn na magnetu a následně byly kuličky resuspendovány na vortexu. Pro eluci antigenu byly magnetické kuličky resuspendovány ve 100 µl omývacího pufru a převedeny do čistých mikrozkumavek. Podle protokolu výrobce byly vyzkoušeny dva typy eluce, které se lišily teplotními podmínkami.

Denaturační eluce – Mikrozkumavky byly umístěny na magnet a byl odstraněn supernatant. K magnetickým kuličkám bylo přidáno 20 µl elučního pufru a 6,6 µl vzorkového pufru SLB. Směs byla resuspendována a zahřata po dobu 10 minut při 70 °C. Supernatant byl převeden do čistých mikrozkumavek, vzorky byly následně naneseny na gel a elektroforeticky rozděleny.

Nedenaturační eluce – Mikrozkumavky byly umístěny na magnet a byl odstraněn supernatant. K magnetickým kuličkám bylo přidáno 20 µl elučního pufru a resuspendováno. Směs byla inkubována na rotátoru 2 min při pokojové teplotě. Supernatant byl převeden do čistých mikrozkumavek. Vzorky byly smíchány se 6,6 µl vzorkového pufru SLB a denaturovány při 95 °C po dobu 3 minut. Vzorky byly následně použity pro elektroforézu.

4.4.10. Hmotnostní spektrometrie ve spojení s nanoprůtokovou kapalinovou chromatografií (nLC-MS)

Pro zjištění vlivu TRH a taltirelinu při různém buněčném množství β-arrestinu 2 na fosfoproteom GH1 buněk byla využita hmotnostní spektrometrie ve spojení s nanoprůtokovou kapalinovou chromatografií (nLC-MS). Pro kvantifikaci množství proteinů byla vybrána metoda neznačené kvantifikace, při které není potřeba proteiny dopředu označit izotopy nebo izobarickými značkami. Tato analýza byla provedena v OMICS Servisním oddělení hmotnostní spektrometrie v centru BIOCEV (Praha). Pelety buněk o hmotnosti přibližně 500 µg byly sonikovány tyčovým sonikátorem a zahřaty v 100 mM roztoku Tris (pH 8,5) obsahujícím 2% deoxycholát sodný při 95 °C po dobu 10 minut. Ke vzorkům byl přidán 40 mM chloroacetamid a 10 mM tris(2-karboxyethyl)fosfin. Koncentrace proteinů ve vzorcích byla změřena stanovením proteinů pomocí BCA. Bylo odebráno 250 µg proteinů na vzorek. Proteiny byly rozštěpeny 5 µg trypsinu přes noc při 37 °C. Pro extrakci fosfoproteinů byl využit oxid titaničitý, který je nerozpustný ve vodě a v kyselém pH má pozitivní náboj, a tak může vázat záporně nabitě fosfoproteiny¹⁰².

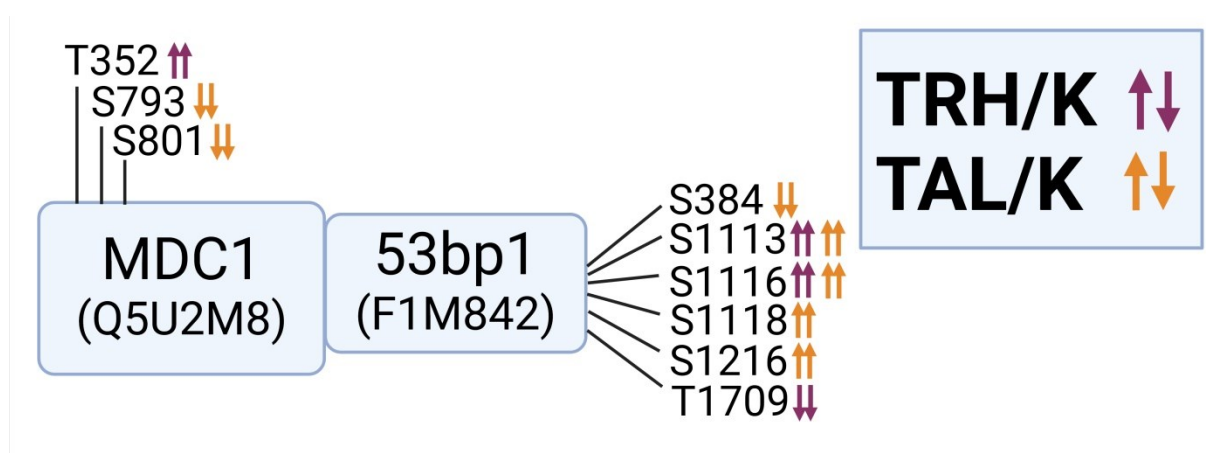
Pro nanoprůtokovou kapalinovou chromatografii byly použity nano kolony PepMap C18. Pufr mobilní fáze A obsahoval 0,1% kyseliny mravenčí v destilované vodě, zatímco pufr mobilní fáze B byla rozpuštěná 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu. Nanášecí pufr obsahující 2% acetonitril a 0,1% trifluoroctovou kyselinu v destilované vodě byl se vzorky nanesen na krátké kolony C18 PepMap100. Dávkování vzorků probíhalo rychlostí 18 $\mu\text{l}/\text{min}$ po dobu 4 minut. Peptidy byly z kolony získávány pomocí gradientové eluce od 2% po 35% koncentraci mobilní fáze B. Eluované peptidové kationty z kapalně fáze byly přeměněny do plynné fáze pomocí elektrosprejové ionizace a analyzované pomocí přístroje Thermo Orbitrap Fusion. Pro detekci peptidů byla provedena tandemová MS/MS. Orbitrap byl nastaven na rozlišení 120 K (při 200 m/z) pro skenování peptidových prekursorů od 350 do 1400 m/z . Ionty byly přeměněny na fragmentované ionty pomocí vysokoenergetické srážkové disociace. Tyto fragmenty byly rozděleny pomocí druhého hmotnostního spektrometru podle m/z a detekovány. MS/MS spektra byla vyhledána v databázi příslušící *Rattus norvegicus* pomocí vyhledávače Andromeda. Analýza, kvantifikace a statistika dat byla provedena pomocí softwarových platforem MaxQuant a Perseus^{103, 104, 105}. Další analýza včetně grafického vyobrazení byla provedena v Laboratoři membránových receptorů a buněčné signalizace na Katedře fyziologie PřF UK (Praha). Rozdíly ve fosforylaci proteinů v párových porovnáních byly definovány jako kvantitativní a kvalitativní. Kvalitativní změnou byla označena detekce fosforylace pouze v jedné experimentální skupině párového porovnání, a to při detekci alespoň ve dvou vzorcích z biologického triplikátu. Kvantitativní změnou byla označena detekce alespoň dvojnásobného rozdílu ve fosforylaci mezi experimentálními skupinami párového porovnání, kdy protein byl detekován alespoň ve dvou vzorcích z biologického triplikátu. Výsledná data byla zobrazena vytvořením grafického znázornění změn ve fosforylaci u různých fosforylačních míst v aminokyselinové sekvenci proteinů pomocí softwarového nástroje BioRender.

5. Výsledky

5.1. Fosfoproteomická analýza

Pomocí fosfoproteomické analýzy bylo zjištěno, že po aktivaci TRH receptorů, při různé expresi β -arrestinu 2, dochází ke změnám ve fosforylačních vzorcích 53bp1 a MDC1. Na základě tohoto zjištění jsme se rozhodli sledovat, zda mohou tyto změny ve fosforylaci souviset se změnami v interakci mezi 53bp1 a MDC1. Na následujících obrázcích jsou zobrazeny výsledky z fosfoproteomické analýzy (Obr. č. 5.1., 5.2., 5.3.).

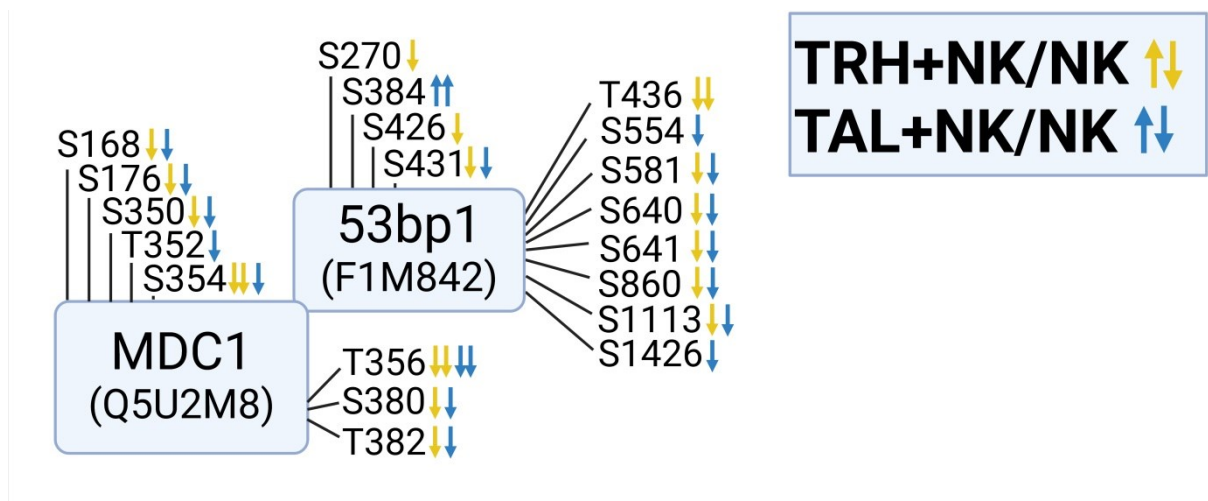
V kontrolních buňkách ovlivnily oba ligandy fosforylační vzorce obou sledovaných proteinů, přičemž se fosforylační vzorce pro TRH a TAL liší (Obr. č. 5.1.). Větší vliv na fosforylaci vykázal TAL. Více změn ve fosforylaci bylo sledováno u proteinu 53bp1.



Obrázek č. 5.1. Fosforylační změny fosfoproteinů 53bp1 a MDC1 po aktivaci TRH receptoru tyroliberinem (TRH, 1 μ M, 30 min) nebo taltirelinem (TAL, 1 μ M, 30 min) vztahované ke kontrole v GH1 buněčné linii. Fosfoproteiny 53bp1 a MDC1 jsou znázorněny pomocí názvu genu společně s identifikačním číslem podle databáze UniProt (www.uniprot.org). Fosfomísta, která byla ovlivněna, jsou znázorněna zkratkou aminokyseliny (S, serin; T, threonin) a pozicí v aminokyselinové sekvenci proteinu. Šipky ve směru nahoru znázorňují vzrůst fosforylace po ovlivnění, zatímco šipky ve směru dolů pokles fosforylace po ovlivnění. Dvě šipky představují kvalitativní změnu, zatímco jedna šipka představuje kvantitativní změnu. Jednotlivá párová porovnání jsou odlišena barvami (párové porovnání TRH/K, fialová; TAL/K, oranžová).

Zkratky: TRH – GH1 buněčná linie ovlivněná tyroliberinem; TAL – GH1 buněčná linie ovlivněná taltirelinem; K – GH1 buněčná linie bez ovlivnění

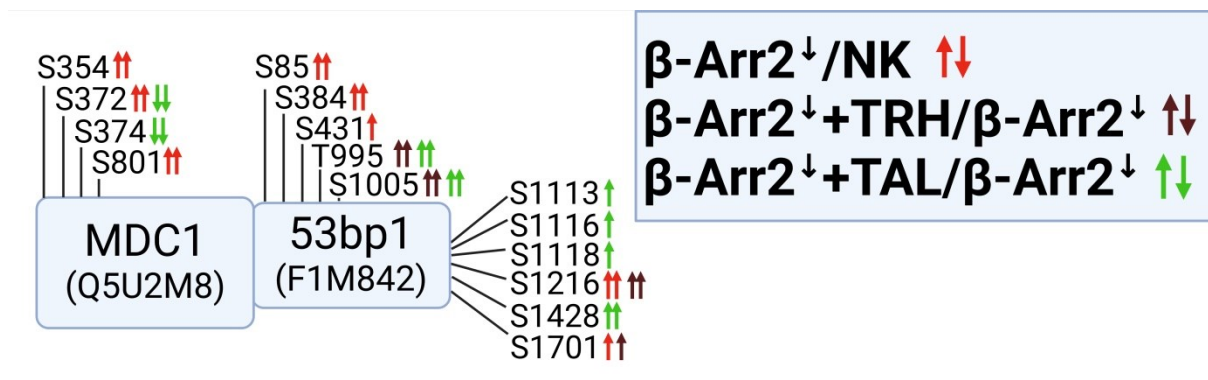
U negativní kontroly ovlivnily oba ligandy fosforylační vzorce obou sledovaných proteinů, přičemž některé fosforylační vzorce jsou pro TRH a TAL stejné (Obr. č. 5.2.). Opět bylo více změn ve fosforylaci sledováno u proteinu 53bp1.



Obrázek č. 5.2. Fosforylační změny fosfoproteinů 53bp1 a MDC1 po aktivaci TRH receptoru tyroliberinem (TRH, 1 μ M, 30 min) nebo taltirelinem (TAL, 1 μ M, 30 min) vztažené ke kontrole v GH1 buněčné linii transfekované negativní siRNA. Fosfoproteiny 53bp1 a MDC1 jsou znázorněny pomocí názvu genu společně s identifikačním číslem podle databáze UniProt (www.uniprot.org). Fosfomísta, která byla ovlivněna, jsou znázorněna zkratkou aminokyseliny (S, serin; T, threonin) a pozicí v aminokyselinové sekvenci proteinu. Šipky ve směru nahoru znázorňují vzrůst fosforylace po ovlivnění, zatímco šipky ve směru dolů pokles fosforylace po ovlivnění. Dvě šipky představují kvalitativní změnu, zatímco jedna šipka představuje kvantitativní změnu. Jednotlivá párová porovnání jsou odlišeny barvami (párové porovnání TRH+NK/NK, žlutá; TRH+NK/NK, modrá).

Zkratky: TRH+NK – GH1 buněčná linie transfekovaná negativní siRNA a následně ovlivněná tyroliberinem; TAL+NK – GH1 buněčná linie transfekovaná negativní siRNA a následně ovlivněná taltirelinem; NK – GH1 buněčná linie transfekovaná negativní siRNA

V buňkách transfekovaných siRNA cílené proti β -arrestinu 2 ovlivnili oba ligandy fosforylační vzorce obou sledovaných proteinů, přičemž se fosforylační vzorce pro TRH a TAL liší (Obr. č. 5.3.). Na obrázku jsou vidět i změny při sníženém množství β -arrestinu 2 oproti negativní kontrole. Vidíme tedy, že i ovlivnění buněk siRNA cílenou proti β -arrestinu 2 způsobuje změny ve fosforylačních vzorcích obou proteinů. Více změn ve fosforylaci bylo sledováno u proteinu 53bp1.



Obrázek č. 5.3. Fosforylační změny fosfoproteinů 53bp1 a MDC1 po aktivaci TRH receptoru tyroliberinem (TRH, 1 μ M, 30 min) nebo taltirelinem (TAL, 1 μ M, 30 min) vztažené ke kontrole GH1 buněčné linie transfekované siRNA cílené proti β -arrestinu 2. Fosfoproteiny 53bp1 a MDC1 jsou

znázorněny pomocí názvu genu společně s identifikačním číslem podle databáze UniProt (www.uniprot.org). Fosfomísta, která byla ovlivněna, jsou znázorněna zkratkou aminokyseliny (S, serin; T, threonin) a pozicí v aminokyselinové sekvenci proteinu. Šipky ve směru nahoru znázorňují vzrůst fosforylace po ovlivnění, zatímco šipky ve směru dolů pokles fosforylace po ovlivnění. Dvě šipky představují kvalitativní změnu, zatímco jedna šipka představuje kvantitativní změnu. Jednotlivá párová porovnání jsou odlišeny barvami (párové porovnání β -Arr2[↓]/NK, červená; β -Arr2[↓]+TRH/ β -Arr2[↓], hnědá; β -Arr2[↓]+TAL/ β -Arr2[↓], zelená).

Zkratky: β -Arr2[↓] – GH1 buněčná linie transfekovaná siRNA cílenou proti β -arrestinu 2; NK – GH1 buněčná linie transfekovaná negativní siRNA; β Arr2[↓]+TRH – GH1 buněčná linie transfekovaná siRNA cílenou proti β -arrestinu 2 a následně ovlivněná thyroliberinem; β Arr2[↓]+TAL – GH1 buněčná linie transfekovaná siRNA cílenou proti β -arrestinu 2 a následně ovlivněná taltirelinem

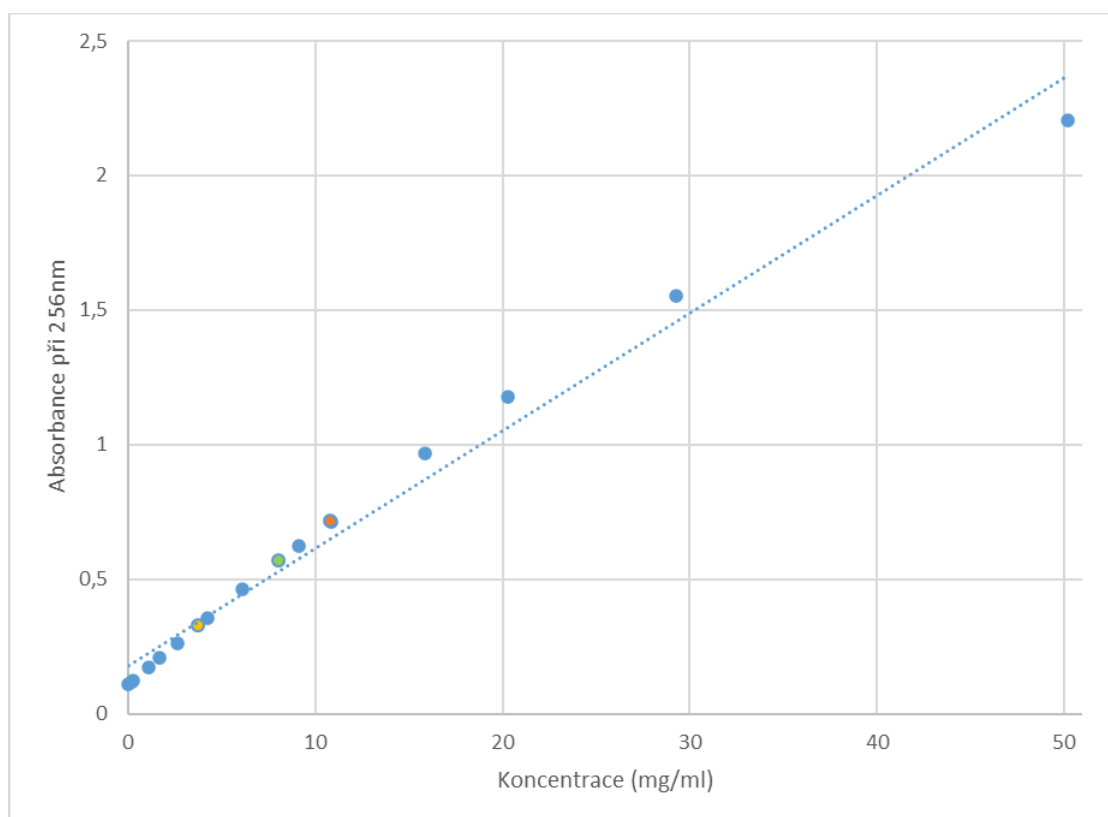
5.2. Frakcionace

Prvním cílem bylo oddělit jadernou frakci z buněčného lyzátu. Celkem byly otestovány tři různé postupy frakcionace, které se lišily použitými pufrů pro lýzi buněk a velikostí relativní odstředivé síly. Při jednokrokové frakcionaci byla lýze buněk provedena použitím lyzačního pufru NP-40 společně se sonikací. Nicméně kombinace této lýze s použitím odstředivé síly 820 x g při centrifugaci se ukázala jako neúčinná pro oddělení jader od cytosolu. Při dvoukrokové frakcionaci byly použity cytosolární a nukleární extrakční pufrů v kombinaci se dvěma centrifugacemi s různými relativními odstředivými silami. Pro účinné oddělení jader od cytosolu se ukázalo jako nezbytné použít v prvním kroku centrifugaci s vysokou relativní odstředivou silou (86 000 x g), která byla provedena v ultracentrifuze Optima™ MAX – XP.

5.2.1. Jednokroková frakcionace v lyzačním pufru NP-40

5.2.1.1. Stanovení proteinů bicinchoninovou metodou

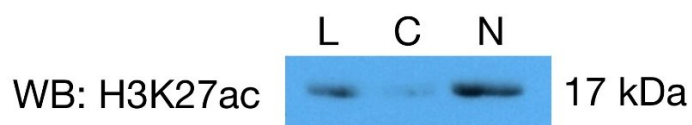
Tato metoda byla využita pouze při jednokrokové frakcionaci v lyzačním pufru NP-40. Pro tuto frakcionaci bylo sklizeno $2,1 \times 10^7$ buněk. Vzorky byly nanášeny na gely v množství 20 μ g vzorku na jamku. Koncentrace lyzátu byla stanovena na 8,1 μ g/ μ l, koncentrace proteinů v solubilní frakci byla stanovena na 10,8 μ g/ μ l a koncentrace proteinů v peletu 3,7 μ g/ μ l. Z výsledků je vidět, že proteiny se nejvíc koncentrují v solubilní frakci a menší množství proteinů je stočeno do peletu.



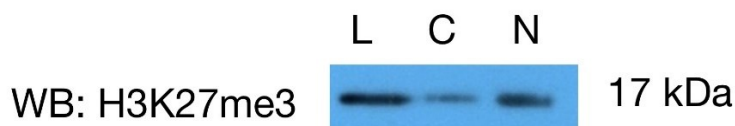
Graf č. 5.1. Lineární závislosti koncentrace proteinů na absorbanci. Vynesené modré body představují jednotlivé standardy, barevné body představují buněčný lysát (zelená), solubilní frakci (oranžová) a pelet (žlutá), jednotlivé vzorky byly použity z jedнокrokové frakcionace v lyzačním pufru NP-40.

5.2.1.2. Stanovení účinnosti jedнокrokové frakcionace v lyzačním pufru NP-40

V prvním postupu byl lysát rozdělen jen na dvě frakce. Předpokládali jsme, že rozpustná frakce (supernatant) získaná při centrifugaci představuje frakci s cytosolem. Získaný pelet měl představovat frakci s jádry. Jako ověření, jestli frakcionace proběhla správně, byla použita elektroforéza s následným imunoblotem. Bylo sledováno, jestli se vybrané proteiny nacházejí ve frakci, kde byly očekávány. Pro detekci byl vybrán acetylovaný histon H3K27ac a trimetylovaný histon H3K27me3, jako zástupci proteinů lokalizovaných pouze v jádře. Dále byly detekovány jaderné proteiny 53bp1 a MDC1, jejichž interakce měla být sledována pomocí imunoprecipitace. Oba histony se nacházely primárně v jaderné frakci, avšak část zůstala i ve vrchní cytosolární frakci (Obr. 5.4. a 5.5.). Protein 53bp1 byl detekován v obou frakcích (Obr. 5.6) a protein MDC1 pouze v cytosolární frakci (Obr. 5.7). Tyto výsledky jasně naznačily, že tento postup nebude vhodný pro oddělení jader od cytosolu.



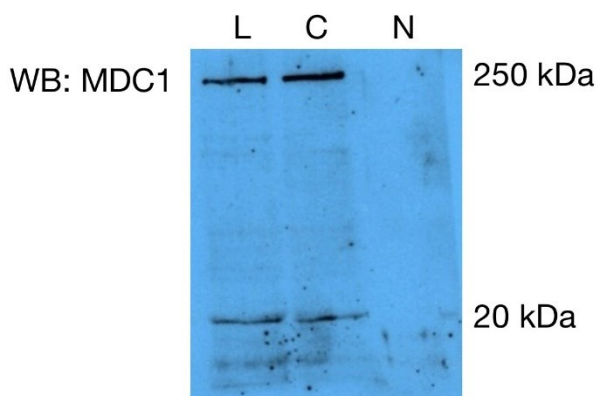
Obrázek č. 5.4. Detekce H3K27ac pomocí elektroforézy (15% gel) a imunoblotu po expozici 2 s. Nachází se primárně ve frakci s jádry (dráha č. 1: L – lysát, dráha č. 2: C – frakce s cytosolem, dráha č. 3: N – jaderná frakce)



Obrázek č. 5.5. Detekce H3K27me3 pomocí elektroforézy (15% gel) a imunoblotu po expozici 2 s. Nachází se primárně ve frakci s jádry (dráha č. 1: L – lyzát, dráha č. 2: C – frakce s cytolem, dráha č. 3: N – jaderná frakce)



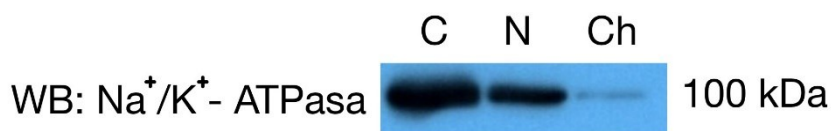
Obrázek č. 5.6. Detekce 53bp1 pomocí elektroforézy (6% gel) a imunoblotu po expozici 50 min. Nachází se primárně v obou frakcích (dráha č. 1: L – lyzát, dráha č. 2: C – frakce s cytolem, dráha č. 3: N – jaderná frakce)



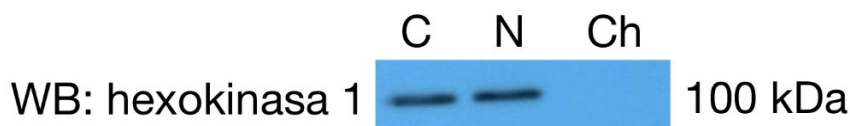
Obrázek č. 5.7. Detekce MDC1 pomocí elektroforézy (6% gel) a imunoblotu po expozici 50 min. Nachází se primárně ve frakci s cytolem (dráha č. 1: L – lyzát, dráha č. 2: C – frakce s cytolem, dráha č. 3: N – jaderná frakce)

5.2.3. Stanovení účinnosti dvoukrokové frakcionace s použitím nižších otáček

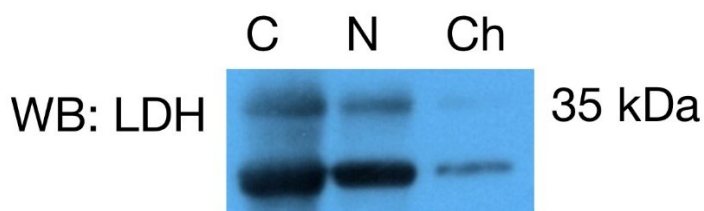
Tímto postupem frakcionace byly izolovány tři různé frakce. Předpokládali jsme, že první frakce bude obsahovat cytosolární proteiny, druhá jaderné proteiny a třetí chromatin. Ověření bylo rovněž provedeno pomocí elektroforézy a následného Western blotu. Pro zjištění účinnosti oddělení cytosolu od jader byly detekovány Na^+/K^+ -ATPasa lokalizovaná v plasmatické membráně, hexokinasa 1 lokalizovaná v cytosolu a vnější mitochondriální membráně, laktátdehydrogenasa (LDH) lokalizovaná v cytoplasmě a jaderný protein 53bp1. Na^+/K^+ -ATPasa (Obr. 5.8), hexokinasa 1 (Obr. 5.9) a LDH (Obr. 5.10) byly detekovány s největší intenzitou v první frakci, avšak jejich přítomnost byla detekována i v dalších frakcích. Protein 53bp1 (Obr. 5.11) se rovněž nachází ve všech frakcích, s největší intenzitou signálu v poslední frakci, představující chromatin. Detekce proteinů lokalizovaných v cytoplasmě se v jednotlivých frakcích překrývala s detekcí jaderného proteinem 53bp1, a proto bylo vyhodnoceno, že ani tato frakcionace není vhodná pro oddělení jaderných proteinů od cytosolu.



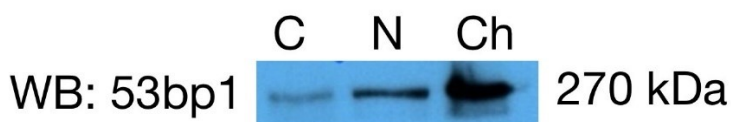
Obrázek č. 5.8. Detekce Na^+/K^+ -ATPasy pomocí elektroforézy (6% gel) a imunoblotu po expozici 2 s. Nachází se primárně ve frakci s cytosolem (dráha č. 1: C – frakce s cytosolem, dráha č. 2: N – jaderná frakce, dráha č. 3: Ch – frakce s chromatinem)



Obrázek č. 5.9. Detekce hexokinasy 1 pomocí elektroforézy (6% gel) a imunoblotu po expozici 2 s. Nachází se ve frakci s cytosolem a jaderné frakci (dráha č. 1: C – frakce s cytosolem, dráha č. 2: N – jaderná frakce, dráha č. 3: Ch – frakce s chromatinem)



Obrázek č. 5.10. Detekce LDH pomocí elektroforézy (10% gel) a imunoblotu po expozici 2 s. Nachází se primárně ve frakci s cytosolem (dráha č. 1: C – frakce s cytosolem, dráha č. 2: N – jaderná frakce, dráha č. 3: Ch – frakce s chromatinem)



Obrázek č. 5.11. Detekce 53bp1 pomocí elektroforézy (6% gel) a imunoblotu po expozici 2 s. Nachází se primárně ve frakci s jádry (dráha č. 1: C – frakce s cytosolem, dráha č. 2: N – jaderná frakce, dráha č. 3: Ch – frakce s chromatinem)

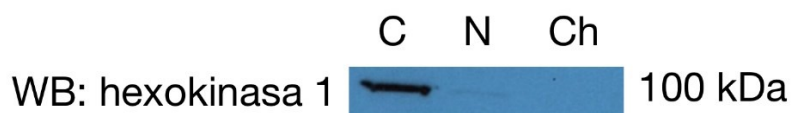
5.2.4. Stanovení účinnosti dvoukrokové frakcionace s použitím vysokých otáček

Na základě těchto výsledků byl vyzkoušen třetí postup frakcionace, který se lišil od druhého postupu pouze zvýšením otáček (86 000 x g) během první centrifugace. Rovněž byly získány tři frakce jako při druhém postupu. MEK 1/2, hexokinasa 1, LDH a Na^+/K^+ -ATPasa byly použity jako cytoplasmatické markery, zatímco 53bp1, MDC1, H3K27ac a H3K27me3 jako jaderné markery. Imunosignály pro MEK1/2 (Obr. 5.12), hexokinasu 1 (obr. 5.13), LDH (Obr. 5.14) a Na^+/K^+ -ATPasu (Obr. 5.15) byly detekovány pouze v první frakci. Imunosignál pro MDC1 (Obr. 5.16) byl detekován v první i druhé frakci, velmi slabě ve třetí frakci. Bylo detekováno několik pruhů s nižší molekulární velikostí než 250 kDa, není jasné, zda jde o nespecifity nebo fragmenty proteinu MDC1. Protein 53bp1 (Obr. 5.17) byl detekován ve druhé frakci a velmi slabě i ve třetí frakci. Histony H3K27ac (Obr. 5.18) a H3K27me3 (Obr.

5.19) pouze ve třetí frakci. Z těchto výsledků je zjevné, že chromatin byl oddělen od cytoplasmy.



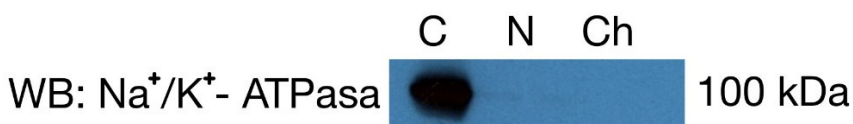
Obrázek č. 5.12. Detekce MEK 1/2 pomocí elektroforézy (10% gel) a imunoblotu po expozici 20 s. Nachází se pouze ve frakci s cytosolem (dráha č. 1: C – frakce s cytosolem, dráha č. 2: N – jaderná frakce, dráha č. 3: Ch – frakce s chromatinem)



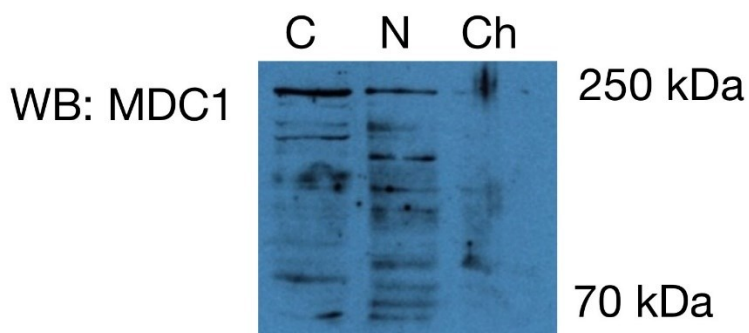
Obrázek č. 5.13. Detekce hexokinasy 1 pomocí elektroforézy (6% gel) a imunoblotu po expozici 2 s. Nachází se pouze ve frakci s cytosolem (dráha č. 1: C – frakce s cytosolem, dráha č. 2: N – jaderná frakce, dráha č. 3: Ch – frakce s chromatinem)



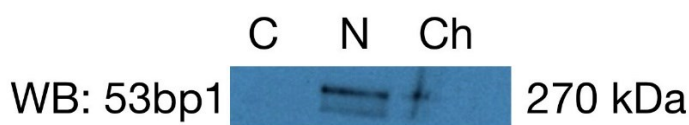
Obrázek č. 5.14. Detekce LDH pomocí elektroforézy (10% gel) a imunoblotu po expozici 2 s. Nachází se pouze ve frakci s cytosolem (dráha č. 1: C – frakce s cytosolem, dráha č. 2: N – jaderná frakce, dráha č. 3: Ch – frakce s chromatinem)



Obrázek č. 5.15. Detekce Na⁺/K⁺-ATPasy pomocí elektroforézy (6% gel) a imunoblotu po expozici 1 s. Nachází se pouze ve frakci s cytosolem (dráha č. 1: C – frakce s cytosolem, dráha č. 2: N – jaderná frakce, dráha č. 3: Ch – frakce s chromatinem)



Obrázek č. 5.16. Detekce MDC1 pomocí elektroforézy (6% gel) a imunoblotu po expozici 1 min. Nachází se ve frakci s cytosolem a v jaderné frakci (dráha č. 1: C – frakce s cytosolem, dráha č. 2: N – jaderná frakce, dráha č. 3: Ch – frakce s chromatinem)



Obrázek č. 5.17. Detekce 53bp1 pomocí elektroforézy (6% gel) a imunoblotu po expozici 1 s. Nachází se primárně ve frakci s jádru (dráha č. 1: C – frakce s cytosolem, dráha č. 2: N – jaderná frakce, dráha č. 3: Ch – frakce s chromatinem)

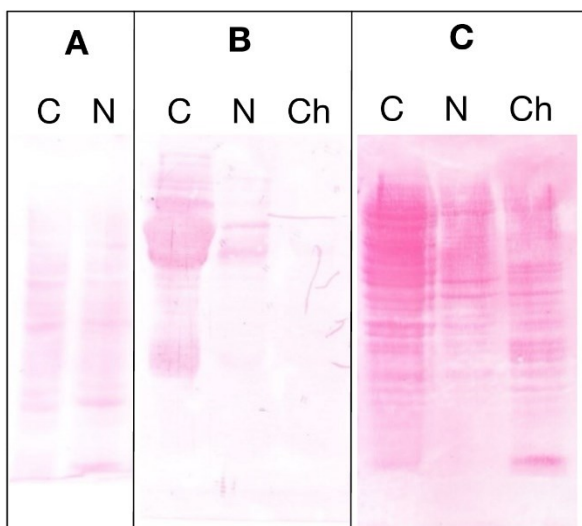


Obrázek č. 5.18. Detekce H3K27ac pomocí elektroforézy (15% gel) a imunoblotu po expozici 1 min. Nachází se pouze ve frakci s chromatinem (dráha č. 1: C – frakce s cytosolem, dráha č. 2: N – jaderná frakce, dráha č. 3: Ch – frakce s chromatinem)



Obrázek č. 5.19. Detekce H3K27me3 pomocí elektroforézy (15% gel) a imunoblotu po expozici 2 s. Nachází se pouze ve frakci s chromatinem (dráha č. 1: C – frakce s cytosolem, dráha č. 2: N – jaderná frakce, dráha č. 3: Ch – frakce s chromatinem)

Dalším ověřením odlišnosti různých postupů frakcionace bylo obarvení membrán po Western blotu pomocí červeně Ponceau (Obr. 5.20). Při jednokrokové frakcionaci v lyzačním pufru NP-40 nejsou velké rozdíly mezi frakcemi a je vidět, že profily obarvených proteinů jsou velmi podobné v obou frakcích (Obr. 5.20A). Při dvoukrokové frakcionaci s použitím nižších otáček neobsahovala frakce s chromatinem téměř žádné proteiny (Obr. 5.20B). Většina proteinů zůstala v první frakci, což ukazuje neúčinnost první centrifugace provedené s nižší relativní odstředivou silou. Při dvoukrokové frakcionaci s použitím vysokých otáček jsou vidět evidentní rozdíly mezi jednotlivými frakcemi, je možné vidět pruhy představující proteiny, které se nachází jen v jedné frakci (Obr. 5.20C).



Obrázek č. 5.20. Zjištění účinnosti rozdělení proteinů pomocí jednokrokové frakcionace v lyzačním pufu NP-40 (A), dvoukrokové frakcionace s použitím nižších otáček (B) a dvoukrokové frakcionace s použitím vysokých otáček (C). Proteiny byly rozděleny pomocí elektroforézy (10% gel) a detekovány následným Western blotem a obarvením Ponceau červení.

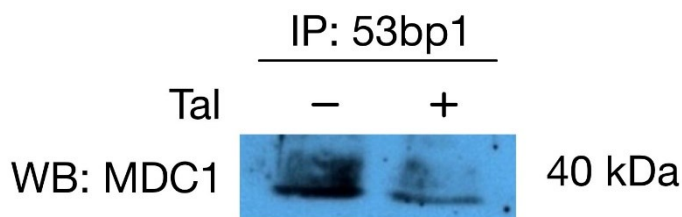
5.3. Optimalizace podmínek imunoprecipitace

Pro detekci interakce 53bp1 s MDC1 byly vyzkoušeny různé podmínky imunoprecipitace. Byla optimalizovaná hustota gelu na elektroforézu, množství protilátek pro imunoprecipitace a podmínky při eluci. Jednotlivé experimenty byly vykonávány s odlišnými frakcemi z různých postupů frakcionace.

Při imunoprecipitaci byly použity protilátky proti 53bp1, zatímco pro Western blot byly použity protilátky proti MDC1, které byly 2000x naředěné.

5.3.1. Imunoprecipitace s použitím denaturující eluce

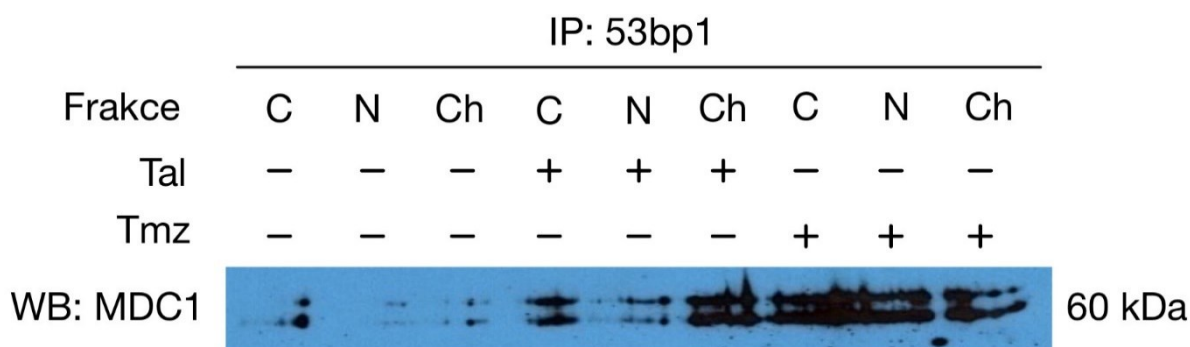
Při první optimalizaci byla použita solubilní frakce z jednokrokové frakcionace v lyzačním pufu NP-40, protože proteiny MDC1 a 53bp1 byly detekovány s větší intenzitou právě v solubilní frakci. Pro navázání protilátek na magnetické kuličky bylo použito 5 μ g protilátky proti 53bp1 na vzorek. Pro uvolnění navázaných komplexů z magnetických kuliček s protilátkami byla použita denaturující eluce. Protein MDC1 byl detekován pouze ve velikosti 40 kDa, s větší intenzitou v kontrolním vzorku oproti vzorku buněk ovlivněných taltirelinem (Obr. 5.21).



Obrázek č. 5.21. Interakce 53bp1 s MDC1 po ovlivnění taltirelinem. Při imunoprecipitaci bylo použito 5 µg protilátky proti 53bp1 na vzorek. Jako vzorek byla použita frakce s cytosolem z jedнокrokové frakcionace v lyzačním pufru NP-40 (Tal – taltirelin, 10 µM, 30 min). Komplexy byly rozděleny pomocí elektroforézy (6% gel) a detekovány imunoblotem s 500x zředěnými protilátkami proti MDC1.

5.3.2. Imunoprecipitace s použitím nedenaturující eluce

Pro imunoprecipitaci s použitím nedenaturující eluce byly použité všechny tři frakce z dvoukrokové frakcionace s použitím vysokých otáček z kontrolních buněk, buněk ovlivněných taltirelinem a buněk ovlivněných temozolomidem rozpuštěným v DMSO. Pro navázání protilátek na magnetické kuličky bylo použito 2 µg protilátek proti 53bp1 na vzorek. Pro uvolnění proteinových komplexů z magnetických kuliček s navázanými protilátkami byl použit šetrnější nedenaturující postup při eluci. Signál MDC1 proteinu detekovaný okolo 60 kDa byl velmi slabý ve všech třech frakcích z kontrolních buněk, zatímco nejsilnější byl v buňkách ovlivněným temozolomidem rozpuštěným v DMSO (Obr. 5.22). Tento postup imunoprecipitace byl používán pro další experimenty.

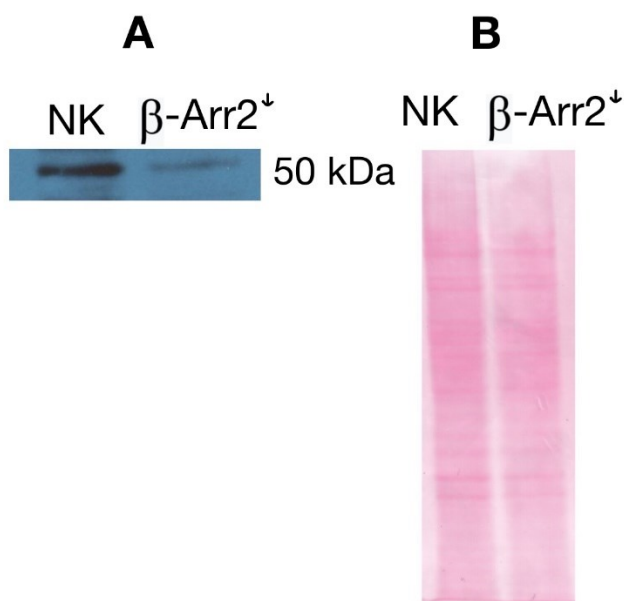


Obrázek č. 5.22. Interakce 53bp1 s MDC1 po ovlivnění taltirelinem a temozolomidem. Při imunoprecipitaci byly použity 2 µg protilátky proti 53bp1 na vzorek. Jako vzorky byly použity frakce s cytosolem, frakce s jádry i frakce s chromatinem z dvoukrokové frakcionace s použitím vysokých otáček (Tal – taltirelin, 10 µM, 30 min, Tmz – temozolomide, 400 µM, 24 hod). Komplexy byly rozděleny pomocí elektroforézy (8% gel) a detekovány imunoblotem s 500x zředěnými protilátkami proti MDC1.

5.4. Ověření účinnosti transfekce pomocí siRNA proti β-arrestinu 2

Třetím cílem bylo ověřit účinnost transfekce pomocí siRNA. Při tomto experimentu byla transfekována siRNA, pomocí které byla snížena exprese β-arrestinu 2. Za účelem určit nespecifické účinky siRNA transfekce byla použita negativní siRNA, jakožto negativní kontrola (NK). V buňkách transfekovaných siRNA proti β-arrestinu 2 (β-Arr2[↓]) byla

detekována pomocí imunoblotu nižší hladina β -arrestinu 2 oproti negativní kontrole (Obr. 5.23A). Imunosignály byly normalizovány pomocí obarvení Ponceau červení (Obr. 5.23B). To potvrzuje, že transfekce siRNA proti β -arrestinu 2 byla účinná.



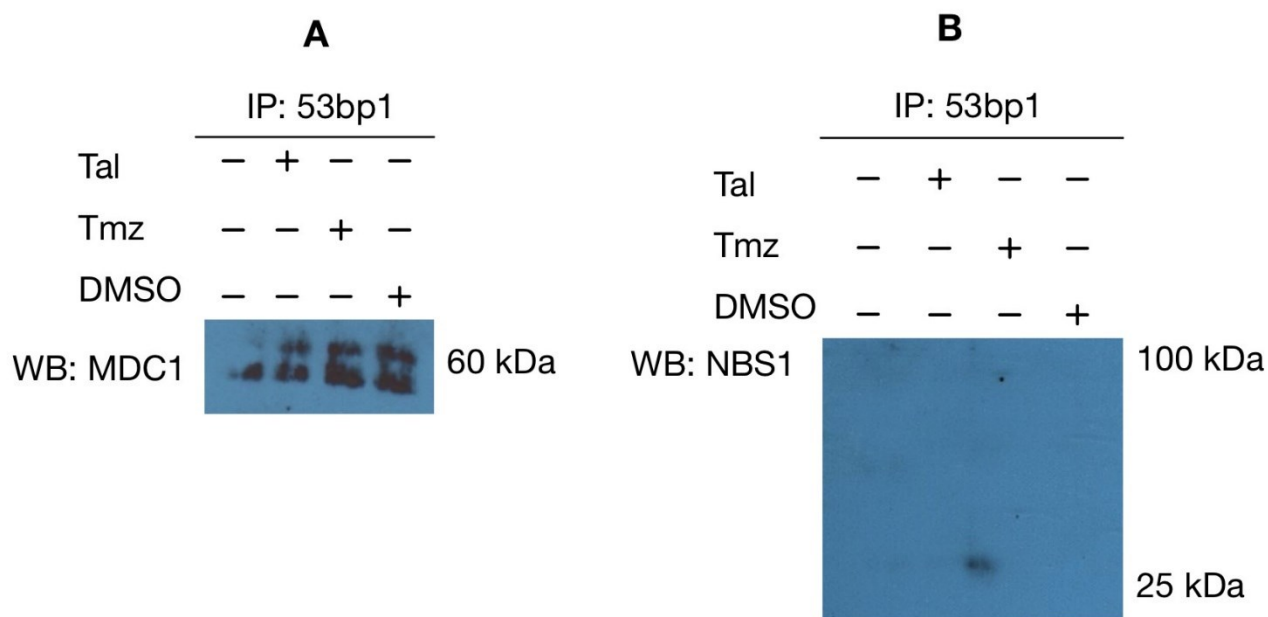
Obrázek č. 5.23. Detekce β -arrestinu 2 (A) a kontrola nanesení proteinů do jamek pomocí Ponceau červeně (B). Buňky byly resuspendovány v 30 μ l TMES pufru (20 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 250 mM sacharóza, pH 7,4) a sonikovány ve vodní lázni na 10 minut (NK – transfekce s negativní siRNA, β Arr2[↓] – transfekce s siRNA proti β -arrestinu). Detekce β -arrestinu 2 proběhla pomocí elektroforézy (10% gel) a Western blotu (protilátky byli 2000x zředěné).

5.5. Identifikace komplexů s 53bp1 po aktivaci TRH receptorů a sníženého množství β -arrestinu 2

Z předcházející fosfoproteomické analýzy z naší laboratoře bylo zjištěno, že po aktivaci TRH receptoru při různé expresi β -arrestinu 2 dochází ke změnám ve fosforylačních vzorcích 53bp1 a MDC1 proteinů, které se účastní opravy DNA. Na základě těchto výsledků byla sledována interakce 53bp1 s jeho vazebnými partnery (MDC1 a NBS1), v kontrolních nebo přechodně transfekovaných buňkách ovlivněných thyroliberinem nebo taltirelinem. V některých experimentech byl sledován vliv temozolomidu rozpuštěného v DMSO a vliv DMSO, jakožto negativní kontrola. Před provedením experimentů nebylo jasné, jaké může být množství komplexů p53bp1 s dalšími proteiny stejně jako hladina fosforylovaného H2AX v kontrolních GH1 buňkách. Z tohoto důvodu byl sledován vliv temozolomidu a DMSO na stabilitu proteinových komplexů a fosforylaci H2AX, aby mohly být výsledky získané z imunoprecipitací a detekce fosforylovaného H2AX správně interpretovány. Všechny imunoprecipitace byly provedeny s použitím frakce s chromatinem z dvoukrokové frakcionace s použitím vysokých otáček.

5.5.1. Interakce mezi 53bp1 a MDC1 a mezi 53bp1 a NBS1

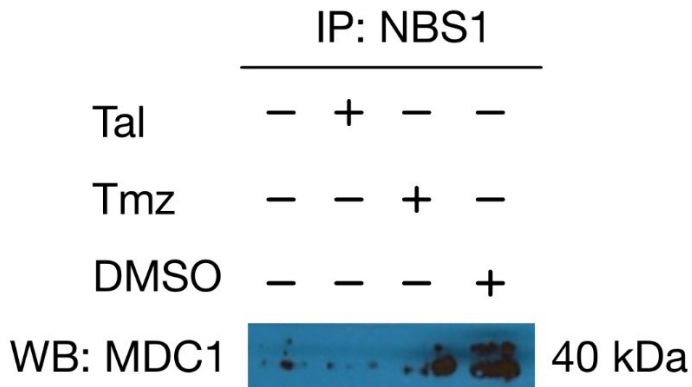
Pomocí imunoprecipitace s navázanými protilátkami proti 53bp1 a následnou detekcí MDC1 pomocí Westernu blotu byly detekovány dva pruhy okolo 60 kDa (Obr. 5.24A). Intenzita signálu byla nejmenší ve vzorku kontrolních buněk, zatímco nejsilnější signál byl detekován ve vzorku buněk ovlivněných temozolomidem v DMSO nebo samotným DMSO. Interakce mezi 53bp1 a NBS1 nebyla pomocí imunoprecipitace a Western blotu detekována (Obr. 5.24B).



Obrázek č. 5.24. Interakce mezi 53bp1 a MDC1 (A), interakce mezi 53bp1 a NBS1 (B). Při imunoprecipitaci byly použity 2 μ g protilátky proti 53bp1 na vzorek. Jako vzorky byly použity frakce s chromatinem z dvoukrokové frakcionace s použitím vysokých otáček (K – kontrola, Tal – taltirelin, 10 μ M, 30 min, Tmz – temozolomide, 400 μ M, 24 hod, DMSO – dimethylsulfoxid, 4%, 24 hod). Proteiny byly detekovány pomocí elektroforézy (8% gel) a Western blotu s 500x zředěnými protilátkami proti MDC1 a 500x zředěnými protilátkami proti NBS1.

5.5.2. Interakce mezi NBS1 a MDC1

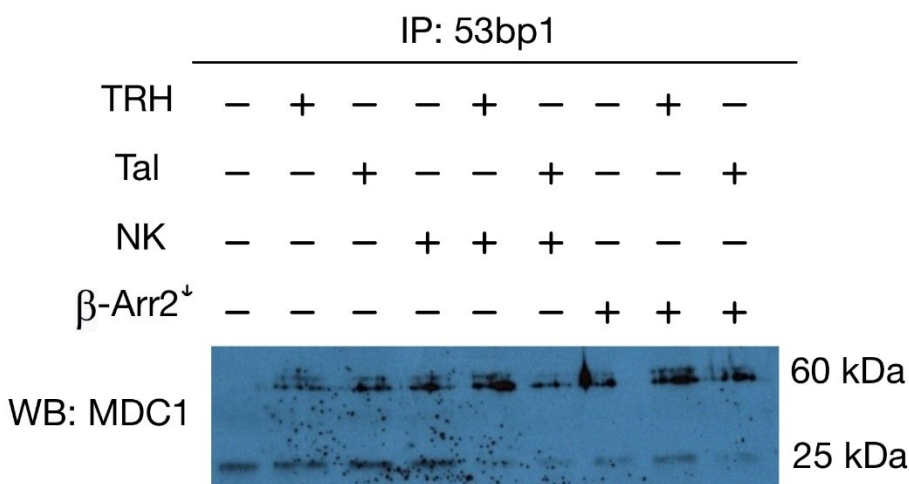
U kontrolních a taltirelinem ovlivněných buněk byl pozorován pouze velmi slabý signál, naznačující slabou interakci mezi NBS1 a MDC1 (Obr. 5.25). Silnější signál byl detekován ve vzorku s temozolomidem v DMSO a nejsilnější signál ve vzorku se samotným DMSO.



Obrázek č. 5.25. Interakce NBS1 s MDC1. Při imunoprecipitaci byly použity 2 μ g protilátky proti NBS1 na vzorek. Jako vzorek byl použit lyzát (sklizené buňky ve 20 μ l lisačního pufru – 1 hod na ledu), (K – kontrola, Tal – altirelin, 10 μ M, 30 min, Tmz – temozolomide, 400 μ M, 24 hod, DMSO – dimethylsulfoxid, 4%, 24 hod). Proteiny byly detekovány pomocí elektroforézy (8% gel) a imunoblotu (ředění protilátek proti MDC1 500x).

5.5.3. Interakce mezi 53bp1 a MDC1 v buňkách se sníženým množstvím β -arrestinu 2

Pomocí imunoprecipitace s navázanými protilátkami proti 53bp1 a následnou detekcí MDC1 pomocí imunoblotu byla sledována stabilita komplexů v kontrolních buňkách, buňkách transfekovaných negativní siRNA nebo siRNA cílenou proti β -arrestinu 2. Byly detekovány komplexy o velikost 60 kDa a 25 kDa (Obr. 5.26). Intenzita signálu o velikost 60 kDa byla vyšší u obou transfekovaných vzorků oproti kontrole. Dále byla vždy vyšší u buněk ovlivněných tyroliberinem oproti neovlivněným buňkám. To nebylo pozorováno při ovlivnění buněk taltirelinem. Intenzita signálu o velikosti 25 kDa se neměnila po působení tyroliberinu nebo taltirelinu v kontrolních buňkách i buňkách transfekovaných siRNA cílenou proti β -arrestinu 2. V buňkách transfekovaných negativní siRNA byla intenzita snížena jako po působení tyroliberinu, tak taltirelinu.

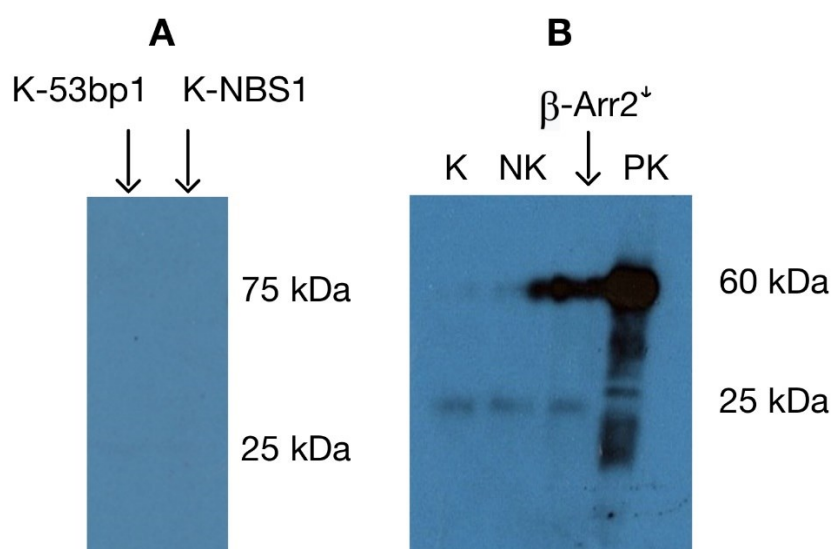


Obrázek č. 5.26. Interakce 53bp1 s MDC1 po ovlivnění TRH nebo taltirelinem za různého množství β -arrestinu 2. Při imunoprecipitaci byly použity 2 μ g protilátky proti 53bp1 na vzorek. Jako vzorky byly použity frakce s chromatinem z dvoukrokové frakcionace s použitím vysokých otáček (TRH –

thyroliberin, 10 μ M, 30 min, Tal – taltirelin, 10 μ M, 30 min, NK – transfekce negativní siRNA, β Arr2[↓] – transfekce siRNA proti β -arrestinu 2). Protein MDC1 byl detekován pomocí elektroforézy (12% gel) a imunoblotu (ředění protilátek proti MDC1 500x).

5.5.4. Negativní a pozitivní kontrola imunoprecipitace

Pro určení specifity detekovaných komplexů imunoprecipitací byla provedena negativní i pozitivní kontrola imunoprecipitace. Jako negativní kontrola byl jako vzorek použit lyzační pufr NP-40 bez buněk. Kontrola byla provedena jak pro protilátky proti 53bp1, tak proti NBS1. Po použití protilátek proti MDC1 nebyl detekován žádný signál (Obr. 5.27A). Jako pozitivní kontrola byly nanášeny 2 μ g protilátek proti 53bp1 v SLB pufru a rozděleny elektroforézou společně s neovlivněnými buňkami. Signál o velikosti 60 kDa byl detekován i v pozitivní kontrole, ve které tento signál odpovídá těžkému řetězci protilátek (Obr. 5.27B). Signál o velikosti 25 kDa byl detekován pouze ve vzorcích po imunoprecipitaci, lehký řetězec protilátek v pozitivní kontrole byl detekován níže (Obr. 5.27B).

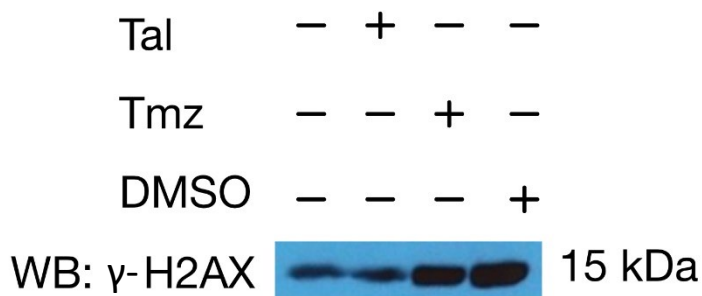


Obrázek č. 5.27. Negativní kontrola imunoprecipitace (A), pozitivní kontrola imunoprecipitace (B). A) Při imunoprecipitaci byly použity 2 μ g protilátky proti 53bp1 na vzorek pro první jamku a 2 μ g protilátky proti NBS1 na vzorek pro druhou jamku (K-53bp1 – negativní kontrola s protilátkami proti 53bp1, K-NBS1 – negativní kontrola s protilátkami NBS1). Jako vzorek byl místo buněčného lyzátu použit jenom samotný lyzační pufr bez buněk. Detekce byla provedena imunoblotem se 500x zředěnými protilátkami proti MDC1. B) Při imunoprecipitaci byly použity 2 μ g protilátky proti 53bp1 na vzorek. Jako vzorky byly použity frakce s chromatinem z dvoukrokové frakcionace s použitím vysokých otáček (K – kontrola, NK – transfekce s negativní siRNA, β Arr2[↓] – transfekce s siRNA proti β -arrestinu 2). Jako pozitivní kontrola (PK – pozitivní kontrola) byly 2 μ g protilátek proti 53bp1 denaturovány v SLB pufru. Detekce byla provedena pomocí elektroforézy (12% gel) a imunoblotu s 500x zředěnými protilátkami proti MDC1.

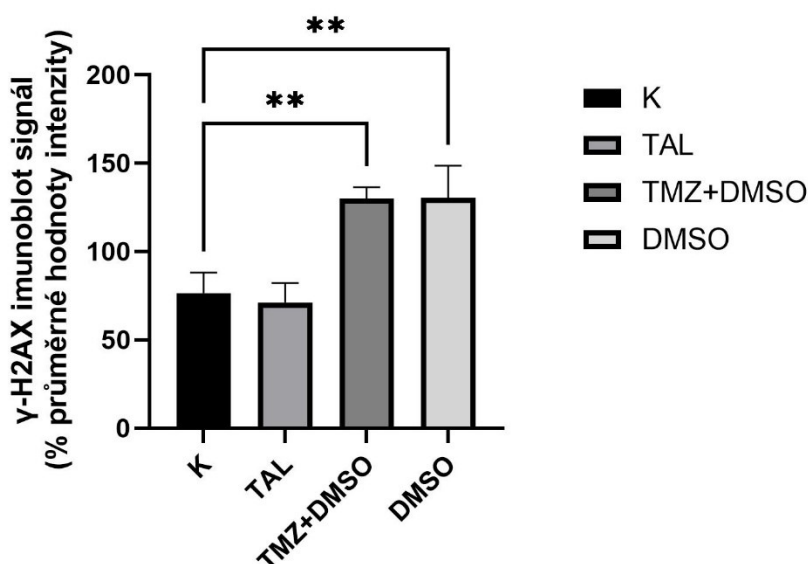
5.5.5. Detekce γ -H2AX

Hladina fosforylovaného H2AX byla detekována pomocí Western blotu a specifických protilátek v kontrolních GH1 buňkách, buňkách ovlivněných taltirelinem, temozolomidem v DMSO nebo samotným DMSO (Obr. 5.28). Experiment byl proveden v triplicátu a pro

statistické vyhodnocení byl použit nástroj pro analýzu dat GraphPad Prism. Při působení temozolomidu v DMSO nebo samotného DMSO bylo pozorováno statisticky významné zvýšení hladiny fosforylovaného H2AX (Graf 5.2).



Obrázek č. 5.28. Detekce γ -H2AX pomocí imunoblotu. Jako vzorek byl použit lyzát (sklizené buňky ve 20 μ l lyzačního pufru – 1 hod na ledu; K – kontrola, Tal – taltirelin (10 μ M, 30 min), Tmz – temozolomid (400 μ M, 24 hod), DMSO – dimethylsulfoxid (4%, 24 hod)). γ -H2AX byly detekovány pomocí elektroforózy (15%) a imunoblotu se 2000x naředěným protilátkami.

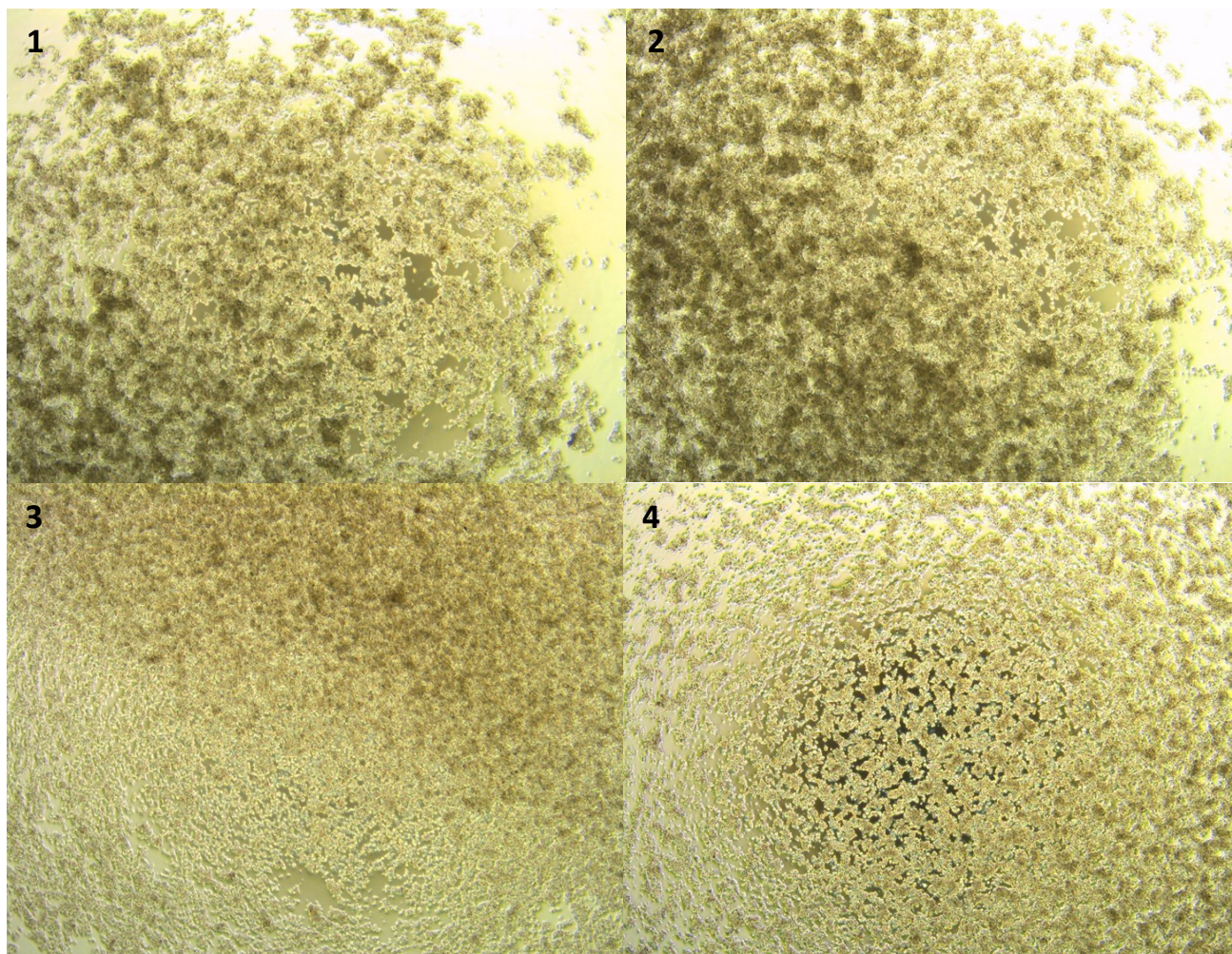


Graf č. 5.2. Průměrné hodnoty intenzit imunoblot signálu fosforylovaného H2AX v procentech. K – kontrola, Tal – taltirelin (10 μ M, 30 min), Tmz – temozolomide (400 μ M, 24 hod), DMSO – dimethylsulfoxid (40 μ l, 24 hod). Výsledky reprezentují průměr \pm SEM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ oproti kontrole; $n=3$).

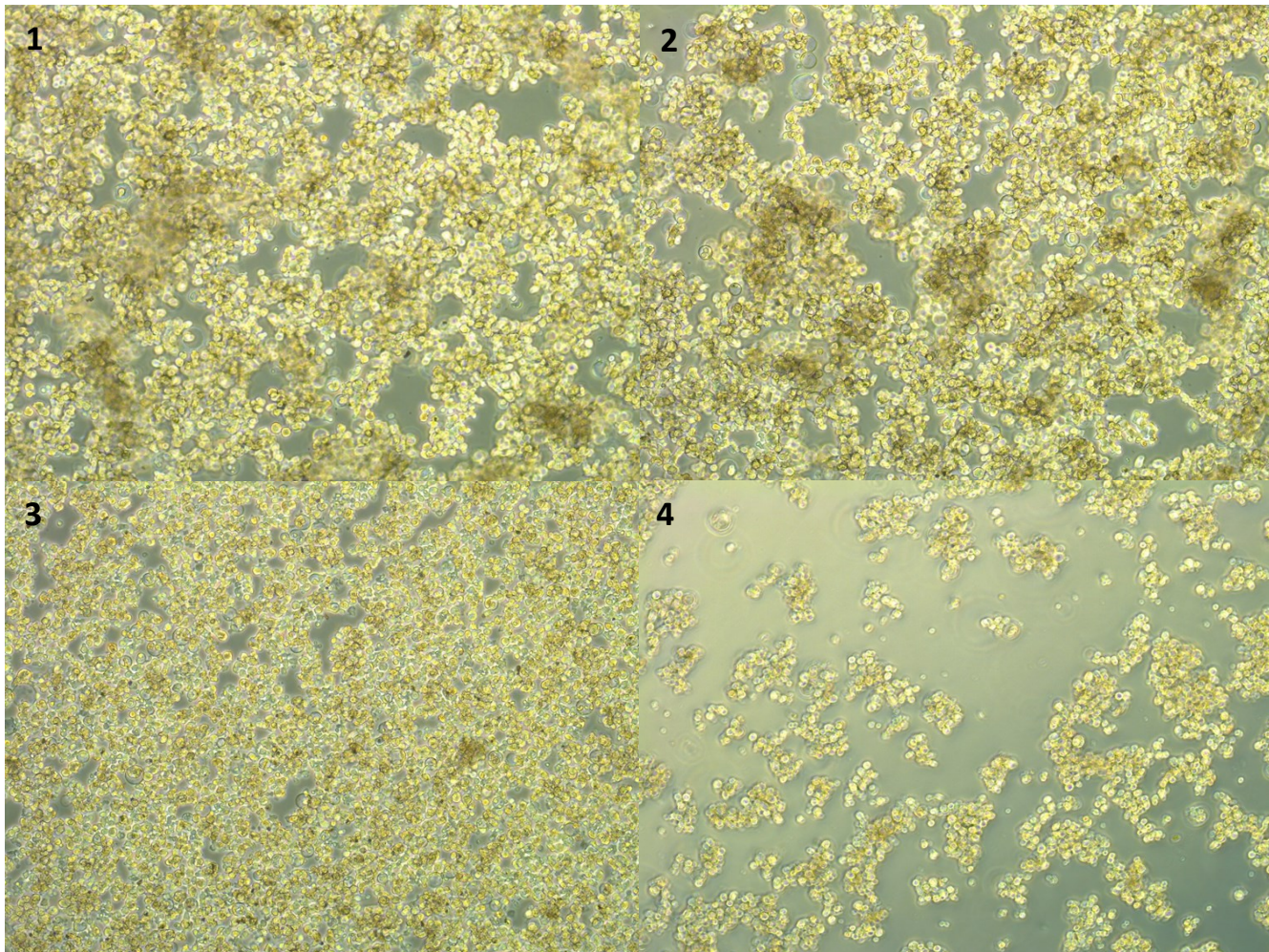
5.6. Mikroskopická analýza GH1 buněk po ovlivnění taltirelinem, temozolomidem a DMSO

Pomocí laboratorního mikroskopu Leica byl pozorován vliv taltirelinu (10 μ m, 30 min), temozolomidu (400 μ M, 24 hod) a DMSO (40 μ l, 24 hod) na množství a adhezenci buněk. Jednotlivé snímky byly porovnány s kontrolními buňkami. Buňky byly zkoumány pod

dvěma různými zvětšeními. Zvětšení okuláru bylo v obou případech použito stejné, a to 10x. Zvětšení objektivu bylo v prvním případě 4x a v druhém případě 10x. V prvním případě bylo celkové zvětšení 40x a ve druhém případě 100x. Na buňkách ovlivněných taltirelinem nebyl oproti kontrolním buňkám pozorován žádný rozdíl. Buňky ovlivněné temozolomidem nevytvářely oproti kontrolním buňkám shluky, byly víc rozprostřené po ploše a méně početné. V případě buněk ovlivněných DMSO byla pozorována výrazně menší početnost, kdy se ale jednotlivé buňky drží u sebe ve shlucích, než aby byly jednotlivě rozprostřeny po ploše.



Obrázek č. 5.30. Obrázek GH1 buněčné linie z mikroskopu Leica S40, zvětšení okuláru 10x, zvětšení objektivu 4x. 1 – neovlivněné GH1 buňky, 2 – taltirelin (Tal, 1 μ M, 30 min), 3 – temozolomid (Tmz, 400 μ M, 24 hod), 4 – dimethylsulfoxid (DMSO, 4%, 24 hod)



Obrázek č. 5.31. Obrázek GH1 buněčné linie z mikroskopu Leica S40, zvětšení okuláru 10x, zvětšení objektivu 10x. 1 – neovlivněné GH1 buňky, 2 – taltirelin (Tal, 1 μ M, 30 min), 3 – temozolomid (Tmz, 400 μ M, 24 hod), 4 – dimethylsulfoxid (DMSO, 4%, 24 hod)

6. Diskuse

V této bakalářské práci jsme se zaměřili na proteiny 53bp1 a MDC1 a jejich vzájemnou interakci. Pro tyto proteiny jsme se rozhodli na základě předcházející fosfoproteomické analýzy, kde bylo detekováno velké množství změn ve fosforylaci na mnoha fosfomístech a to jak v kontrolních buňkách, tak buňkách se sníženým množstvím β -arrestinu 2.

Je známo, že během DDR je 53bp1 regulován fosforylací na Ser1317 pomocí AMPK. Tato fosforylace podporuje navázání 53bp1 do míst poškození, čímž zvyšuje aktivitu c-NHEJ pro efektivní DSB¹⁰⁶. N-konec 53bp1 obsahuje četné (S/T)Q motivy, o kterých je známo, že jsou regulovány fosforylací pomocí ATM nebo DNA-PKcs¹⁰⁷. ATM je hlavní kinasa zodpovědná za fosforylaci 28 míst na N-konci 53bp1, který je nepostradatelný při navázání dvou responzivních efektorů RIF1 a PTIP, které se podílejí na potlačení BRCA1-zprostředkované koncové resekce^{108, 109, 110}.

Jako první jsme se zaměřili na získání jaderné frakce z buněčného lyzátu GH1 buněk. Celkem byly odzkoušeny tři různé postupy frakcionace.

Jednokroková frakcionace v lyzačním pufru NP-40: Tento přístup využívá jednu centrifugaci při nízkých otáčkách, která oddělí cytosol od jádra. Jeho výhodou je jednoduchost a rychlost, ale může být méně účinný v čistém oddělení cytosolické a jaderné frakce.

Dvoukroková frakcionace s nižšími otáčkami: Tato metoda poskytuje detailnější rozdělení frakcí na cytosol, jádra a chromatiny, ale vyžaduje více kroků a času. Použití nižších otáček může minimalizovat riziko kontaminace, ale nemusí být tak efektivní při oddělení všech komponent.

Dvoukroková frakcionace s vysokými otáčkami: Tato metoda je identická s předchozí, ale s vyššími otáčkami při první centrifugaci, což může zlepšit separaci cytosolu a jader, ale je náročnější na vybavení (ultracentrifuga).

Naše postupy frakcionace jsme porovnali i s metodou, ze které jsme původně vycházeli¹⁰¹. Tato metoda přidává krok promývání, což zlepšuje čistotu jaderné frakce. První centrifugace při velmi vysokých otáčkách ($86\ 000 \times g$) zajišťuje efektivní separaci cytosolu, následované dalším promýváním peletu a přenesením do jaderného extrakčního pufru. Je velmi důkladná, ale také časově a technicky náročná. Každá metoda má své výhody a nevýhody v závislosti na požadovaném stupni čistoty a dostupném vybavení.

Každý postup měl jako kontrolu několik imunoblotů s různými protilátkami, sledovali jsme, jestli se budou vybrané proteiny nacházet ve frakci, kde jsou očekávány. Jako nejefektivnější se ukázal až třetí postup, kdy se na jednotlivých imunoblotech nacházely proteiny jen ve frakcích, kde byly očekávány.

Můžeme ale porovnat výskyt histonů 3 a MDC1 proteinů s jinými publikacemi. V této práci se histony 3 nacházeli ve frakci s chromatinem. V jiné publikaci, ale bylo označeno, že

histon 3 se nachází v jaderné frakci¹⁰¹. Tento rozdíl může být způsobený v rozdílných technikách izolace a frakcionace, což ovlivní čistotu jednotlivých frakcí. Na tento rozdíl může mít vliv stav buněk, včetně fáze buněčného cyklu a míry poškození DNA. Obvykle se uvádí, že protein MDC1 je jaderný¹¹¹. V této práci byl detekovaný, ale i v cytosolární frakci, stejně jako ve výše zmíněné publikaci¹⁰¹.

Následně jsme se věnovali druhému cíli, a to optimalizaci podmínek imunoprecipitace. V této části jsme otestovali různé podmínky imunoprecipitace pro optimální výsledek. Největší rozdíl v podmínkách byl v použitém postupu eluce. V prvním případě jsme použili denaturující postup eluce a v druhém případě nedenaturující postup.

Při denaturační eluci se používá vysoká teplota (70 °C) a eluční pufr obsahující silné detergenty¹¹². Mezi výhody tohoto postupu patří efektivní uvolnění cílového proteinu z komplexu tím, že rozkládá jeho strukturu. To je vhodné, pokud není nutné zachovat funkční stav proteinu nebo jeho interakce s jinými proteiny. Nevýhodou je, že proteiny mohou ztratit svou nativní konformaci a funkční vlastnosti, což znemožňuje následnou funkční analýzu nebo studium protein-proteinových interakcí¹¹³. Nedenaturační eluce probíhá za pokojové teploty, následovaná mírnou denaturací (zahřátí na 95 °C po 3 minuty) až po eluci¹¹⁴. Výhodou je, že postup zachovává nativní strukturu a funkci proteinu, což je vhodné pro studie protein-proteinových interakcí a funkční analýzy. Nevýhodou je, že postup může být méně účinný v uvolňování všech navázaných proteinů, což může vést k nižším výtěžkům¹¹⁵.

Denaturační eluce je teda vhodná spíš pro analýzu samotného proteinu bez ohledu na jeho interakce, zatímco nedenaturační eluce je vhodnější, pokud je cílem studium protein-proteinových interakcí a zachování funkčnosti proteinu.

Na imunoblotu po frakcionaci a jednorozměrné elektroforéze se nám podařilo detekovat protein MDC1. Po rozdělení proteinů pomocí jednorozměrné elektroforézy byl MDC1 detekován jako několik pruhů. Při imunoprecipitaci jsme detekovali jen imunosignály 40 a 60 kDa. Jiná publika¹¹⁶ detekovala štěpy MDC1 ve velikostech 50 a 70 kDa, což může být způsobeno použitím různých buněčných linií. V této práci byly použity potkaní linie a ve vybrané publikaci byla použita lidská linie HCT116. Je známo, že homologní proteiny v lidských a potkaních buňkách se mohou ve velikosti lišit¹¹⁷. Je však také možné, že tyto detekované signály jsou denaturované protilátky uvolněné z magnetických kuliček, a to i přes to, že jsme použili BS³. BS³ je široce používaný zesíťovač proteinů v biochemických studiích, zejména při detekci interakcí protein-protein. Jedná se o homobifunkční síťovač rozpustný ve vodě, který reaguje s primárními aminy, jako jsou lysinové zbytky na proteinech, za vzniku stabilních amidových vazeb. Tato schopnost vytvářet příčné vazby mezi aminoskupinami na různých proteinech nebo v rámci jedné molekuly proteinu umožňuje studovat struktury a interakce proteinů v jejich přirozeném prostředí¹¹⁸.

Nabízí se hned několik možností, jak do budoucna metody vylepšit a získat lepší a přesnější výsledky. V případě imunoprecipitace by to mohlo být prodloužení doby navázání protilátek na magnetické kuličky (například přes noc), aby se prodloužila doba navázání cílových proteinů na protilátky¹¹⁹. Dále při Western blotu by mohly být použity sekundární protilátky TidyBlot Western Blot Detection Reagent: HRP od firmy Bio-Rad¹²⁰. Tyto

protilátky se váží pouze k nedenaturovaným protilátkám, to jsou protilátky, které byly navázány jako primární protilátky. Jako další možnost se nabízí předčistit lyzát pomocí izotopových kontrolních protilátek, což snižuje nespecifické navázání jiných než cílových proteinů při navazování proteinů z lyzátu na specifické protilátky navázané na magnetické kuličky¹²¹.

Jako třetí cíl bylo ověřit účinnost transfekce pomocí siRNA cílené proti β -arrestinu 2. Množství β -arrestinu 2 na úrovni proteinů je nižší, jak jsme očekávali.

Tyto jednotlivé cíle nám pomohli při provedení posledního čtvrtého cíle, který byl identifikovat a kvantifikovat komplexy, které námi vybrané proteiny vytváří. Sledovali jsme komplexy proteinu 53bp1 s MDC1 a NBS1 a proteinu NBS1 s MDC1 po ovlivnění taltirelinem, temozolomidem nebo cytotoxickou látkou DMSO.

Zjistili jsme, že interakci mezi 53bp1 a MDC1 ovlivňuje taltirelin pozitivně, signál na imunoblotu je silnější. Významné ovlivnění bylo také sledováno po přidání temozolomidu v DMSO, a i samotného DMSO. Tyto dvě látky byly použity pro porovnání bazální interakce mezi 53bp1 a MDC1. Temozolomid je látka špatně rozpustná ve vodě, a proto se musí rozpustit v DMSO¹²². V našich experimentech byl temozolomid rozpuštěný v DMSO přidáván k buněčné kultuře tak, že konečná koncentrace DMSO v médiu během kultivace buněk byla 4%. To představuje vysokou cytotoxickou koncentraci DMSO, která snižuje buněčnou variabilitu¹²³. To potvrzují i naše výsledky z mikroskopie (Obr. 5.31) a detekce množství γ -H2AX (Obr. 5.28). Přítomnost fosforylovaného H2AX nám hovoří o množství poškození DNA, a to hlavně dvouřetězcových zlomech. Čím víc bude fosforylovaný H2AX v buňce, tím víc bude DNA v buňce poškozená¹²⁴. Z výsledků je zjevné, že taltirelin neovlivnil množství γ -H2AX, a tedy ani poškození DNA. Vliv temozolomidu a DMSO už byl zřejmý. Jelikož ale vzorky ovlivněné temozolomidem v DMSO nebo samotným DMSO mají stejnou intenzitu, nárůst intenzity ve vzorku s temozolomidem byl způsobený DMSO, ve kterém byl temozolomid rozpuštěný. Podobný účinek byl sledován i po imunoprecipitaci s protilátkami proti 53bp1, kdy imunosignály proteinu MDC1 jsou porovnatelně stejně silné při ovlivnění temozolomidem nebo samotným DMSO. Jelikož temozolomid je rozpuštěný v DMSO, silnější interakce mezi 53bp1 a MDC1 byla způsobena cytotoxickým účinkem DMSO. Interakce mezi 53bp1 a NBS1 nebyla pomocí imunoprecipitace a Western blotu detekována. Interakce mezi NBS1 a MDC1 byla detekována především v buňkách ovlivněných temozolomidem v DMSO nebo samotným DMSO, což je zjevně důsledek cytotoxického působení DMSO. Výsledky z imunoprecipitací sledující interakce mezi 53bp1, MDC1 a NBS1 naznačují, že MDC1 tvoří komplex s 53bp1 i NBS1, ale jedná se o dva odlišné komplexy.

Byl proveden také experiment, kdy byl sledován vliv taltirelinu nebo TRH v buňkách se sníženým množstvím β -arrestinu 2. Výsledky ukazují, že v kontrolních buňkách jsou imunosignály po ovlivnění taltirelinem i TRH silnější. Také byl sledován nárůst imunosignálu po ovlivnění TRH v buňkách transfekovaných siRNA cílenou proti β -arrestinu 2 nebo negativní kontrolní siRNA. Takový účinek nebyl pozorován u taltirelinu. To může být vysvětleno tím, že tyto dva agonisté stimulují receptor a následné dráhy různým způsobem a

účinkují tedy jako tzv. usměřňovací agonisté. Účinek TRH nebo taltirelinu byl stejný v buňkách transfekovaných siRNA cílenou proti β -arrestinu 2 v porovnání s negativní kontrolou. To naznačuje, že buněčné množství β -arrestinu 2 nemá vliv na interakce mezi 53bp1 a MDC1, a tedy je tato interakce zprostředkovaná přes aktivaci G proteinů.

Jiná studie zkoumala přímé interakce mezi 53bp1 a MDC1¹²⁵. Podle této studie je interakce mezi těmito proteiny dynamická a mění se během DDR a mitózy. Interakce 53bp1-MDC1 je sama o sobě nutná pro navázání 53bp1 do míst DSB. Tato studie taky identifikovala serinový zbytek v 53bp1, který je *in vivo* fosforylován v mitotických buňkách a taky ukázala, že interakce mezi těmito proteiny zahrnuje jak interakce závislé i nezávislé na fosforylaci¹²⁵.

7. Závěr

V této bakalářské práci jsme se zaměřili na zkoumání vztahu mezi aktivací GPCR a mechanismy opravy poškození DNA. Jako jedna z největších a nejdůležitějších tříd receptorů v lidském těle hrají GPCR klíčovou roli v celé řadě buněčných procesů, včetně signálních drah, které mohou ovlivňovat odpověď buňky na poškození DNA. Výsledky naší analýzy naznačují, že aktivace GPCR může modulovat reakci na poškození DNA prostřednictvím různých mechanismů. Konkrétně jsou GPCR schopny ovlivňovat signalizaci prostřednictvím β -arrestinů, které mohou přímo nebo nepřímo působit na procesy opravy DNA.

V praktické části se nám úspěšně podařilo získat z buněčného lyzátu GH1 buněk jak cytosolární, tak jadernou frakci, a i frakci s chromatinem. S těmito získanými frakcemi byly pak vykonány další pokusy. Dále jsme optimalizovali podmínky imunoprecipitace, aby bylo použito optimální množství protilátky a taky optimální ředění. Následně jsme pak ověřili účinnost transfekce pomocí siRNA proti β -arrestinu 2. Na základě těchto postupů byly detekovány možné interakce 53bp1 s MDC1 a NBS1 s MDC1, protein MDC1 byl detekován při nízkých velikostech (60 a 40 kDa). Vzhledem k dynamice detekovaných imunesignálů po působení ligandů TRH receptoru a při různých transfekčních podmínkách můžeme usuzovat, že se nejedná o detekci denaturovaných protilátek uvolněných při eluci v závěru imunoprecipitace. Nicméně je třeba tyto výsledky podpořit dalšími experimenty použitím optimalizací během imunoprecipitace. Jako další způsob je zde možnost využít imunofluorescence a detekovat komplexy pomocí fluorescenční mikroskopie.

Při detekci fosforylovaného H2AX po ovlivnění taltirelinem nebyly pozorovány významné změny. Přírozená hladina fosforylovaného H2AX byla v buněčné linii GH1 nízká a zdá se tedy, že DNA na bazální hladině obsahuje malé množství dvouvláknových štěpů. V budoucích experimentech by bylo zajímavé zjistit, jaký účinek mají na hladinu fosforylovaného H2AX další ligandy TRH receptoru po vyvolání poškození DNA za různého množství β -arrestinu 2 či β -arrestinu 1.

8. Seznam použité literatury

- (1) Obot, D. N.; Udom, G. J.; Udoh, A. E.; Onyeukwu, N. J.; Olusola, A. J.; Udoh, I. M.; Umana, I. K.; Yemitan, O. K.; Okokon, J. E. 1 Advances in the Molecular Understanding of G Protein-Coupled Receptors and Their Future Therapeutic Opportunities. *Future J. Pharm. Sci.* **2021**, 7 (1), 194. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00341-0>.
- (2) Oprea, T. I.; Bologa, C. G.; Brunak, S.; Campbell, A.; Gan, G. N.; Gaulton, A.; Gomez, S. M.; Guha, R.; Hersey, A.; Holmes, J.; Jadhav, A.; Jensen, L. J.; Johnson, G. L.; Karlson, A.; Leach, A. R.; Ma'ayan, A.; Malovannaya, A.; Mani, S.; Mathias, S. L.; McManus, M. T.; Meehan, T. F.; von Mering, C.; Muthas, D.; Nguyen, D.-T.; Overington, J. P.; Papadatos, G.; Qin, J.; Reich, C.; Roth, B. L.; Schürer, S. C.; Simeonov, A.; Sklar, L. A.; Southall, N.; Tomita, S.; Tudose, I.; Ursu, O.; Vidović, D.; Waller, A.; Westergaard, D.; Yang, J. J.; Zahoránszky-Köhalmi, G. 5 Unexplored Therapeutic Opportunities in the Human Genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, 17 (5), 317–332. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.14>.
- (3) Liu, N.; Wang, Y.; Li, T.; Feng, X. 3 G-Protein Coupled Receptors (GPCRs): Signaling Pathways, Characterization, and Functions in Insect Physiology and Toxicology. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22 (10), 5260. <https://doi.org/10.3390/ijms22105260>.
- (4) Hutchings, C. J. 6 A Review of Antibody-Based Therapeutics Targeting G Protein-Coupled Receptors: An Update. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2020**, 20 (8), 925–935. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1745770>.
- (5) Gao, Q.-B.; Wang, Z.-Z. 2 Classification of G-Protein Coupled Receptors at Four Levels. *Protein Eng. Des. Sel.* **2006**, 19 (11), 511–516. <https://doi.org/10.1093/protein/gzl038>.
- (6) Krumm, B.; Roth, B. L. 4 Activation Mechanisms for a Universal Signalling Protein. *Nature* **2018**, 557 (7705), 318–319. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-04977-6>.
- (7) Hoermann, R.; Midgley, J. E. M.; Larisch, R.; Dietrich, J. W. 97 Homeostatic Control of the Thyroid–Pituitary Axis: Perspectives for Diagnosis and Treatment. *Front. Endocrinol.* **2015**, 6. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00177>.
- (8) Engel, S.; Gershengorn, M. C. 98 Thyrotropin-Releasing Hormone and Its Receptors — A Hypothesis for Binding and Receptor Activation. *Pharmacol. Ther.* **2007**, 113 (2), 410–419. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.09.004>.
- (9) Kakarala, K. K.; Jamil, K. 100 Sequence-Structure Based Phylogeny of GPCR Class A Rhodopsin Receptors. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2014**, 74, 66–96. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.01.022>.
- (10) Trubacova, R.; Drastichova, Z.; Novotny, J. 99 Biochemical and Physiological Insights into TRH Receptor-Mediated Signaling. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.981452>.

- (11) Anderson, L.; Alexander, C. L.; Faccenda, E.; Eidne, K. A. 101 Rapid Desensitization of the Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor Expressed in Single Human Embryonal Kidney 293 Cells. *Biochem. J.* **1995**, *311* (2), 385–392. <https://doi.org/10.1042/bj3110385>.
- (12) Rosenbaum, D. M.; Rasmussen, S. G. F.; Kobilka, B. K. 8 The Structure and Function of G-Protein-Coupled Receptors. *Nature* **2009**, *459* (7245), 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature08144>.
- (13) Syrovatkina, V.; Alegre, K. O.; Dey, R.; Huang, X.-Y. 7 Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428* (19), 3850–3868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>.
- (14) Mystek, P.; Rysiewicz, B.; Gregrowicz, J.; Dzedzicka-Wasylewska, M.; Polit, A. 9 $G\gamma$ and $G\alpha$ Identity Dictate a G-Protein Heterotrimer Plasma Membrane Targeting. *Cells* **2019**, *8* (10), 1246. <https://doi.org/10.3390/cells8101246>.
- (15) Kamato, D.; Thach, L.; Bernard, R.; Chan, V.; Zheng, W.; Kaur, H.; Brimble, M.; Osman, N.; Little, P. J. 11 Structure, Function, Pharmacology, and Therapeutic Potential of the G Protein, $G\alpha_q/11$. *Front. Cardiovasc. Med.* **2015**, *2*, 14. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2015.00014>.
- (16) Syrovatkina, V.; Alegre, K. O.; Dey, R.; Huang, X.-Y. 12 Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428* (19), 3850–3868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>.
- (17) Gilman, A. G. 10 G Proteins and Dual Control of Adenylate Cyclase. *Cell* **1984**, *36* (3), 577–579. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90336-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90336-2).
- (18) Kobilka, B. K. 13 G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768* (4), 794–807. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.10.021>.
- (19) Gether, U. 14 Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors. *Endocr. Rev.* **2000**, *21* (1), 90–113. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0390>.
- (20) Katritch, V.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. 15 Structure-Function of the G Protein-Coupled Receptor Superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *53*, 531–556. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923>.
- (21) Khan, S. M.; Sleno, R.; Gora, S.; Zylbergold, P.; Laverdure, J.-P.; Labbé, J.-C.; Miller, G. J.; Hébert, T. E. 16 The Expanding Roles of $G\beta\gamma$ Subunits in G Protein-Coupled Receptor Signaling and Drug Action. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65* (2), 545–577. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005603>.
- (22) Sprang, S. R.; Chen, Z.; Du, X. 17 Structural Basis of Effector Regulation and Signal Termination in Heterotrimeric $G\alpha$ Proteins. In *Advances in Protein Chemistry; Mechanisms and Pathways of Heterotrimeric G Protein Signaling*; Academic Press, 2007; Vol. 74, pp 1–65. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(07\)74001-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(07)74001-9).

- (23) Coleman, D. E.; Berghuis, A. M. 18 Structures of Active Conformations of Gi...1 and the Mechanism of GTP Hydrolysis. *Science* **1994**, *265* (5177), 1405. <https://doi.org/10.1126/science.8073283>.
- (24) Iiri, T.; Farfel, Z.; Bourne, H. R. 19 G-Protein Diseases Furnish a Model for the Turn-on Switch. *Nature* **1998**, *394* (6688), 35–38. <https://doi.org/10.1038/27831>.
- (25) Cherfils, J.; Chabre, M. 20 Activation of G-Protein G α Subunits by Receptors through G α –G β and G α –G γ Interactions. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28* (1), 13–17. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)00006-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)00006-3).
- (26) Rajagopal, K.; Lefkowitz, R. J.; Rockman, H. A. 25 When 7 Transmembrane Receptors Are Not G Protein–Coupled Receptors. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115* (11), 2971–2974. <https://doi.org/10.1172/JCI26950>.
- (27) Szczepek, M.; Beyrière, F.; Hofmann, K. P.; Elgeti, M.; Kazmin, R.; Rose, A.; Bartl, F. J.; von Stetten, D.; Heck, M.; Sommer, M. E.; Hildebrand, P. W.; Scheerer, P. 26 Crystal Structure of a Common GPCR-Binding Interface for G Protein and Arrestin. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4801. <https://doi.org/10.1038/ncomms5801>.
- (28) Strange, P. G. 27 Signaling Mechanisms of GPCR Ligands. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2008**, *11* (2), 196–202.
- (29) Neubig, R. R.; Gantz, R. D.; Thomsen, W. J. 28 Mechanism of agonist and antagonist binding to α_2 adrenergic receptors: evidence for a precoupled receptor-guanine nucleotide protein complex. ACS Publications. <https://doi.org/10.1021/bi00407a019>.
- (30) Wang, J.; Gareri, C.; Rockman, H. A. 21 G-Protein-Coupled Receptors in Heart Disease. *Circ. Res.* **2018**, *123* (6), 716–735. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311403>.
- (31) Chi, X.; Wang, S.; Huang, Y.; Stamnes, M.; Chen, J.-L. 22 Roles of Rho GTPases in Intracellular Transport and Cellular Transformation. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (4), 7089–7108. <https://doi.org/10.3390/ijms14047089>.
- (32) Kaur, G.; Verma, S. K.; Singh, D.; Singh, N. K. 23 Role of G-Proteins and GPCRs in Cardiovascular Pathologies. *Bioengineering* **2023**, *10* (1), 76. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10010076>.
- (33) Oliveira de Souza, C.; Sun, X.; Oh, D. 24 Metabolic Functions of G Protein-Coupled Receptors and β -Arrestin-Mediated Signaling Pathways in the Pathophysiology of Type 2 Diabetes and Obesity. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 715877. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.715877>.
- (34) Jean-Charles, P.-Y.; Kaur, S.; Shenoy, S. K. 29 G Protein-Coupled Receptor Signaling Through β -Arrestin-Dependent Mechanisms. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2017**, *70* (3), 142–158. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000482>.

- (35) Ranjan, R.; Dwivedi, H.; Baidya, M.; Kumar, M.; Shukla, A. K. 30 Novel Structural Insights into GPCR- β -Arrestin Interaction and Signaling. *Trends Cell Biol.* **2017**, *27* (11), 851–862. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.05.008>.
- (36) Oakley, R. H.; Laporte, S. A.; Holt, J. A.; Barak, L. S.; Caron, M. G. 31 Association of Beta-Arrestin with G Protein-Coupled Receptors during Clathrin-Mediated Endocytosis Dictates the Profile of Receptor Resensitization. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (45), 32248–32257. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32248>.
- (37) Pydi, S. P.; Barella, L. F.; Meister, J.; Wess, J. 32 Key Metabolic Functions of β -Arrestins: Studies with Novel Mouse Models. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **2021**, *32* (2), 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.11.008>.
- (38) Shukla, A. K.; Xiao, K.; Lefkowitz, R. J. 33 Emerging Paradigms of β -Arrestin-Dependent Seven Transmembrane Receptor Signaling. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36* (9), 457–469. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.06.003>.
- (39) Ahn, S.; Shenoy, S. K.; Wei, H.; Lefkowitz, R. J. 34 Differential Kinetic and Spatial Patterns of Beta-Arrestin and G Protein-Mediated ERK Activation by the Angiotensin II Receptor. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (34), 35518–35525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405878200>.
- (40) Alvarez-Curto, E.; Inoue, A.; Jenkins, L.; Raihan, S. Z.; Prihandoko, R.; Tobin, A. B.; Milligan, G. 35 Targeted Elimination of G Proteins and Arrestins Defines Their Specific Contributions to Both Intensity and Duration of G Protein-Coupled Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291* (53), 27147–27159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.754887>.
- (41) Shukla, A. K.; Westfield, G. H.; Xiao, K.; Reis, R. I.; Huang, L.-Y.; Tripathi-Shukla, P.; Qian, J.; Li, S.; Blanc, A.; Oleskie, A. N.; Dosey, A. M.; Su, M.; Liang, C.-R.; Gu, L.-L.; Shan, J.-M.; Chen, X.; Hanna, R.; Choi, M.; Yao, X. J.; Klink, B. U.; Kahsai, A. W.; Sidhu, S. S.; Koide, S.; Penczek, P. A.; Kossiakoff, A. A.; Woods, V. L.; Kobilka, B. K.; Skiniotis, G.; Lefkowitz, R. J. 36 Visualization of Arrestin Recruitment by a G-Protein-Coupled Receptor. *Nature* **2014**, *512* (7513), 218–222. <https://doi.org/10.1038/nature13430>.
- (42) Thomsen, A. R. B.; Plouffe, B.; Cahill, T. J.; Shukla, A. K.; Tarrasch, J. T.; Dosey, A. M.; Kahsai, A. W.; Strachan, R. T.; Pani, B.; Mahoney, J. P.; Huang, L.; Breton, B.; Heydenreich, F. M.; Sunahara, R. K.; Skiniotis, G.; Bouvier, M.; Lefkowitz, R. J. 37 GPCR-G Protein- β -Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* **2016**, *166* (4), 907–919. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.004>.
- (43) Luttrell, L. M.; Ferguson, S. S.; Daaka, Y.; Miller, W. E.; Maudsley, S.; Della Rocca, G. J.; Lin, F.; Kawakatsu, H.; Owada, K.; Luttrell, D. K.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. 76 Beta-Arrestin-Dependent Formation of Beta2 Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes. *Science* **1999**, *283* (5402), 655–661. <https://doi.org/10.1126/science.283.5402.655>.

- (44) Maudsley, S.; Gent, J. P.; Findlay, J. B.; Donnelly, D. 77 The Relationship between the Agonist-Induced Activation and Desensitization of the Human Tachykinin NK2 Receptor Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *124* (4), 675–684. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701889>.
- (45) Luttrell, L. M.; Gesty-Palmer, D. 78 Beyond Desensitization: Physiological Relevance of Arrestin-Dependent Signaling. *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62* (2), 305–330. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002436>.
- (46) Magalhaes, A. C.; Dunn, H.; Ferguson, S. S. 79 Regulation of GPCR Activity, Trafficking and Localization by GPCR-Interacting Proteins. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165* (6), 1717–1736. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01552.x>.
- (47) Hara, M. R.; Sachs, B. D.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. 80 Pharmacological Blockade of a $\beta(2)$ AR- β -Arrestin-1 Signaling Cascade Prevents the Accumulation of DNA Damage in a Behavioral Stress Model. *Cell Cycle Georget. Tex* **2013**, *12* (2), 219–224. <https://doi.org/10.4161/cc.23368>.
- (48) Luan, B.; Zhang, Z.; Wu, Y.; Kang, J.; Pei, G. 81 Beta-Arrestin2 Functions as a Phosphorylation-Regulated Suppressor of UV-Induced NF-kappaB Activation. *EMBO J.* **2005**, *24* (24), 4237–4246. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600882>.
- (49) Luttrell, L. M.; Maudsley, S.; Gesty-Palmer, D. 82 Translating in Vitro Ligand Bias into in Vivo Efficacy. *Cell. Signal.* **2018**, *41*, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.05.002>.
- (50) Maudsley, S.; Martin, B.; Luttrell, L. M. 83 The Origins of Diversity and Specificity in G Protein-Coupled Receptor Signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *314* (2), 485–494. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.083121>.
- (51) Peterson, Y. K.; Luttrell, L. M. 84 The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Pharmacol. Rev.* **2017**, *69* (3), 256–297. <https://doi.org/10.1124/pr.116.013367>.
- (52) Guo, C.; Zhao, Y. 38 Autophagy and DNA Damage Repair. *Genome Instab. Dis.* **2020**, *1* (4), 172–183. <https://doi.org/10.1007/s42764-020-00016-9>.
- (53) Wang, M.; Xie, C. 39 - DNA Damage Repair and Current Therapeutic Approaches in Gastric Cancer: A Comprehensive Review. *Front. Genet.* **2022**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.931866>.
- (54) Kang, T.-H. 40 - DNA Damage, Repair, and Cancer Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (22), 16430. <https://doi.org/10.3390/ijms242216430>.
- (55) Guengerich, F. P. 41 DNA Damage, Types Of. In *Molecular Life Sciences: An Encyclopedic Reference*; Wells, R. D., Bond, J. S., Klinman, J., Masters, B. S. S., Eds.; Springer: New York, NY, 2018; pp 205–208. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1531-2_60.

- (56) Paul, H.; Judith, C.; Jan, H.; Harry, van S.; Jan, V. 42 Aging and Genome Maintenance: Lessons from the Mouse? *Science* **2003**, *299* (5611). <https://doi.org/10.1126/science.1079161>.
- (57) Jr, M.; Jh, H.; Lj, N. 43 Divide and Conquer: Nucleotide Excision Repair Battles Cancer and Ageing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15* (2). [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00018-8](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00018-8).
- (58) Matt, S.; Hofmann, T. G. 44 The DNA Damage-Induced Cell Death Response: A Roadmap to Kill Cancer Cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2016**, *73* (15), 2829–2850. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2130-4>.
- (59) Surova, O.; Zhivotovsky, B. 45 Various Modes of Cell Death Induced by DNA Damage. *Oncogene* **2013**, *32* (33), 3789–3797. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.556>.
- (60) 46 *Instability and decay of the primary structure of DNA* - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8469282/> (accessed 2024-07-28).
- (61) Menolfi, D.; Zha, S. 48 ATM, DNA-PKcs and ATR: Shaping Development through the Regulation of the DNA Damage Responses. *Genome Instab. Dis.* **2020**, *1* (2), 47–68. <https://doi.org/10.1007/s42764-019-00003-9>.
- (62) Roos, W. P.; Kaina, B. 49 DNA Damage-Induced Cell Death: From Specific DNA Lesions to the DNA Damage Response and Apoptosis. *Cancer Lett.* **2013**, *332* (2), 237–248. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.007>.
- (63) Enriquez-Rios, V.; Dumitrache, L. C.; Downing, S. M.; Li, Y.; Brown, E. J.; Russell, H. R.; McKinnon, P. J. 50 DNA-PKcs, ATM, and ATR Interplay Maintains Genome Integrity during Neurogenesis. *J. Neurosci.* **2017**, *37* (4), 893–905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4213-15.2016>.
- (64) Menolfi, D.; Zha, S. 51 ATM, ATR and DNA-PKcs Kinases—the Lessons from the Mouse Models: Inhibition ≠ Deletion. *Cell Biosci.* **2020**, *10* (1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-0376-x>.
- (65) Ciccia, A.; Elledge, S. J. 52 The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell* **2010**, *40* (2), 179–204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>.
- (66) Vessoni, A. T.; Filippi-Chiela, E. C.; Menck, C. F.; Lenz, G. 53 Autophagy and Genomic Integrity. *Cell Death Differ.* **2013**, *20* (11), 1444–1454. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.103>.
- (67) Milanowska, K.; Rother, K.; Bujnicki, J. M. 59 Databases and Bioinformatics Tools for the Study of DNA Repair. *Mol. Biol. Int.* **2011**, *2011*, 475718. <https://doi.org/10.4061/2011/475718>.

- (68) Gomes, L. R.; Menck, C. F. M.; Leandro, G. S. 54 Autophagy Roles in the Modulation of DNA Repair Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (11), 2351. <https://doi.org/10.3390/ijms18112351>.
- (69) Nazio, F.; Maiani, E.; Cecconi, F.; Nazio, F.; Maiani, E.; Cecconi, F. 55 The Cross Talk among Autophagy, Ubiquitination, and DNA Repair: An Overview. In *Ubiquitination Governing DNA Repair - Implications in Health and Disease*; IntechOpen, 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71404>.
- (70) Hewitt, G.; Korolchuk, V. I. 56 Repair, Reuse, Recycle: The Expanding Role of Autophagy in Genome Maintenance. *Trends Cell Biol.* **2017**, *27* (5), 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.011>.
- (71) Moldovan, G.-L.; Madhavan, M. V.; Mirchandani, K. D.; McCaffrey, R. M.; Vinciguerra, P.; D'Andrea, A. D. 57 DNA Polymerase POLN Participates in Cross-Link Repair and Homologous Recombination. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30* (4), 1088–1096. <https://doi.org/10.1128/MCB.01124-09>.
- (72) 58 *Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice: Molecular Cell*. [https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765\(12\)00656-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1097276512006569%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765(12)00656-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1097276512006569%3Fshowall%3Dtrue) (accessed 2024-07-30).
- (73) Alexandrov, N.; Alexandrov, V. 60 Computational Science Research Methods for Science Education at PG Level. *Procedia Comput. Sci.* **2015**, *51*, 1685–1693. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2015.05.305>.
- (74) Milanowska, K.; Rother, K.; Bujnicki, J. M. 61 Databases and Bioinformatics Tools for the Study of DNA Repair. *Mol. Biol. Int.* **2011**, *2011*, 475718. <https://doi.org/10.4061/2011/475718>.
- (75) Zentout, S.; Smith, R.; Jacquier, M.; Huet, S. 62 New Methodologies to Study DNA Repair Processes in Space and Time Within Living Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 730998. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.730998>.
- (76) Liu, S.; Opiyo, S. O.; Manthey, K.; Glanzer, J. G.; Ashley, A. K.; Amerin, C.; Troksa, K.; Shrivastav, M.; Nickoloff, J. A.; Oakley, G. G. 63 Distinct Roles for DNA-PK, ATM and ATR in RPA Phosphorylation and Checkpoint Activation in Response to Replication Stress. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (21), 10780–10794. <https://doi.org/10.1093/nar/gks849>.
- (77) Marteijn, J. A.; Lans, H.; Vermeulen, W.; Hoeijmakers, J. H. J. 64 Understanding Nucleotide Excision Repair and Its Roles in Cancer and Ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15* (7), 465–481. <https://doi.org/10.1038/nrm3822>.
- (78) Schärer, O. D. 65 Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5* (10), a012609. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012609>.

- (79) Costa, R. M. A.; Chigaças, V.; da Silva Galhardo, R.; Carvalho, H.; Menck, C. F. M. 66 The Eukaryotic Nucleotide Excision Repair Pathway. *Biochimie* **2003**, *85* (11), 1083–1099. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2003.10.017>.
- (80) Jiricny, J. 67 Postreplicative Mismatch Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5* (4), a012633. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012633>.
- (81) Li, G.-M. 68 Mechanisms and Functions of DNA Mismatch Repair. *Cell Res.* **2008**, *18* (1), 85–98. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.115>.
- (82) Hsieh, P.; Yamane, K. 69 DNA Mismatch Repair: Molecular Mechanism, Cancer, and Ageing. *Mech. Ageing Dev.* **2008**, *129* (7), 391–407. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.02.012>.
- (83) Filippo, J. S.; Sung, P.; Klein, H. 70 Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77* (Volume 77, 2008), 229–257. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255>.
- (84) Prakash, R.; Zhang, Y.; Feng, W.; Jasin, M. 71 Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *7* (4), a016600. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016600>.
- (85) Heyer, W.-D.; Ehmsen, K. T.; Liu, J. 72 Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **2010**, *44* (Volume 44, 2010), 113–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-051710-150955>.
- (86) Lieber, M. R. 73 The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79* (Volume 79, 2010), 181–211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>.
- (87) Mehta, A.; Haber, J. E. 74 Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, *6* (9), a016428. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016428>.
- (88) Waters, C. A.; Strande, N. T.; Pryor, J. M.; Strom, C.; Mieczkowski, P.; Burkhalter, M. D.; Oh, S.; Qaqish, B. F.; Moore, D. T.; Hendrickson, E. A.; Ramsden, D. A. 75 The Fidelity of the Ligation Step Determines How Ends Are Resolved during Nonhomologous End Joining. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4286. <https://doi.org/10.1038/ncomms5286>.
- (89) Panier, S.; Boulton, S. J. 85 Double-Strand Break Repair: 53BP1 Comes into Focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15* (1), 7–18. <https://doi.org/10.1038/nrm3719>.
- (90) Lei, T.; Du, S.; Peng, Z.; Chen, L. 96 Multifaceted Regulation and Functions of 53BP1 in NHEJ-mediated DSB Repair (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2022**, *50* (1), 1–19. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2022.5145>.

- (91) Rockman, H. A.; Lefkowitz, R. J. 87 G Protein–Coupled Receptors: From Radioligand Binding to Cellular Signaling. *J. Clin. Invest.* **2024**, *134* (5). <https://doi.org/10.1172/JCI178109>.
- (92) Kroeze, W. K.; Sheffler, D. J.; Roth, B. L. 88 G-Protein-Coupled Receptors at a Glance. *J. Cell Sci.* **2003**, *116* (24), 4867–4869. <https://doi.org/10.1242/jcs.00902>.
- (93) Zimmermann, M.; de Lange, T. 89 53BP1: Pro Choice in DNA Repair. *Trends Cell Biol.* **2014**, *24* (2), 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.09.003>.
- (94) Gao, Q.-B.; Wang, Z.-Z. 90 Classification of G-Protein Coupled Receptors at Four Levels. *Protein Eng. Des. Sel.* **2006**, *19* (11), 511–516. <https://doi.org/10.1093/protein/gzl038>.
- (95) Liu, N.; Wang, Y.; Li, T.; Feng, X. 91 G-Protein Coupled Receptors (GPCRs): Signaling Pathways, Characterization, and Functions in Insect Physiology and Toxicology. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (10), 5260. <https://doi.org/10.3390/ijms22105260>.
- (96) Isberg, V.; Mordalski, S.; Munk, C.; Rataj, K.; Harpsøe, K.; Hauser, A. S.; Vroiling, B.; Bojarski, A. J.; Vriend, G.; Gloriam, D. E. 92 GPCRdb: An Information System for G Protein-Coupled Receptors. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (D1), D356–D364. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1178>.
- (97) Mirman, Z.; de Lange, T. 93 53BP1: A DSB Escort. *Genes Dev.* **2020**, *34* (1–2), 7–23. <https://doi.org/10.1101/gad.333237.119>.
- (98) Jaspers, J. E.; Kersbergen, A.; Boon, U.; Sol, W.; van Deemter, L.; Zander, S. A.; Drost, R.; Wientjens, E.; Ji, J.; Aly, A.; Doroshov, J. H.; Cranston, A.; Martin, N. M. B.; Lau, A.; O’Connor, M. J.; Ganesan, S.; Borst, P.; Jonkers, J.; Rottenberg, S. 94 Loss of 53BP1 Causes PARP Inhibitor Resistance in Brca1-Mutated Mouse Mammary Tumors. *Cancer Discov.* **2013**, *3* (1), 68–81. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0049>.
- (99) Bouwman, P.; Jonkers, J. 95 The Effects of Deregulated DNA Damage Signalling on Cancer Chemotherapy Response and Resistance. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12* (9), 587–598. <https://doi.org/10.1038/nrc3342>.
- (100) Wiechelmann, K. J.; Braun, R. D.; Fitzpatrick, J. D. 105 Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay: Identification of the Groups Responsible for Color Formation. *Anal. Biochem.* **1988**, *175* (1), 231–237. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90383-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90383-1).
- (101) Radhakrishnan, K.; Park, S.-J.; Kim, S. W.; Hariharasudhan, G.; Jeong, S.-Y.; Chang, I. Y.; Lee, J.-H. 106 Karyopherin α -2 Mediates MDC1 Nuclear Import through a Functional Nuclear Localization Signal in the tBRCT Domain of MDC1. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (7), 2650. <https://doi.org/10.3390/ijms21072650>.
- (102) Humphrey, S. J.; Karayel, O.; James, D. E.; Mann, M. 107 High-Throughput and High-Sensitivity Phosphoproteomics with the EasyPhos Platform. *Nat. Protoc.* **2018**, *13* (9), 1897–1916. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0014-9>.

- (103) Cox, J.; Mann, M. 108 MaxQuant Enables High Peptide Identification Rates, Individualized p.p.b.-Range Mass Accuracies and Proteome-Wide Protein Quantification. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (12), 1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>.
- (104) Tyanova, S.; Temu, T.; Cox, J. 109 The MaxQuant Computational Platform for Mass Spectrometry-Based Shotgun Proteomics. *Nat. Protoc.* **2016**, *11* (12), 2301–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>.
- (105) Tyanova, S.; Temu, T.; Sinitcyn, P.; Carlson, A.; Hein, M. Y.; Geiger, T.; Mann, M.; Cox, J. 110 The Perseus Computational Platform for Comprehensive Analysis of (Prote)Omics Data. *Nat. Methods* **2016**, *13* (9), 731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>.
- (106) Jiang, Y.; Dong, Y.; Luo, Y.; Jiang, S.; Meng, F.-L.; Tan, M.; Li, J.; Zang, Y. 114 AMPK-Mediated Phosphorylation on 53BP1 Promotes c-NHEJ. *Cell Rep.* **2021**, *34* (7), 108713. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108713>.
- (107) Panier, S.; Boulton, S. J. 115 Double-Strand Break Repair: 53BP1 Comes into Focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15* (1), 7–18. <https://doi.org/10.1038/nrm3719>.
- (108) Escribano-Díaz, C.; Orthwein, A.; Fradet-Turcotte, A.; Xing, M.; Young, J. T. F.; Tkáč, J.; Cook, M. A.; Rosebrock, A. P.; Munro, M.; Canny, M. D.; Xu, D.; Durocher, D. 116 A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. *Mol. Cell* **2013**, *49* (5), 872–883. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.001>.
- (109) Chapman, J. R.; Barral, P.; Vannier, J.-B.; Borel, V.; Steger, M.; Tomas-Loba, A.; Sartori, A. A.; Adams, I. R.; Batista, F. D.; Boulton, S. J. 117 RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection. *Mol. Cell* **2013**, *49* (5), 858–871. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.002>.
- (110) Callen, E.; Di Virgilio, M.; Kruhlik, M. J.; Nieto-Soler, M.; Wong, N.; Chen, H.-T.; Faryabi, R. B.; Polato, F.; Santos, M.; Starnes, L. M.; Wesemann, D. R.; Lee, J.-E.; Tubbs, A.; Sleckman, B. P.; Daniel, J. A.; Ge, K.; Alt, F. W.; Fernandez-Capetillo, O.; Nussenzweig, M. C.; Nussenzweig, A. 118 53BP1 Mediates Productive and Mutagenic DNA Repair through Distinct Phosphoprotein Interactions. *Cell* **2013**, *153* (6), 1266–1280. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.023>.
- (111) Dave, J. H.; Vora, H. H.; Ghosh, N. R.; Trivedi, T. I. 129 Mediator of DNA Damage Checkpoint Protein 1 (MDC1) as a Prognostic Marker for Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **2017**, *46* (4), 253–258. <https://doi.org/10.1111/jop.12558>.
- (112) Woodward, L.; Gangras, P.; Singh, G. 121 Identification of Footprints of RNA:Protein Complexes via RNA Immunoprecipitation in Tandem Followed by Sequencing (RIPiT-Seq). *J. Vis. Exp. JoVE* **2019**, No. 149, 10.3791/59913. <https://doi.org/10.3791/59913>.

- (113) Jensen, K. B.; Darnell, R. B. 122 CLIP: Crosslinking and ImmunoPrecipitation of In Vivo RNA Targets of RNA-Binding Proteins. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2008**, *488*, 85–98. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-475-3_6.
- (114) Antrobus, R.; Borner, G. H. H. 123 Improved Elution Conditions for Native Co-Immunoprecipitation. *PLOS ONE* **2011**, *6* (3), e18218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018218>.
- (115) Tang, Z.; Takahashi, Y. 124 Analysis of Protein–Protein Interaction by Co-IP in Human Cells. In *Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols*; Oñate-Sánchez, L., Ed.; Springer: New York, NY, 2018; pp 289–296. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7871-7_20.
- (116) Solier, S.; Pommier, Y. 111 MDC1 Cleavage by Caspase-3: A Novel Mechanism for Inactivating the DNA Damage Response during Apoptosis. *Cancer Res.* **2011**, *71* (3), 906–913. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3297>.
- (117) Tada, S.; Tsutsumi, K.; Ishihara, H.; Suzuki, K.; Gohda, K.; Teno, N. 125 Species Differences Between Human and Rat in the Substrate Specificity of Cathepsin K. *J. Biochem. (Tokyo)* **2008**, *144* (4), 499–506. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn093>.
- (118) Alegria-Schaffer, A. 112 Chapter Six - General Protein–Protein Cross-Linking. In *Methods in Enzymology*; Lorsch, J., Ed.; Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part B; Academic Press, 2014; Vol. 539, pp 81–87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420120-0.00006-2>.
- (119) Brown, E. A.; Neier, S. C.; Neuhauser, C.; Schrum, A. G.; Smith, S. E. 126 Quantitative Multiplex Co-Immunoprecipitation: Measuring Input-Specific Changes in Protein Interaction Networks at Mesoscale. *J. Vis. Exp. JoVE* **2019**, No. 150. <https://doi.org/10.3791/60029>.
- (120) Wu, J.; Movérare-Skrtic, S.; Zhang, F.-P.; Koskela, A.; Tuukkanen, J.; Palvimo, J. J.; Sipilä, P.; Poutanen, M.; Ohlsson, C. 127 Androgen Receptor SUMOylation Regulates Bone Mass in Male Mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2019**, *479*, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.09.008>.
- (121) Nikolados, E.-M.; Weiße, A. Y.; Oyarzún, D. A. 128 Prediction of Cellular Burden with Host-Circuit Models. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2021**, *2229*, 267–291. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1032-9_13.
- (122) Ahad, A.; Shakeel, F.; Raish, M.; Ahmad, A.; Bin Jardan, Y. A.; Al-Jenoobi, F. I.; Al-Mohizea, A. M. 120 Thermodynamic Solubility Profile of Temozolomide in Different Commonly Used Pharmaceutical Solvents. *Mol. Basel Switz.* **2022**, *27* (4), 1437. <https://doi.org/10.3390/molecules27041437>.
- (123) Dlodla, P. V.; Jack, B.; Viraragavan, A.; Pheiffer, C.; Johnson, R.; Louw, J.; Muller, C. J. F. 119 A Dose-Dependent Effect of Dimethyl Sulfoxide on Lipid Content, Cell Viability

and Oxidative Stress in 3T3-L1 Adipocytes. *Toxicol. Rep.* **2018**, *5*, 1014–1020.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.10.002>.

(124) Sharma, A.; Singh, K.; Almasan, A. 104 Histone H2AX Phosphorylation: A Marker for DNA Damage. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2012**, *920*, 613–626.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-998-3_40.

(125) Eliezer, Y.; Argaman, L.; Rhie, A.; Doherty, A. J.; Goldberg, M. 113 The Direct Interaction between 53BP1 and MDC1 Is Required for the Recruitment of 53BP1 to Sites of Damage *. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (1), 426–435. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807375200>.