

POKROČILÉ METODY STUDIA VZÁJEMNÝCH INTERAKCÍ PROTEINŮ S DNA

LUCIE BÉRESOVÁ^{a,b} a RENÉ LENOBEL^b

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

Došlo 4.11.16, přijato 30.11.16.

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

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

Obsah

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

1. Úvod

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

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

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

2. DNA-afinitní chromatografie

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

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

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

2.1. Konstrukce DNA-afinitní matrice

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

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

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

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

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

2.2. Způsob provedení DNA afinitní chromatografie

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

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

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

může způsobit inhibici požadované interakce a destabilizaci vznikajících komplexů¹⁹.

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Gelová retardační analýza (EMSA)

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

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

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

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

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

4. Fluorescenční mikroskopie

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

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

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

4.1. Přímá metoda detekce interakce proteinů s DNA

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

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

4.2. Nepřímá metoda detekce interakce proteinů s DNA

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

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

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

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

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

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

5. Závěr

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

LITERATURA

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

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

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

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