

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Dizertační práce

2016

Mgr. Jan Švadlenka

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie



Analýza buněčné signalizace zprostředkované adaptérovým proteinem Daxx

Dizertační práce

Vypracoval: Mgr. Jan Švadlenka

Školitel: RNDr. Ladislav Anděra, CSc.

Místo: Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.
Oddělení buněčné signalizace a apoptózy

Praha 2016

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Ladislava Anděry, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne

Podpis:

Poděkování:

Tato dizertační práce byla vypracována v bývalém Oddělení buněčné signalizace a apoptózy Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i. Děkuji všem svým kolegům, kteří touto laboratoří za dlouhou dobu mého působení prošli, za vytvoření příjemného a přátelského prostředí. Jmenovitě bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Ladislavu Anděrovi, CSc. za trpělivé vedení a Mgr. Lukáši Čermákovi, Ph. D., který mi na počátku mého působení poskytl velmi cennou školu práce v laboratoři. Ostatní členy laboratoře raději nebudu jmenovat, abych na někoho nezapomněl.

Mimo to chci též poděkovat své milé přítelkyni Veronice Kordové za to, že vždy stála při mě a podporovala mě, a dále svým rodičům, prarodičům, sestře a dalším příbuzným za to, že mi vždy byli dobrou rodinou. Dokončení mého doktorského studia je všechny jistě potěší.

Abstrakt

Multifunkční protein Daxx se jako adaptér či histonový chaperon podílí na značném množství buněčných pochodů zahrnujících regulaci apoptotické či stresové signalizace, antivirové odpovědi, transkripce a dalších pochodů spojených s chromatinem. Procesy, které souvisejí s chromatinem, Daxx ovlivňuje pomocí své interakce s DNA-metyltransferázou-1, histondeacetylázami a s ATPázou remodelující chromatin ATRX. V komplexu s ní Daxx působí jakožto histonový chaperon pro histon-3.3, důležitý pro udržování konstitutivního heterochromatinu například v oblasti centromer a telomer.

Hlavním cílem této dizertační práce byla hlubší analýza buněčných funkcí proteinu Daxx za pomoci identifikace a funkční charakterizace nových proteinů, které s ním interagují. K jejich vyhledání byl použit kvasinkový dvojhybridní systém a výsledkem byla identifikace několika nových interagujících proteinů, převážně jaderných a spojených zejména s regulací chromatinu. Detailněji byla analyzována interakce proteinu Daxx s ATPázou remodelující chromatin Brg1. Ta byla potvrzena jak *in vitro*, tak i v živých buňkách, kde spolu oba proteiny nejvíce asociovaly v komplexech s vyšší relativní molekulovou hmotností. Tyto předpokládané remodelační komplexy obsahovaly vedle Brg1 i další s ním asociované faktory (BAF). Společná lokalizace obou proteinů byla po jejich nadprodukcí pozorována také v jaderných PML-tělíscích. Při hledání částí obou proteinů, které interakci zprostředkovávají, bylo zjištěno, že Daxx váže oblast Brg1 mezi jeho N-koncovými doménami QLQ a HSA, ale také blíže neurčenou oblast v C-koncové části proteinu. Obdobně Brg1 asocioval jak s N-koncovou částí proteinu Daxx, tak i s jeho centrální oblastí. Jejich vzájemnou interakci tedy pravděpodobně zprostředkovávají nejméně dvě části obou proteinů. Následná funkční analýza interakce proteinů Daxx a Brg1 ukázala, že zatímco v buněčné linii SW13 se Daxx podílí na inhibici genové exprese regulované proteinem Brg1, v buněčné linii MCF10a jsou oba proteiny nezbytné pro aktivaci exprese genu SNCAIP. Daxx by tedy mohl působit v některých případech jakožto transkripční korepresor, ale v jiných coby koaktivátor genové exprese. Jeho interakce s proteinem Brg1 navíc může ovlivňovat regulaci struktury chromatinu během pochodů, které s regulací transkripce bezprostředně nesouvisejí.

Abstract

Multifunctional adapter protein and histone chaperone Daxx has been described in numerous cellular processes, including the regulation of apoptotic and stress signalling, antiviral response and processes connected to chromatin (e. g. transcription). Its influence on chromatin-related processes is mainly carried out by several associated enzymes, such as DNA-methyltransferase-1, histone deacetylases and chromatin-remodelling ATPase ATRX. In the complex with ATRX Daxx functions as a chaperone of histone-3.3, maintaining the constitutive heterochromatin e. g. at centromeric and telomeric regions.

The main aim of this Thesis was a better understanding of the Daxx cellular functions through identification and functional characterization of its novel interacting proteins. Using the yeast two-hybrid screen, several such new Daxx-interacting proteins were identified. These proteins were mainly nuclear, connected to the regulation of chromatin-related processes. More detailed analysis focused on the interaction of Daxx with chromatin-remodelling ATPase Brg1. This interaction was confirmed both *in vitro* and in the cells, where Daxx and Brg1 associated mainly in high molecular weight protein complexes. These likely chromatin-remodelling complexes contain, in addition to Brg1, several other Brg1-associated factors (BAFs). The co-localization of ectopically expressed Daxx and Brg1 was also observed in PML nuclear bodies. The mapping of the sites that mediate the Daxx-Brg1 interaction showed that Daxx binds not only the Brg1 region between its N-terminal QLQ and HSA domains but also some unidentified region(s) in the C-terminal half of Brg1. Consistently with this finding, Brg1 associates not only with the N-terminal third of Daxx but also with its central region. The Daxx-Brg1 interaction is thus probably mediated by at least two parts of both proteins. Subsequent functional analysis of Daxx-Brg1 interaction revealed that whereas Daxx participates in repression of several Brg1-activated genes in SW13 cell line, both proteins are necessary for the expression of SNCAIP gene in MCF10a cells. It thus seems that Daxx could act both as co-repressor and a co-activator of Brg1-driven gene expression. Daxx/Brg1 complex could also regulate other chromatin-related processes, not connected with gene expression.

Obsah

Abstrakt	1
Abstract	2
Obsah	3
Seznam použitých zkratk	8
Úvod	18
I. Základní informace o proteinu Daxx	18
I. 1. Představení proteinu Daxx	18
I. 2. Struktura proteinu Daxx	18
II. Úloha proteinu Daxx při buněčné reakci na stresové či apoptotické signály	20
II. 1. Přehled apoptotické signalizace	20
II. 2. Úloha proteinu Daxx při apoptotické signalizaci vyvolané vazbou ligandu na receptor Fas	23
II. 3. Jaderná lokalizace proteinu Daxx a regulace jeho přechodu do cytoplazmy	25
II. 4. Úloha proteinu Daxx při apoptotické signalizaci vyvolané aktivací dalších buněčných receptorů	27
II. 4. 1. Úloha proteinu Daxx v signální dráze TGF β	27
II. 4. 2. Účast proteinu Daxx při apoptóze vyvolané aktivací CD43	27
II. 4. 3. Účast proteinu Daxx v signální dráze TNF α	28
II. 4. 4. Účast proteinu Daxx při apoptóze vyvolané interferony	28
II. 5. Úloha proteinu Daxx při reakci na buněčný stres	29
II. 5. 1. Buněčný stres a úloha proteinu p53	29
II. 5. 2. Úloha proteinu Daxx při apoptotické signalizaci v reakci na oxidační stres	30
II. 5. 3. Buněčná odpověď na poškození DNA	32
II. 5. 4. Úloha proteinu Daxx při reakci na ultrafialové záření	33
II. 5. 5. Regulace proteinu p53 prostřednictvím proteinu Daxx	34
II. 6. Shrnutí úlohy proteinu Daxx při buněčné odpovědi na stresové či apoptotické signály	37
III. Jaderné funkce proteinu Daxx	38
III. 1. Úvod k jaderným funkcím proteinu Daxx	38
III. 2. PML-tělíška	38
III. 3. Úloha proteinu Daxx při antivirové odpovědi	40
III. 3. 1. Úvod k úloze proteinu Daxx při antivirové odpovědi	40
III. 3. 2. Úloha proteinu Daxx při infekci herpetickými viry	41
III. 3. 3. Úloha proteinu Daxx při infekci adenoviry	42
III. 3. 4. Úloha proteinu Daxx při infekcích retroviry	42

III. 3. 5. Úloha proteinu Daxx při dalších virových infekcích	42
III. 4. Chromatin a aktivace transkripce řízené RNA-polymerázou II	43
III. 4. 1. Struktura chromatinu	43
III. 4. 2. ATPázy remodelující chromatin	44
III. 4. 3. Posttranslační modifikace histonových konců	45
III. 4. 4. Histonové chaperony	45
III. 4. 5. Metylace DNA	46
III. 4. 6. Transkripční faktory a koregulátory	46
III. 5. Úloha proteinu Daxx při regulaci zahájení transkripce	48
III. 5. 1. Interakce proteinu Daxx s transkripčními faktory a úloha modifikátoru SUMO	48
III. 5. 2. Úloha PML-tělísek při regulaci transkripčních funkcí proteinu Daxx	49
III. 5. 3. Další způsoby regulace transkripčních funkcí proteinu Daxx	50
III. 5. 4. Způsob, jímž Daxx reguluje zahájení transkripce	50
III. 6. Úloha proteinu Daxx jakožto histonového chaperonu	52
III. 6. 1. Objev proteinového komplexu Daxx/ATRAX jako chaperonu pro histon-3.3	52
III. 6. 2. Funkce histonového chaperonu Daxx/ATRAX	53
III. 6. 3. Narušení funkce komplexu Daxx/ATRAX v nádorech	54
III. 7. Účast proteinu Daxx při dalších jaderných pochodech	55
III. 7. 1. Daxx jako součást mitotických kontrolních bodů	55
III. 7. 2. Úloha proteinu Daxx při regulaci fosfatázy PTEN	56
III. 7. 3. Daxx jako regulátor telomerázy	56
III. 8. Shrnutí úlohy proteinu Daxx	57
IV. Cíl dizertační práce	59
Metodika	60
I. Použité bakteriální a kvasinkové kmeny, savčí buněčné linie a kultivační média	60
I. 1. Kmeny bakterií <i>Escherichia coli</i>	60
I. 2. Kmeny kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
I. 3. Kultivační média pro bakterie a kvasinky	60
I. 3. 1. Médium LB – kultivační médium pro bakterie	60
I. 3. 2. YPDA – kompletní médium pro kultivaci kvasinek	61
I. 3. 3. Médium SD – minimální médium pro kvasinky	61
I. 4. Lidské buněčné linie a média, v nichž byly kultivovány	61
II. Seznam použitých protilátek a siRNA	62
II. 1. Seznam použitých protilátek	62
II. 2. Seznam použitých siRNA	63

III. Seznam konstruktů DNA a popis jejich přípravy	63
III. 1. Metody použité k přípravě rekombinantních plazmidů (vektorů, konstruktů)	63
III. 1. 1. Restrikční štěpení, purifikace DNA, ligace	63
III. 1. 2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	63
III. 1. 3. Místně řízená mutageneze (site directed mutagenesis)	64
III. 1. 4. Sekvencování DNA	65
III. 1. 5. Příprava transformačně kompetentních bakterií <i>Escherichia coli</i>	65
III. 1. 6. Transformace kompetentních bakterií	66
III. 1. 7. Produkce a purifikace plazmidové DNA	66
III. 2. Použité konstrukty DNA	66
III. 2. 1. Konstrukty pro expresi v savčích buňkách	66
III. 2. 2. Konstrukty pro expresi v kvasinkách	71
III. 2. 3. Konstrukty pro expresi v bakteriích (pro „GST-pulldown“)	71
IV. Manipulace s lidskými buněčnými liniemi	72
IV. 1. Kultivace buněk	72
IV. 2. Transfekce plazmidovou DNA	72
IV. 2. 1. Transfekce menšího množství buněk	72
IV. 2. 2. Transfekce s použitím kalcium/fosfátové metody	73
IV. 2. 3. Transfekce s použitím PEI	73
IV. 3. Transfekce siRNA	74
IV. 4. Transdukce savčích buněk	74
IV. 4. 1. Použití lentivirů	74
IV. 4. 2. Použití adenovirů	75
IV. 5. Cílená genová delece pomocí metody TALEN	75
V. Vyhledávání nových interakčních partnerů v kvasinkovém dvojhybridním systému	76
V. 1. Kvasinkový dvojhybridní systém (Y2H)	76
V. 2. Manipulace s kvasinkami	77
V. 2. 1. Izolace plazmidové DNA z kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77
V. 2. 2. Transformace kvasinek s použitím octanu lithného (LiAc)	78
V. 2. 3. Párování kvasinek (mating)	79
VI. Příprava lysátů savčích buněk	79
VI. 1. Lýze ve 2x redukujícím vzorkovém pufru	79
VI. 2. Lýze v 1x neredukujícím vzorkovém pufru	80
VII. SDS-PAGE a Western blotting	81

VIII. Ověření interakce proteinů in vitro s použitím GST-fúzního proteinu	82
VIII. 1. Příprava GST-fúzního proteinu	83
VIII. 2. Vlastní ověření interakce in vitro	84
IX. Imunoprecipitace	86
IX. 1. Lýze buněk	86
IX. 1. 1. Nativní lýze	86
IX. 1. 2. Detergentová lýze	87
IX. 1. 3. Gelová filtrace	88
IX. 2. Vlastní imunoprecipitace	89
X. Celogenomová analýza změn genové exprese (DNA-čip, <i>microarray</i>)	90
XI. Stanovení relativní genové exprese s použitím qRT-PCR	91
XII. Imunocytochemie	92
Výsledky	95
I. Multifunkční adaptérový protein Daxx interaguje s ATPázou remodelující chromatin Brg1	95
I. 1. Vyhledání nových potenciálních interakčních partnerů proteinu Daxx v kvasinkovém dvojhybridním systému	95
I. 2. Výběr proteinů k dalším analýzám	95
I. 3. Ověření interakce proteinu Daxx s vybranými potencionálními interakčními partnery	98
I. 4. Analýza interakce proteinu Daxx s vybranými proteiny na endogenní úrovni	99
I. 5. Daxx interaguje s ATPázou remodelující chromatin Brg1 a jí příbuzným proteinem Brm	102
I. 6. Daxx a Brg1 spolu interagují v jaderných proteinových komplexech s vyšší relativní molekulovou hmotností	103
I. 7. Lokalizace proteinů Daxx a Brg1 v jaderných PML-tělíscích	105
I. 8. Vazbu s Brg1 zprostředkovává více částí proteinu Daxx	107
I. 9. Vazbu proteinu Daxx také zprostředkovává více částí proteinu Brg1	111
I. 10. Celogenomová analýza exprese genů regulovaných proteiny Daxx a Brg1	113
I. 11. Identifikace genů, které jsou v buněčné linii MCF10a regulovány proteinem Daxx	117
I. 12. Daxx inhibuje expresi některých genů regulovaných proteinem Brg1 v buněčné linii SW13	119
II. Další výzkumné projekty a z nich vycházející odborné články, na nichž se autor této dizertační práce podílel	124
II. 1. Souhra mezi proteiny Daxx, p53, kinázou ATM a fosfatázou Wip1 po poškození DNA (Bražina a kol., Cell Cycle, 2015)	124
II. 1. 1. Překlad anglického abstraktu článku	124
II. 1. 2. Podíl autora této dizertační práce	125
II. 2. Inhibice vakuolární ATPázy má tlumivý účinek na aktivaci kaspázy-8 způsobenou vazbou	127

ligandu TRAIL na receptor a ovlivňuje přepravu receptozómů u receptoru pro ligand TRAIL (Horová a kol., FEBS Journal, 2013)	
II. 2. 1. Překlad anglického abstraktu článku	127
II. 2. 2. Podíl autora této dizertační práce	127
II. 3. Specifická inhibice jednotlivých proteinů z rodiny Bcl-2 pomocí chemikálií ABT-199 a homoharringtonin odhalila existenci podskupin difúzních velkobuněčných B-lymfomů, závislých buď na Bcl-2, nebo na Mcl-1 (Klánová a kol., Clinical Cancer Research, 2015)	128
II. 3. 1. Překlad anglického abstraktu článku	128
II. 3. 2. Podíl autora této dizertační práce	129
Diskuze	130
Závěr	136
Seznam použité literatury	137

Seznam použitých zkratk

Abra1	Abraxas-1
ADD	<i>ATRX / DNMT3 / DNMT3L</i> , doména proteinu ATRX, která je přítomna i v DNA-metyltransferáze-3 a jí příbuzném proteinu DNMT3L
AIRE	<i>autoimmune regulator</i> , regulátor autoimunity
ALT	<i>alternative lengthening of telomeres</i> , alternativní prodlužování telomer
APC/C	<i>anaphase promoting complex</i> , komplex podporující anafázi
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i> , faktor aktivující apoptotickou proteázu
ARF	<i>alternative reading frame</i> , alternativní čtecí rámec
Ask1	<i>apoptotic signal-regulating kinase 1</i> , apoptotický signál regulující kináza 1
APS	<i>ammonium persulfate</i> , persíran amonný
ASF1	<i>anti-silencing function 1</i> , „protiumlčovací funkce 1“, složka histonového chaperonu HIRA/ASF1, objeven u kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> jakožto gen, jehož nadprodukce inhibovala represí párovacího lokusu
ATM	<i>ataxia telangectasia mutated</i> , gen mutovaný u vrozené poruchy ataxia telangectasia
ATP	adenozintrifosfát
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i> , kináza příbuzná ATM a Rad3
ATRX	<i>X-linked alpha-thalassemia/mental retardation</i> , gen mutovaný u syndromu ATR-X (alfa-thalasémie / mentální retardace vázaná na chromozóm X), ATPáza remodelující chromatin
BAF	<i>Brm/Brg1-associated factor</i> , faktor asociovaný s Brm/Brg1
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i> , antagonist homologní proteinu Bcl-2
BAP1	<i>BRCA1 associated protein 1</i> , protein asociovaný s BRCA1

BBS	<i>BES buffered saline</i> , roztok soli pufovaný BES
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i> , protein X, asociovaný s Bcl-2
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i> , protein nadprodukovaný u B-buněčného lymfomu
Bcl-X _L	<i>Bcl extra large</i> , protein příbuzný Bcl-2, ale s výrazně větší relativní molekulovou hmotností
BES	N,N-bis(2-hydroxyetyl)-2-aminoetansulfonová kyselina
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i> , agonista smrti, který obsahuje interakční doménu BH3; jeho zkrácená forma (vzniklá štěpením iniciálními kaspázami) se nazývá tBid („ <i>truncated Bid</i> “)
Bim	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i> , mediátor buněčné smrti, který interaguje s Bcl-2
Brg1	<i>Brahma-related gene 1</i> , gen příbuzný proteinu Brahma, ATPáza remodelující chromatin
Brm	<i>Brahma</i> , ATPáza remodelující chromatin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAD	<i>caspase activated DNase</i> , DNáza aktivovaná kaspázami
CAF1	<i>chromatin assembly factor 1</i> , faktor uspořádávání chromatinu
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i> , doména vázající a aktivující kaspázu
CBP	<i>CREB binding protein</i> , protein vázající transkripční faktor CREB (<i>cAMP response element binding protein</i> , tj. protein vázající element odpovědi na cyklický adenosinmonofosfát)
CD44, 137	<i>cluster of differentiation 44, 137</i> , „CD“ je zkratka používaná u povrchových proteinů bílých krvinek a číslo vyjadřuje pořadí, v němž byly popsány
Cdc20	<i>cell division cycle 20</i> , protein buněčného cyklu
Cdh1	<i>Cdc20 homologue 1</i> , homolog Cdc20
C/EBPbeta	<i>CCAAT/enhancer binding protein beta</i> , protein vázající sekvenci CCAAT v promotoru či zesilovači

c-Myc	<i>avian myelocytomatosis viral oncogene cellular homologue</i> , buněčný homolog onkogenu z viru ptačí myelocytomatózy
CENP-A, C	centromerový protein A či C
CHIP	<i>carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein</i> , protein interagující s C-koncem Hsp70
CHX	cykloheximid
CK2	<i>casein kinase 2</i> , kaseinová kináza 2
CMV	cytomegalovirus
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i> , protein vázající sekvenci DNA zvanou „odpovědní element na cAMP“
CRM1	<i>chromosomal maintenance 1</i> , protein důležitý pro chromozómovou integritu
CRYAB	<i>crystallin alpha B</i> , krystalin- α B
CSF1	<i>colony stimulating factor 1</i> , faktor stimulující kolonie
Daxx	<i>death domain-associated protein six</i> , protein asociovaný s doménou smrti
DD	<i>death domain</i> , doména smrti
DED	<i>death effector domain</i> , výkonná doména smrti
DISC	<i>death inducing signalling complex</i> , smrtící signální komplex
DKC1	<i>dyskeratosis congenita 1</i> , protein mutovaný u dědičné poruchy dyskeratosis congenita, podjednotka telomerázového komplexu
DLBCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i> , difúzní velkobuněčný B-lymfom
DMAP1	<i>DNA methyltransferase associated protein 1</i> , protein asociovaný s DNA-metyltransferázou
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> , druh kultivačního média pro savčí buňky, poprvé popsán Eaglem a modifikovaný Dulbeccem
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i> , proteinkináza závislá na DNA
DNMT1	DNA-metyltransferáza-1

DR	<i>death receptor</i> , receptor smrti
DTT	dithiothreitol
E1B-55K	protein o relativní molekulové hmotnosti 55 kDa, který je produkován z adenovirového genu E1B
EBV	virus Epstein-Barrové
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , zelený fluorescenční protein
ETS1	<i>avian erythroblastosis virus E26 oncogene homologue 1</i> , homolog proteinu viru ptačí erythroblastózy v-ets
FADD	<i>Fas-associated death-domain protein</i> , protein obsahující doménu smrti, který asociuje s receptorem smrti Fas
Fas	<i>apoptosis stimulating fragment</i> , fragment stimulující apoptózu
FBS	<i>foetal bovine serum</i> , plodové hovězí sérum
FEZ2	<i>fasciculation and elongation protein zeta-2</i> , fascikulační a elongační protein zeta-2
FLASH	<i>FLICE associated huge</i> , velký protein asociovaný s kaspázou-8
FLIP	<i>FLICE inhibitory protein</i> , protein inhibující kaspázu-8 (<i>FLICE</i> , <i>Fas-associated death-domain-like interleukin-1beta-converting enzyme</i>)
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i> , druh kapalinové chromatografie
Gadd45a	<i>growth arrest and DNA damage gene 45a</i> , gen zástavy růstu a poškození DNA
GST	glutathion-S-transferáza; v tomto případě pouze její fragment používaný ke značení proteinu v experimentu nazývaném „GST-pulldown“
HAT	histonacetyltransferáza
Hausp	<i>herpesvirus associated ubiquitin specific protease</i> , proteáza specifická k ubikvitinu, která je asociovaná s herpetickými viry
HCF1	<i>host cell factor 1</i> , faktor hostitelské buňky
HEPES	4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetanesulfonová kyselina, používaná jako pufr

HHV8	<i>human herpes virus 8</i> , lidský herpetický virus 8
HIPK1, 2	<i>homeodomain-interacting proteinkinase 1, 2</i> , proteinkináza interagující s homeodomény 1 či 2
HIRA	<i>histone cell cycle regulator</i> , histonový regulátor v průběhu buněčného cyklu, složka histonového chaperonu HIRA/ASF1
HIV-1	<i>human immunodeficiency virus 1</i> , virus lidské imunitní nedostatečnosti
HSF1	<i>heat shock factor 1</i> , transkripční faktor teplotního šoku
HSP27, 70	<i>heat shock protein 27, 70</i> , proteiny teplotního šoku 27 či 70
HSV1, 2	<i>herpes simplex virus 1, 2</i> , viry oparu (herpes simplex)
HtrA2	<i>high temperature requirement A2</i> , savčí homolog bakteriálního proteinu HtrA
HU	hydroxyurea (hydroxymočovina či hydroxykarbamid)
Chk1, 2	<i>check-point kinase 1, 2</i> , kinázy aktivující kontrolní bod buněčného cyklu v reakci na poškození DNA
CHIP	<i>carboxyl terminus of HSP70-interacting protein</i> , C-konec proteinu interagujícího s Hsp70
IAP	<i>inhibitor of apoptotic proteins</i> , inhibitor apoptotických proteinů
ICAD	inhibitor DNázy CAD
IL1RL1	<i>interleukin 1 receptor-like 1</i> , protein podobný receptoru interleukinu-1
INO80	<i>inositol-requiring 80</i> , název mutace u kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , ATPáza remodelující chromatin
IPTG	izopropyl- β -D-thioglukopyranosid
IRF7	<i>interferon regulatory factor 7</i> , faktor podílející se na regulaci interferonové odpovědi
ISG20	<i>interferon stimulated exonuclease gene 20 kDa</i> , exonukleáza stimulovaná interferony o relativní molekulové hmotnosti 20 kDa
ISWI	<i>imitation Swi</i> , ATPáza remodelující chromatin
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> , N-koncová kináza transkripčního faktoru c-Jun

LB	Luria-Bertani, médium pro kultivaci bakterií
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , proteinkináza aktivovaná mitogeny (někdy se též uvádí jako MAP-kináza).
MAP3K	kináza kinázy MAP-kinázy (někdy též uváděná jako MAPKKK)
Mcl-1	<i>myeloid cell leukaemia-1</i> , protein mutovaný u myeloidní leukémie
MCM6	<i>minichromosome maintenance complex component 6</i> , složka komplexu udržujícího mj. minichromozomy kvasinek
MDM2	<i>murine double minute 2</i> (lidský protein se někdy nazývá Hdm2, tj. <i>human double minute 2</i>), myši „dvojnásobně maličký 2“, klíčová ubiquitin-ligáza regulující stabilitu proteinu p53
MMP1, 7	matrixová metalopeptidáza-1 či -7
MOPS	3-(<i>N</i> -morfolino)propansulfonová kyselina, používaná jako pufr
MRN	Mre11 / Rad51 / Nbs1 (<i>meiotic recombination 11 / radiation gene 50 / Nijmegen breakage syndrome 1</i>), komplex proteinů, který má důležitou úlohu při opravách DNA
mSin3A	<i>mammalian homologue of yeast Sin3</i> , savčí homolog kvasinkového genu Sin3 (<i>switch independent 3</i>)
MSP58	<i>58-kDa microspherule protein</i> , „mikrokuličkový“ protein s relativní molekulovou hmotností 58 kDa
MST1	<i>mammalian Ste20-like kinase-1</i> , savčí kináza podobná kvasinkové kináze Sterile-20 (Ste20)
Mx1	<i>myxovirus resistance 1</i> , gen rezistence k myxovirům
NCoA1	<i>nuclear receptor coactivator 1</i> , koaktivátor jaderného receptoru
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i> , jaderný faktor κ B
Noxa	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i> , protein indukovaný pomocí forbol-12-myristát-13-acetátem
NP40	Nonidet P-40, detergent
NuRD	<i>nucleosome remodelling and histone deacetylase complex</i> , komplex remodelující nukleozomy asociovaný s histondeacetylázami
OD ₆₀₀	optická denzita (absorbance) při vlnové délce 600 nm

p21, p53, p65	proteiny o relativní molekulové hmotnosti 21, 53, resp. 65 kDa
PanNET	pankreatické neuroendokrinní tumory
Pax3, 5	<i>paired box 3, 5</i> , transkripční faktor nesoucí tzv. párovaný box
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , fosforečnanem pufovaný roztok soli, druh fyziologického roztoku
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , polymerázová řetězová reakce
Pdcd4	<i>programmed cell death gene 4</i> , gen programované buněčné smrti
PEFAbloc	4-(2-aminoethyl)-benzensulfonylfluoridhydrochlorid, inhibitor serinových proteáz
PEI	polyetylenimin
PIAS1	<i>protein inhibitor of activated STAT</i> , proteinový inhibitor aktivovaného proteinu STAT
PIKK	<i>phosphatidyl-inositol-3-kinase-related-kinase</i> , kináza příbuzná fosfatidyl-inozitol-3-kináze (PI3K)
PML	<i>promyelocytic leukaemia</i> , gen mutovaný u akutní promyelocytární leukémie, kde je v důsledku chromozómové translokace fúzován s alfa-receptorem pro retinoovou kyselinu (RAR α)
pp71	fosfoprotein o relativní molekulové hmotnosti 71 kDa
pRB	retinoblastomový protein
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue</i> , homolog fosfatázy a tenzinu
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i> , modulátor apoptózy, jehož exprese je regulována proteinem p53
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i> , kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase,
RASSF1A, C	<i>Ras-association domain family 1 A, C</i> , protein 1A či C z proteinové rodiny obsahující Ras-asociační doménu
RelB	<i>avian reticuloendotheliosis viral oncogene related B</i> , protein příbuzný proteinu v-rel pocházejícímu z viru ptačí retikuloendocytózy
RIPK3	<i>receptor-interacting protein kinase 3</i> , proteinkináza interagující s receptorem

RNA	kyselina ribonukleová
RNAi	RNA-interference
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktivní druhy kyslíku
SANT	<i>SWI3, ADA2, NCoR, TFIIIB B</i> , doména některých jaderných faktorů
SAP30	<i>mSin3A-associated protein 30</i> , protein asociovaný s korepresorem mSin3A
SCEL	sciellin
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i> , elektroforéza v SDS-polyakrylamidovém gelu
SENP-1	<i>sentrin specific peptidase 1</i> , peptidáza specifická k sentrinu (proteinu SUMO)
Sesn2	Sestrin 2
SNCAIP	<i>synuclein alpha interacting protein</i> , protein interagující se synukleinem- α
shRNA	<i>small hairpin RNA</i> , RNA-interference pomocí umělé exprese malé vlásenkové RNA
siRNA	<i>small interfering RNA</i> , malá interferující RNA používaná k RNAi
Smac/DIABLO	<i>second mitochondria-derived activator / direct IAP-binding protein with low pI</i> , proapoptotický protein uvolňovaný z mitochondrií
Smad	spřežka vzniklá spojením slov Sma (<i>small</i> , malý) a MAD (<i>mothers against decapentaplegic</i> , „matky proti desetinohosti“), což jsou proteiny popsány u <i>Coenorhabditis elegans</i> (Sma) a <i>Drosophily melanogaster</i> (MAD), které náležejí do téže proteinové rodiny
SMARCA5	<i>SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5</i> , chromatinový regulátor příbuzný SWI/SNF, asociovaný s matrix a závislý na aktinu, podrodina A, člen 5; ATPáza remodelující chromatin
SNF2H	<i>sucrose nonfermenting 2 homologue</i> , homolog „sacharózu nefermentujícího 2“, jiný název pro SMARCA5

SOX15	<i>SRY-box 15</i> , protein obsahující SRY-box (pojmenován podle oblasti chromozómu Y podílející se na určení pohlaví, <i>sex determining region Y</i>)
SP100	<i>speckled protein 100</i> , protein o relativní molekulové hmotnosti 100 kDa, který v buňkách vytváří „skvrnky“
SPARC	<i>secreted protein, acidic, cysteine-rich</i> , kyselý sekretovaný protein bohatý na cystein (také zvaný osteonectin)
SPINK6	<i>serine peptidase inhibitor, Kazal type 6</i> , inhibitor serinových peptidáz, který obsahuje doménu Kazal
SPOP	<i>speckle-type POZ protein</i> , protein obsahující doménu POZ (<i>Pox virus / Zinc finger</i> , tj. nalezená v proteinu poxvirů a asociovaná se zinkovými prsty), který v buňce vytváří „skvrnky“
STAT3, 4	<i>signal transducer and activator of transcription</i> , přenašeč signálu a aktivátor transkripce
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i> , malý modifikátor podobný ubikvitinu
Swi/Snf	<i>switch / sucrose-nonfermenting</i> , „přepnutí“ / „nefermentující sacharózu“, název genu objeveného v kvasinkách u mutant neschopných změny párovacího typu a fermentace sacharózy; později se ukázalo, že příbuzné geny tvoří rodinu ATPáz remodelujících chromatin
Swr1	<i>Swi / Snf related protein 1</i> , protein příbuzný Swi / Snf
TβRII	TGFβ-receptor-2
TAE	Tris / acetát (octan) / EDTA, název pufru, který se používá k elektroforéze v agarózovém gelu
TCF4	<i>transcription factor 4</i> , transkripční faktor 4
TALEN	<i>transcription activator-like effector nuclease</i> , nukleáza vycházející z efektoru podobného transkripčnímu aktivátoru
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin
TGFβ	<i>transforming growth factor β</i> , transformující růstový faktor β
Tigar	<i>TP53 induced glycolysis regulatory phosphatase</i> , fosfatáza regulující glykolýzu, indukovaná pomocí p53

TNF/TNFR	<i>tumour necrosis factor / TNF receptor</i> , faktor nekrotizující nádory a jeho receptor
TRADD	<i>TNFR-associated death-domain protein</i> , adaptérový protein asociovaný s receptorem TNF, který obsahuje doménu smrti
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i> , ligand vyvolávající apoptózu příbuzný TNF
TRIM21	<i>tripartite motif containing 21</i> , protein obsahující trojstranný motiv
Tyk2	tyrozinkináza-2
Ubc9	<i>ubiquitin conjugating enzyme 9</i> , ubikvitin-konjugující enzym 9
Ubn1	Ubinuclein-1
UL97	produkt cytomegalovirového genu UL97
UXT	<i>ubiquitously expressed transcript</i> , protein, jehož exprese byla zjištěna ve všech zkoumaných tkáních
VP16	etopozid, zkratka pravděpodobně pochází z kombinace jmen von Wartbung a von Kuhn a slova podophyllotoxin [1]
Wip1	<i>wildtype p53-induced phosphatase 1</i> , fosfatáza indukovaná „divokou“ formou proteinu p53
Wnt	<i>wingless / integrated</i> , „wingless“ je název mutace u octomilky <i>Drosophila melanogaster</i> , která se vyznačuje ztrátou křídel, „ <i>integrated-1</i> “ je gen, v jehož blízkosti se integruje virus myšího nádoru mléčné žlázy (postupně se ukázalo, že se jedná o geny, jejichž produkty náleží do téže proteinové rodiny)
Y2H	<i>yeast 2-hybrid</i> , kvasinkový dvojhybridní systém
YPDA	<i>Yeast-Peptone-Dextrose-Adenine</i> , kvasnice / pepton / glukóza / adenin, kompletní médium pro kultivaci kvasinek
Zac1	<i>zinc-finger protein which regulates apoptosis and cell cycle arrest</i> , transkripční faktor se zinkovými prsty, který reguluje apoptózu a zastavení buněčného cyklu
ZIPK	<i>zipper interacting protein kinase</i> , proteinkináza interagující s proteinem nesoucím leucinový zip

Úvod

I.

Základní informace o proteinu Daxx

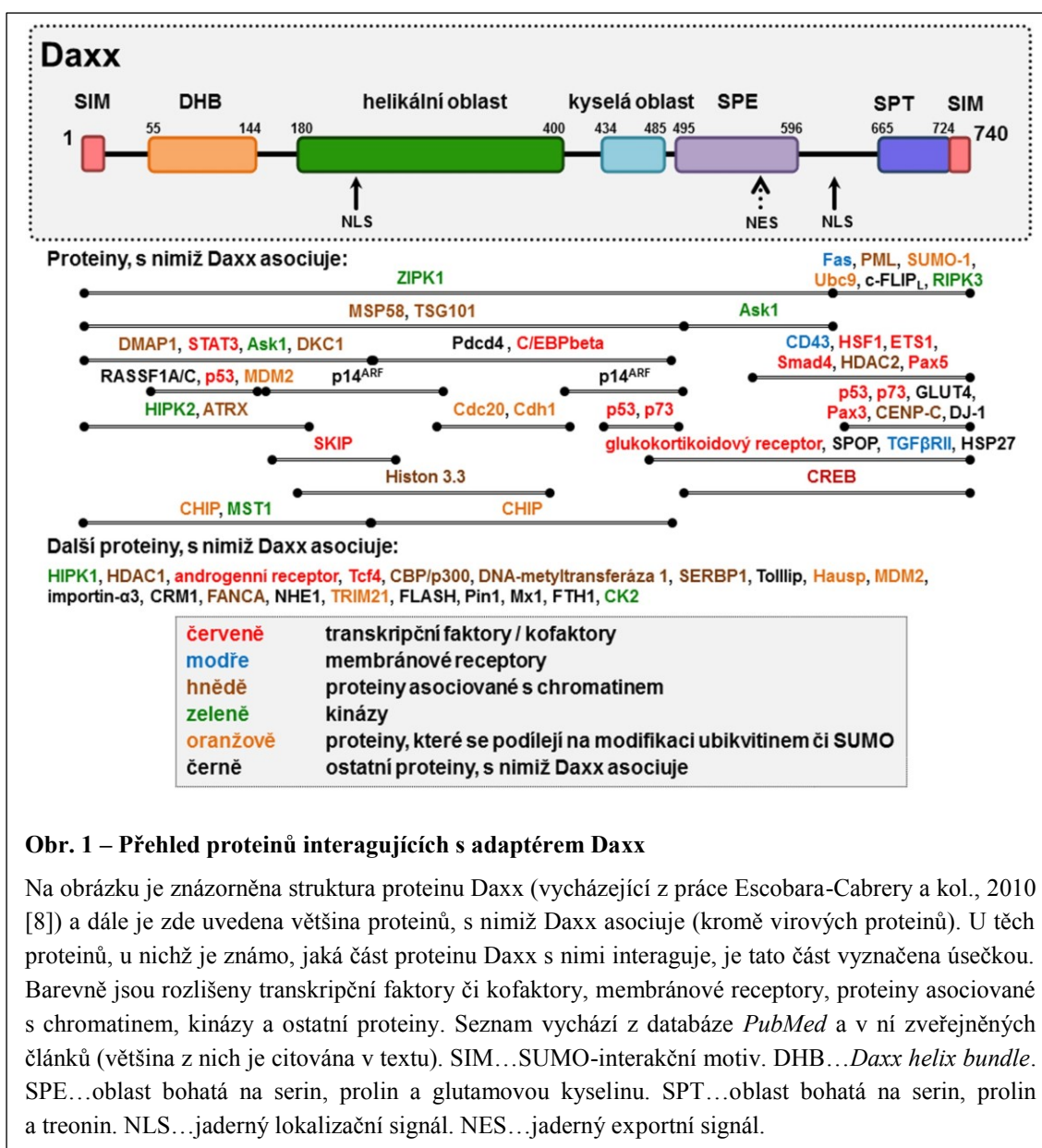
I. 1. Představení proteinu Daxx

Daxx (*death domain-associated protein six*) je multifunkční, převážně jaderný adaptérový protein, který interaguje s desítkami jaderných i cytoplazmatických proteinů (viz obr. 1) a účastní se nejrůznějších buněčných pochodů, mezi něž patří regulace genové exprese, struktury chromatinu, posttranslačních modifikací, apoptotické signalizace, antivirové odpovědi a dalších. V jednotlivých případech, pravděpodobně v závislosti na buněčném kontextu či aktuálních fyziologických podmínkách, může mít Daxx vliv jak aktivační, tak inhibiční. U některých pochodů tak jeho role zůstává nejasná.

Poprvé byl Daxx popsán v roce 1997 Yangem a spol., kteří jej identifikovali v kvasinkovém dvojhybridním systému jakožto protein interagující s vnitrobuněčnou doménou smrti (*death domain*) receptoru smrti (*death receptor*) Fas, u něhož se podílí na aktivaci apoptózy [2]. Gen pro expresi proteinu Daxx byl nalezen na chromozómu 6 v lokusu 6p21.3 uvnitř hlavního histokompatibilního komplexu, což by naznačovalo jeho roli v imunitním systému [3, 4]. V téže době Pluta a spol. charakterizovali Daxx coby jaderný protein, který asociuje s centromerovým proteinem CENP-C [5] a krátce nato se také ukázalo, že je Daxx složkou jaderných PML-tělísek [6]. Již tyto počáteční práce tedy naznačovaly, že se Daxx účastní širokého spektra buněčných pochodů.

I. 2. Struktura proteinu Daxx

Hlavní forma lidského proteinu Daxx obsahuje 740 aminokyselin a má předpokládanou relativní molekulovou hmotnost 81,4 kDa. V SDS-PAGE se však pohybuje jako proužek o velikosti 110 – 120 kDa (viz např. obr. 8), což je zřejmě způsobeno tím, že Daxx obsahuje značné množství záporně nabitých aminokyselin. Vedle hlavní formy proteinu Daxx existuje podle databáze *Entrez Gene* ještě několik izoform, které se odlišují buď v N-konci, nebo v C-konci, ale jejich funkce je převážně neznámá. U izoform beta a gama, které mají jinou C-koncovou oblast (posledních asi 100 aminokyselin), byla pozorována odlišná distribuce v jádře. Tyto izoformy také nejsou schopny vázat protein



Obr. 1 – Přehled proteinů interagujících s adaptérem Daxx

Na obrázku je znázorněna struktura proteinu Daxx (vycházející z práce Escobara-Cabrery a kol., 2010 [8]) a dále je zde uvedena většina proteinů, s nimiž Daxx asociuje (kromě virových proteinů). U těch proteinů, u nichž je známo, jaká část proteinu Daxx s nimi interaguje, je tato část vyznačena úsečkou. Barevně jsou rozlišeny transkripční faktory či kofaktory, membránové receptory, proteiny asociované s chromatinem, kinázy a ostatní proteiny. Seznam vychází z databáze *PubMed* a v ní zveřejněných článků (většina z nich je citována v textu). SIM...SUMO-interakční motiv. DHB...*Daxx helix bundle*. SPE...oblast bohatá na serin, prolin a glutamovou kyselinu. SPT...oblast bohatá na serin, prolin a treonin. NLS...jaderný lokalizační signál. NES...jaderný exportní signál.

p53 [7]. Další informace v tomto teoretickém úvodu se proto budou týkat nejlépe charakterizované, hlavní formy proteinu Daxx (tj. formy alfa).

Tato hlavní forma se skládá z několika lépe definovaných úseků či sekvenčních motivů (viz obr. 1). Neobsahuje však žádnou doposud charakterizovanou funkční doménu a nebyla u ní pozorována ani žádná enzymová funkce. N-koncová polovina proteinu Daxx je organizovanější, s několika helikálními motivy, C-koncová je spíše volná a značně flexibilní [8].

Prvním helikálním motivem proteinu Daxx je tzv. „*Daxx helix bundle*“ (aminokyseliny 55 – 144), svazek čtyř alfa-helixů, uzavřený mezi helixem 2 a 4 dalším alfa-helixem. Tento motiv je pro Daxx charakteristický a pravděpodobně slouží k interakcím s dalšími proteiny, např. RASSF1C [8]. Mezi aminokyselinami 180 – 400 následuje další předpo-

kládaný helikální motiv, který zřejmě také slouží k protein-proteinovým interakcím, v C-koncové polovině je poté oblast bohatá na záporně nabitě aminokyseliny (434 – 485), oblast bohatá na serin, prolin a glutamovou kyselinu (495 – 596) a oblast bohatá na serin, prolin a treonin (665 – 724).

Daxx dále obsahuje dva jaderné lokalizační signály, jeden v N-koncové, druhý v C-koncové polovině [9], jeden jaderný exportní signál v C-koncové polovině [10] a dva SUMO-vazebné motivy (*SUMO-interacting motif*, SIM) na C- i N-konci [11-13].

Uvedené protein-proteinové interakční motivy tedy dokládají množství pochodů, na nichž se Daxx podílí.

II.

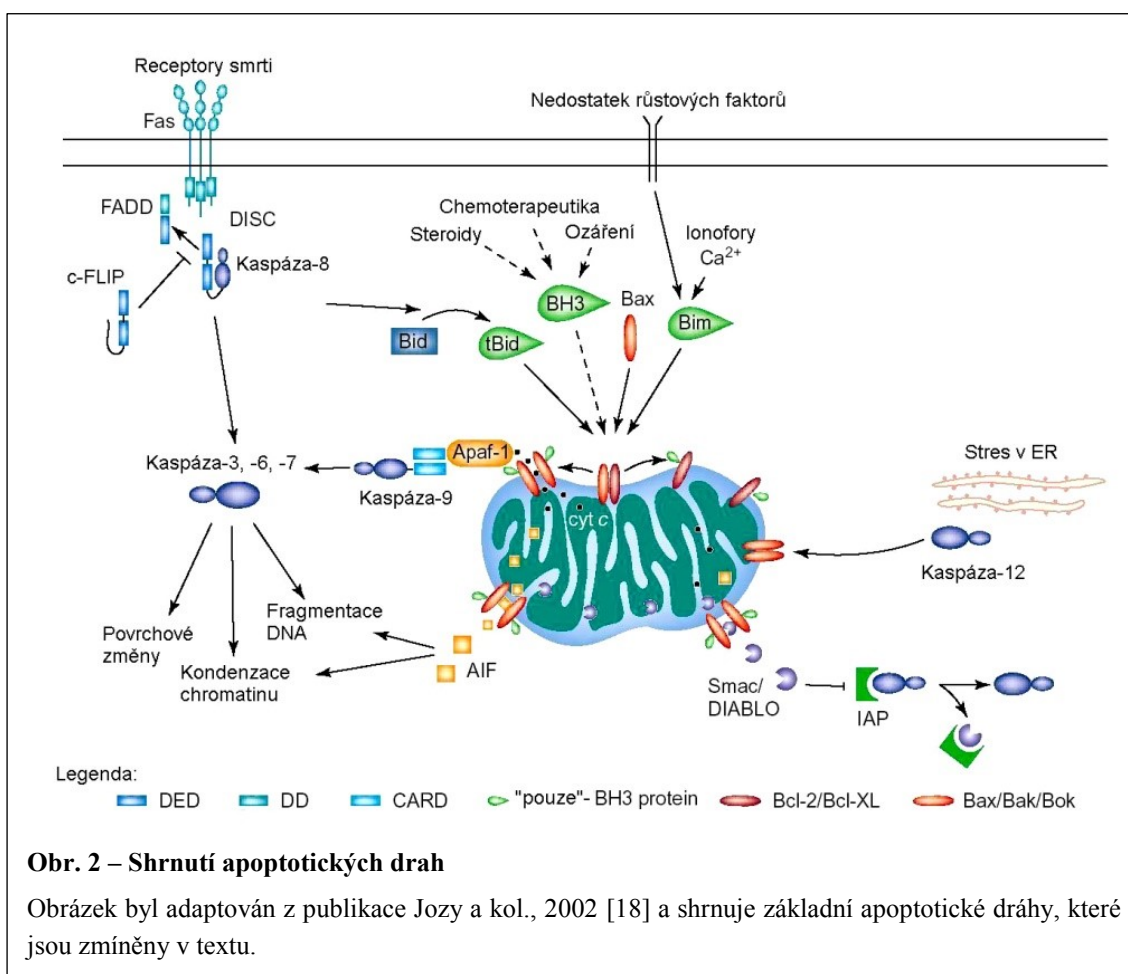
Úloha proteinu Daxx při buněčné reakci na stresové či apoptotické signály

II. 1. Přehled apoptotické signalizace

Apoptóza (z řeckého výrazu označujícího opad listů ze stromů) je jednou z forem řízené buněčné smrti. Při tomto procesu (na rozdíl od „spontánní“, neřízené buněčné smrti, tj. nekrózy) jsou odstraňovány buňky nepotřebné (např. během zárodečného vývinu) či potenciaálně nebezpečné (napadené viry či chovající se „nestandardně“, kupř. nádorové). Během apoptózy je postupně kondenzován chromatin, DNA štěpena na malé fragmenty a buňka se nakonec rozpadá na váčky (apoptotická tělíčka), které jsou posléze pohlceny fagocytujícími buňkami. Nedochozí tedy k uvolnění buněčného obsahu, a tedy ani k aktivaci některých složek imunitního systému, jako při nekróze či formách řízené buněčné smrti, které se nekróze podobají [14-16].

Apoptotická signalizace může být vyvolána nejrůznějšími faktory, majícími původ jak uvnitř buňky, tak vně. Ke vnitřním faktorům patří různé formy buněčného stresu (nadměrný výskyt chybně sbalených proteinů, poškození DNA, apod.), ale též přemíra signálů podporujících buněčné dělení, apod. [14-16]. Velmi důležitou úlohu při aktivaci takovéto apoptózy má transkripční faktor p53, který nejrůznější vnitřní signály integruje [17] (viz zejména oddíl II. 5. 1.).

Vnějšími spouštěči apoptózy může být např. nedostatek mitogenních signálů, zásadní význam však mají především tzv. receptory smrti (*death receptors*) z proteinové rodiny TNFR. Tyto receptory, mezi nimi zejména Fas a receptory ligandu TRAIL (DR4, DR5),



ve své vnitrobuněčné části obsahují tzv. doménu smrti (*death domain*, DD), interakční motiv, který může vázat jinou doménu smrti. Po vazbě ligandu (většinou z proteinové rodiny TNF; tyto ligandy se nacházejí např. na membráně cytotoxických lymfocytů) na receptor asociují s touto doménou adaptérové proteiny (FADD a TRADD), které kromě domény smrti obsahují také tzv. výkonnou doménu smrti (*death effector domain*, DED), motiv, který může vázat jiné výkonné domény smrti, přítomné např. v prodroménách iniciačních kaspáz (např. kaspázy-8). Postupně se tak ve vnitrobuněčné části receptoru smrti vytváří tzv. smrtící signální komplex (*death inducing signaling complex*, DISC) [14-16].

Kaspázy jsou proteinovou rodinou proteáz, jež ve svém aktivním místě obsahují cystein a štěpí peptidovou sekvenci za kyselinou asparágovou a které hrají během apoptotické signalizace důležitou úlohu. Substráty kaspáz jsou jednak kaspázy samotné, jednak proteiny inhibující apoptózu (např. ICAD – inhibitor nukleázy CAD, kaspázové inhibitory z proteinové rodiny IAP, aj.), proteiny regulující buněčný cyklus, proteiny cytoskeletu, proteiny účastníci se oprav DNA, apod. Vzhledem k tomu, že zejména aktivace tzv. výkonných (efektorových) kaspáz (např. kaspázy-3) většinou představuje nevratný

krok, jsou tyto proteázy velmi pečlivě regulovány. Všechny jsou syntetizovány coby neaktivní proenzymy, které se aktivují štěpením. Nejprve jsou takto aktivovány tzv. iniciační kaspázy, obsahující dlouhé prodomény s protein-proteinovými interakčními motivy. Např. prokaspáza-8 se pomocí své výkonné domény smrti váže do smrtícího signálního komplexu na receptoru smrti, při této vazbě dojde k lokální kumulaci prokaspáz-8, jejich vzájemnému štěpení a tím i aktivaci. Aktivní kaspáza-8 poté může štěpit, a tím rovněž aktivovat výkonné kaspázy. Tomuto procesu brání jednak protein FLIP, který se podobá kaspáze-8, ale nemá aktivní katalytické místo, jednak inhibitory z proteinové rodiny IAP [14-16].

U většiny buněk aktivace iniciačních kaspáz nestačí k dostatečné aktivaci výkonných kaspáz a apoptotický signál je dále amplifikován přes mitochondrie. V jejich membráně se postupně vytvářejí póry, které jednak naruší mitochondriální elektrochemický membránový potenciál a jednak se skrze ně uvolní proteiny, které dále podporují apoptózu. Mezi ně patří např. HtrA/Omi a Smac/Diablo, které inhibují apoptotické inhibitory z proteinové rodiny IAP, a zejména cytochrom c. Ten interaguje s adaptérovým proteinem Apaf-1, který následně vytvoří heptamer a pomocí své domény CARD (*caspase activating and recruiting domain*) váže iniciační kaspázu-9, přičemž vzniká tzv. apoptozóm. V něm se kaspáza-9 štěpením aktivuje a následně může aktivovat výkonné kaspázy [14-16].

Vytváření pórů v mitochondriální membráně je regulováno proteiny z rodiny Bcl-2. Mezi ně patří jak inhibitory tvorby pórů (např. Bcl-2, Bcl-X_L), tak proteiny tyto póry vytvářející (Bax, Bak). Tyto proteiny jsou dále regulovány tzv. pouze-BH3-proteiny (*BH3-only proteins*), které rovněž náležejí do proteinové rodiny Bcl-2 a mohou jak blokovat protiapoptotické proteiny z rodiny Bcl-2 (všechny pouze-BH3-proteiny), tak pomáhat při aktivaci proapoptotických proteinů Bax a Bak (zejména Bim, tBid či Puma). Pouze-BH3-proteiny Noxa a Puma mohou být aktivovány vnitřními spouštěči apoptózy, neboť jejich expresi reguluje např. transkripční faktor p53. Naproti tomu protein Bid je štěpen přímo iniciační kaspázou-8 a jeho zkrácená forma (tBid) poté podporuje tvorbu apoptotických pórů v mitochondriální membráně [14-16].

Z výše uvedeného je zřejmé, že je apoptóza vzhledem ke své nezvratnosti v buňce regulována mnoha signálními drahami. To, jak silný musí apoptotický signál být, závisí na míře exprese apoptotických inhibitorů. Apoptóza proběhne jedině v případě, kdy převáží proapoptotické signály.

II. 2. Úloha proteinu Daxx při apoptotické signalizaci vyvolané vazbou ligandu na receptor Fas

První práce zkoumající Daxx naznačily, že je tento protein zřejmě dalším typem adaptéru interagujícího s doménou smrti receptoru Fas, který se liší od adaptérů s doménou smrti FADD a TRADD a po asociaci s doménou smrti aktivuje kinázu JNK, což podporuje apoptózu [2]. Tato asociace, ačkoli na proteinu FADD nezávisí [19], může být blokována apoptotickým inhibitorem FLIP_L [20].

Kinázová rodina JNK zahrnuje tři blízce si příbuzné geny (JNK-1, -2 a -3) náležející do širší proteinové rodiny tzv. mitogeny aktivovaných proteinkináz (MAP-kináz). Kinázy JNK se účastní odpovědi na různé formy buněčného stresu či na apoptotické signály buď přímo, tedy prostřednictvím fosforylace příslušných proteinů, nebo nepřímo pomocí regulace genové exprese. U apoptózy mohou hrát roli jak aktivační, tak inhibiční, přičemž mohou aktivovat různé formy buněčné smrti [21].

Daxx pravděpodobně s kinázami z proteinové rodiny JNK neinteraguje přímo, nýbrž je aktivuje prostřednictvím MAP3-kinázy Ask1, kterou váže prostřednictvím svého úseku obsahujícího aminokyseliny 501 – 625. Je-li tento úsek nadprodukován, dokáže sám o sobě aktivovat MAP3-kinázu Ask1, skrze ni MAP-kinázy z proteinové rodiny JNK a následně též indukovat apoptózu [22]. Takto vyvolané apoptotické signalizace se zřejmě účastní kaspázy a její signál je amplifikován přes mitochondrie prostřednictvím pouze-BH3-proteinů Bim a tBid [23]. Nadprodukováný Daxx společně s kinázou Ask1 mohou také vyvolat buněčnou smrt morfologicky odlišnou od klasické apoptózy, nezávislou na kaspázách [24].

Výše popsanou signální dráhu, v níž by vazba ligandu na receptor Fas vedla k aktivaci kináz JNK prostřednictvím proteinu Daxx a jím aktivované kinázy Ask1, nicméně zpochybňují pozdější studie. Nadprodukce proteinu Daxx sice v některých případech zvyšovala citlivost buněk k apoptóze vyvolané vazbou ligandu na receptor Fas, ale Daxx ve skutečnosti s tímto receptorem vůbec neinteragoval. Namísto toho asocioval s jadernými PML-tělísky, a tato lokalizace proteinu Daxx byla pro jeho proapoptotickou úlohu nezbytná [25]. To bylo ve shodě s předchozím pozorováním u buněk akutní promyelocytární leukémie, kde proapoptotickou funkci proteinu Daxx inhiboval fúzní protein PML-RAR α , který tvorbu PML-tělísek narušuje [26]. Jindy však zvýšená lokalizace proteinu Daxx v PML-tělíscích, vyvolaná nadprodukcí proteinu SUMO-1, apoptózu

po vazbě ligandu na receptor Fas potlačovala a opačný účinek měla nadprodukce deSUMOylačního enzymu SENP-1 [27].

U prvních studií, které popisovaly úlohu proteinu Daxx během apoptotické signalizace, bylo navíc problematické, že využívaly nadprodukce buď celého proteinu, nebo dokonce pouze jeho fragmentu obsahujícího aminokyseliny 501 – 625. Relevance výsledků zjištěných v takovémto umělém systému je tedy sporná. Například nadprodukce C-koncové oblasti proteinu Daxx, která by podle předchozích zjištění měla interagovat s doménou smrti receptoru Fas (aminokyseliny 625-740), a tudíž interferovat s proapoptotickou funkcí proteinu Daxx, v některých případech neměla na apoptózu způsobenou vazbou ligandu na receptor Fas žádný vliv [28, 29], ačkoli např. u T-lymfocytů či neuronů před takovouto apoptózou chránila [30, 31]. Je tedy možné, že tento fragment ve skutečnosti působil jinak, než že by bránil vazbě endogenního proteinu Daxx na receptor Fas. Rovněž tak nadprodukce celého proteinu Daxx mohla spíše uměle zvyšovat buněčný stres, což mohlo přispívat k apoptotické signalizaci, než aby ji tento protein ovlivňoval přímo (viz oddíl II. 5.).

Práce, které namísto nadprodukce využívaly umělého potlačení exprese proteinu Daxx pomocí RNA-interference (RNAi), naznačily, že přinejmenším v některých případech Daxx před apoptózou, vyvolanou různými stresovými faktory či vazbou ligandu na receptor Fas, spíše chrání, neboť jeho odstranění takovouto apoptotickou signalizaci zesilovalo [32-34].

Ochranné funkci proteinu Daxx by nasvědčoval i úhyn myších zárodků, u nichž byla jeho exprese zcela potlačena pomocí techniky genové delece (*gene knock-out*), deset dní po implantaci do dělohy. U takovýchto zárodků byly patrné dosti závažné poruchy vývinu, doprovázené masivní apoptózou [35]. Po odstranění proapoptotického proteinu by přitom bylo možné očekávat spíše opačný efekt, tj. závažné následky spojené s hromaděním buněk. Obdobný účinek jako genová delece mělo také potlačení exprese proteinu Daxx pomocí RNAi, které způsobovalo zvýšenou spontánní apoptózu [36]. Uvedená pozorování nicméně nemusejí dokazovat inhibiční funkci proteinu Daxx při apoptotické signalizaci. Odstranění proteinu Daxx za použití techniky genové delece způsobuje poruchy v buněčném cyklu, spojené s výskytem vícejaderných buněk, které mohou vést až k senescenci či řízené buněčné smrti [37, 38]. To může souviset s dalšími důležitými úlohami proteinu Daxx, např. při udržování konstitutivního heterochromatinu (viz oddíl III. 6.) či při regulaci mitózy (viz oddíl III. 7.).

Z výše popsaných zjištění vyplývá, že úloha proteinu Daxx během apoptotické signalizace způsobené vazbou ligandu na receptor Fas zůstává poněkud nejasná. Rozporné výsledky jednotlivých studií lze vysvětlit použitím odlišných experimentálních podmínek, buněčných linií, apod. Další možností je, že je apoptotická signální dráha, jíž se Daxx účastní, spíše doplňková a uplatňuje se pouze za některých podmínek, zatímco jindy převládnu další funkce proteinu Daxx. Tomu by nasvědčoval i fakt, že je Daxx převážně jaderný protein (viz následující oddíl II. 3.), zatímco počáteční kroky apoptotické signalizace po vazbě ligandu na receptor Fas se odehrávají v cytoplazmě. Bylo přitom pozorováno, že přesun proteinu Daxx z jádra do cytoplazmy podporuje samotná aktivace receptoru Fas [39] či nadprodukce kinázy Ask1 [40]. Možná tedy Daxx napomáhá spíše k amplifikaci apoptotického signálu, podobně jako je tento signál někdy amplifikován přes mitochondrie.

II. 3. Jaderná lokalizace proteinu Daxx a regulace jeho přechodu do cytoplazmy

Ačkoli byl Daxx poprvé popsán coby adaptérový protein, který interaguje s membránovým receptorem Fas, již krátce po jeho objevu bylo zjištěno, že se nachází především v jádře [5]. Další analýzy ukázaly, že Daxx obsahuje dva jaderné lokalizační signály, přičemž interaguje s importinem- α 3 [9], ale kromě toho též jaderný exportní signál. Za přechod z jádra do cytoplazmy odpovídá protein CRM1 [10].

Tento přesun proteinu Daxx z jádra do cytoplazmy se zřejmě odehrává pouze za některých podmínek, třeba při nedostatku glukózy, oxidačním stresu či po aktivaci receptoru Fas, a jinak zůstává Daxx v jádře [10, 39, 41]. K regulaci přechodu do cytoplazmy nejspíše slouží posttranslační modifikace, případně interakce s dalšími proteiny. Důležitý je například serin 668¹, jehož nahrazení alaninem přesun do cytoplazmy blokuje [10, 42]. Serin 668 může být fosforylován kinázou HIPK1, která sama může být fosforylována, a tím aktivována kinázou JNK1 [43, 44], což je ve shodě s pozorováním, že ke zvýšenému přechodu proteinu Daxx do cytoplazmy přispívá aktivace kináz z proteinové rodiny JNK způsobená nadprodukcí kinázy Ask1 [40]. Další kinázou, která fosforyluje serin 668 proteinu Daxx, je kináza RIPK3, která hraje důležitou roli při programované nekróze (nekroptóze) a zánětlivé odpovědi [45]. I v tomto případě má fosforylace serinu 668, vyvolaná oxidačním stresem, za následek přechod proteinu Daxx z jádra do cytoplazmy [46].

¹ V některých zdrojích je aminokyselina serin 668 uváděna jako 667, ale v této pozici se serin nenachází a v nejbližším okolí je pouze na pozici 668. Pravděpodobně se tedy jedná o chybu.

Jinou posttranslační modifikací proteinu Daxx, která má pravděpodobně vliv na jeho buněčnou lokalizaci, je kovalentní vazba proteinu SUMO, podobného ubikvitinu. Tato modifikace proteinů probíhá obdobně jako ubikvitinylace, ale na rozdíl od některých jejích typů nevede zpravidla k degradaci modifikovaného proteinu a ovlivňuje spíše proteinové interakce. Ukazuje se navíc, že hraje důležitou roli při reakci na různé formy buněčného stresu [47, 48]. Daxx interaguje s E2-konjugujícím proteinem Ubc9 [49] a hlavním místem jeho modifikace proteinem SUMO jsou aminokyseliny lyzin 630 a 631 [50], které se nacházejí přímo v C-koncovém jaderném lokalizačním signálu (aminokyseliny 630 – 637 [9]). Nahrazení těchto aminokyselin alaninem v některých případech vedlo ke hromadění proteinu Daxx v cytoplazmě [51, 52], jindy to však na jeho buněčnou lokalizaci vliv nemělo [50].

Jinou aminokyselinou důležitou pro buněčnou lokalizaci proteinu Daxx je tryptofan 622². Tato aminokyselina se nachází v těsném sousedství C-koncového jaderného lokalizačního signálu a zřejmě jej nějak ovlivňuje, neboť její záměna za alanin způsobí hromadění proteinu Daxx v cytoplazmě [10, 42]. Zatím však není známo, zda je také tato aminokyselina posttranslačně modifikována.

Přechod proteinu Daxx z jádra do cytoplazmy může také regulovat interakce s proteiny TRIM21 a FLASH. TRIM21 je ubikvitin-ligáza důležitá pro antivirovou odpověď [53] a FLASH byl popsán jako protein, který kromě toho, že interaguje s receptorem Fas a podílí se na aktivaci kaspázy-8, se jinak vyskytuje v jádře, kde mj. asociuje s PML-tělísky, a do cytoplazmy se přesouvá pouze v některých případech [54, 55]. Daxx, FLASH a TRIM21 spolu vytvářejí komplex a jejich společná nadprodukce způsobí přednostní lokalizaci proteinu Daxx v cytoplazmě [56].

Pravděpodobným důvodem přechodu proteinu Daxx do cytoplazmy je regulace různých funkcí, které tento protein v buňce má. Účast při apoptotické signalizaci byla u proteinu Daxx popsána především v cytoplazmě, a je-li jeho přechod do cytoplazmy blokován, potlačuje to též apoptózu způsobenou jeho nadprodukcí či nadprodukcí kinázy Ask1, případně oxidačním stresem [39, 41, 57-59]. Také fragment obsahující pouze aminokyseliny 501-625, jehož nadprodukce indukuje apoptózu, je cytoplazmatický [43].

Obdobně jako v případě úlohy proteinu Daxx při apoptóze vyvolané vazbou ligandu na receptor Fas je i jeho přechod z jádra do cytoplazmy poněkud sporný. Některé publi-

² Stejně zdroje, které uvádějí serin 668 jako serin 667, uvádějí také tryptofan 622 jako tryptofan 621. V pozici 621 se ale tryptofan také nenachází. Pravděpodobně se jedná o tutéž chybu.

kované práce ukazují, že Daxx do cytoplazmy nepřechází, a pokud se apoptotické signalizace účastní, děje se to v jádře, zejména pak v PML-tělíscích [25, 26, 60].

II. 4. Úloha proteinu Daxx při apoptotické signalizaci vyvolané aktivací dalších buněčných receptorů

II. 4. 1. Úloha proteinu Daxx v signální dráze TGF β

Daxx se účastní také dalších typů apoptotické signalizace. Jedním z nich je signalizace po aktivaci receptorů ligandů z proteinové rodiny TGF β , které hrají důležitou úlohu při regulaci imunitní odpovědi, zárodečného vývinu, buněčného růstu i apoptózy a také při mnoha patologických stavech spojených s chronickým zánětem, např. tkáňových fibrózách či nádorovém bujení. V kanonické signální dráze TGF β dochází k fosforylaci, a tím aktivaci transkripčních faktorů z proteinové rodiny Smad, nicméně existují i další, nekanonické dráhy, při nichž mohou být např. aktivovány i kinázy z proteinové rodiny JNK [61]. U proteinu Daxx bylo popsáno, že interaguje s vnitrobuněčnou částí TGF β -receptoru-2 (T β RII). Vazba TGF β na tento receptor u hepatocytů způsobuje apoptózu spojenou s aktivací JNK. Nadprodukce proteinu Daxx tento proces dále zesiluje a naopak potlačení jeho exprese inhibuje [62]. Daxx je v této dráze pravděpodobně regulován kinázou HIPK2, která je příbuzná HIPK1. Tato kináza interaguje s C-koncovou částí proteinu Daxx a její nadprodukce způsobuje strukturní změny PML-tělísek, spojené s uvolňováním proteinů včetně proteinu Daxx, který je zároveň fosforylován. Společná nadprodukce HIPK2 s proteinem Daxx má za následek vyšší citlivost hepatocytů k apoptóze vyvolané aktivací T β RII, zatímco snížení exprese HIPK2 pomocí RNAi tuto apoptózu potlačuje [63, 64]. Dráha TGF β je ovšem proteinem Daxx pravděpodobně regulována na více úrovních, neboť bylo také popsáno, že Daxx potlačuje expresi regulovanou transkripčním faktorem Smad4 [65]. Úloha proteinu Daxx při regulaci zahájení transkripce je pojednána v oddíle III. 5.

II. 4. 2. Účast proteinu Daxx při apoptóze vyvolané aktivací CD43

Další buněčný receptor, s nímž Daxx interaguje, byl identifikován v laboratoři, v níž působil i autor této dizertační práce. Pomocí protilátek proti povrchovým molekulám bílých krvinek (tzv. CD-molekulám) byly hledány takové protilátky, které způsobují apoptózu. Jednou z nich byla imobilizovaná protilátka proti proteinu CD43 (leukosialin), která vyvolávala apoptózu u myeloidních progenitorů. Při následném Y2H byl jako interakční partner vnitrobuněčné části CD43 objeven Daxx, jehož nadprodukce však

apoptózu vyvolanou imobilizovanou protilátkou proti CD43 potlačovala [66]. Po tomto svém objevu byl Daxx podroben dalším analýzám, z nichž vychází i tato dizertační práce.

II. 4. 3. Účast proteinu Daxx v signální dráze TNF α

Signální dráha Ask1-JNK, vedoucí k apoptóze, může být aktivována též receptorem smrti TNFR1 [67], a vede mimo jiné i ke zvýšení množství proteinu Daxx v buňce. Kináza Ask1 v tomto případě fosforyluje Daxx na serinech 176 a 184, což vede k vytvoření polyubikvitinového řetězce (vázaného přes lyzin 63) na lyzinu 122. Tato polyubikvitinylace sice není potřeba pro regulaci množství proteinu Daxx či pro jeho interakci s kinázou Ask1, ale je nezbytná pro zvýšení její aktivity, projevující se vyšší aktivací kinázy JNK po inkubaci buněk s TNF α [68, 69]. Také signální dráha TNF α je zřejmě proteinem Daxx regulována na více úrovních, neboť po inkubaci buněk s tímto cytokinem Daxx asociuje s transkripčním faktorem NF- κ B a snižuje jeho aktivitu [70]. Vzhledem k tomu, že NF- κ B reguluje spíše dráhy vedoucí k buněčnému přežití [71], lze předpokládat, že takováto jeho inhibice poté podporuje buněčnou smrt. Úloha proteinu Daxx při regulaci transkripce je podrobněji diskutována v oddíle III. 5.

II. 4. 4. Účast proteinu Daxx při apoptóze vyvolané interferony

Daxx je také spojován s apoptotickou signalizací po aktivaci některých interferonových receptorů. Např. u krevních buněk či jejich progenitorů inkubovaných s interferony typu I ($-\alpha$, $-\beta$ či $-\xi$ /limitin) exprese proteinu Daxx vzrůstá, což koreluje s potlačením buněčného růstu či vyšší apoptózou, zatímco snížení exprese proteinu Daxx pomocí RNAi tento účinek zvrátí. Odstranění receptorů pro interferon $-\alpha$ a $-\beta$ vede k nižší expresi proteinu Daxx a současně i k inhibici apoptózy. V této signální dráze je ale role proteinu Daxx spíše nepřímá a souvisí s jeho lokalizací v jaderných PML-tělíscích působením kinázy Tyk2 [72-77]. Mimo to Daxx přispívá i k apoptóze způsobené inkubací s interferonem- γ . Exprese proteinu Daxx se také v tomto případě zvyšuje, což vede k aktivaci proapoptotické kinázy MST1 a následné apoptóze [78]. Rovněž pro tuto apoptotickou signalizaci je zřejmě nezbytný přesun proteinu Daxx do PML-tělísek a podílí se na ní též proapoptotická kináza ZIPK [79].

Účast proteinu Daxx při signalizaci vyvolané interferony může souviset i s jeho rolí při antivirové odpovědi, která bude pojednána dále (viz zejména oddíly III. 2. a III. 3.).

II. 5. Úloha proteinu Daxx při reakci na buněčný stres

II. 5. 1. Buněčný stres a úloha proteinu p53

Jako buněčný stres lze označit jakýkoli stav, který může vést k poškození buňky, např. zvýšený výskyt chybně sbalených proteinů, oxidační stres, poškození DNA (genotoxický stres), apod. Vzhledem k rozmanitosti jeho forem buňky využívají širokého spektra signálních drah vedoucích k jeho nápravě či naopak k odstranění neopravitelně poškozené buňky [80].

Jak již bylo uvedeno výše (viz oddíl II. 1.), významnou úlohu při reakci na buněčný stres mají transkripční faktory z proteinové rodiny p53 (kromě p53 ještě zahrnující příbuzné proteiny p63 a p73). Tyto proteiny mohou být na mnoha svých místech posttranslačně modifikovány (např. fosforylovány, ubikvitinylovány, acetylovány, apod.) a v závislosti na kombinaci příslušných modifikací se poté podílejí buď na zastavení buněčného cyklu do doby, než je stres napraven, anebo odstranění buňky pomocí řízené buněčné smrti. Protein p53 je vzhledem ke své důležité funkci senzoru buněčného stresu častým cílem mutací v nádorech, které mají za následek jeho nadměrné hromadění, narušení jeho funkce a v některých případech i získání pronádorových aktivit. Pozměněny mohou být i dráhy, které p53 regulují [81, 82].

Za normálních podmínek je množství p53 v buňce udržováno na nízkých hladinách pomocí ubikvitin-ligáz, zejména MDM2. Buněčný stres způsobí disociaci MDM2 od p53, deubikvitinylaci p53 pomocí ubikvitin-hydrolázy Hausp a následné zvýšení jeho koncentrace. Zároveň ovšem p53 mimo jiné spouští též expresi MDM2 a dalších svých regulátorů, což vytváří zpětnou vazbu, podílející se na účinné regulaci celé dráhy [81, 82].

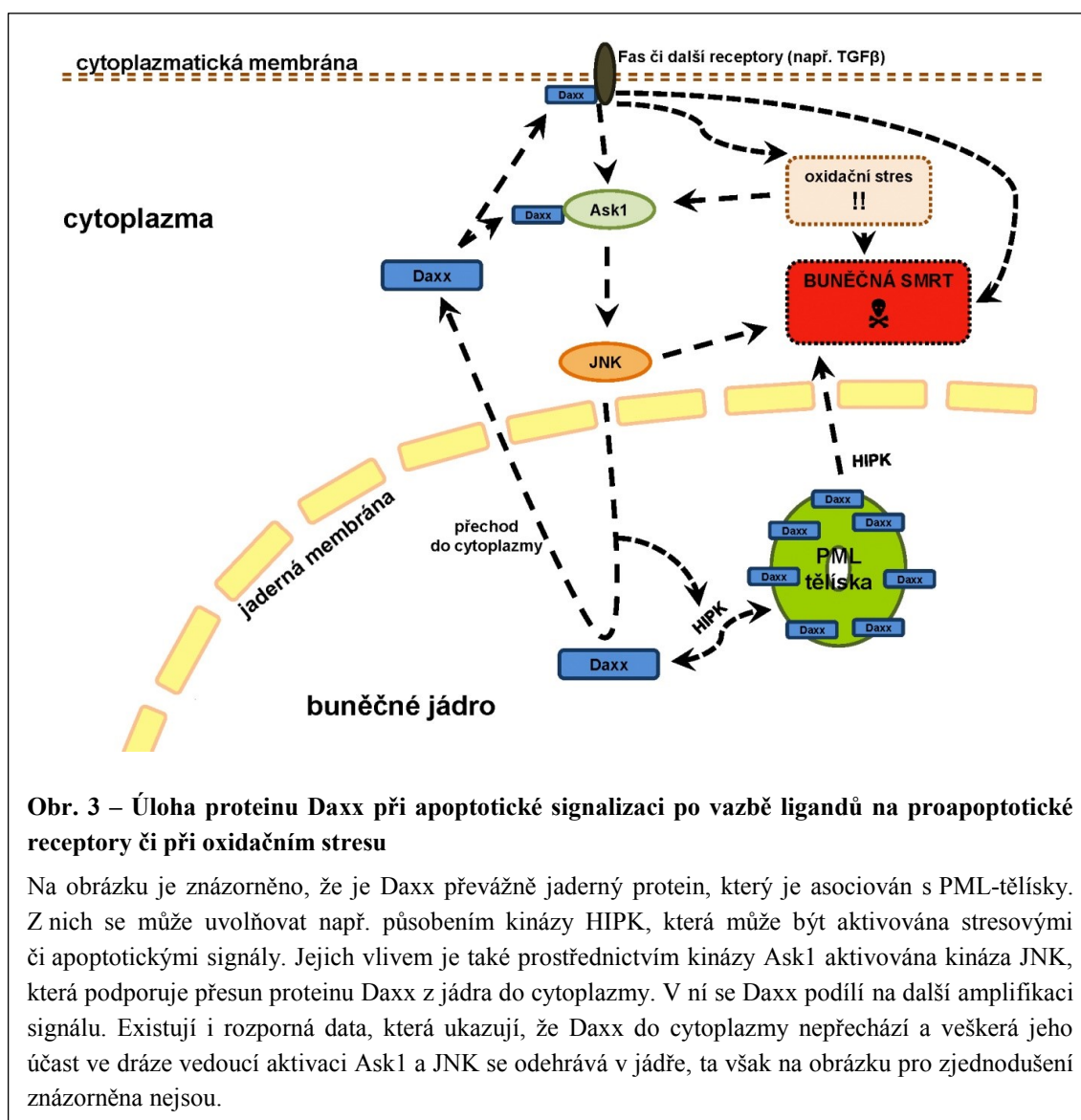
Jedním z dalších modulátorů funkce proteinu p53 je kináza HIPK2, která rovněž interaguje s proteinem Daxx (viz oddíl II. 4. 1.). Tato kináza, aktivovaná např. poškozením DNA, fosforyluje p53 na serinu 46, čímž podporuje jeho stabilizaci a následně jím regulovanou apoptózu [83, 84]. Fosforylace serinu 46 proteinu p53 kromě toho, že zvyšuje expresi proapoptotických genů, zároveň též potlačuje expresi MDM2. HIPK2 rovněž inhibuje MDM2 tím, že zvyšuje jeho přenos z jádra a následné odbourávání [85]. Sama kináza HIPK2 je ovšem ubikvitinylována prostřednictvím MDM2, což vede k jejímu odbourání [86]. To, jaká dráha v této složité síti zpětných vazeb nakonec převládne, závisí na míře buněčného stresu. Stabilizace p53 a jeho fosforylace na serinu 46 nastane pouze v případě opravdu masivního poškození buňky [87].

Daxx se účastní především reakcí na oxidační stres a na poškození DNA.

II. 5. 2. Úloha proteinu Daxx při apoptotické signalizaci v reakci na oxidační stres

Oxidační stres se vyznačuje zvýšeným výskytem reaktivních forem kyslíku (*reactive oxygen species*, ROS, např. superoxidových iontů, peroxidových iontů, apod.), jejichž zdrojem jsou především mitochondrie. Vysoká koncentrace ROS může způsobovat oxidační poškození proteinů, lipidových membrán či nukleových kyselin. Za běžných, fyziologických podmínek proto buňka udržuje nízkou hladinu ROS pomocí specifických enzymů (např. enzymů katalázy, glutathion-peroxidázy či superoxid-dismutázy) [88]. V poslední době se nicméně ukazuje, že ROS mohou sloužit také coby signální molekuly. Jejich zvýšená produkce např. podporuje buněčné dělení, čemuž naopak brání anti-onkogen p53, který mj. reguluje expresi antioxidantních genů. Vysoká hladina ROS také podporuje apoptózu, např. prostřednictvím aktivace kinázy JNK. Tvorba ROS v mitochondriích je přitom regulována proteiny z rodiny Bcl-2 a zřejmě slouží k amplifikaci apoptotického signálu [89-91].

Daxx se buněčné odpovědi na oxidační stres účastní zejména prostřednictvím aktivace signální dráhy JNK. Kináza Ask1 je za běžných podmínek inhibována vazbou proteinů thioredoxinu a glutaredoxinu, které fungují jako senzory oxidačního stavu buňky a uvolňují se při zvýšených koncentracích ROS [92, 93]. Toho lze dosáhnout např. inkubací buněk v médiu s nízkou koncentrací glukózy, inkubací nervových buněk s amyloidem- β či vystavením buněk některých tkání ischemii. Následně dochází k aktivaci kinázy JNK prostřednictvím Ask1 a byl také pozorován přechod proteinu Daxx z jádra do cytoplazmy. V cytoplazmě Daxx asociuje s kinázou Ask1 a podílí se na vyvolání apoptózy [94-97]. Obdobný účinek má též inkubace buněk s H_2O_2 . Naopak potlačení exprese proteinu Daxx pomocí RNAi citlivost buněk k působení H_2O_2 snižuje [43, 98, 99]. Dráhu lze inhibovat také nadprodukcí katalázy, která rozkládá H_2O_2 , nebo pomocí antioxidantu N-acetylcysteinu či inhibitoru JNK [41, 59]. Daxx je v této signální dráze regulován senzorem oxidačního stresu DJ-1, který jej váže a brání jeho přechodu z jádra do cytoplazmy. Nadprodukce proteinu DJ-1 apoptotickou signalizaci následkem oxidačního stresu, již se Daxx účastní, inhibuje, odstranění proteinu DJ-1 ji naopak podporuje [57, 100-103]. V souladu s tím, že je Daxx pozitivním regulátorem apoptotické signalizace v důsledku oxidačního stresu, jeho exprese vzrůstá po inkubaci buněk s H_2O_2 či vystavení buněk některých tkání ischemii [96-99] a naopak klesá po použití chemikálie edaravonu, která oxidační stres potlačuje [104].



Opět nicméně existují také práce, které popsanou signální dráhu buněčné odpovědi na oxidační stres zpochybňují. Exprese proteinu Daxx po inkubaci s H_2O_2 v některých případech zůstala beze změny [105], někdy nebyl pozorován přechod proteinu Daxx do cytoplazmy v reakci na stresové signály [60, 98] a u kardiomyocytů nadprodukce proteinu Daxx před apoptózou vyvolanou oxidačním stresem spíše chránila, než aby ji podporovala [106]. U buněk chronické myeloidní leukémie navíc zvýšená koncentrace ROS sice vedla k apoptóze spojené s aktivací JNK, ale zároveň docházelo k poklesu exprese proteinu Daxx [107].

Uvedené rozporné výsledky nasvědčují tomu, že je funkce proteinu Daxx při reakci na oxidační stres také pravděpodobně dosti komplexní, uplatňující se na více úrovních, případně je buněčně specifická. Účast proteinu Daxx při apoptotické signalizaci

a při reakci na buněčný stres, spojená s jeho přechodem do cytoplazmy, je shrnuta na obr. 3.

II. 5. 3. Buněčná odpověď na poškození DNA

Buněčná DNA je každodenně vystavována nespočtu poškození, mezi něž patří zařazení chybného nukleotidu při replikaci, chemická modifikace bází (např. alkylace), vznik pyrimidinových dimerů a dalších nadbytečných kovalentních vazeb, jedno- i dvojřetězcové zlomy v DNA, apod. Příčinami těchto poškození mohou být některé chemikálie (např. látky způsobující zlomy v DNA, jako např. cytostatika cisplatina, etopozid, 5-fluorouracil či doxorubicin), ionizující záření, ale též přirozené látky vznikající během „běžného buněčného provozu“, chyby při mitóze, rekombinaci, apod. [108-110].

Poškozenou DNA musí buňka průběžně opravovat, jinak by docházelo ke vzniku mutací, jak jednoduchých záměn nukleotidů, inzercí či delecí, tak u dvojřetězcových zlomů k rozsáhlým chromozómovým aberacím. Vzhledem k rozmanitosti poškození DNA mají buňky k dispozici různé mechanismy k jejich opravě. Jednoduché poškození, jako je např. zařazení chybného nukleotidu během replikace, je opraveno jeho odstraněním a zařazením správného (*mismatch repair*), chemické modifikace bází jsou opravovány pomocí jejich vystřížení (*base excision repair*), složitější poškození pomocí odstranění delšího řetězce nukleotidů a jeho následné náhrady podle druhého, nepoškozeného vlákna (*nucleotide excision repair*), jednořetězcové zlomy mohou být opraveny opětovným spojením volných konců a nejobtížnější je oprava dvojřetězcových zlomů, u nichž jsou přerušena obě vlákna DNA. Zde buňka v závislosti na fázi buněčného cyklu může využít dvou různých mechanismů, které se vzájemně vylučují i inhibují. Ve fázi G1, dokud ještě neproběhla replikace, jsou dvojřetězcové zlomy opravovány prostým spojením volných konců DNA (*non-homologous end-joining*) či příbuzným způsobem, při němž jsou volné konce před spojením ještě enzymově „opracovány“ – většinou zkráceny (*microhomology mediated end-joining*). Tento způsob opravy je nicméně náchylný k chybám, jestliže je volných konců více (čímž mohou vznikat chromozómové translokace), a v některých případech též může docházet k vícenukleotidovým delecím, které způsobují posun čtecího rámce. Přesnější je způsob opravy nazvaný homologní rekombinace, k němuž je však nezbytné, aby proběhla replikace DNA, a může tedy probíhat především ve fázi G2 a částečně též fázi S buněčného cyklu. Při homologní rekombinaci je použita replikovaná část DNA (sesterská chromatida), podle níž se opraví poškozené dvojvlákno [108-112].

Buněčný aparát reakce na poškození DNA zahrnuje několik úrovní. Nejdříve je nutné poškození rozeznat, poté signál amplifikovat a nakonec aktivovat opravné mechanismy. Důležitou roli při regulaci všech těchto úrovní mají kinázy příbuzné PI3-kinázám (PIKK) DNA-PK, ATR a ATM. Mezi nimi DNA-PK a ATM regulují především reakci na dvojřetězcové zlomy, zatímco ATR reakci na další typy poškození DNA, například na vznik kovalentní vazby v řetězci DNA, která brání replikaci [113]. Před časem bylo mimo jiné zjištěno, že je Daxx jedním z cílů kinázy ATM, z čehož je zřejmé, že se Daxx reakce na poškození DNA rovněž účastní [114].

Klíčovým proteinem reakce na poškození DNA je opět p53, který je kinázami z rodiny PIKK fosforylován, což napomáhá zastavení buněčného cyklu na dobu nutnou k opravě DNA, ale též k apoptóze [81, 82].

Úloha proteinu Daxx při reakci na poškození DNA je pravděpodobně značně komplexní. U působení ultrafialového záření bylo popsáno, že Daxx může regulovat signální dráhu JNK, ale u ostatních typů poškození DNA ovlivňuje spíše protein p53.

II. 5. 4. Úloha proteinu Daxx při reakci na ultrafialové záření

Při apoptotické signalizaci v důsledku působení ultrafialového záření je úloha proteinu Daxx opět poněkud nejednoznačná. Nadprodukce jeho tzv. dominantně negativní formy (112 C-koncových aminokyselin) inhibovala kinázu JNK aktivovanou ultrafialovým zářením, ale stejný účinek měla též nadprodukce kompletního proteinu Daxx [115]. V souladu s tím byl Daxx vlivem ultrafialového záření a dalších stresových signálů, které způsobují poškození DNA, odbouráván. Také v tomto případě sice docházelo k aktivaci kinázy JNK, avšak nikoli prostřednictvím proteinu Daxx, nýbrž proteinu RASSF1C, který byl proteinem Daxx vyvazován v PML-tělíscích a po jeho odbourání přecházel do cytoplazmy [116]. Jindy bylo nicméně pozorováno, že vlivem ultrafialového záření exprese proteinu Daxx vzrůstá a jeho odstranění pomocí RNAi apoptózu vyvolanou touto formou buněčného stresu potlačuje. Zároveň však také nebyl pozorován přechod proteinu Daxx do cytoplazmy, a namísto toho se do jádra přesouvala kináza Ask1 [98]. Daxx byl zároveň vázán do tělísek obsahujících proteiny, které modifikovala SUMO-ligáza PIAS1 [117].

Působením ultrafialového záření může být rovněž aktivován protein p53, na jehož regulaci se Daxx také podílí (viz následující podkapitola).

II. 5. 5. Regulace proteinu p53 prostřednictvím proteinu Daxx

Daxx reguluje p53 na více úrovních a vzhledem k různým zpětným vazbám může mít v odlišném buněčném kontextu i protichůdnou roli. Zvolené buněčné modely by poté mohly vysvětlovat rozporné výsledky jednotlivých studií. V některých z nich Daxx působil coby protiapoptotický protein, jehož odstranění pomocí RNAi podporovalo apoptózu způsobenou inkubací buněk s genotoxickými látkami, jako např. etopozidem či doxorubicinem, což korelovalo s vyšší koncentrací i aktivitou proteinu p53 [118, 119]. Nadprodukce proteinu Daxx naopak apoptózu způsobenou 5-fluorouracilem inhibovala a na hladinu p53 vliv neměla [120]. Jiné studie však naznačily, že by Daxx mohl při reakci na poškození DNA fungovat i proapoptoticky. Odstranění proteinu Daxx pomocí RNAi totiž potlačovalo transkripční aktivitu p53 i apoptózu způsobenou ultrafialovým zářením [121], zatímco nadprodukce proteinu Daxx vedla k vyšší apoptóze po inkubaci buněk s genotoxickými chemikáliemi doxorubicinem a cisplatinou. To korelovalo i s vyšší aktivitou p53 u proapoptotických genů, ačkoli bylo též pozorováno, že Daxx zároveň potlačuje expresi genu p21, který se podílí na zastavení buněčného cyklu [122, 123]. K uvedeným rozporům pravděpodobně přispěl i fakt, že byly použity různé nádorové buněčné linie, které mohou mít některé regulační dráhy proteinu p53 narušeny.

Z dosavadních publikovaných výsledků lze nicméně usuzovat, že v nepřítomnosti buněčného stresu Daxx dráhu p53 spíše inhibuje, zatímco po poškození DNA napomáhá k její aktivaci, což může vést i k apoptóze.

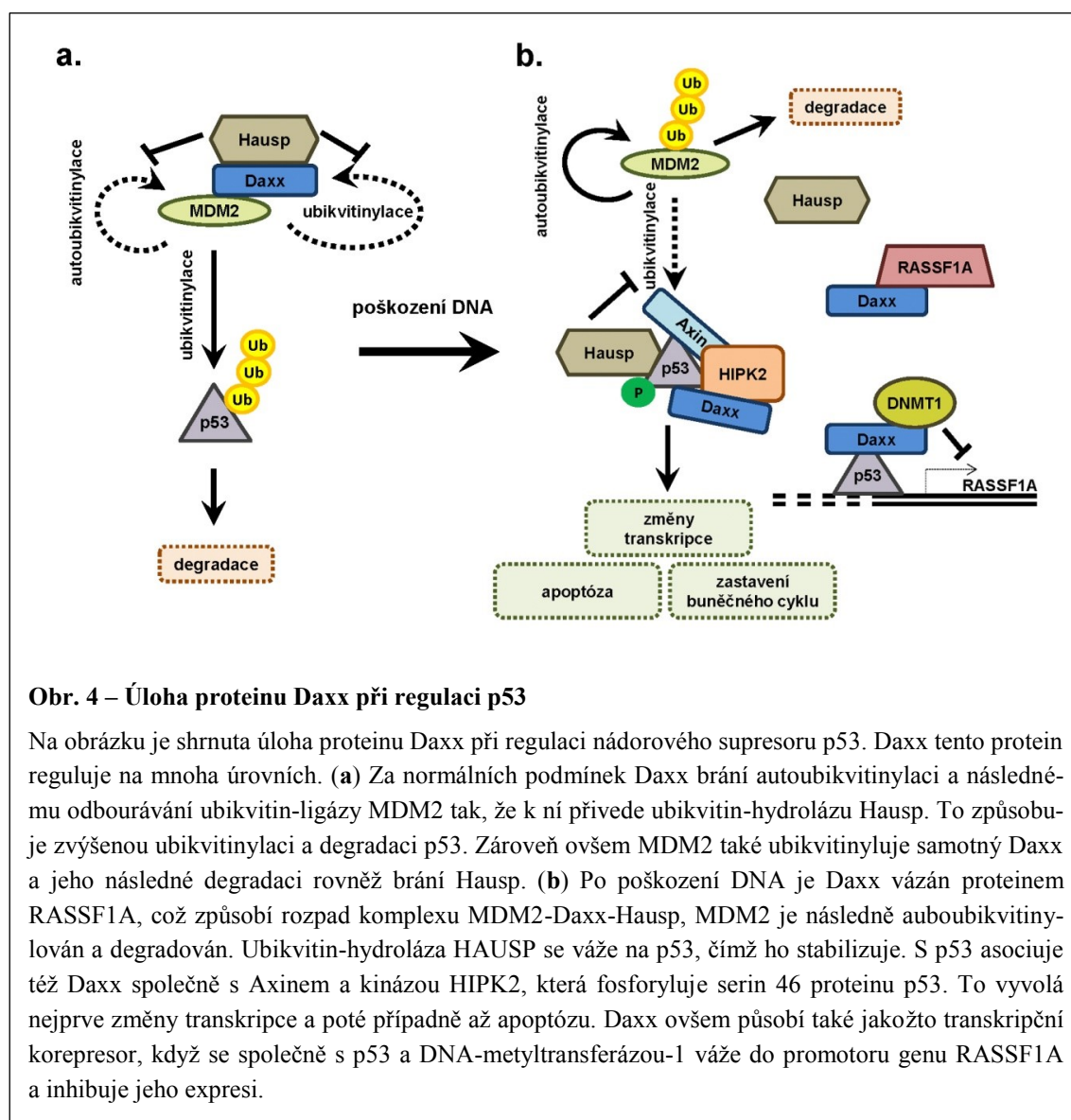
Poprvé byla interakce proteinu Daxx popsána u nádorové formy p53, kdežto jeho normální, nemutovaná forma (tzv. *wild-type*) protein Daxx nevázála. Expresí mutované formy potlačovala aktivaci kináz Ask1 i JNK vyvolanou nadprodukcí proteinu Daxx a snižovala jeho množství v buňce [68, 124]. Nicméně byla brzy nato objevena také interakce proteinu Daxx nejen s normálním proteinem p53, nýbrž i jeho příbuzným p73 [125].

První práce naznačovaly, že Daxx působí především coby regulátor (převážně korepresor) transkripce řízené p53, což bylo ve shodě s rolí proteinu Daxx u jiných transkripčních faktorů (viz oddíl III. 5.). Nadprodukce proteinu Daxx potlačovala expresi syntetického reportérového genu s promotorem vázajícím p53, např. promotorem genu p21 či MDM2, v některých případech však také zvyšovala expresi reportérového genu s promotorem genu Puma. Potlačení exprese z promotoru p21 způsobené proteinem

Daxx bylo zároveň možné zvrátit inkubací s inhibítorem histondeacetyláz [9, 120-123, 125]. Později byla zjištěna, že Daxx ovlivňuje expresi regulovanou p53 přímo, potvrzena také na chromatinové DNA, když se ukázalo, že se Daxx na p53 váže společně DNA-metyltransferázou-1 (DNMT1) a způsobuje zvýšenou metylaci promotoru genu pro RASSF1A, což vede k potlačení jeho exprese [119].

Některé účinky proteinu Daxx na expresi řízenou p53 jsou nicméně způsobeny spíše regulací stability tohoto transkripčního faktoru či jeho posttranslačních modifikací. U některých buněčných linií bylo pozorováno, že nadprodukce proteinu Daxx snižuje množství p53 a naopak zvyšuje hladinu jeho ubikvitin-ligázy MDM2, kdežto potlačení exprese proteinu Daxx pomocí RNAi má opačný účinek [118, 126]. MDM2 totiž kromě p53 a dalších proteinů zároveň průběžně ubikvitinyluje sám sebe a před následným odbouráním jej chrání deubikvitinylace pomocí ubikvitin-hydrolázy Hausp [127]. Pro asociaci MDM2 a Hausp je důležitý Daxx, který oba proteiny váže. Jeho odstranění pomocí RNAi nebo pomocí inkubace s chemikálií berberinem vede k uvolnění Hausp od MDM2 a zvýšenému odbourávání MDM2 [118, 128, 129]. Komplex MDM2-Daxx-Hausp se rozpadá také po poškození DNA. Po inkubaci s etopozidem se Hausp méně váže na MDM2 a naopak více na p53, což koreluje se zvýšenou ubikvitinylací a odbouráváním MDM2 a deubikvitinylací a stabilizací p53 [118]. Rozpadu komplexu MDM2-Daxx-Hausp po poškození DNA napomáhá nádorový supresor RASSF1A, který vyvazuje protein Daxx, což vede ke stabilizaci p53 a zvýšení exprese proteinu p21, korelující se zastavením buněčného cyklu [130]. Jak ovšem bylo již uvedeno výše, Daxx se mimo to společně s p53 účastní represe genu RASSF1A, což patrně představuje zpětnou vazbu bránící nadměrné aktivaci p53 [119]. To však není jediná zpětná vazba, jíž je Daxx součástí, neboť bylo též popsáno, že je samotný Daxx ubikvitinylován proteinem MDM2, což vede k jeho odbourávání, a této ubikvitinylaci také brání protein Hausp [131].

Jiná role proteinu Daxx při regulaci p53 byla pozorována po poškození DNA. Daxx nejenže se uvolňuje z komplexu s MDM2 a Hausp, ale zároveň vytváří komplex s p53 a adaptérovým proteinem Axinem (klíčovým proteinem signální dráhy Wnt [132]). Tento komplex umožní vazbu HIPK2 a následnou fosforylaci serinu 46 proteinu p53, což vede ke zvýšené transkripční aktivitě a apoptóze [121]. Vznik komplexu p53-Axin-Daxx-HIPK2 může být inhibován ubikvitin-ligázou CHIP, která mj. inhibuje též dráhu JNK tím, že ubikvitinyluje kinázu Ask1, což vede k jejímu odbourávání [133].



Obr. 4 – Úloha proteinu Daxx při regulaci p53

Na obrázku je shrnuta úloha proteinu Daxx při regulaci nádorového supresoru p53. Daxx tento protein reguluje na mnoha úrovních. **(a)** Za normálních podmínek Daxx brání autoubikvitinylaci a následnému odbourávání ubikvitin-ligázy MDM2 tak, že k ní přivede ubikvitin-hydrolázu Hausp. To způsobuje zvýšenou ubikvitinylaci a degradaci p53. Zároveň ovšem MDM2 také ubikvitinyluje samotný Daxx a jeho následné degradaci rovněž brání Hausp. **(b)** Po poškození DNA je Daxx vázán proteinem RASSF1A, což způsobí rozpad komplexu MDM2-Daxx-Hausp, MDM2 je následně autoubikvitinylován a degradován. Ubikvitin-hydroláza HAUSP se váže na p53, čímž ho stabilizuje. S p53 asociuje též Daxx společně s Axinem a kinázou HIPK2, která fosforyluje serin 46 proteinu p53. To vyvolá nejprve změny transkripce a poté případně až apoptózu. Daxx ovšem působí také jakožto transkripční korepresor, když se společně s p53 a DNA-metyltransferázou-1 váže do promotoru genu RASSF1A a inhibuje jeho expresi.

Také Daxx je proteinem CHIP ubikvitinylován přímo v lyzinech 630, 631, které jsou jinak SUMOylovány. To způsobí jeho odbourání a následně též nižší fosforylaci serinu 46 proteinu p53 a nižší apoptózu po vystavení buněk stresu [134]. Obdobně působí i vazba nádorového supresoru Pdc4. Ten zřejmě brání asociaci proteinu Daxx s ubikvitin-hydrolázou Hausp, následkem čehož je Daxx více ubikvitinylován a odbouráván, a to poté vede i k nižší fosforylaci serinu 46 proteinu p53. Účinek Pdc4 může být inhibován vystavením buněk ultrafialovému záření, kdy koncentrace Pdc4 klesá a fosforylace serinu 46 proteinu p53 vzrůstá [135].

Výše popsaná komplexní role proteinu Daxx při regulaci p53 je znázorněna na obr. 4.

II. 6. Shrnutí úlohy proteinu Daxx při buněčné odpovědi na stresové či apoptotické signály

Z údajů uvedených v této kapitole zřetelně vyplývá, že se Daxx reakce na buněčný stres či apoptotické signalizace účastní pravděpodobně na více úrovních, regulovaných různými zpětnými vazbami. Ačkoli k tomu doposud chybí dostatek experimentálních dat, lze předpokládat, že má Daxx také u dalších signálních drah podobně komplexní roli jako při regulaci proteinu p53. Tomu by nasvědčovala zjištění, že u signální dráhy TGF β Daxx nejenže interaguje s receptorem, nýbrž také potlačuje genovou expresi řízenou transkripčním faktorem Smad4 (viz oddíl II. 4. 1.), a u signální dráhy TNF α se Daxx kromě aktivace kinázy JNK podílí též na potlačení genové exprese řízené transkripčním faktorem NF- κ B (viz oddíl II. 4. 3.). Inhibice tohoto transkripčního faktoru, který podporuje spíše buněčné přežití, může zvyšovat citlivost buněk k apoptotickým signálům. Daxx navíc asociuje s vazebnými místy pro NF- κ B u promotorů genů, jako je FLIP či Bcl2, což koreluje s jejich nižší transkripční aktivitou a zvýšené apoptóze po aktivaci receptoru Fas [136].

Jak bylo popsáno výše, jsou jednotlivé signální dráhy odpovědi na buněčný stres či signály podporující řízenou buněčnou smrt navzájem provázány. Také během řízené buněčné smrti narůstá oxidační stres či další formy buněčného stresu, které slouží k amplifikaci signálu, kdežto v jiném kontextu mohou naopak stresové signály patřit ke vnitřním spouštěčům řízené buněčné smrti. I kdyby ji samy o sobě nezpůsobovaly, zvyšují citlivost k ostatním spouštěčům, které v součtu k buněčné smrti nakonec vedou.

Je tudíž pravděpodobné, že rozporné výsledky týkající se úlohy proteinu Daxx při stresové či apoptotické signalizaci lze podobně jako u regulace proteinu p53 vysvětlit odlišnými experimentálními podmínkami a stavem či typem buněčných modelů. K mnoha pokusům byly použity snadněji kultivovatelné nádorové či imortalizované buněčné linie, které však mohou mít některé důležité signální dráhy pozměněny. Zároveň také nelze vyloučit, že se mohly lišit i kultivační podmínky buněk při jednotlivých pokusech.

K lepšímu pochopení úlohy proteinu Daxx v těchto signálních drahách tedy přispějí další experimentální data, která by pomohla některé dosavadní rozporné výsledky pokusů týkajících se multifunkčního adaptérového proteinu Daxx zasadit do kontextu.

III.

Jaderné funkce proteinu Daxx

III. 1. Úvod k jaderným funkcím proteinu Daxx

V předchozí kapitole byly popsány funkce proteinu Daxx v cytoplasmě, které souvisejí převážně se stresovou či apoptotickou signalizací. V závěru podkapitoly věnované proteinu p53 bylo nicméně ukázáno, že může Daxx reakci na buněčný stres ovlivňovat také v jádře. S jádrem též souvisí většina jeho dalších funkcí, týkajících se většinou regulace struktury chromatinu a genové exprese. Přítomnost proteinu Daxx byla popsána v nejrůznějších jaderných strukturách, zejména v PML tělískách, centromerách a heterochromatinu, ale též v jadérku a Cajalových tělískách [5, 137-140].

Klíčovou úlohu u jaderných funkcí proteinu Daxx hrají PML-tělíska, která představují jeho nejvýraznější akumulace. Z PML-tělísek je Daxx uvolňován v závislosti na podmínkách, například během buněčného stresu (viz předchozí kapitolu). Následkem stresové signalizace bylo pozorováno zvýšené množství proteinu Daxx v centromerním a pericentromerním heterochromatinu [141] a v heterochromatinu se Daxx hromadil i během S-fáze buněčného cyklu [37]. Dále je Daxx z PML tělísek uvolňován během mitózy, kdy se z nich vytvářejí velké agregáty, které následně slouží jako zdroj PML v nově vznikajících PML-tělískách v dceřiných buňkách [142].

III. 2. PML-tělíska

PML-tělíska jsou kulovité převážně jaderné útvary o průměru 0,1 – 1 μm , jež se vyskytují ve většině buněk a jejich počet se zpravidla pohybuje mezi 5 až 15 na buněčné jádro. Tyto struktury jsou zpravidla duté a jejich kostru tvoří různé izoformy proteinu PML, které asociují s dalšími proteiny. Nukleové kyseliny většinou PML-tělíska neobsahují, mohou se však vyskytovat v blízkosti některých chromozómových lokusů, jejichž expresi pomáhají regulovat, a také poblíž míst poškození DNA. Existuje též funkční propojení mezi PML-tělísky a jadérkem, což se projevuje i v podobném složení. Tvorba PML-tělísek a změny v jejich struktuře mohou být vyvolány nejrůznějšími formami buněčného stresu, mezi něž patří inkubace buněk s As_2O_3 či těžkými kovy, teplotní šok, poškození DNA, působení interferonů, virová infekce, apod. Jejich následkem vznikají PML-tělíska s různou strukturou, složením, umístěním i velikostí. Např. působením As_2O_3 se tvoří menší počet velkých tělísek, kdežto následkem některých typů poškození DNA vzniká velké množství rozptýlených malých tělísek. To naznačuje, že

ačkoli jsou nazývána souhrnně „PML-tělíska“, ve skutečnosti jich existuje více typů. Počet i struktura PML-tělísek se dále mění i v průběhu buněčného cyklu, např. během S-fáze se tělíska dělí, při mitóze přechodně zanikají [143, 144].

Strukturu tělísek reguluje množství kináz, které jsou součástí odpovědi na buněčný stres, včetně ATM či ATR a HIPK. Klíčový pro jejich tvorbu je také modifikátor SUMO – samotný protein PML obsahuje místa pro SUMOylaci a zároveň též SUMO-vazebné motivy. Protein SUMO tedy může sloužit jako spojující faktor, který drží tělíska pohromadě. Také mnohé další proteiny asociované s PML-tělísky jsou SUMOylovány, nebo dokonce obsahují SUMO-vazebné motivy [143, 144]. Jedním z nich je i Daxx, který pro asociaci s PML-tělísky rovněž potřebuje SUMOylaci PML a jeho asociaci s tělísky blokuje acetylace modifikátoru SUMO [6, 11-13, 50, 145, 146]. Rozpad PML-tělísek, např. během mitózy, naopak bývá spojen s deSUMOylací. Bylo nicméně pozorováno, že některé typy PML-tělísek mohou existovat i bez modifikace proteinem SUMO [143, 144].

Poprvé byl protein PML popsán u akutní promyelocytární leukémie (odtud pochází i jeho název) a původně byl považován za onkogen. Posléze se však ukázalo, že se u tohoto typu leukémie ve skutečnosti jedná o mutaci, jejímž následkem je PML fúzován s jaderným receptorem pro retinoovou kyselinu (RAR α). Takto vzniklý fúzní protein, narušující diferenciaci myeloidních progenitorů, brání tvorbě PML-tělísek a funguje též coby transkripční faktor. Přirozený PML byl postupně popsán jakožto antionkogen, který se účastní značného množství buněčných pochodů, z nichž většina souvisí s buněčným stresem, řízenou buněčnou smrtí či imunitní odpovědí. PML-tělíska se při nich podílejí na zastavení buněčného růstu, případně na vyvolání řízené buněčné smrti nebo senescence. Mimo to jsou PML-tělíska důležitá i pro udržování „kmenovosti“ embryonálních kmenových buněk [143, 144].

Funkce PML-tělísek souvisí s jejich schopností akumulovat některé proteiny. Do kontaktu se v nich mohou dostávat např. enzymy se svými substráty. Jedním z nich je i protein p53, který je v PML těliscích acetylován, a tím aktivován působením acetyltransferázy CBP. Dalšími enzymy, které regulují posttranslační modifikace p53 a mohou být přítomny v PML-těliscích, jsou i ubikvitin-ligáza MDM2, ubikvitin-hydroláza Hausp či kináza HIPK (viz též oddíl II. 5. 1.). Jiné proteiny naopak mohou být v PML-těliscích zadržovány („sekvestrovány“), což jim brání účastnit se buněčných pochodů mimo tato tělíska [143, 144].

Výše popsaných funkcí PML-tělísek je využito i při antivirové odpovědi, při níž tyto buněčné struktury hrají nezastupitelnou roli. Pro potlačení nejrůznějších virových infekcí (např. herpetickými viry, adenoviry, virem dětské obrny, chřipkovými viry, apod.) je správná funkčnost PML-tělísek nezbytná, a mnohé viry se proto naopak snaží jejich strukturu narušit. Některé z nich přímo podporují odbourávání PML či s ním asociovaných proteinů (např. herpetické viry HSV-1 či -2), jiné způsobují deSUMOylaci a rozpad PML-tělísek (např. lidský cytomegalovirus), další jejich přestavbu (např. adenoviry, virus vztekliny) [147].

Buněčná reakce na virovou infekci je regulována interferony, jejichž působení může vést až k řízené buněčné smrti. Vlivem interferonů také vzrůstá jak exprese PML, tak i s ním asociovaných proteinů včetně SP100 či proteinu Daxx (viz též oddíl II. 4. 4.) a pokud jsou naopak PML či některé s ním asociované proteiny odstraněny, antivirovou funkci interferonů to výrazně omezí [143, 144, 147].

Daxx byl nalezen v PML-těliscích již krátce po svém objevu [6] a bývá považován za jejich integrální součást. Ukazuje se nicméně, že je s nimi asociován mnohem volněji. Naprostá většina proteinu Daxx neustále rychle přechází mezi PML-tělisky a zbytkem jádra a pouze jeho malá část je v PML-těliscích vázána pevněji [148]. Tyto rozdílné formy proteinu Daxx by se mohly odlišovat posttranslačními modifikacemi a změna jeho mobility by pak mohla představovat způsob jeho regulace (více je tato možnost diskutována v oddíle III. 5.).

Jednotlivé funkce proteinu Daxx, které souvisejí s PML-tělisky, jsou popsány v následujících podkapitolách.

III. 3. Úloha proteinu Daxx při antivirové odpovědi

III. 3. 1. Úvod k úloze proteinu Daxx při antivirové odpovědi

Účast proteinu Daxx při odpovědi na virovou infekci pravděpodobně souvisí s jeho výskytem v PML-těliscích. Některé virové proteiny proto způsobují jeho uvolňování z těchto jaderných struktur a následné odbourávání. Doposud známé funkce proteinu Daxx v infikovaných buňkách většinou spočívají v represi virových genů, a odbourávání proteinu Daxx tedy vede k aktivaci jejich exprese. Určitou funkci má zřejmě i asociace proteinu Daxx s antivirovou GTPázou Mx1 [149], ale ta zatím nebyla blíže prozkoumána.

Daxx při virové infekci interaguje s množstvím virových proteinů nejrůznějších virových rodin. Nejlépe je popsána jeho funkce při infekci herpetickými viry (zejména lidským cytomegalovirem) a adenoviry.

III. 3. 2. Úloha proteinu Daxx při infekci herpetickými viry

Životní cyklus herpetických virů se skládá ze dvou hlavních fází. Zatímco během infekční (lytické) fáze probíhá tvorba a uvolňování virových částic, spojená s intenzivním buněčným stresem, který může vést až k řízené buněčné smrti, během latentní fáze je exprese virových proteinů minimální. Virus v této fázi „vyčkává“ na vhodné podmínky, a jakmile nastanou, začne lytická fáze. Kupř. viry oparu (*herpes simplex*) po prvotní infekci přetrvávají v periferních neuronech či gliích a při své lytické fázi napadají epitelové buňky, což se projevuje tvorbou vředků (oparů) [150].

Účast proteinu Daxx byla popsána u infekce cytomegalovirem (CMV), oparovým virem 1 (HSV1, tj. *herpes simplex virus 1*), virem Epstein-Barrové (EBV) a lidským herpetickým virem 8 (HHV8), který je asociován s Kaposiho sarkomem.

U cytomegalovirů se Daxx pravděpodobně podílí na udržení latentní fáze virové infekce tím, že brání aktivaci transkripce tzv. časných genů lytické fáze (*immediate early transcription*) [151]. K tomu slouží histondeacetyláza-1 (HDAC1), kterou Daxx přivede do virových promotorů, a na počátku lytické fáze virové infekce je proto HDAC1 inhibována fosforylací prostřednictvím virové kinázy UL97 [152]. Dalším proteinem, jehož prostřednictvím Daxx brání expresi virových genů, je ATPáza remodelující chromatin ATRX (úloha proteinového komplexu, jehož součástí jsou Daxx a ATRX, je pojednána v oddíle III. 6.). Komplex Daxx/ATRX je proto inhibován virovým proteinem pp71, který způsobuje uvolňování ATRX z PML-tělísek [153, 154]. Protein pp71 zároveň způsobuje odbourávání proteinu Daxx mechanismem, který nezávisí na modifikaci ubikvitinem. Pro dostatečnou aktivaci časných genů a virovou replikaci je interakce pp71 s proteinem Daxx v PML-tělíscích nezbytná [155-162]. Kromě pp71 Daxx interaguje i s dalšími cytomegalovírovými proteiny, a tyto interakce rovněž narušují inhibiční účinek proteinu Daxx na expresi virových genů [163, 164]. V souladu s tím potlačení exprese proteinu Daxx pomocí RNAi či techniky genového „knock-outu“ zvyšuje expresi časných virových genů a podporuje virovou replikaci [165-168], zatímco působením interferonů exprese proteinu Daxx vzrůstá, což expresi časných genů inhibuje [169].

Komplex složený z proteinů Daxx a ATRX je důležitý i pro represi genů dalších herpetických virů, jako např. EBV, HSV1 a HHV8, a tudíž i tyto viry produkují proteiny, jež funkci tohoto komplexu narušují [170-174]. I z toho lze vyvozovat, že má Daxx pravděpodobně důležitou úlohu také při infekci ostatními herpetickými viry, u kterých prozatím nebyla podrobněji popsána.

III. 3. 3. Úloha proteinu Daxx při infekci adenoviry

U adenovirů Daxx interaguje s virovým onkogenem E1B-55K a vytváří s ním v jádře tělíska, která jsou odlišná od PML-tělísek. Ta obsahují též p53, což koreluje s jeho nižší transkripční aktivitou [175]. Protein E1B-55K také blokuje vazbu proteinu Daxx do PML-tělísek a zároveň podporuje jeho odbourávání. Mimo to mu brání v interakci s proteinem ATRX, který je následně rovněž odbouráván [176-179]. Pro interakci E1B-55K s proteinem Daxx je důležitá SUMOylace E1B-55K [180]. Dále Daxx interaguje s kapsidovým proteinem VI, a také tato interakce potlačuje transkripční represi zprostředkovanou proteinem Daxx [181].

III. 3. 4. Úloha proteinu Daxx při infekcích retroviry

Účast proteinu Daxx byla popsána u infekce retroviry, zejména virem HIV-1 a virem ptačího sarkomu. Daxx interaguje s virovou integrázou obou těchto virů, což vede k transkripční represi virových genů prostřednictvím histondeacetyláz či DNA-metyltransferáz [182-185]. Inhibiční účinek proteinu Daxx, resp. komplexu Daxx/ATRX, na expresi virových genů byl pozorován i u endogenních retrovirů [186]. Při infekci retroviry je zřejmě Daxx důležitý pro represi virových genů v nepřítomnosti interferonů. Jestliže jsou přítomné, je jejich inhibiční účinek natolik silný, že k němu protein Daxx není potřeba a jeho odstranění nemá žádný vliv. Jedná se tedy zřejmě o navzájem paralelní dráhy inhibice virové replikace [187]. U viru HIV-1 Daxx také interaguje se SUMOylovaným virovým proteinem p6 a SUMOylace má zřejmě pro organismus ochrannou funkci, neboť snižuje infekčnost vzniklých virových částic [188]. Dále Daxx inhibuje reverzní transkripci viru HIV-1, k čemuž je nezbytný vznik cytoplazmatických PML-tělísek zabraňujících jeho odbourávání [189].

III. 3. 5. Úloha proteinu Daxx při dalších virových infekcích

Dalšími infekcemi, u nichž má Daxx regulační roli, je infekce papilomaviry [190-192], hantaviry [193], virem horečky Dengue [194-198], pikornaviry [199], reoviry [200] a chřipkovými viry [201]. Úloha proteinu Daxx u těchto infekcí však prozatím nebyla

dostatečně prozkoumána. Např. u viru horečky Dengue je narušena interakce proteinu Daxx s transkripčním faktorem NF- κ B, což u hepatocytů vede k vyšší expresi receptoru smrti CD137 a zvýšené apoptóze [194-196, 198]. U chřipkových virů naopak zabránění interakce proteinu Daxx s NF- κ B zvyšuje expresi genů, které podporují přežívání [201]. Infekce reoviry pak způsobuje vyšší apoptózu doprovázenou přesunem proteinu Daxx do cytoplazmy, který podporují interferony [200].

Dosavadní výsledky tedy zjevně poukazují na významnou úlohu proteinu Daxx při regulaci antivirové odpovědi a na blokování této jeho funkce některými virovými proteiny.

III. 4. Chromatin a regulace transkripce řízené RNA-polymerázou II

III. 4. 1. Struktura chromatinu

DNA je v buněčném jádře vysoce organizována prostřednictvím své asociace s dalšími proteiny, s nimiž dohromady tvoří tzv. chromatin. Základní strukturální jednotkou chromatinu je nukleozóm, složený z osmi histonových podjednotek (vždy dva histony-2A, -2B, -3 a -4), kolem nichž je asi 1,65-krát ovinuto vlákno DNA o délce 147 nukleotidů. Jednotlivé nukleozómy odděluje volný úsek 50 – 60 nukleotidů, čímž vzniká struktura podobná korálkům na niti o průměru 10 nm. Toto vlákno může být dále svinuto za pomoci histonu-1 do vlákna o průměru 30 nm a případně též do vyšších struktur, asociovaných s proteiny vytvářejícími tzv. jadernou kostru (*scaffold*) či jadernou matrix. Nejvíce kondenzovaný je chromatin v průběhu mitózy, kdy jsou chromozómy viditelné i v jednoduchém světelném mikroskopu [202].

Míra organizovanosti chromatinu určuje, jak je vlákno DNA přístupné pro transkripční aparát či další pochody spjaté s DNA, přičemž se zpravidla rozlišují dva hlavní stavy chromatinu – méně organizovaný (rozvolněnější) a transkripčně aktivnější euchromatin a výrazněji organizovaný (kondenzovanější) a transkripčně málo aktivní heterochromatin [203, 204]. Stav chromatinu v příslušném genovém lokusu se v průběhu života buňky může měnit a je podstatou regulace genové exprese. Tyto změny jsou zprostředkovány zejména posttranslačními modifikacemi histonů, chemickými modifikacemi vláknů DNA, vkládáním různých histonových variant do nukleozómů či posunem nukleozómů za spotřeby ATP.

III. 4. 2. ATPázy remodelující chromatin

Poloha jednotlivých nukleozómů ovlivňuje přístupnost vlákna DNA pro vazbu dalších proteinů. V místech, kde je DNA ovinuta kolem histonového oktameru, je toto vlákno hůře přístupné než v úsecích nacházejících se mezi nukleozómy. Poloha nukleozómů na vlákne DNA není pevně daná, nýbrž se může měnit působením ATPáz remodelujících chromatin. Tyto multiproteinové komplexy, tvořené vlastními enzymy a dalšími podjednotkami, které zprostředkovávají specifickou, využívají energie získané hydrolyzou ATP buď k posunu histonového oktameru podél vlákna DNA, nebo k jeho odstranění či změně jeho podjednotkového složení. Tím mohou v DNA místa pro vazbu dalších proteinů odkrývat nebo je naopak zneprístupňovat. ATPázy remodelující chromatin tak představují důležité molekulární nástroje, které se uplatňují nejen při regulaci transkripce (aktivaci i represi), ale i při dalších pochodech spojených s chromatinem, jako např. replikaci, opravách DNA, apod. [205].

Určitou chromatin-remodelující aktivitu má mj. i komplex RNA-polymerázy II [206]. Jinak ale tvoří ATPázy remodelující chromatin samostatnou proteinovou rodinu, která je přítomna ve všech eukaryontních organismech. Proteiny z této rodiny obsahují jednak samotnou ATPázovou doménu, jednak další funkční domény, na základě nichž je rozlišováno několik jejich skupin [205]. Mimo toto členění se nachází protein ATRX, u něhož byla popsána interakce s proteinem Daxx [37, 207] (viz zejména oddíl III. 6.).

Jednou z uvedených skupin je proteinová rodina Swi2/Snf2, jejíž členové kromě ATPázové domény obsahují ještě tzv. BROMO-doménu (viz dále) a několik dalších (viz obr. 14). U savců do ní náležejí proteiny Brm (*Brahma*) a Brg1 (*Brahma-related gene 1*), které jsou si velmi podobné, ale jejich funkce se překrývají pouze částečně. Oba tyto proteiny mají důležitou úlohu při regulaci transkripce (aktivaci i represi), opravách DNA a dalších pochodech. Zejména Brg1 se uplatňuje při zárodečném vývinu, při němž se podílí na přestavbách chromatinu souvisejících s buněčnou diferenciací. Genová delece Brg1 způsobí úhyn myších zárodků již v několikabuněčném stádiu [205].

Dalšími enzymy remodelujícími chromatin jsou proteiny rodiny ISWI, mezi něž patří např. lidský protein SNF2H. Tyto proteiny namísto BROMO-domény obsahují doménu SANT. Zástupci této skupiny jsou přítomni jak v euchromatinu, tak v heterochromatinu a bývají mj. součástí korepresorových komplexů. Kromě toho se rovněž podílejí na replikaci DNA a udržování pluripotence zárodečných kmenových buněk. Více funkcí

mají také ATPázy remodelující chromatin z rodiny NuRD, jež sice vytvářejí korepresorový komplex, ale mohou být přítomny i v místech aktivních genů. Důležitou skupinou je též proteinová rodina INO80/SWR1, vyznačující se tím, že má ATPázovou doménu rozdělenou, a ačkoli je stále funkční, slouží také k asociaci s DNA-helikázami. Proteiny z rodiny INO80/SWR1 se podílejí na přestavbách chromatinu v místě homologní rekombinace při opravách dvojřetězcových zlomů v DNA či během meiózy. Mimo to se ale též uplatňují při regulaci transkripce [205].

Mechanismus činnosti ATPáz remodelujících chromatin zatím není plně objasněn. Pravděpodobně vnášejí do vlákna DNA pnutí, které způsobí posun nukleozómového oktameru [205].

III. 4. 3. Posttranslační modifikace histonových konců

Kromě regulace polohy nukleozómů je přístupnost vlákna DNA ovlivňována také silou jeho vazby k histonovým oktamerům. Ta může být regulována několika způsoby. Jedním z nich jsou posttranslační modifikace histonových N-konců. Obecně platí, že acetylace jejich lyzinů působením histonacetyltransferáz (HAT) vede k větší přístupnosti vlákna DNA, neboť se záporný náboj zbytku kyseliny octové odpuzuje se záporným nábojem DNA, kdežto deacetylace vlivem histondeacetyláz (HDAC) má na transkripci inhibiční účinek. Mimo to existují i další posttranslační modifikace histonů (fosforylace, metylace, ubikvitinylace, SUMOylace, aj.), jejichž účinek na transkripci i další pochody spojené s chromatinem závisí na kontextu ostatních modifikací. Někdy se proto hovoří o tzv. histonovém kódu. Kromě toho, že tyto modifikace ovlivňují sílu vazbu histonů a vlákna DNA, zároveň též asociují s funkčními doménami dalších proteinů. Např. tzv. BROMO-doména, která je přítomna např. v ATPáze remodelující chromatin Brg1, váže acetylované histony, zatímco CHROMO-doména asociuje s metylovanými N-konci histonů [203, 204].

III. 4. 4. Histonové chaperony

Kromě posttranslačních modifikací histonových konců je přístupnost vlákna DNA ovlivňována také pomocí různých histonových variant, z nichž některé podporují transkripci, zatímco jiné ji inhibují. Např. varianta histonu-3 zvaná CENP-A se podílí na utváření vysoce organizovaného heterochromatinu v oblasti centromer, zatímco varianta zvaná histon-3.3 (H3.3) bývá často spojena s aktivací transkripce. Obdobně je třeba varianta histonu-2 zvaná H2A.Z přítomna spíše v euchromatinu, zatímco varianta mak-

roH2A se podílí na vytváření heterochromatinu v umlčeném chromozómu X u žen [208].

Výměnu histonových variant zprostředkovávají jednak ATPázy remodelující chromatin (viz výše, oddíl III. 4. 2.) a jednak tzv. histonové chaperony. To jsou proteinové komplexy, které slouží ke správnému skládání histonových oligomerů (především H2A/H2B a H3/H4) a jejich umístění do nukleozómů. Některé tak činí při replikaci (např. histonový chaperon CAF1 u histonového dimeru H3.1/H4), čímž pomáhají udržovat aktivovaný či umlčený chromatin i v dceřiných buňkách, zatímco jiné (např. komplex HIRA/ASF1 u histonového dimeru H3.3/H4) v průběhu buněčného cyklu, kdy se mj. podílejí na regulaci transkripce [209, 210].

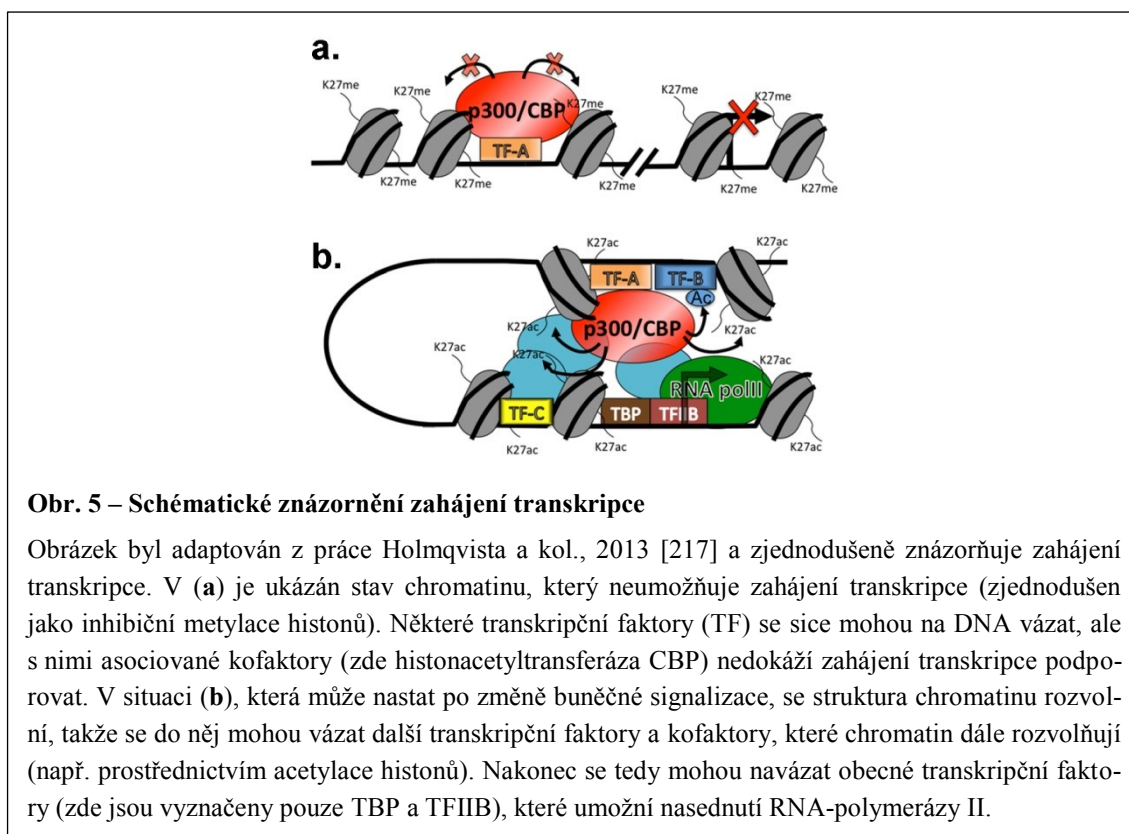
III. 4. 5. Metylace DNA

Cílem chemických modifikací může být i vlákno DNA. Důležitá je především metylace cytozinů v oblastech bohatých na cytozin a guanin (tzv. CG-ostrovy) působením DNA-metyltransferáz (DNMT). Metylace cytozinu má na transkripci většinou inhibiční účinek, jelikož se na takto modifikovanou DNA váží proteiny podporující vyšší organizaci (kondenzaci) chromatinu [211].

III. 4. 6. Transkripční faktory a koregulátory

Samotné zahájení transkripce je řízeno tzv. transkripčními faktory. Z nich tzv. obecné transkripční faktory přesně určí místo, kde transkripce započne, a podílejí se na vazbě RNA-polymerázy, zatímco sekvenčně specifické transkripční faktory tuto činnost regulují. Mezi nimi jsou rozlišovány tzv. aktivátory, které podporují transkripci, a represory, jež ji inhibují. Typický sekvenčně specifický transkripční faktor je složen z několika modulů, zejména obsahuje DNA-vazebnou doménu, která váže konkrétní sekvenci v řetězci DNA, a funkční doménu, kam se váží další proteiny, tzv. transkripční koregulátory. Mimo to může být přítomna i oligomerizační doména, regulační doména a další moduly [212, 213].

Regulační úseky genů (např. promotory) obsahují více vazebných míst pro transkripční faktory a teprve jejich vzájemná souhra určí, jestli transkripce započne. To, zda se transkripční faktor chová spíše jako aktivátor, nebo jako represor, záleží i na tom, jaké koregulátory (tzv. koaktivátory či korepresory) se na jeho funkční doménu váží. Např. u signální dráhy Wnt je transkripční faktor z rodiny TCF za běžných podmínek asociován s korepresorem Groucho, což přispívá k potlačení genové exprese. Teprve



Obr. 5 – Schématické znázornění zahájení transkripce

Obrázek byl adaptován z práce Holmqvista a kol., 2013 [217] a zjednodušeně znázorňuje zahájení transkripce. V (a) je ukázán stav chromatinu, který neumožňuje zahájení transkripce (zjednodušen jako inhibiční metylace histonů). Některé transkripční faktory (TF) se sice mohou na DNA vázat, ale s nimi asociované kofaktory (zde histonacetyltransferáza CBP) nedokáží zahájení transkripce podporovat. V situaci (b), která může nastat po změně buněčné signalizace, se struktura chromatinu rozvolní, takže se do něj mohou vázat další transkripční faktory a kofaktory, které chromatin dále rozvolňují (např. prostřednictvím acetylace histonů). Nakonec se tedy mohou navázat obecné transkripční faktory (zde jsou vyznačeny pouze TBP a TFIIB), které umožní nasednutí RNA-polymerázy II.

po vazbě ligandu Wnt na příslušný receptor asociuje transkripční faktor TCF s koaktivátorem β -kateninem a aktivuje transkripci cílových genů [132, 213-215].

Koregulátory transkripce se rozlišují na tzv. pasivní a aktivní. Pasivní koregulátory slouží spíše k vazbě dalších proteinových komplexů, a působí tak coby kostrové (*scaffold*) či adaptérové proteiny. Sem patří např. korepresor mSin3A, asociovaný mj. s HDAC, či koaktivátor NCoA1, asociovaný s histonacetyltransferázou CBP. Některé pasivní koaktivátory, např. proteinový komplex Mediátor, také přímo interagují s transkripčním aparátem a pomáhají mu ke správnému nasednutí na DNA. Naproti tomu aktivní koregulátory se většinou vyznačují enzymovou funkcí a zpravidla slouží k regulaci struktury chromatinu (sem patří např. výše zmíněné ATPázy remodelující chromatin, HDAC, HAT, DNMT, aj.) [214-216].

Daxx byl již krátce po svém objevu popsán coby koregulátor transkripce, působící většinou jakožto korepresor. Později se ukázalo také to, že je jedním z histonových chaperonů pro dimer H3.3/H4.

Transkripční faktor	Funkce proteinu Daxx
AIRE	transkripční represe
androgenní receptor	transkripční represe
C/EBPbeta	transkripční represe
CREB	transkripční represe
E2A	transkripční represe
E2F1	transkripční represe
ETS1	transkripční represe
glukokortikoidový receptor	transkripční represe
HSF1	aktivace transkripce
NF- κ B (p65)	transkripční represe
NF- κ B (RelB)	transkripční represe
p53	transkripční represe
Pax3	transkripční represe
Pax5	aktivace transkripce
Smad4	transkripční represe
STAT3	transkripční represe
Tcf4	transkripční aktivace i represe

Tab. 1 – Seznam transkripčních faktorů, s nimiž interaguje Daxx

V tabulce je uveden seznam transkripčních faktorů, s nimiž interaguje protein Daxx (včetně těch, jež váže prostřednictvím modifikátoru SUMO) a úloha, kterou při této interakci Daxx má [36, 65, 70, 119, 120, 122, 125, 218-236]. Ze seznamu je zřejmé, že při transkripci Daxx působí převážně jakožto korepresor.

III. 5. Úloha proteinu Daxx při regulaci zahájení transkripce

III. 5. 1. Interakce proteinu Daxx s transkripčními faktory a úloha modifikátoru SUMO

V tab. 1 je uveden seznam sekvenčně specifických transkripčních faktorů, s nimiž Daxx interaguje. Daxx s některými z těchto transkripčních faktorů interaguje přímo, avšak jiné musejí být nejprve modifikovány proteinem SUMO, který poté Daxx váže svým SUMO-vazebným motivem (SIM). Doposud to bylo popsáno u androgenního a glukokortikoidového receptoru, Smad4, ETS1 [11, 13, 65, 224] a některých virových proteinů (viz oddíl III. 3.). Lze tedy předpokládat, že SUMOylace hraje roli také u dalších transkripčních faktorů, s nimiž Daxx interaguje. Existuje nicméně též studie, která potřebu SUMOylace glukokortikoidového receptoru pro transkripční represí zprostředkovanou proteinem Daxx zpochybňuje [237].

Modifikátor SUMO je v každém případě pro regulaci jaderných funkcí proteinu Daxx důležitý. Jak již bylo uvedeno v úvodní kapitole (viz oddíl I. 2.), Daxx obsahuje dva SIM, jeden na svém N-konci, druhý na C-konci, přičemž mají oba afinitu jak pro modifikátor SUMO-1, tak i pro SUMO-2, avšak N-koncový motiv s nimi interaguje slaběji [11-13]. C-koncový SIM však může být fosforylován prostřednictvím kinázy CK2, což výrazně zvýší jeho afinitu k SUMO-1 [136]. Je tedy možné, že fosforylace či defosforylace tohoto motivu představuje způsob, jakým je u proteinu Daxx regulována jeho vazba k jednotlivým SUMOylovaným proteinům. Dalším způsobem regulace může být acety-

lace modifikátoru SUMO, která vazbě proteinu Daxx zabraňuje [146]. Aspoň jeden funkční SIM je rovněž nezbytný pro SUMOylaci proteinu Daxx, neboť právě prostřednictvím modifikátoru SUMO Daxx asociuje se SUMO-ligázou Ubc9 [11, 12]. Úloha SUMOylace proteinu Daxx však zůstává poněkud nejasná. Pravděpodobně ovlivňuje interakci s dalšími SUMO-vázajícími proteiny či jeho lokalizaci, neboť se místa pro SUMOylaci nacházejí přímo v jednom z jaderných lokalizačních signálů proteinu Daxx [9, 50].

III. 5. 2. Úloha PML-tělísek při regulaci transkripčních funkcí proteinu Daxx

SIM proteinu Daxx jsou kromě interakce s transkripčními faktory důležité i pro jeho asociaci s PML-tělísky, pro niž sice nejsou zcela nezbytné, ale výrazně ji zesilují [11, 12]. Jak již bylo uvedeno v podkapitole věnované PML-tělískům (viz oddíl III. 2.), slouží SUMOylace PML coby molekulární „lepidlo“, které většinu PML-tělísek drží pohromadě a zároveň umožňuje i jejich asociaci se SUMO-vazebnými proteiny. Stejně je to i v případě proteinu Daxx, u něhož je SUMOylace PML nezbytná pro jeho přesun do PML-tělísek z oblastí heterochromatinu [6, 137].

Většina proteinu Daxx je ovšem s PML-tělísky asociována spíše slabě a víceméně volně přechází mezi tělísky a zbytkem jádra [148]. Přesto mohou PML-tělíska blokovat transkripční represi zprostředkovanou proteinem Daxx. Nadprodukce PML či podpoření tvorby PML-tělísek pomocí inkubace s As_2O_3 potlačí inhibiční účinek proteinu Daxx u transkripčního faktoru Pax3, glukokortikoidového receptoru či u reportérového systému s umělým promotorem, v němž je produkován protein Daxx fúzovaný s DNA vazebnou doménou. Tento vliv zvýšené tvorby PML-tělísek na transkripční represi zprostředkovanou proteinem Daxx je závislý na SUMOylaci PML [11, 220, 222, 238].

PML-tělíska tak zřejmě představují pufrující prostředí, jež reguluje množství volně dostupné formy proteinu Daxx. Změna posttranslačních modifikací PML, proteinu Daxx, modifikátoru SUMO i dalších proteinů pravděpodobně ovlivňují zadržování proteinu Daxx v PML-těliscích nebo naopak jeho větší uvolňování, s následnými vlivy na transkripci či např. apoptotickou nebo stresovou signalizaci (viz oddíl II.). K podobné regulaci funkce proteinu Daxx patrně mohou sloužit i další jaderné struktury obsahující tento protein. Kupř. nadprodukce proteinu MSP58 podporuje vazbu proteinu Daxx do jádérka, což potlačí inhibici glukokortikoidního receptoru [138].

III. 5. 3. Další způsoby regulace transkripčních funkcí proteinu Daxx

Funkce proteinu Daxx jakožto regulátoru transkripce je pravděpodobně ovlivňována i jeho nejružnějšími posttranslačními modifikacemi, nejenom pomocí jeho lokalizace v různých jaderných oddílech. Např. fosforylace serinu 668 prostřednictvím HIPK1 dále zvyšuje represi promotorů pro gen *c-met* či promotorů regulovaných transkripčními faktory CREB či E2F1 [44]. Naopak ubiquitinylace proteinu Daxx zprostředkovaná adaptérovým proteinem SPOP podporuje jeho odbourávání, což následně zvyšuje transkripční aktivitu p53 a ETS1 [226, 239].

III. 5. 4. Způsob, jímž Daxx reguluje zahájení transkripce

Z tabulky 1 je zřejmé, že Daxx působí převážně coby korepresor. Tato jeho funkce byla navíc popsána nejen u uvedených transkripčních faktorů, nýbrž též u genů pro *c-met*, interleukin-6, genů podporujících autofágii a protiapoptotických proteinů FLIP a Bcl2 [136, 240-243]. U těchto genů byl sice Daxx nalezen v jejich promotorech, ale zatím není zřejmé, s jakými transkripčními faktory interaguje. Pravděpodobně však DNA neváže přímo, neboť u něj doposud nebyla identifikována DNA-vazebná doména. U promotorů protiapoptotických genů by transkripčním faktorem asociovaným s proteinem Daxx mohl být NF- κ B, jelikož byl Daxx objeven v jeho vazebných místech na DNA [136].

Pozitivní vliv proteinu Daxx na zahájení transkripce byl pozorován pouze u transkripčních faktorů HSF1, Pax5 a Tcf4. U posledně jmenovaného je navíc poněkud sporný, neboť byl Daxx v jedné studii identifikován coby inhibitor transkripce řízené Tcf4 po aktivaci signální dráhy Wnt [228], zatímco u dvou byl nalezen v proteinovém komplexu obsahujícím Tcf4 a koaktivátor β -katenin, s nimiž se vázal i do promotoru genu pro *c-Myc* a podporoval transkripci proteinu *c-Myc* a cyklinu-D [233, 244]. Obdobně nejasná je i role proteinu Daxx u transkripce regulované faktorem HSF1, klíčovým regulátorem odpovědi na různé formy buněčného stresu [245]. Daxx sice interaguje s jeho trimerní formou, vznikající v reakci na buněčný stres, a podporuje jím regulovanou expresi chaperonu HSP70, avšak není zřejmé, zda tento účinek přímo souvisí s regulací struktury chromatinu [225]. Daxx ovšem patrně může působit jakožto koaktivátor, neboť s transkripčním faktorem Pax5 interaguje společně s histonacetyltransferázou CBP [221]. Nelze však vyloučit, že je u Tcf4 i dalších transkripčních faktorů úloha proteinu Daxx obdobně komplexní jako v případě p53 (popsaná v oddíle II. 5. 5.) a ne vždy se bezprostředně týká regulace transkripce.

Lépe je prozkoumán mechanismus účinku proteinu Daxx při transkripční represi. Daxx interaguje s histondeacetylázou (HDAC) -1 a -2 [238, 246] a s DNA-metyltransferázou-1 (DNMT1) či s ní asociovaným proteinem DMAP1 [231, 247] a patrně je coby adaptér (korepresor) přivede k transkripčním faktorům, což způsobí nižší acetylaci histonů či vyšší metylaci cytozinu v promotoru.

Inhibice transkripce prostřednictvím HDAC byla u proteinu Daxx zjištěna již v jednoduchém systému, v němž byl Daxx fúzován s DNA-vazebnou doménou. Takovýto umělý transkripční faktor potlačoval transkripci reportérového genu, a tento účinek bylo možné zvrátit inkubací buněk s inhibitorem HDAC [238]. Obdobné působení proteinu Daxx prostřednictvím interakce s HDAC bylo nalezeno i u transkripčních faktorů CREB, E2A, p53, glukokortikoidového receptoru [11, 125, 232, 248] a některých virových proteinů (viz oddíl III. 3.). Snížená acetylace histonů po vazbě proteinu Daxx byla též prokázána v promotorech genů pro c-met a interleukin-6 [240, 241]. Represní účinek proteinu Daxx prostřednictvím DNMT či DMAP1, vedoucí k metylaci promotoru, pak byl popsán u glukokortikoidového receptoru, RelB, p53 [119, 231, 247] a také u některých virových proteinů (viz oddíl III. 3.). Dále se Daxx společně s DNMT1 váže do promotorů genů podporujících autofágii a způsobuje jejich metylaci [242, 243].

Jiným mechanismem, jímž Daxx může ovlivňovat některé transkripční faktory, je inhibice jejich acetylace závislé na acetyltransferáze CBP. Doposud to bylo popsáno u transkripčních faktorů p53, NF- κ B a C/EBPbeta, přičemž inhibice jejich acetylace snižuje jejich transkripční aktivitu [70, 120] [234]. Daxx přímo interaguje se SUMOylovaným CBP, což má za následek potlačení jeho funkce, zřejmě související i s působením HDAC2 [248].

Dalším způsobem, jímž Daxx ovlivňuje transkripci, je prostřednictvím interakce s ATPázou remodelující chromatin ATRX. Komplex Daxx/ATRX, který funguje jako histonový chaperon pro histon-3.3 (H3.3), se podílí nejen na transkripční represi genů (např. virového původu, viz oddíl III. 3.), ale i na udržování heterochromatinu v oblasti repetitivních sekvencí (např. v centromerách či telomerách). Tato úloha proteinu Daxx je popsána v následující podkapitole.

III. 6. Úloha proteinu Daxx jakožto histonového chaperonu

III. 6. 1. Objev proteinového komplexu Daxx/ATR_X jako chaperonu pro histon-3.3

Identifikace funkce proteinu Daxx coby histonového chaperonu souvisela s rozvojem nových experimentálních metod a měla zásadní vliv na ujasnění úlohy proteinu Daxx v buněčné fyziologii. Změna struktury chromatinu je spojena s mnoha buněčnými pochody a její narušení, způsobené např. odstraněním či nadprodukcí proteinu Daxx, by mohlo mít vliv nejenom na stresové či apoptotické signály, ale i na transkripci. Odlišná struktura chromatinu je zároveň častá v nádorových buněčných liniích, jejichž použití při experimentech by mohlo vysvětlit některé rozporné výsledky týkající se proteinu Daxx, které byly popsány v předchozích kapitolách.

Coby histonový chaperon Daxx asociuje s ATPázou remodelující chromatin ATR_X, jejíž gen je mutován u dědičného syndromu spojeného s mentální retardací, α -thalasémií a chromozómovými změnami [249]. Také mutace ATR_X v buněčných liniích způsobují rozsáhlé změny metylace DNA související s heterochromatinem [250].

Interakce proteinů Daxx a ATR_X byla popsána v roce 2003 [207]. Oba proteiny spolu asociovaly v PML-tělíscích, kam se ATR_X vázal v závislosti na proteinu Daxx. Lokalizace obou proteinů se měnila během buněčného cyklu. Zatímco ATR_X byl v jeho průběhu přítomen v heterochromatinu, Daxx se sem výrazněji vázal pouze koncem fáze S a ve fázi G₂ oba proteiny přecházely do PML-tělísek, kde se zřejmě podílejí na obnově heterochromatinu v čerstvě replikované satelitní DNA [37, 207, 251]. Pokud byl ATR_X fúzován s DNA-vazebnou doménou, inhiboval transkripci reportérového genu, a tento efekt mohla narušit nadprodukce proteinu Daxx, který ATR_X vázal do PML-tělísek [252]. ATR_X sice pravděpodobně nemá vlastní DNA-vazebnou doménu, ale na jeho N-konci se nachází doména ADD, která váže trimetylovaný lyzin 9 histonu-3, jestliže je zároveň demetylován jeho lyzin 4 (oboje jsou posttranslační modifikace typické pro heterochromatin) [253-255]. ATR_X se tak pravděpodobně podílí na udržení heterochromatinu a utlumení genové exprese.

Možná interakce proteinu Daxx s nukleozómovými histony byla naznačena ve studii z roku 2002, v níž byl s nimi izolován z buněčného lyzátu [246], či později, kdy byl Daxx izolován společně s histonem-4 [256]. V roce 2010 byl pak Daxx identifikován jako histonový chaperon. Ukázalo se totiž, že již dříve popsáný histonový chaperon H3.3 HIRA/ASF1 [209] umísťuje H3.3 do chromatinu nezávisle na replikaci DNA, a to do oblasti transkripčně aktivních i umlčených genů, avšak nikoli do oblasti telomer

či těch částí DNA, kam se váží transkripční faktory. Při následné analýze byly z buněčného lyzátu společně s H3.3 (nikoli však s příbuzným H3.1, který je vkládán během replikace podle předlohy) izolovány proteiny Daxx a ATRX. Ty společně s H3.3 vytvářejí komplex důležitý pro umístování H3.3 v telomerách a oblastí centromer a udržování represivního stavu zdejšího chromatinu. Daxx navíc coby histonový chaperon může fungovat sám o sobě, neboť dokáže umísťovat tetramery H3.3/H4 (a nikoli H3.1/H4) na „nahém“ vlákne DNA. ATRX tedy může sloužit např. k rozvolňování vyšších chromatinových struktur a ke směřování proteinu Daxx do oblastí heterochromatinu, který ATRX rozpoznává pomocí své domény ADD (viz výše) [257-259]. Pro chromatinovou lokalizaci histonu H3.3 tak existují dva chaperonové komplexy, HIRA/ASF1 a Daxx/ATRX, jež jsou navzájem nezávislé a ani spolu nesdílejí další podjednotky. Zatímco první komplex se vyskytuje již v kvasinkách, druhý je unikátní pro mnohobuněčné živočichy [260].

III. 6. 2. Funkce histonového chaperonu Daxx/ATRX

Protein ATRX byl již v roce 1999 nalezen v pericentromerním heterochromatinu a na koncích akrocentrických chromozómů, kde se nacházejí ribozómové geny [261]. Později se ukázalo, že se váže především do tandemových repetitivních sekvencí bohatých na guanin, které jsou typické pro centromery, telomery, oblasti ribozómových genů, apod., a podílí se na udržení konstitutivního heterochromatinu [262]. Na tom pravděpodobně spolupracuje s proteinem Daxx, neboť jeho odstranění způsobí v konstitutivním heterochromatinu výrazné strukturní změny [263].

Jednou z funkcí závisících na správném umístění H3.3, kterou histonový chaperon Daxx/ATRX má, je udržení stability telomer [264]. Ztráta ATRX u myších nervových progenitorů způsobí změny integrity telomer a fúze chromozómů [265] [266]. Odstranění ATRX v myších oocytech zvýší nestabilitu centromer, která vede až k aneuploidii [267], a umlčení jeho exprese v myších zárodcích během implantace do dělohy způsobí křehké centromery, chromozómové translokace, apod. [268]. Histonový chaperon Daxx/ATRX se dále podílí na udržení represivního stavu repetitivních sekvencí (včetně retrotranspozónů) při zárodečném vývinu i v buněčných liniích a také na zachování genového imprintingu [186, 269-271]. Nefunkčnost ATRX navíc u repetitivních sekvencí způsobuje defekty v replikaci [272]. Mimo to, jak již bylo zmíněno výše (viz oddíl III. 3.), se komplex Daxx/ATRX podílí také na umlčení exprese virových proteinů.

Pro některé funkce histonového chaperonu Daxx/ATRX jsou důležitá i PML-tělíska, v nichž zřejmě dochází ke správné asociaci H3.3 a jeho chaperonů. Volné dimery H3.3/H4 jsou do PML-tělísek vázány prostřednictvím proteinu Daxx, který sem zároveň přivádí i ATRX. Následně dimer H3.3/H4 asociuje s chaperonem Daxx/ATRX, ale i se svým dalším chaperonem HIRA/ASF1, a poté je distribuován do příslušných míst v chromatinu. Po ztrátě proteinů Daxx či PML bylo narušeno ukládání H3.3 do oblasti centromer, ale nikoli celková ztráta H3.3 v chromatinu. PML-tělíska jsou tedy zřejmě potřeba pro cílení H3.3 pouze do některých oblastí chromatinu [273, 274]. Dalším proteinem, který se podílí na regulaci umístování H3.3, je protoonkogen DEK. Jeho odstranění způsobí, že je H3.3 méně umístován do oblastí telomer, odkud mizí i ATRX, což následně způsobí jejich křehkost [275].

III. 6. 3. Narušení funkce komplexu Daxx/ATRX v nádorech

Vzhledem k tomu, jak vážné chromozómové poruchy způsobí odstranění proteinu Daxx či ATRX, není příliš překvapivé, že byly jejich mutace nalezeny i v nádorech. Jako první to byly pankreatické neuroendokrinní nádory (PanNET), které představují méně častý typ nádorů slinivky s lepším předpokladem přežití [276-278]. Funkce komplexu Daxx/ATRX je narušena i v dalších typech neuroendokrinních nádorů, některých dětských glioblastomech, neuroblastomech, astrocytomech, liposarkomech a angiosarkomech. Častěji je přitom mutován ATRX a výrazně méně často Daxx. U expresních analýz některých typů nádorů byly zmíněny i mutace H3.3 [279-284].

V nádorech s mutacemi chaperonu Daxx/ATRX se velmi často vyskytuje tzv. alternativní prodlužování telomer (ALT), související zřejmě s tím, že je tento chaperon důležitý pro zajištění stability chromozómových konců. Vedle obvyklejší aktivace exprese telomerázy je proces ALT méně častým způsobem, jímž nádorové buňky uniknou omezení danému postupným zkracování telomer během každé replikace DNA. Telomery jsou při něm prodlužovány mechanismem, který se podobá opravám dvojřetězcových zlomů v DNA pomocí homologní rekombinace, podílejí se na něm stejné proteinové komplexy a účastní se ho i odchýlná PML-tělíska [285].

Proces ALT byl zjištěn u většiny zkoumaných PanNET a všechny, které tento proces využívaly, měly mutován protein ATRX (výrazně častěji) nebo Daxx (méně často) a byly asociovány s pozdním stádiem nádoru a sníženým přežitím pacientů [286-288]. Obdobné zjištění bylo učiněno i u neuroblastomů, astrocytomů, liposarkomů a angiosarkomů, které sice ALT využívaly méně často, ale pokud se vyskytl, byl zároveň mu-

tován Daxx nebo ATRX [281-284]. Také u většiny imortalizovaných buněčných linií, které se vyznačují ALT, zcela převládaly mutace ATRX. V některých buněčných liniích byla též snížena či potlačena exprese proteinu Daxx což mělo za následek vymizení ATRX v PML těliscích [289]. Uvedená zjištění naznačují dvě možnosti. Buď je ztráta proteinu Daxx pro rozvoj ALT méně významná než ztráta ATRX, anebo vyřazení proteinu Daxx naruší jiné procesy, které příslušný nádorový klon znevýhodní během klonální selekce.

Mechanismus, jímž ALT vzniká, ještě není zcela prozkoumán. Je pro něj typická menší míra kondenzace chromatinu v telomerách spojená se zvýšenou transkripcí. Ztráta ATRX ale k navození tohoto stavu nestačí. Pokud byl nicméně v buňkách produkován velký T-antigen pocházející z viru SV40, který narušuje kontrolní body buněčného cyklu, k imortalizaci a ALT docházelo častěji. Je tedy zřejmé, že jsou k rozvoji ALT potřeba další mutace, které vyřadí buněčné kontrolní mechanismy [290, 291]. Jestliže se ovšem ALT vyvine, lze jej potlačit obnovením funkce histonového chaperonu Daxx/ATRX, jak dokazují pokusy u buněčné linie U2OS, která využívá ALT a zároveň postrádá expresi ATRX. Pozitivní efekt obnovení exprese ATRX lze navíc potlačit odstraněním proteinu Daxx, což nasvědčuje tomu, že jsou oba proteiny při ochraně telomerových konců a potlačení ALT funkčně provázány [292].

Jak je tedy zřejmé, Daxx je kromě svých ostatních funkcí také důležitý pro udržení některých typů konstitutivního heterochromatinu, které mohou mít strukturní funkci, jako je tomu u telomer či centromer, anebo se může jednat o trvale umlčené geny (např. virového původu).

III. 7. Účast proteinu Daxx při dalších jaderných pochodech

III. 7. 1. Daxx jako součást mitotických kontrolních bodů

Odstranění proteinu Daxx pomocí techniky genového „knock-outu“ způsobuje poruchy buněčného cyklu spojené s výskytem vícejaderných buněk, což naznačuje, že se Daxx podílí také na regulaci mitózy [37]. Chemoterapeutikum taxol (paclitaxel) aktivuje mitotický kontrolní bod uspořádání vřeténka (*spindle assembly checkpoint*) tím, že brání depolymerizaci mikrotubulů. Prodloužená aktivace kontrolního bodu následně vede k apoptóze [293]. U buněčných linií, které mají vyšší expresi proteinu Daxx, bylo zjištěno, že na taxol reagují silněji, zatímco buňky s jeho nižší expresí nebo u nichž byla exprese proteinu Daxx snížena pomocí RNAi, jsou k taxolu rezistentní. U takovýchto

buněk byla zároveň zjištěna prodloužená stabilita mitotického cyklinu B. Daxx při regulaci kontrolního bodu uspořádání vřeténka spolupracuje i s ubikvitin-hydrolázou Hausp a proteinem RASSF1, s nimiž interaguje a jejichž odstranění má stejný účinek jako odstranění proteinu Daxx. Zároveň k tomu není potřeba protein p53, jehož regulace se jinak všechny tři proteiny účastní (viz oddíl II. 5. 5.) [294-296]. Je také možné, že se tohoto procesu účastní i ATRX, u něhož bylo dříve popsáno, že je důležitý pro správné uspořádání chromozómů v mitotickém vřeténku [297, 298].

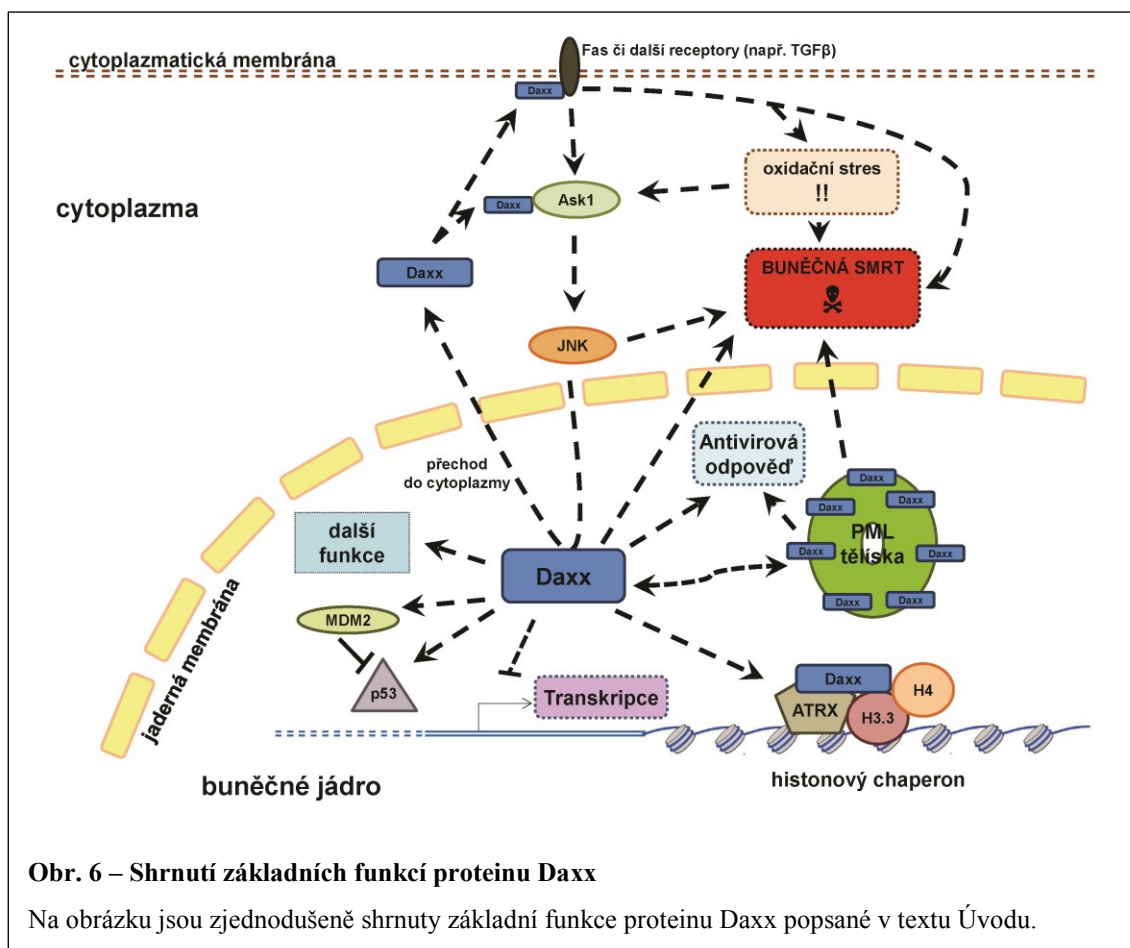
Daxx mimo to interaguje s proteiny Cdc20 a Cdh1, aktivačními podjednotkami ubikvitin-ligázy APC/C, která odbourává mitotické proteiny (včetně výše zmíněného cyklinu B), a tím umožňuje ukončit mitózu [299]. Daxx prostřednictvím této interakce komplex APC/C inhibuje a jeho nadprodukce způsobí prodloužení mitózy a vyvolá sklon k polyploidii. Zvýšená exprese proteinu Daxx byla zjištěna i u některých nádorů prostaty [300]. Toto zjištění ukazuje, že je úloha proteinu Daxx při mitóze pravděpodobně také komplexní a doposud nebyla plně prozkoumána.

III. 7. 2. Úloha proteinu Daxx při regulaci fosfatázy PTEN

Daxx se též účastní regulace důležité protinádorové fosfatázy PTEN, která má nejrůznější funkce jak v cytoplazmě, tak v jádře, v němž ji postrádají mnohé agresivní nádory [301]. Buněčná lokalizace fosfatázy PTEN je regulována mj. její ubikvitinylací. Pokud je modifikována ubikvitinem, přesouvá se do jádra, zde jí může být ubikvitin odštěpen působením ubikvitin-hydrolázy Hausp, a to vede k jejímu návratu do cytoplazmy. Na regulaci tohoto procesu se zřejmě podílí i Daxx. Jeho nadprodukce způsobí, že je fosfatázy PTEN v jádře méně, a snížení jeho exprese pomocí RNAi její množství v jádře zvyšuje. Podstata tohoto účinku proteinu Daxx však není příliš jasná, zřejmě se na něm podílejí i PML-tělíška, která působí opačně než Daxx [302].

III. 7. 3. Daxx jako regulátor telomerázy

Další doposud nepříliš prozkoumanou funkcí proteinu Daxx, která souvisí s regulací telomer, je jeho asociace s proteinem DKC1, podjednotkou telomerázového komplexu, v Cajalových tělíscích. Tato asociace je zřejmě důležitá pro vazbu telomerázy do oblasti telomer. Mutace proteinu Daxx, které brání jeho asociaci s telomerázou, či potlačení jeho exprese pomocí RNAi, mohou totiž vést ke zkracování telomer [140].



III. 8. Shrnutí úlohy proteinu Daxx

Jak bylo popsáno v této kapitole, většina jaderných funkcí proteinu Daxx podle všeho souvisí s regulací struktury chromatinu. Daxx se jakožto histonový chaperon H3.3 a adaptér přivádějící k chromatinu modifikující enzymy (HDAC, DNMT1) podílí na udržení konstitutivního heterochromatinu v oblasti telomer a centromer, ale také na trvalém umlčení některých genů, jež mohou být jak buněčného, tak virového původu (včetně retrotranspozónů). Viry se této transkripční represi svých genů brání tak, že se Daxx pokoušejí nejrůznějšími způsoby inhibovat. Daxx také působí coby koregulátor u některých transkripčních faktorů, které jsou součástí nejrůznějších signálních drah, což dále rozšiřuje spektrum buněčných pochodů, jichž se Daxx účastní. Mnohé z funkcí proteinu Daxx jsou regulovány PML-tělisky, která kromě toho, že se na některých z těchto funkcí podílejí, slouží též coby pufrující prostředí, které ovlivňuje množství volně dostupného proteinu Daxx. Obdobně zřejmě působí i další jaderné struktury (jadérko, Cajalova tělíska, aj.), ale jejich role u proteinu Daxx prozatím nebyla důkladněji prozkoumána.

Připočteme-li k jaderným funkcím proteinu Daxx i jeho účast při regulaci apoptotické a stresové signalizace, je zřejmé, že je množství pochodů, na nichž se Daxx podílí, značné (většina funkcí proteinu Daxx je shrnuta na obr. 6). Tyto pochody se pravděpodobně navzájem ovlivňují, což může komplikovat analýzu experimentálních dat a také vysvětlovat rozporné výsledky některých studií. Prozatím poněkud roztříštěně se jevící funkce proteinu Daxx budou pravděpodobně časem integrovány do širších signálních sítí. K lepšímu pochopení funkcí proteinu Daxx by mohlo napomoci i nalezení dalších proteinů, které s ním interagují, případně lepší analýza jeho posttranslačních modifikací.

IV.

Cíl dizertační práce

Cílem této dizertační práce bylo dále rozšířit poznání týkající se buněčných funkcí proteinu Daxx. Základem bylo vyhledání jeho nových potencionálních interakčních partnerů v kvasinkovém dvojhybridním systému. U takto nalezených interakcí se předpokládalo jejich potvrzení v dalších systémech (nejlépe *in vivo*) a následné nalezení jejich buněčné funkce.

Metodika

I.

Použité bakteriální a kvasinkové kmeny, savčí buněčné linie a kulturační média

I. 1. Kmeny bakterií *Escherichia coli*

- **TOP-10** (*Invitrogen*): F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 ara*Δ139 Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*
- **BL-21** (*Invitrogen*): F⁻, *ompT*, *hsdS*(r-B, m-B), *gal*, *dcm*, *lacI*, *lacUV5-T7 gene 1*, *ind1*, *sam7*, *nin5*

Kmen TOP10 byl používán k přípravě plazmidové DNA (viz oddíl III.), kmen BL21 k produkci rekombinantních proteinů (viz oddíl VIII. 1.). Experimentální přístupy byly prováděny dle standardních molekulárněbiologických protokolů (viz např. [303], kapitola 1, oddíl I).

I. 2. Kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*

- **AH109** (*Clontech*): MAT_a, *trp1-901*, *leu2-3*, 112, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2* :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ
- **Y187** (*Clontech*): MAT_α, *ura3-52*, *his3-200*, *ade 2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, 112, *gal4Δ*, *met-gal80Δ*, URA3 :: GAL1_{UAS} -GAL1_{TATA} -lacZ, MEL1

I. 3. Kultivační média pro bakterie a kvasinky

Kultivační média byla použita jednak tekutá pro přípravu buněčných kultur, jednak pevná (s agarem) pro kultivaci bakterií na Petriho miskách.

I. 3. 1. Médium LB – kultivační médium pro bakterie

- | | |
|--|--------|
| • LB Broth Miller (<i>Amresco</i>) | 20 g/l |
| • agar pro pevné médium (<i>Sigma Aldrich</i>) | 18 g/l |

Připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu.

Pro přípravu médií k selekci bakterií s rezistencí vůči příslušnému antibiotiku byl přidán streptomycin (konečná koncentrace 50 µg/ml), ampicilin (100 µg/ml) nebo kanamycin (50 µg/ml). Všechna antibiotika byla pořízena u firmy *Sigma Aldrich*.

I. 3. 2. YPDA – kompletní médium pro kultivaci kvasinek

- pepton (*Neopeptone, Difco*) 20 g/l
- kvasničný lyzát (*Yeast Extract, Sigma Aldrich*) 10 g/l
- agar pro pevné médium (*Sigma Aldrich*) 20 g/l
- deionizovaná H₂O do 900 ml/l

Po sterilizaci v autoklávu a ochlazení na teplotu 55°C bylo přidáno 100 ml 20% glukózy, adenin-hemisulfát (výsledná koncentrace 0,03%) a kanamycin (výsledná koncentrace 50 µg/ml).

I. 3. 3. Médium SD – minimální médium pro kvasinky

- NH₄(SO₄)₂ (*Sigma Aldrich*) 2 g/l
- kvasinkový zdroj dusíku (*yeast nitrogen base, Biogen*) 6,7 g/l
- agar pro pevné médium (*Sigma Aldrich*) 20 g/l
- deionizovaná H₂O do 800 ml/l

Po sterilizaci v autoklávu a ochlazení na teplotu 55°C bylo přidáno 100 ml/l 20% glukózy, a 100 ml/l roztoku 10x „drop-out“.

10x „drop-out“ (aminokyseliny i adenin byly dodány firmou *Sigma Aldrich*)

L-izoleucin:	300 mg/l	adenin-hemisulfát:	200 mg/l	L-leucin :	1000 mg/l
L-valin:	1500 mg/l	L-arginin.HCl:	200 mg/l	L-lyzin.HCl:	300 mg/l
L-metionin:	200 mg/l	L-histidin.HCl-monohydrát:	200 mg/l	L-tryptofan:	200 mg/l
L-treonin:	2000 mg/l	L-fenylalanin:	500 mg/l		

V médiích SD pro selekci kvasinek byly vždy vynechány příslušné aminokyseliny či adenin (např. „selekční médium SD -WLAH“, tj. neobsahující tryptofan, leucin, adenin a histidin).

I. 4. Lidské buněčné linie a média, v nichž byly kultivovány

- **HEK293T:** buněčná linie z embryonálních ledvin; kultivována v médiu DMEM s 10% FBS a 1% směsí antibiotik (penicilin a streptomycin)
- **HeLa:** buněčná linie z karcinomu děložního krčku; kultivována v médiu DMEM s 10% FBS a 1% směsí antibiotik (penicilin a streptomycin)
- **MCF10a:** imortalizovaná primární buněčná linie z prsního epitelu; kultivována ve speciálním médiu (od *ATCC*)
- **SW13:** buněčná linie z adenokarcinomu kůry nadledvinek, která postrádá expresi Brg1; kultivována v médiu DMEM s 10% FBS a 1% směsí antibiotik (penicilin a streptomycin)
- **U2OS:** buněčná linie z osteosarkomu; kultivována v médiu DMEM s 10% FBS a 1% směsí antibiotik (penicilin a streptomycin)

II.

Seznam použitých protilátek a siRNA

II. 1. Seznam použitých protilátek

- **anti-Myc:** myší monoklonální protilátka proti epitopu „Myc“ (9E10 *Sigma Aldrich*)
- **anti-FLAG:** myší monoklonální protilátka proti epitopu „FLAG“ (M2, *Sigma Aldrich*)
- **anti-AFP:** myší monoklonální protilátka proti lidskému α -fetoproteinu (AFP01, poskytnuta laboratoří prof. Václava Hořejšího z Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.)
- **anti- β -aktin:** kozí polyklonální protilátka proti lidskému β -aktinu (C-11, *Santa Cruz Biotechnology*)
- **anti-BAF155:** králičí polyklonální protilátka proti lidskému proteinu BAF155 (H-76, *Santa Cruz Biotechnology*)
- **anti-Brg1:** králičí polyklonální protilátka proti lidskému proteinu Brg1 (H-88, *Santa Cruz Biotechnology*) nebo myší monoklonální protilátka proti lidskému proteinu Brg1 (G-7, *Santa Cruz Biotechnology*)
- **anti-Brm:** myší monoklonální protilátka proti lidskému proteinu Brm (E-1, *Santa Cruz Biotechnology*)
- **anti-CD44:** myší monoklonální protilátka proti lidskému proteinu CD44 (MEM-263, poskytnuta laboratoří prof. Václava Hořejšího)
- **anti-Daxx:** myší monoklonální protilátky proti lidskému proteinu Daxx (Daxx01, 02, 03, připraveny v autorově laboratoři proti peptidu s aminokyselinami 558-740), králičí polyklonální protilátka proti lidskému proteinu Daxx (M-112, *Santa Cruz Biotechnology*) nebo jiná králičí protilátka proti lidskému proteinu Daxx (25C12, *Cell Signaling Technology*)
- **anti-Histon-3:** myší monoklonální protilátka proti lidskému histonu-3 (1B1B2, *Cell Signaling Technology*)
- **anti- α -tubulin:** myší monoklonální protilátka proti lidskému α -tubulinu (TU-01, *Exbio*)
- **GAM-Px:** „goat anti-mouse“, sekundární kozí protilátka proti myším protilátkám třídy IgG, konjugovaná s křenovou peroxidázou (*Bio-Rad* nebo *Jackson ImmunoResearch Laboratories*)
- **GAR-Px:** „goat anti-rabbit“, sekundární kozí protilátka proti králičím protilátkám, konjugovaná s křenovou peroxidázou (*BioRad*)
- **RAG-Px:** „rabbit anti-goat“, sekundární králičí protilátka proti kozím protilátkám, konjugovaná s křenovou peroxidázou (*Santa Cruz Biotechnology*)

- **GAM-Alexa647:** „goat anti-mouse“, sekundární kozí protilátka proti myším protilátkám třídy IgG, konjugovaná s fluorescenčním barvivem Alexa647 (*Jackson ImmunoResearch Laboratories*)
- **GAR-Rhod-RedX:** „goat anti-rabbit“, sekundární kozí protilátka proti králičím protilátkám, konjugovaná s fluorescenčním barvivem Rhodamine Red-X (*Jackson ImmunoResearch Laboratories*)

II. 2. Seznam použitých siRNA

- **siDaxx #1:** GGAGUUGGAUCUCUCAGAA; siRNA pro snížení exprese proteinu Daxx (viz [36]) od firmy *Dharmacon*
- **siDaxx B+C+D:** směs siRNA pro snížení exprese proteinu Daxx *siGENOME* od firmy *Dharmacon* (J-004420-07, J-004420-06, J-004420-05)
- **siDaxx D:** siRNA pro snížení exprese proteinu Daxx *siGENOME* od firmy *Dharmacon* (J-004420-05)
- **siCTRL:** AGGUCGAACUACGGGUCAAdTdT, kontrolní siRNA od firmy *Dharmacon*

III.

Seznam konstruktů DNA a popis jejich přípravy

III. 1. Metody použité k přípravě rekombinantních plazmidů (vektorů, konstruktů)

III. 1. 1. Restrikční štěpení, purifikace DNA, ligace

Ke štěpení konstruktů DNA byly použity restrikční endonukleázy od firmy *Thermo Scientific* (dříve *Fermentas*) a dodrženy doporučené postupy. Štěpená DNA byla separována pomocí elektroforézy v agarózovém gelu s použitím pufru TAE (viz [303], stránky 6.13-6.15). Vzniklé fragmenty DNA byly z gelu vyříznuty a izolovány s použitím soupravy *ZymoClean Gel DNA Recovery Kit* (*Zymo Research*). Následná ligace (spojení štěpených úseků DNA) byla provedena pomocí enzymu T4-DNA ligázy od firmy *Thermo Scientific*. Vzniklým konstruktem po ligaci byly transformovány bakterie *Escherichia coli* kmene TOP10.

III. 1. 2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

K polymerázové řetězové reakci byla použita termostabilní DNA-polymeráza *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* od firmy *Finnzymes* a dodrženy postupy uvedené v manuálu. Seznam použitých oligonukleotidů (primérů) je uveden v tab. 2.

Název oligonukleotidu	Sekvence	Použití
TEV_site_fwd	TCGAGAACCTGTACTTCCAAGGTT	příprava vektoru pGTH (kóduje štěpné místo pro TEV-proteázu)
TEV_site_rev	TCGAAACCTTGAAGTACAGGTTTC	příprava vektoru pGTH (kóduje štěpné místo pro TEV-proteázu)
Myc-tag_fwd	CGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGT AATCTAGA	příprava vektoru pMyc-CMV-5a
Myc-tag_rev	TCTAGATTACAGGTCCTCTCTGAGATCAGCTT CTGCTCGGTAC	příprava vektoru pMyc-CMV-5a
Daxx_1_fwd	GGGAATTCACCATGGCCACCGCTAACAGCAT	příprava konstruktů kódujícího Daxx od aminokyseliny 1
Daxx_225_fwd	GGGAATTCACCATGGAGGCACGGTTGAAGCGT	příprava konstruktů kódujícího Daxx od aminokyseliny 225
Daxx_503_fwd	GGGAATTCACCATGGCCAATGAAAAGAACCTG GAACC	příprava konstruktů kódujícího Daxx od aminokyseliny 503
Daxx_225_rev	GGGGATCCAACCTTACGCTTCTTCTTAGGCTGC AGGTATGCGGAGTCTGG	příprava konstruktů kódujícího Daxx po aminokyselinu 225
Daxx_503_rev	GGGGATCCAACCTTACGCTTCTTCTTAGGGGA GATCTGTAGTGAGGACAT	příprava konstruktů kódujícího Daxx po aminokyselinu 503
Daxx_595_rev	ATGCGGGCCGCTGCTCCTCTGATTGCTTCTGG	příprava konstruktů kódujícího Daxx po aminokyselinu 595
Daxx_3_end_rev	GGGGATCCATCAGAGTCTGAGAGCACGATGA	příprava konstruktů kódujícího Daxx po jeho poslední aminokyselinu
DaxxS564A_HindIII_rev	GGGGCAAAGCTTCAATCTCTAGCTCAAAGAGCT GAGCCACAGGGC	příprava konstruktů kódujícího Daxx se záměnou serinu 564 za alanin
DaxxS564E_HindIII_rev	GGGGCAAAGCTTCAATCTCTAGCTCAAAGAGCT GCTCCACAGGGC	příprava konstruktů kódujícího Daxx se záměnou serinu 564 za glutamovou kyselinu
Daxx_S707A_mut_fwd	CTCCAGCCCGGCTGGCCCAA	místně řízená mutagenese, pro záměnu serinu 707 proteinu Daxx za alanin
Daxx_S707A_mut_rev	TTGGGCCAGCCGGGCTGGAG	místně řízená mutagenese, pro záměnu serinu 707 proteinu Daxx za alanin
DaxxT726A_BamHI_rev	ACCGGATCCATCAGAGTCTGAGAGCACGATGA TCTCTTCTGGATCGCATTGTGCGGCCAC	příprava konstruktů kódujícího Daxx se záměnou treoninu 726 za alanin
Brg1_1_fwd	GGGGTCGACGTGAAGATGTCCACTCCAGACCC ACC	příprava konstruktů kódujícího Brg1 od aminokyseliny 1
Brg1_748_fwd	GGGGTCGACGTGAAGATGTCCCCTAAGAAGAA GCGTAAGGTTCTTATGGTCAATGGTGTCTCT	příprava konstruktů kódujícího Brg1 od aminokyseliny 748
Brg1_747_rev	GGGGTCGACGCTGACTGCTTGCCACTC	příprava konstruktů kódujícího Brg1 po aminokyselinu 747
Brg1_357_rev	CCCCCGGTACCCCTTCTGGATGGGGGTGATG C	příprava konstruktů kódujícího Brg1 po aminokyselinu 357
Brg1_429_rev	CCCCCGGTACCCCGCTGTGTCCCTCCGCATG C	příprava konstruktů kódujícího Brg1 po aminokyselinu 429
Brg1_473_rev	CCCCCGGTACCCCTGGTGCTTCTGCCGCGC T	příprava konstruktů kódujícího Brg1 po aminokyselinu 473
Brg1_3_end_rev	GGGGTCGACGAGTCTTCTCGCTGCCACTTC	příprava konstruktů kódujícího Brg1 po jeho poslední aminokyselinu

Tab. 2 – Seznam oligonukleotidů (primérů) použitých k přípravě konstruktů DNA pomocí PCR

V tabulce je uveden seznam primérů použitých k přípravě konstruktů popsanych v oddíle III. 2. „fwd“ znamená „forward“ (primér nasedá ve směru čtení sekvence DNA), „rev“ znamená „reverse“ (primér nasedá na řetězec komplementární k řetězci, na nějž nasedá primér „forward“).

III. 1. 3. Místně řízená mutagenese (site directed mutagenesis)

Řízená mutagenese specifických nukleotidů v cílové sekvenci byla provedena pomocí PCR, v níž byly použity dva komplementární oligonukleotidy o délce 30 párů bází, které uprostřed obsahovaly požadovanou mutaci. Reakční směs obsahující produkty po PCR byla poté inkubována s restričním enzymem *DpnI*, který štěpí pouze metylovanou DNA, a odstraní tak původní plazmid. Následně byly reakční směsi transformovány kompetentní baktérie *Escherichia coli*.

III. 1. 4. Sekvencování DNA

Pro ověření, zda nedošlo k nežádoucí mutaci (nebo zda došlo k požadované mutaci u místně řízené mutagenese), byly konstrukty, při jejichž přípravě byla použita PCR, sekvencovány. K tomu bylo využito služeb firmy *SeqMe* a při přípravě vzorků dodržen postup uvedený v manuálu.

III. 1. 5. Příprava transformačně kompetentních bakterií *Escherichia coli*

Potřebné chemikálie:

- roztok TFBI: 30 mM octanu draselného, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% glycerol, pH upraveno na 5,8
- roztok TFBII: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% glycerol, pH upraveno na 6,5

Oba roztoky byly zfiltrány pomocí 0,22 µm filtru (*Millipore*).

- médium LB (*Amresco*, u kmene TOP10 použito médium LB se streptomycinem o koncentraci 100 µg/ml)
- 1 M MgSO₄

Postup:

- Baktérie byly zaočkovány ze zamražené zásoby do 5 ml média LB a pěstovány přes noc ve 37 °C.
- Z této noční kultury byly baktérie zaočkovány s ředěním 1:100 do 250 ml LB s 20 mM MgSO₄ a pěstovány ve 37 °C, dokud absorbance (optická denzita) kultury nedosáhla 0,6 (2-3 hod.)
- Poté byly baktérie centrifugovány (5000 otáček/min, 5 min, 4 °C), bakteriální peleta rozptýlena ve 100 ml vychlazeného roztoku TFBI, inkubována na ledě 5 min a poté opět centrifugována (5000 otáček/min, 5 min, 4 °C).
- Následně byly baktérie rozptýleny v 10 ml vychlazeného roztoku TFBII a 30 min inkubovány na ledě.
- Takto připravená bakteriální suspenze byla rozdělena do chlazených zkumavek, rychle zmrazena v tekutém dusíku a uložena v -80 °C.

III. 1. 6. Transformace kompetentních bakterií

Postup:

- 50 µl bakteriální suspenze bylo smícháno s plazmidovou DNA (5 µl reakční směsi použité při ligaci či místně řízené mutagenезi, 0,5 µg izolovaného plazmidu) a bakterie byly 15 min inkubovány na ledě.
- Následně byly bakterie 90 s inkubovány ve 42 °C, 2 min chlazeny na ledě, poté k nim bylo přidáno 500 µl média LB a bakterie inkubovány 30 min ve 37 °C.
- Po této inkubaci byly bakterie vysety na pevné médium se selekčním antibiotikem.

III. 1. 7. Produkce a purifikace plazmidové DNA

Bakterie *Escherichia coli* kmene TOP10 transformované příslušnou plazmidovou DNA byly kultivovány v selekčním médiu LB a plazmidová DNA následně izolována jednou z níže uvedených metod:

- Alkalickou lýzí (viz [303], stránky 1.25-1.27)
- Minipreparací s použitím soupravy *Zippy Plasmid Miniprep Kit* (*Zymo Research*) pro získání menšího množství DNA
- Midipreparací s použitím souprav *JET Star* (*Genomed*) nebo *Geneaid Plasmid Midi Kit* (*Geneaid*), případně s použitím izopyknické centrifugace v CsCl (viz [303], stránky 1.42-1.50) pro získání většího množství DNA použitelné např. k transfekci (viz oddíl IV. 2.)

Koncentrace izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje *NanoDrop-1000* (*Thermo Scientific*).

III. 2. Použité konstrukty DNA

III. 2. 1. Konstrukty pro expresi v savčích buňkách

- **pCDNA3-Myc-Daxx FL**
Konstrukt pro expresi kompletního proteinu Daxx (aminokyseliny 1-740) s N-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Příprava byla popsána dříve [66].
- **pXJ41-Daxx FL**
Konstrukt pro expresi kompletního proteinu Daxx (aminokyseliny 1-740). Připraven přenesením sekvence kódující Daxx z pCDNA3-Myc-Daxx FL do vektoru pXJ41 [304] za použití restričních enzymů *EcoRI* a *XhoI*

- **pFLAG-CMV-5a-Daxx FL (někde též WT)**

Konstrukt pro expresi kompletního proteinu Daxx (aminokyseliny 1-740) s C-koncovou afinitní kotvou „FLAG“. Fragment DNA pro expresi proteinu Daxx byl připraven pomocí PCR a do vektoru pFLAG-CMV-5a (*Sigma Aldrich*) vložen za použití restrikčních enzymů *EcoRI* a *BamHI*.
- **pFLAG-CMV-5a-Daxx 504-740**

Konstrukt pro expresi zkráceného proteinu Daxx (aminokyseliny 504-740) s C-koncovou afinitní kotvou „FLAG“. Připraven obdobně jako konstrukt pFLAG-CMV-5a-Daxx FL. Na 5'-konci exprimované oblasti byla vytvořena Kozakové sekvence ACCATGG (podtržen je první kódující triplet).
- **pFLAG-CMV-5a-Daxx S564A, S707A, T726A**

Konstrukty pro expresi mutované formy proteinu Daxx s C-koncovou afinitní kotvou „FLAG“. Protein Daxx má v těchto konstruktech nahrazen serin 564, serin 707 či treonin 726 alaninem buď samostatně, nebo kombinací více těchto mutací. Záměna S564 byla připravena pomocí PCR, kde mutované místo bylo přímo součástí oligonukleotidu. Fragment DNA byl následně štěpen restrikčními enzymy *EheI* a *HindIII* a vložen do stejně štěpeného konstruktů pFLAG-CMV-5a-Daxx FL. Mutace T726A byla připravena pomocí PCR obdobně jako S564A, ale s následným štěpením restrikčními enzymy *EheI* a *BamHI*. Mutace S707A byla připravena pomocí místně řízené mutagenese (*site-directed mutagenesis*), úsek, v němž se nacházejí mutované nukleotidy, byl poté vyštěpen pomocí enzymů *HindIII* a *BamHI* a vložen do stejně štěpeného původního konstruktů pFLAG-CMV-5a-Daxx FL. Ve všech případech poté nebylo nutné sekvencovat celý úsek pro expresi proteinu Daxx, ale pouze úsek ohraničený použitými restrikčními enzymy.
- **pCDH-EF1-neo-Daxx WT, S564A, S707A, T726A a S564E**

Konstrukty pro expresi původní nebo mutované formy proteinu Daxx s C-koncovou afinitní kotvou FLAG. Připraveny štěpením příslušného konstruktů ve vektoru pFLAG-CMV-5a restrikčními enzymy *EcoRI* a *ScaI* a přenesením úseku pro expresi proteinu Daxx s kotvou „FLAG“ do lentivirového vektoru pCDH-CMV-MCS-EF1-G418 (*System Biosciences*), který umožňuje selekci transdukovaných buněk pomocí genicinu. Tento vektor byl nejprve štěpen restrikčním enzymem *BamHI*, zatupen pomocí T4-DNA-polymerázy a poté štěpen restrikčním enzymem *EcoRI*.
- **pMyc-CMV-5a**

Vektor pro expresi proteinů s C-koncovou afinitní kotvou „Myc“, který byl připraven z vektoru pFLAG-CMV-5a (*Sigma Aldrich*). Sekvence pro kotvu „FLAG“ v něm byla zahrazena sekvencí pro kotvu „Myc“ s použitím restrikčních enzymů *KpnI* a *ScaI*.
- **pMyc-CMV-5a-Daxx FL**

Konstrukt pro expresi kompletního proteinu Daxx (aminokyseliny 1-740) s C-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Fragment DNA pro expresi proteinu Daxx byl vyštěpen z konstruktů

pFLAG-CMV-5a-Daxx FL pomocí restrikčních enzymů *EcoRI* a *BamHI* a vložen do stejně štěpeného vektoru pMyc-CMV-5a.

- **pMyc-CMV-5a-Daxx 1-224**

Konstrukt pro expresi zkráceného proteinu Daxx (aminokyseliny 1-224) s C-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Připraven byl pomocí PCR a do vektoru pMyc-CMV-5a vložen za použití restrikčních enzymů *EcoRI* a *BamHI*. Na 5'-konci exprimované oblasti byla vytvořena Kozakové sekvence ACCATGG (podtržen je první kódující triplet) a na 3'-konec byla připojena sekvence pro jaderný lokalizační signál PKKKRKV (pocházející z velkého T-antigenu viru SV40).

- **pMyc-CMV-5a-Daxx 225-503**

Konstrukt pro expresi zkráceného proteinu Daxx (aminokyseliny 225-503) s C-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Připraven obdobně jako konstrukt pMyc-CMV-5a-Daxx 1-224. Na 5'-konci exprimované oblasti byla vytvořena Kozakové sekvence ACCATGG (podtržen je první kódující triplet) a na 3'-konec byla připojena sekvence pro jaderný lokalizační signál PKKKRKV (pocházející z velkého T-antigenu viru SV40).

- **pMyc-CMV-5a-Daxx 504-740**

Konstrukt pro expresi zkráceného proteinu Daxx (aminokyseliny 504-740) s C-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Připraven obdobně jako konstrukt pMyc-CMV-5a-Daxx FL. V 5'-konci exprimované oblasti byla vytvořena Kozakové sekvence ACCATGG.

- **pK-Myc-C1 a C3**

Vektory pro expresi proteinů s N-koncovou afinitní kotvou „Myc“ byly poskytnuty V. Kořínkem (Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.), který je připravil z vektorů pEGFP-C1 a C3 (*Clontech*) nahrazením fluorescenční značky „EGFP“ afinitní kotvou „Myc“.

- **pK-Myc-C3-Brg1-klon #3**

Konstrukt pro expresi zkráceného proteinu Brg1 (aminokyseliny 264-585) s N-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Sekvence pro expresi Brg1 byla vyštěpena z konstruktu pGAD-GH-Brg1-klon #3 pomocí restrikčních enzymů *BglII* a *SalI* a vložena do stejně štěpeného vektoru pK-Myc-C3.

- **pREP7-Brg1 FL**

Konstrukt pro expresi kompletního proteinu Brg1 (aminokyseliny 1-1647) s C-koncovou afinitní kotvou „HA“. Získán od K. Zhaa (National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, USA).

- **pEGFP-N1-Brg1 FL**

Konstrukt pro expresi kompletního proteinu Brg1 (aminokyseliny 1-1647) s C-koncovou fluorescenční značkou „EGFP“. Sekvence pro expresi proteinu Brg1 byla vyštěpena z konstruktu pREP7-Brg1 FL pomocí restrikčních enzymů *EcoRI* a *XbaI*, zatupena pomocí T4-DNA-polymerázy a vložena do vektoru pEGFP-N1 (*Clontech*), štěpeného restrikčními enzymy *EcoRI* a *XbaI* a rovněž zatupenému.

- **pXJ41- Brg1 FL**

Konstrukt pro expresi kompletního proteinu Brg1 (aminokyseliny 1-1647). Sekvence pro expresi proteinu Brg1 byla vyštěpena z konstruktů pEGFP-N1-Brg1 FL pomocí restrikčního enzymu *SaI* a vložena do vektoru pXJ41 štěpeného *XhoI*.
- **pFLAG-CMV-5b-Brg1 FL**

Konstrukt pro expresi kompletního proteinu Brg1 (aminokyseliny 1-1647) s C-koncovou afinitní kotvou „FLAG“. Sekvence pro expresi proteinu Brg1 byla vyštěpena z konstruktů pEGFP-N1-Brg1 FL za použití restrikčního enzymu *SaI* a vložena do stejně štěpeného vektoru pFLAG-CMV-5b (*Sigma Aldrich*).
- **pFLAG-CMV-5b-Brg1 1-747**

Konstrukt pro expresi N-koncové poloviny proteinu Brg1 (aminokyseliny 1-747) s C-koncovou afinitní kotvou „FLAG“. Fragment DNA pro expresi proteinu Brg1 byl připraven pomocí PCR a do vektoru pFLAG-CMV-5b vložen za použití restrikčního enzymu *SaI*.
- **pFLAG-CMV-5b-Brg1 1-747 Δ358-536**

Konstrukt pro expresi N-koncové poloviny proteinu Brg1 (aminokyseliny 1-747) s C-koncovou afinitní kotvou „FLAG“, v níž byl odstraněn úsek aminokyselin 358-536. Toho bylo docíleno štěpením konstruktů pFLAG-CMV-5b-Brg1 1-747 restrikčním enzymem *KpnI* a vložením úseku DNA, který byl připraven pomocí PCR a štěpen stejným enzymem.
- **pFLAG-CMV-5b-Brg1 1-747 Δ430-536**

Konstrukt pro expresi N-koncové poloviny proteinu Brg1 (aminokyseliny 1-747) s C-koncovou afinitní kotvou „FLAG“, v níž byl odstraněn úsek aminokyselin 430-536. Toho bylo docíleno štěpením konstruktů pFLAG-CMV-5b-Brg1 1-747 restrikčním enzymem *KpnI* a vložením úseku DNA, který byl připraven pomocí PCR a štěpen stejným enzymem.
- **pFLAG-CMV-5b-Brg1 1-747 Δ474-536**

Konstrukt pro expresi N-koncové poloviny proteinu Brg1 (aminokyseliny 1-747) s C-koncovou afinitní kotvou „FLAG“, v níž byl odstraněn úsek aminokyselin 474-536. Toho bylo docíleno štěpením konstruktů pFLAG-CMV-5b-Brg1 1-747 restrikčním enzymem *KpnI* a vložením úseku DNA, který byl připraven pomocí PCR a štěpen stejným enzymem.
- **pFLAG-CMV-5b-Brg1 748-1647**

Konstrukt pro expresi C-koncové poloviny proteinu Brg1 (aminokyseliny 748-1647) s C-koncovou afinitní kotvou „FLAG“. Fragment DNA pro expresi proteinu Brg1 byl připraven pomocí PCR a do vektoru pFLAG-CMV-5b vložen za použití restrikčního enzymu *SaI*. Na 5'-konci exprimované oblasti byla vytvořena Kozakové sekvence ACCATGG a sekvence pro jaderný lokalizační signál PKKKRKV (pocházející z velkého T-antigenu viru SV40).

- **pK-Myc-C3-BAP1**

Konstrukt pro expresi proteinu BAP1 s N-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Připraven štěpením plazmidu pOTB7-BAP1 (*Open Biosystems*) restrikčními enzymy *SacII* a *SmaI* a vložení vzniklého fragmentu do stejně štěpeného vektoru pK-Myc-C3.
- **pK-Myc-C1-FEZ2**

Konstrukt pro expresi proteinu FEZ2 s N-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Připraven štěpením plazmidu pGAD-GH-FEZ2, který byl izolován v Y2H restrikčními enzymy *EcoRI* a *SalI* a vložení vzniklého fragmentu do stejně štěpeného vektoru pK-Myc-C1.
- **pK-Myc-C1-Ubn1**

Konstrukt pro expresi proteinu Ubn1 s N-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Připraven z plazmidu pCMV6-Ubn1 (*OriGene*) štěpením restrikčními enzymy *PvuI* a *KpnI*, zatupením pomocí T4-DNA-polymerázy a vložení úseku pro expresi Ubn1 do vektoru pK-Myc-C1, který byl štěpen restrikčním enzymem *SmaI*.
- **pK-Myc-C1-Abra1**

Konstrukt pro expresi proteinu Abraxas-1 s N-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Připraven štěpením plazmidu pGAD-GH-Abra1, který byl izolován v Y2H, restrikčními enzymy *EcoRI* a *KpnI* a vložení vzniklého fragmentu do stejně štěpeného vektoru pK-Myc-C1.
- **pK-Myc-C1-SAP30**

Konstrukt pro expresi proteinu SAP30 s N-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Připraven štěpením plazmidu pGAD-GH-SAP30, který byl izolován v Y2H, restrikčními enzymy *EcoRI* a *KpnI* a vložení vzniklého fragmentu do stejně štěpeného vektoru pK-Myc-C1.
- **pK-Myc-C1-UXT a pEGFP-C1-UXT**

Konstrukt pro expresi proteinu UXT s N-koncovou afinitní kotvou „Myc“ nebo „EGFP“. Připraven štěpením plazmidu pGAD-GH-UXT, který byl izolován v Y2H, restrikčními enzymy *EcoRI* a *SalI* a vložení vzniklého fragmentu do stejně štěpených vektorů pK-Myc-C1 a pEGFP-C1.
- **pcDNA-FLAG-SMARCA5**

Konstrukt pro expresi proteinu SMARCA5 se afinitní kotvou „FLAG“. Získán od T. Stopky (1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze).
- **pXJ41-FLAG-BrmDN**

Konstrukt pro expresi proteinu Brm se afinitní kotvou „FLAG“ a mutací v ATPázové doméně. Připraven štěpením konstruktů pFLAG-BrmDN (*Addgene*) pomocí restrikčního enzymu *EcoRI* a vložení vzniklého fragmentu do stejně štěpeného vektoru pXJ41.
- **pEGFP-C1-PML-IVa**

Konstrukt pro expresi proteinu PML-IVa s N-koncovou fluorescenční značkou EGFP. Získán od P. P. Pandolfiho (Sloan-Kettering Institute, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA).

III. 2. 2. Konstrukty pro expresi v kvasinkách

- **pGBKT7-Daxx 1-595**

Konstrukt pro expresi zkráceného proteinu Daxx (aminokyseliny 1-595) s N-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Fragment DNA pro expresi proteinu Daxx byl připraven pomocí PCR a do vektoru pGBKT7 vložen za použití restrikčních enzymů *EcoRI* a *NotI*.

- **pGBKT7-Daxx 1-502**

Konstrukt pro expresi zkráceného proteinu Daxx (aminokyseliny 1-502) s N-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Fragment DNA pro expresi proteinu Daxx byl připraven štěpením plazmidu pGBKT7-Daxx 1-595 restrikčními enzymy *BglII* a *NotI*, zatupením pomocí T4-DNA-polymerázy a opětovným spojením volných konců pomocí T4-DNA-ligázy.

- **pGBKT7-Daxx 1-224**

Konstrukt pro expresi zkráceného proteinu Daxx (aminokyseliny 1-224) s N-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Fragment DNA pro expresi proteinu Daxx byl připraven z plazmidu pGBKT7-Daxx 1-595 štěpením restrikčními enzymy *EcoNI* a *NotI*, jeho zatupením pomocí T4-DNA-polymerázy a opětovným spojením jeho volných konců pomocí T4-DNA-ligázy.

- **pGBKT7-Daxx 225-503**

Konstrukt pro expresi zkráceného proteinu Daxx (aminokyseliny 225-503) s N-koncovou afinitní kotvou „Myc“. Fragment DNA pro expresi proteinu Daxx byl připraven z plazmidu 1-502 štěpením restrikčními enzymy *EcoNI* a *SfiI*, jeho zatupením pomocí T4-DNA-polymerázy a opětovným spojením jeho volných konců pomocí T4-DNA-ligázy.

- **pGBKT7-p53 a pGAD-GH-T-antigen**

Konstrukty pro expresi proteinů p53, lamin a T-antigen viru SV40 byly dodány jako součást soupravy pro kvasinkový dvojhybridní systém *MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3* (Clontech).

- **pGAD-GH-Brg1 „klon #3“ (263-579), Abra1, BAP1, FEZ2, SAP30, Ubn1 a UXT**

Konstrukty pro expresi uvedených proteinů (některé z nich zkrácené) byly získány v Y2H.

III. 2. 3. Konstrukty pro expresi v bakteriích (pro „GST-pulldown“)

- **pGTH**

Vektor, který byl připraven z vektoru pET42b (Clontech) a umožňuje exprimovat proteiny s N-koncovou afinitní kotvou „GST“ a C-koncovou kotvou „6xHis“, před níž je sekvence pro štěpení TEV-proteázou. Nejprve byla v původním vektoru pET42b odstraněna sekvence pro N-koncovou afinitní kotvu „6xHis“ za pomoci štěpení restrikčními enzymy *SpeI* a *SacI*, následného zatupení zbytku plazmidu pomocí T4-DNA-polymerázy a opětovné ligace s použitím T4-DNA-ligázy, poté byla sekvence pro TEV-proteázu vložena po štěpení plazmidu restrikčním enzymem *XhoI*.

- **pGTH-Daxx FL**
Konstrukt pro bakteriální expresi kompletního proteinu Daxx (aminokyseliny 1-740) s afinitními kotvami „6xHis“ a „GST“. Sekvence pro expresi proteinu Daxx byla vyštěpena z konstruktů pMyc-CMV-5a-Daxx FL pomocí restrikčních enzymů *EcoRI* a *KpnI*, zatupena pomocí T4-DNA-polymerázy a vložena do plazmidu pGTH, který byl štěpen restrikčními enzymy *StuI* a *XhoI* a rovněž zatupen.
- **pGTH-Daxx 1-224**
Konstrukt pro bakteriální expresi zkráceného proteinu Daxx (aminokyseliny 1-224) s afinitními kotvami „6xHis“ a „GST“. Připraven obdobně jako konstrukt pGTH-Daxx FL.
- **pGTH-Daxx 225-503**
Konstrukt pro bakteriální expresi zkráceného proteinu Daxx (aminokyseliny 225-503) s afinitními kotvami „6xHis“ a „GST“. Připraven obdobně jako konstrukt pGTH-Daxx FL.
- **pGTH-Daxx 504-740**
Konstrukt pro bakteriální expresi zkráceného proteinu Daxx (aminokyseliny 504-740) s afinitními kotvami „6xHis“ a „GST“. Připraven obdobně jako konstrukt pGTH-Daxx FL.

IV.

Manipulace s lidskými buněčnými liniemi

IV. 1. Kultivace buněk

Kultivace lidských buněčných linií a postupy s ní související vycházely standardních protokolů (viz např. [303], appendix 3F). Pokud není uvedeno jinak, byly buněčné linie kultivovány ve 37 °C, 95% vlhkosti a 5% CO₂ v médiu obsahujícím FBS i 1% směs antibiotik (které je proto uváděno pouze např. jako DMEM).

IV. 2. Transfekce plazmidovou DNA

IV. 2. 1. Transfekce menšího množství buněk

K transfekci buněk rostoucích na 12- či 24-jamkové kultivační destičce byla použita následující transfekční činidla:

- *JetPEI (Polyplus)* – zejména u buněk HEK293T17
- *GeneCellin (BioCellChallenge)* – zejména u buněk HeLa či SW13

Transfekce byla provedena podle doporučení výrobce. Buňky byly zpracovány 2 – 3 dny po transfekci.

IV. 2. 2. Transfekce s použitím kalcium/fosfátové metody

Pomocí kalcium/fosfátové metody byly transfectovány buňky HEK293T k produkci lentivirů. Postup byl uzpůsoben podle standardních protokolů (např. [303], stránky 16.33-16.36).

Potřebné chemikálie:

- roztok 2xBBS – ve 250 ml: 2,665 g BES (*Sigma Aldrich*), 4,091 g NaCl, 0,134 g Na₂HPO₄·12H₂O, pH upraveno na 6,95 pomocí NaOH a směs zfiltrována přes 0,2 µm filtr
- 0,25 M CaCl₂ (zfiltrovaný přes 0,2 µm filtr)
- vektory pro produkci virové částice psPAX a pMD2G (*Addgene*)
- konstrukty pro vložení do genomu
- médium DMEM s 25 µM chloroquinem (*Sigma Aldrich*)

Postup pro buňky HEK293T pěstované na 10cm kultivační misce:

- Buňky byly nasazeny den před transfekcí tak, aby v okamžiku transfekce měly konfluenci 70 – 80 %. Před transfekcí k nim bylo přidáno 9 ml čerstvého média DMEM (+FBS a antibiotika).
- Při transfekci bylo nejprve smícháno 500 µl CaCl₂ s 20 µg DNA (4 µg vektoru pMD2G, 7 µg psPAX a 9 µg konstruktu nesoucího sekvenci pro vložení do genomu a následnou expresi požadovaného proteinu). K tomu bylo přidáno 500 µl 2xBBS a směs byla 15 min inkubována v pokojové teplotě.
- Následně byla transfekční směs po kapkách přidána k buňkám, dobře promíchána v médiu a buňky byly 6 hod. inkubovány v inkubátoru, v němž byla koncentrace CO₂ 3 %.
- Nakonec byly buňky omyty PBS a 36 hod. inkubovány v 10 ml média DMEM s chloroquinem (již ve standardní koncentraci CO₂ 5 %). Následně byly z média izolovány virové částice (viz oddíl IV. 4. 1.).

IV. 2. 3. Transfekce s použitím PEI

Transfekce pomocí polyetyleniminu (PEI) byla používána pro transfekci většího množství buněk HEK293T před imunoprecipitací. Metoda byla adaptována podle [305].

Potřebné chemikálie:

- 1 mM PEI 25 kDa (koncentrovaná zásoba od *Sigma Aldrich* byla naředěna vodou, pH upraveno na 7,4 a roztok zfiltrován přes 0,2 µm filtr
- 150 mM NaCl (zfiltrovaný přes 0,2 µm filtr)

- médium DMEM bez séra a antibiotik

Postup pro buňky HEK293T pěstované na 10cm kultivační misce:

- 30 µg plazmidové DNA a 90 µl PEI bylo smícháno se 750 µl 150 mM NaCl, obě směsi byly inkubovány 15 min při pokojové teplotě.
- Směsi byly smíchány, inkubovány dalších 15 min v pokojové teplotě a přidány na buňky v 7,5 ml média DMEM (bez séra a antibiotik). Ty byly takto ponechány 6 hod., poté bylo médium vyměněno za DMEM obsahující FBS a směs penicilinu a streptomycinu.
- Buňky byly zpracovány dva dny po transfekci.

IV. 3. Transfekce siRNA

K transfekci siRNA bylo použito činidlo Lipofectamine RNAiMAX (*Invitrogen*) a dodržen postup doporučený výrobcem. Buněčná linie SW13 byla pro zvýšení účinnosti siRNA transfektována ve dvou po sobě jdoucích dnech, buněčná linie U2OS byla transfektována pouze jednou. Buňky byly zpracovány 2 – 3 dny po transfekci. Seznam použitých siRNA je uveden v oddíle II. 2.

IV. 4. Transdukce savčích buněk

IV. 4. 1. Použití lentivirů

Lentiviry byly izolovány z média buněk HEK293T po transfekci kalcium/fosfátovou metodou (viz oddíl IV. 2. 2.).

Potřebné chemikálie:

- roztok k precipitaci virových částic *PEG/it Virus Precipitation Solution (System Biosciences)*
- médium DMEM bez séra a antibiotik

Postup:

- Médium od transfektovaných buněk bylo centrifugováno (3000 otáček/min, 15 min, 4 °C) a supernatant smíchán s 1/5 objemu roztoku k precipitaci virových částic. Tato směs byla následně inkubována nejméně 15 min ve 4 °C.
- Následně byla směs centrifugována (1500 x g, 30 min, 4 °C) a peleta, obsahující lentivirové částice, resuspendována ve vychlazeném PBS (1/10 – 1/100 původního objemu, obvykle 0,5 ml).
- Virová suspenze byla rozdělena do alikvótů po 50 – 100 µl a uchovávána v -80 °C. K následné transdukci bylo používáno 15 µl virové suspenze v 500 µl média

DMEM na jednu jamku 12-jamkové kultivační destičky. 24 hod. po přidání lentivirů bylo k buňkám přidáno selekční médium, obsahující buď antibiotikum puromycin (2 $\mu\text{g/ml}$), nebo geneticin (G418, 1 mg/ml). Stejné množství antibiotika bylo přidáno i ke kontrolním, netransdukovaným buňkám. Selekcce byla považována za úspěšně provedenou, jakmile tyto kontrolní buňky odumřely.

IV. 4. 2. Použití adenovirů

Adenoviry pro expresi EGFP nebo EGFP-Brg1 byly získány od R. Bremera (Univerzita Toronto, viz [306]). Následně byly pomnoženy v buňkách HEK293T a purifikovány pomocí soupravy *Adeno-X purification kit* (Clontech). Purifikované viry byly uchovávány v pufru GTS (2,5% glycerol, 25 mM NaCl, and 20 mM Tris.HCl pH 8,0) při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. K transdukcii bylo používáno 0,05, 0,1 či 0,15 μl adenoviru (MOI 1-2) v 500 μl média DMEM na jednu jamku 12-jamkové kultivační destičky. K buňkám SW13 byly adenoviry přidány následující den po jejich transfekci siRNA (viz oddíl IV. 3.) a buňky byly sklizeny 48 hod. po transdukcii.

IV. 5. Cílená genová delece pomocí metody TALEN

Metoda TALEN byla poprvé popsána v roce 2011 T. Čermákem a kol. [307]. Její podstatou je indukce vzniku dvojřetězcového zlomu ve vybraném úseku DNA pomocí uměle připravené endonukleázy. DNA-vazebnou doménu této nukleázy lze snadno vytvořit tak, aby byla specifická pro vybranou sekvenci. Vzniklý dvojřetězcový zlom aktivuje kaskádu buněčných dějů, které vedou k jeho opravě. V některých případech však opravný aparát udělá chybu, a pokud v důsledku této chyby dojde k posunu čtecího rámce, poškozený gen již není schopen exprimovat svůj původní produkt. Jsou-li takto poškozeny obě alely genu, gen již v buňce není exprimován, což má za následek deleci daného genu – tzv. genový „knock-out“.

Postup:

- K přípravě „knock-outu“ genu pro expresi proteinu Daxx v buňkách U2OS byly použity konstrukty získané v *TALEN Library Resource* (Národní univerzita v Soulu, Korejská republika).
- Těmito konstrukty byly pomocí činidla *GeneCellin* (viz oddíl IV. 2. 1.) transfektovány buňky U2OS pěstované ve 12-jamkové kultivační destičce.
- Dva dny po transfekci byly buňky uvolněny pomocí inkubace v trypsinu, jejich množství v 1 ml suspenze spočítáno pomocí hemacytometru a následně byly rozdě-

leny do 96-jamkových kultivačních destiček tak, aby v každé jamce byla přibližně jedna buňka, která tak dala vznik jednomu klonu.

- Když se po několika týdnech kultivace klony rozrostly, byly z 96-jamkových kultivačních destiček přeneseny do 24-jamkových kultivačních destiček a pěstovány dále.
- Expresí proteinu Daxx byla zjišťována pomocí SDS-PAGE s následným Western blottingem; takto bylo analyzováno 165 klonů. 28 klonů s nízkou či nezjistitelnou expresí proteinu Daxx bylo dále analyzováno pomocí qRT-PCR. Nakonec byly vybrány tři klony s nízkou relativní koncentrací mRNA, pravděpodobně odbourávanou procesem „*nonsense mediated decay*“ (viz [308]) a dva klony s normální expresí proteinu Daxx (kontrola), ostatní klony byly vyřazeny. Nukleáza použitá k přípravě genomického „knock-outu“ totiž štěpila až ve 4. exonu genu pro protein Daxx, který se již nachází v překládané oblasti. U klonů s vysokou relativní koncentrací mRNA pro protein Daxx tedy nešlo vyloučit, že zůstala produkována jeho zkrácená forma (protilátky, které byly po Western blottingu použity k detekci proteinu Daxx, vážaly pouze C-konec, a nebyly tak schopny detektovat N-koncový fragment).

V.

Vyhledávání nových interakčních partnerů v kvasinkovém dvojhybridním systému

V. 1. Kvasinkový dvojhybridní systém (Y2H)

Podstatou vyhledávání nových interakčních partnerů zkoumaného proteinu v kvasinkovém dvojhybridním systému je zprostředkování interakce mezi DNA-vazebnou doménou transkripčního faktoru a jeho transaktivační doménou. DNA-vazebná doména je v tomto systému spojena se zkoumaným proteinem (tzv. „návnada“ či *bait*), kdežto transaktivační doména je navázána na sekvenci z knihovny cDNA (tzv. „kořist“ či *prey*). Pokud produkt konkrétní cDNA interaguje se zkoumaným proteinem, aktivuje se exprese vybraného, tzv. reportérového genu, do jehož promotoru se DNA-vazebná doména váže. Reportérovým genem bývá v kvasinkách takový gen, jehož produkt překoná některou auxotrofní mutaci. Kvasinka s takovouto mutací není schopna růst v médiu, jež postrádá příslušnou živinu (např. aminokyselinu), a vyroste

jedině v případě, že spolu „návnada“ a „kořist“ interagují, čímž aktivují produkci genu, který kvasince umožní v takovémto médiu růst.

K vyhledání potenciálních interakčních partnerů proteinu Daxx byl použit kvasinkový dvojhybridní systém *MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3* (Clontech), v němž je transkripčním faktorem GAL4 a knihovna cDNA pochází z lidské buněčné linie HeLa. Při vyhledávání interakčních partnerů proteinu Daxx v Y2H bylo postupováno podle doporučení výrobce.

Stručný postup:

- Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kmene AH109 (párovací typ MATa) byly transformovány „návnadou“ (Daxx 1-595 ve vektoru pGBKT7). Tyto kvasinky byly párovány s kvasinkami Y187 (párovací typ MAT α), které obsahovaly knihovnu cDNA z buněčné linie HeLa (ve vektoru pGAD-GH).
- Kvasinky byly po párování (*mating*) vysety na pevné selekční médium SD -WLAH.
- Pouze kvasinky, v nichž došlo k expresi z promotoru genu pro komplementaci autotrofní mutace, vytvořily kolonie. Tyto kolonie byly zaočkovány do média SD -WLAH, byla z nich izolována plazmidová DNA a s ní byly transformovány bakterie *Escherichia coli* kmene TOP10 (pro amplifikaci plazmidové DNA).
- Amplifikovanou plazmidovou DNA byly znovu transformovány kvasinky kmene Y187. Tyto kvasinky byly poté párovány kvasinkami kmene AH109, které obsahovaly jednak původní „návnadu“, jednak konstrukty pGBKT7-p53 a T-antigen či prázdný vektor pGBKT7 coby kontrolu. Pokud po opětovném párování vyrostly kolonie, které namísto „návnady“ obsahovaly kontrolu, byla získaná DNA považována za falešně pozitivní a dále již analyzována nebyla.
- Po odstranění falešných pozitivit byly ostatní cDNA ve vektoru pGAD-GH, získané v Y2H, sekvencovány (viz oddíl III. 1. 4).

V. 2. Manipulace s kvasinkami

Veškeré manipulace s kvasinkami vycházely s manuálu *Yeast Protocol Handbook* (Clontech). Níže jsou uvedeny pouze vybrané metody.

V. 2. 1. Izolace plazmidové DNA z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*

Potřebné chemikálie:

- selekční médium SD

- lyzační roztok: 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
- skleněné kuličky (průměr 150 μm)
- směs fenol/chloroform (1:1)
- 3M octan amonný, 100% a 70% etanol, pufr TE (10 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA, pH upraveno na 7,5)

Postup:

- Kultura kvasinek v 1 ml selekčního média SD -WLAH získaná noční kultivací ve 30 °C byla centrifugována (13500 otáček/min, 2 min, 20°C) a buněčná peleta následně resuspendována ve směsi 250 μl lyzačního roztoku smíchaného s 250 μl směsi fenol/chloroform.
- Do takto připravené lyzační směsi bylo odměřeno 250 μl skleněných kuliček a směs byla 5-10 min promíchávána pomocí laboratorní třepačky („vortexu“).
- Promíchaná směs byla centrifugována (10 min, 13500 otáček/min) a vzniklá horní fáze přenesena do další zkumavky. Zde k ní bylo přidáno 8 μl 3M octanu sodného a 500 μl 100% etanolu. Vysrážená DNA byla po centrifugaci (10 min, 13500 otáček/min) opláchnuta 500 μl 70% etanolu, vysušena a rozpuštěna v 50 μl pufru TE.

V. 2. 2. Transformace kvasinek s použitím octanu lithného (LiAc)

Potřebné chemikálie:

- médium SD bez přídavku roztoku 10x „drop-out“ i glukózy
- pevné selekční médium SD
- kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kmene AH109 či Y187
- vychlazená deionizovaná voda
- roztok TE/LiAc: 10 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA, 0,1 M LiAc pH 7,5
- roztok PEG/LiAc: 10 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA, 0,1 M LiAc pH 7,5, 40% polyetylglykol
- 100% DMSO
- nosičová DNA z lososích spermií (*salmon sperm*, od firmy Invitrogen)

Postup:

- Kvasinková kultura získaná noční kultivací (30 °C, 200 otáček/min) byla zaočkována do 100 ml média YPDA tak, aby absorbance při 600 nm (OD₆₀₀) byla 0,1 – 0,2, a kultivována až do OD₆₀₀ přibližně 0,5. Poté byla kultura centrifugována (4000 otáček/min, 5 min, 4 °C) a buněčná peleta následně několikrát omyta vychlazenou de-

ionizovanou vodou. Po poslední centrifugaci byla peleta resuspendována v roztoku TE/LiAc (100 μ l – 2 ml v závislosti na počtu transformací).

- Mezitím byly na ledě připraveny směsi obsahující 12,5 μ l denaturované nosičové DNA (10 min v 95 °C) a 1 μ g plazmidové DNA. K nim bylo přidáno po 25 μ l kvasinek resuspendovaných v roztoku TE/LiAc. Vzniklé transformační směsi byly promíchány a poté k nim bylo přidáno po 150 μ l čerstvě připraveného roztoku PEG/LiAc. Po opětovném promíchání byly transformační směsi inkubovány ve 30 °C a při 200 otáčkách/min po 30 min.
- Po skončení inkubace bylo k transformačním směsím přidáno po 17,5 μ l DMSO a proveden teplotní šok (inkubace 20 min ve 42 °C). Následně byly transformační směsi zchlazeny na ledě, centrifugovány (4000 otáček/min, 4 °C, 5 min) a vzniklé buněčné pelety resuspendovány v 50 μ l média SD. Z těchto směsí byly kvasinky vysévány po 20 μ l na pevné selekční médium SD a inkubovány ve 30 °C, dokud nebyly jejich kolonie dostatečně narostlé.

V. 2. 3. Párování kvasinek (*mating*)

35 μ l média 2x YPDA, v němž byly resuspendovány kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kmene AH109, transformované rekombinantním plazmidem pGBKT7, bylo smícháno s 35 μ l média 2x YPDA obsahujícím kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kmene Y187, transformované rekombinantním plazmidem pGAD-GH. Takto smíchané směsi kvasinek byly kultivovány přes noc (30 °C, 70 otáček/min) a následně z nich bylo po 20 μ l vyséváno na pevné selekční médium SD -WL. Kolonie, narostlé po kultivaci ve 30 °C, byly resuspendovány v 60 μ l média SD a po kapkách o objemu 20 μ l vysety na pevné selekční médium SD -WLAH.

VI.

Příprava lyzátů savčích buněk

VI. 1. Lýze ve 2x redukujícím vzorkovém pufru

Lýze buněk ve 2x redukujícím vzorkovém pufru byla použita v případě, kdy nezáleželo na tom, zda mají jednotlivé vzorky stejnou celkovou koncentraci proteinů (např. při ověření, zda funguje nově připravený konstrukt DNA).

Potřebné chemikálie:

- 2x redukující vzorkový pufr: 50 mM Tris.HCl pH 6,8, 20% glycerol, 4 % SDS, 0,02 % bromfenolové modře, 0,5 % DTT

Postup pro 12-jamkovou kultivační destičku s přisedlými buňkami:

- Buňky byly omyty vychlazeným PBS a následně k nim bylo přidáno po 100 μ l 2x redukujícího vzorkového pufru. Pufr byl pomocí špičky pečlivě rozprostřen po celé ploše jamky.
- Vzniklé slizovité sraženiny byly přeneseny do filtračních kolonek. Ty byly připraveny z 1,5 ml mikrozkuvek, u nichž bylo pomocí skalpelu protnuto víčko a následně do něj vložena pipetovací špička s filtrem (100 μ l).
- Slizovitá sraženina byla odstraněna centrifugací (13500 otáček/min, 3 min, pokojová teplota).
- Vzniklé lyzáty byly denaturovány 10 min v 95 °C a následně použity v SDS-PAGE (zpravidla 15 μ l lyzátu na jamku akrylamidového gelu).

VI. 2. Lyze v 1x neredukujícím vzorkovém pufruPotřebné pomůcky a chemikálie:

- 1x neredukující vzorkový pufr: 25 mM Tris.HCl pH 6,8, 6% glycerol, 2 % SDS
- souprava ke stanovení celkové koncentrace proteinů *Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)*
- 10% DTT
- koncentrovaná bromfenolová modř

Postup pro 12-jamkovou kultivační destičku s přisedlými buňkami:

- Buňky byly omyty vychlazeným PBS a následně k nim bylo přidáno po 100 μ l 1x neredukujícího vzorkového pufru. Pufr byl pomocí špičky pečlivě rozprostřen po celé ploše jamky.
- Vzniklé slizovité sraženiny byly přeneseny do filtračních kolonek (viz výše).
- Slizovitá sraženina byla odstraněna centrifugací (13500 otáček/min, 3 min, pokojová teplota).
- Vzniklé lyzáty byly 3 min inkubovány v 95 °C.
- V lyzátech byla následně pomocí soupravy pro použití metody BCA (*Pierce*) změřena celková proteinová koncentrace a lyzáty byly zředěny 1x neredukujícím vzorkovým pufrům tak, aby byly celkové proteinové koncentrace shodné.

- Následně byla k lyzátům přidána koncentrovaná bromfenolová modř (1 μ l na 100 μ l) a DTT (5 μ l 10% DTT do 100 μ l) a vzorky byly denaturovány 10 min v 95 °C.
- Takto připravené vzorky byly použity v SDS-PAGE (zpravidla 15 μ l na jamku, což odpovídalo 20-40 μ g proteinu v závislosti na buněčné linii a také konfluenci lyzovaných buněk).

VII.

SDS-PAGE a Western blotting

Potřebné pomůcky a chemikálie:

- standardy *PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)*
- chemikálie potřebné pro polymeraci gelu: 40% akrylamid (*Sigma Aldrich*), 1,5M Tris.HCl pH 8,8, 0,5M Tris.HCl pH 6,8, 10% SDS, 10% APS, TEMED, vodný n-butanol
- stojánek pro nalévání gelu *Mighty Small* a přístroj pro SDS-PAGE *Mighty Small (Hoefler)*
- SDS-elektrodotový pufr: 250 mM glycin, 10 mM Tris.HCl, 0,1% SDS, pH 8,3
- barvivo *Coomassie Brilliant Blue (10% Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% metanol, 10% kyselina octová)* a roztok k omytí přebytečného barviva (40% metanol, 10% kyselina octová)
- přístroj pro přenos na membránu *SemiPhor (Hoefler)*
- pufr pro přenos na membránu: 48 mM Tris.HCl, 39 mM glycin, 20% metanol
- nitrocelulózová membrána *Amersham Protran Premium 0.45 μ m NC (GE Healthcare)*
- filtrační papír *Whatman*
- sušené odtučněné mléko (*Laktino Nový Bydžov*)
- roztok PBS/TWEEN: 0,05% Tween-20 v PBS
- Ponceau S: 0,1% Ponceau S v 5% kyselině octové
- roztok primární protilátky: 1% sušené odtučněné mléko v PBS/TWEEN + azid sodný a primární protilátka ředěná podle doporučení výrobce
- roztok sekundární protilátky: 1% sušené odtučněné mléko v PBS/TWEEN, 5000x zředěná sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou
- roztok ECL1: 2,5mM luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindion) ve 100 mM Tris.HCl pH 8,8
- Roztok ECL2: 5,4 mM H₂O₂ ve 100mM Tris.HCl pH 8,8
- film používaný v medicíně k pořizování rentgenových snímků *Medical X-ray Blue / MXBE Film (Kodak/Carestream)*

Postup:

- Elektroforéza v SDS-polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) byla provedena podle standardního protokolu (viz např. [303], stránky 18.47-18.59). Gel byl polymerován v nalévacím stojánku a poté následovala vlastní elektroforéza. Rozdělené proteiny byly z gelu pomocí metody Western blottingu (viz např. [309], stránky 18.60-18.75) přeneseny na nitrocelulózovou membránu. V některých případech byl gel obarven pomocí *Coomassie Brilliant Blue* (viz např. [309], kapitola 10, oddíl III, 10. 6., Základní protokol 1). Western blotting nebyl prováděn v případě ověřování interakcí proteinů *in vitro* (viz oddíl VIII). Zde byl gel přímo obarven barvivem *Coomassie Brilliant Blue*.
- Po skončení Western blottingu byla nitrocelulózová membrána nejprve inkubována v barvivo Ponceau S pro ověření úspěšnosti přenosu proteinů, poté byla blokována inkubací 30 min v 5% sušeném mléce v PBS/TWEEN (během té doby bylo také odmyto barvivo Ponceau S) a následně byla provedena imunodetekce. Při ní byla membrána 30 min až přes noc inkubována v roztoku primární protilátky (doba inkubace závisela na typu protilátky) a 40 min v roztoku sekundární protilátky. Po inkubaci jak s primární, tak se sekundární protilátkou byla membrána 3 – 6x 5 min omývána roztokem PBS/TWEEN. Nakonec byla vysušena a 1 min inkubována ve směsi roztoků ECL1+ECL2 smíchaných v poměru 1:1. Chemiluminiscence byla zachycena na rentgenový film.

VIII.

Ověření interakce proteinů *in vitro* s použitím GST-fúzního proteinu

Při ověření interakce *in vitro* s použitím GST-fúzního proteinu (tzv. „*GST-pulldown*“) je jeden ze zkoumaných proteinů fúzován s glutathion-S-transferázou (GST) a produkován v bakteriálním indukčním systému (baktérie *Escherichia coli* kmene BL21 jsou transformovány například konstruktem řady pET42 a k indukci exprese požadovaného proteinu je užit IPTG), kdežto druhý protein je připraven pomocí translace *in vitro*. Součástí translační směsi (lyzát z králičích retikulocytů, obsahující mj. ribozómy a uměle dodaný transkripční aparát, který přepisuje sekvence, jimž předchází T7-promotor) jsou aminokyseliny metionin a cystein obsahující síru ³⁵S, jejíž radioaktivita je využito při následné analýze. Komplexy GST-fúzního a *in vitro*-translatovaného proteinu jsou

z roztoku izolovány pomocí agarózových kuliček s navázaným glutathionem, který silně interaguje s GST, a analyzovány pomocí SDS-PAGE.

VIII. 1. Příprava GST-fúzního proteinu

Potřebné chemikálie:

- transformované bakterie *Escherichia coli* kmene BL21, selekční médium LB
- IPTG (200 mg/ml)
- 1x lyzační roztok na *Escherichia coli*: 20 mM HEPES pH 7,4, 300 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 5% glycerol, PEFabloc (Roche, zásobní roztok 0,024 mg/ml v metanolu ředěn 100x)
- TALON Metal Affinity Resin (Clontech)
- činidlo Bradford Quick Start Bradford Dye Reagent 1x (Bio-Rad Laboratories)
- zahušťovací kolonka AmiCon Ultra-4 (Millipore) s propustností pro částice menší než 30 kDa
- 2x redukující vzorkový pufr (viz oddíl VI. 1.)

Postup:

- Kultura bakterií BL21 transformovaných rekombinantním plazmidem pGTH, získaná kultivací přes noc (37 °C, 200 otáček/min), byla zaočkována do 300 ml selekčního média LB + kanamycin tak, aby OD₆₀₀ byla 0,1-0,2, a kultivována až do OD₆₀₀ 0,5-0,7.
- Po dosažení žádané optické denzity byl ke kultuře přidán IPTG (výsledná koncentrace 500 µg/l) a poté byla inkubována při 25 °C další 3 hod.
- Po indukci pomocí IPTG byla kultura centrifugována (4000 otáček/min, 10 min, 4 °C) a peleta po omytí PBS lyzována v 5 ml 1x lyzačního roztoku na *Escherichia coli*.
- Bakterie byly dezintegrovány pomocí sonikace (sonikátor *Branson Digital Sonifier*, amplituda 50%, pulzy po 10 s, mezi pulzy 59 s prodleva a celkem 3 min pulzů) a lyzát následně centrifugován (8000 otáček/min, 30 min, 4 °C).
- Protein se s C-koncovou afinitní kotvou „6xHis“ byl poté purifikován pomocí 500 µl TALONu, s nímž byl lyzát inkubován 1 hod. ve 4 °C na rotačním stojánku.
- Kuličky TALONu byly následně 6x omyty 0,5x lyzačním roztokem na *Escherichia coli* (vždy 1 ml roztoku, následovala inkubace 10 min na rotačním stojánku ve 4 °C a centrifugace – 1200 otáček/min, 4 °C, 5 min).
- Nakonec byly proteiny navázané na TALONu uvolněny (eluovány) pomocí 0,5x lyzačního roztoku na *Escherichia coli* se 150 mM imidazolem. Při této eluci byly kuličky přeneseny do eluční kolonky a proteiny byly uvolňovány přidáním

400 μ l elučního roztoku. Přítomnost proteinu v eluátech byla ověřována pomocí činidla Bradford smícháním 5 μ l vzorku s 50 μ l činidla. Přítomnost proteinu se projevila zmodráním činidla.

- Frakce po eluci, v nichž byl pomocí činidla Bradford zjištěn protein, byly následně smíchány a zahuštěny pomocí centrifugace v zahušťovací kolonce na objem 2 ml. Přítomnost a přibližná koncentrace proteinů byly průběžně stanovovány pomocí činidla Bradford.
- Množství a kvalita takto purifikovaného proteinu byly poté analyzovány pomocí SDS-PAGE. Vzorky byly připraveny smícháním 20 μ l proteinu s 20 μ l 2x redukujícího vzorkového pufru a následnou inkubací 10 min v 95 °C. K SDS-PAGE bylo použito 20 μ l takto připraveného vzorku na jamku a výsledný gel byl obarven pomocí *Coomassie Brilliant Blue*.
- Bylo-li to potřeba, byly purifikované proteiny dále ředěny roztokem použitým k eluci tak, aby se síla proužků, která odpovídá relativní molekulové hmotnosti purifikovaného proteinu, u jednotlivých proteinů použitých k ověření interakce *in vitro* shodovala. Na menší, „kontaminující“ fragmenty nebyl brán zřetel.
- Purifikované proteiny byly uchovávány v -80 °C.

VIII. 2. Vlastní ověření interakce *in vitro*

Potřebné chemikálie:

- lyzační roztok na *Escherichia coli* (viz výše)
- navazovací roztok: 40 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1% NP40, 0,65 mM DTT
- kuličky *Glutathione Sepharose 4B* (*GE Healthcare*), v textu označované jako „glutathion-sepharóza“
- souprava *TNT Quick Coupled Transcription/Translation kit* (*Promega*)
- směs obsahující aminokyseliny metionin a cystein se sírou ³⁵S *TRAN³⁵S Label* (*MGP*)
- plazmidová DNA, v níž expresní sekvenci předchází T7-promotor (v této práci konstrukty připravené z vektorů pK-Myc a pXJ41)
- 2x redukující vzorkový pufr (viz oddíl VI. 1.)

Postup:

- K 300 μ l purifikovaných proteinů, obsahujících N-koncovou afinitní kotvu „GST“ a C-koncovou kotvu „6xHis“, bylo přidáno po 20 μ l kuliček glutathion-sepharózy

několikrát omytých 0,5x lyzačním roztokem na *Escherichia coli*. Následně byla tato směs inkubována 90 min ve 4 °C na rotačním stojánku.

- Mezitím byl pomocí translace *in vitro* připraven protein značený sírou ^{35}S . K tomu byly použity konstrukty pK-Myc-Ubn1 -BAP1, -UXT, -SAP30, -Abra1, Fez2 či -Brg1 klon #3 nebo pXJ41-Brg1, souprava *TNT Quick Coupled Transcription/Translation kit* a směs obsahující aminokyseliny cystein a metionin se sírou ^{35}S *TRAN ^{35}S Label*. Při přípravě proteinu proteinů značených sírou ^{35}S byly dodrženy upravené postupy doporučené výrobcem (1 μg plazmidové DNA byl smíchán se 40 μl lyzátu z retikulocytů, 8 μl směsi se sírou ^{35}S a 0,5 μl roztoku „*RNase Out*“ a inkubován 90 min ve 30 °C).
- Po skončení translace *in vitro* byla reakční směs přidána ke 2 ml navazovacího roztoku. Ze vzniklé směsi byly odebrány 3 μl a smíchány se 40 μl 2x redukujícího vzorkového pufru, který byl následně inkubován 10 min v 95 °C (takto byl připraven vzorek pro kontrolu množství proteinu translatovaného *in vitro* – tzv. „input“ neboli vsádka).
- Kuličky po inkubaci s GST-fúzními proteiny byly centrifugovány (2000 otáček/min, 4 °C, 4 min) a po odsátí supernatantů 3x omyty 500 μl navazovacího roztoku. Následně k nim bylo přidáno po 400 μl navazovacího roztoku smíchaného s proteiny připravenými translací *in vitro*. Tyto vzorky byly inkubovány na rotačním stojánku 4 hod. ve 4 °C.
- Po skončení inkubace byly kuličky centrifugovány (2000 otáček/min, 4 °C, 4 min) a 5x omyty 500 μl navazovacího roztoku tak, že byly resuspendovány v navazovacím roztoku, 10 min inkubovány ve 4 °C na rotačním stojánku a následně centrifugovány.
- Omyté kuličky byly resuspendovány v 60 μl 2x redukujícího vzorkového pufru a 10 min inkubovány v 95 °C. Kuličky byly následně odstraněny přes špičky s filtrem (obdobně, jako je popsáno v oddíle VII).
- Proteiny uvolněné do vzorkového pufru analyzovány pomocí SDS-PAGE, gel byl obarven pomocí barviva *Coomassie Brilliant Blue* a následně vysušen na filtračním papíře nad vakuem. Takto vysušený gel byl připevněn k desce pro detekci radioaktivity proteinů značených sírou ^{35}S *Phosphor Imaging Plate (FujiFilm)*. Po noční expozici byla deska analyzována pomocí přístroje BAS 5000 (*FujiFilm*).

IX.

Imunoprecipitace

Imunoprecipitace je metoda založená na izolaci proteinových komplexů z buněčných lyzátů pomocí nosičů (agarózových či sepharózových kuliček) s navázanými protilátkami proti některému z proteinů komplexu. Nosič může být například konjugován s bakteriálním proteinem A či G, které silně váží Fc-fragmenty protilátek. Izolované proteiny jsou po imunoprecipitaci analyzovány pomocí SDS-PAGE a Western blottingu.

IX. 1. Lýze buněk

K přípravě lyzátů byly použity dvě různé metody: nativní lýze předcházela imunoprecipitaci endogenních proteinů z buněk HEK293T či MCF10a, kdežto detergentová imunoprecipitaci proteinů nadprodukovaných v buněčné linii HEK293T či U2OS.

IX. 1. 1. Nativní lýze

Potřebné chemikálie:

- hypotonický lyzační roztok: 10 mM HEPES pH 7,5, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,65 mM DTT
- hypertonický lyzační roztok: 20 mM HEPES pH 7,5, 1,5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 0,2 mM EDTA pH 8,0, 25% glycerol, 0,65 mM DTT
- 2x redukující vzorkový pufr (viz oddíl VI. 1.)

Do lyzačních roztoků byly před použitím přidány proteázové inhibitory *Complete EDTA-free* (Roche)

Postup:

- K nativní lýzi byly použity buňky z pěti 10cm kultivačních misek u buněčné linie HEK293T, nebo z devíti 15cm kultivačních misek u buněčné linie MCF10a.
- Misky byly omyty PBS, buňky seškrábnuty pomocí škrabky a centrifugovány (1500 otáček/min, 4 °C, 5 min). Buněčné pelety byly resuspendovány v trojnásobném objemu hypotonického lyzačního roztoku (peleta o objemu 100 μl byla resuspendována ve 300 μl roztoku) a 15 min inkubovány na ledě.
- Následně byly buňky dezintegrovány pomocí stříkačky s jehlou 25xG, do níž byla buněčná suspenze pětkrát natažena a poté vystříknuta.
- Buněčná suspenze byla centrifugována (13500 otáček/min, 4 °C, 30 s) a supernatant, obsahující cytoplazmatickou frakci, přenesen do jiné zkumavky, kde byl smíchán s hypertonickým lyzačním roztokem o 1,5-násobku objemu původní buněčné pelety

(150 μ l roztoku pro buněčnou peletu 100 μ l) a DTT do výsledné koncentrace 0,65 mM. Tak vznikl cytoplazmatický lyzát.

- Peleta, obsahující převážně buněčná jádra, byla resuspendována v hypertonickém lyzačním roztoku o objemu 1,5-násobku původní buněčné pelety, krátce sonikována a poté 30 min inkubována na rotačním stojánku ve 4 °C.
- Tato suspenze byla centrifugována a supernatant smíchán s hypotonickým pufrem o stejném objemu, který byl použit k lýzi buněk (na 150 μ l hypertonického roztoku bylo použito 300 μ l hypotonického). Takto byl připraven jaderný lyzát.
- Jaderný i cytoplazmatický lyzát byly centrifugovány (13500 otáček/min, 4 °C, 10 min) a supernatanty byly použity ke imunoprecipitaci. Před vlastní imunoprecipitací z nich ještě bylo odebráno po 25 μ l, to bylo smícháno s 25 μ l 2x redukujícího vzorkového pufru a inkubováno 10 min v 95 °C. Tyto vzorky byly následně použity v SDS-PAGE společně se vzorky po imunoprecipitacích jako tzv. „input“ neboli vsádka.

IX. 1. 2. Detergentová lýze

Potřebné chemikálie:

- lyzační roztok: 50 mM HEPES pH 7,5, 250 mM NaCl, 0,5% Nonidet P40, 2% glycerol, proteázové inhibitory *EDTA-free Complete (Roche)*
- 10% DTT (0,65 M)
- 2x redukující vzorkový pufr (viz oddíl VI. 1.)

Postup pro buňky na 10cm miskách:

- Misky byly omyty PBS, buňky sklizeny pomocí škrabky a centrifugovány (1500 otáček/min, 4 °C, 5 min). Buněčné pelety byly resuspendovány ve trojnásobném objemu lyzačního roztoku (300 μ l lyzačního roztoku na peletu o objemu 100 μ l), krátce sonikovány a poté 20 min inkubovány ve 4 °C na rotačním stojánku.
- Po této inkubaci byly suspenze centrifugovány (13500 otáček/min, 4 °C, 10 min) a supernatanty zředěny deionizovanou vodou o objemu 1,5-násobku původní buněčné pelety (150 μ l vody u pelety o objemu 100 μ l, tj. lyzačního roztoku o objemu 300 μ l). K těmto směsím byl následně přidán DTT do výsledné koncentrace 0,65 mM a směsi byly centrifugovány (13500 otáček/min, 4 °C, 10 min).
- Supernatanty byly použity ke imunoprecipitaci. Před vlastní imunoprecipitací z nich bylo odebráno po 25 μ l, to bylo smícháno s 25 μ l 2x redukujícího vzorkového pufru

a inkubováno 10 min v 95 °C. Tyto vzorky byly následně použity v SDS-PAGE společně se vzorky po imunoprecipitacích jako tzv. „input“ neboli vsádka.

IX. 1. 3. Gelová filtrace

Podstatou gelové filtrace proteinového lyzátu je průchod lyzátu skrze kolonu obsahující polymer, který vytváří vlákna či dutinky. Zatímco velké proteinové komplexy se do těchto dutinek nedostanou, malé komplexy a proteiny jsou jimi zadržovány a zpomalovány. Velké komplexy tak kolonu opustí dříve, což umožňuje izolovat proteinové komplexy podle velikosti.

Potřebné pomůcky a chemikálie:

- hypotonický lyzační roztok: 10 mM HEPES pH 7,5, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,65 mM DTT
- hypertonický lyzační roztok: 20 mM HEPES pH 7,5, 1,5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 0,2 mM EDTA pH 8,0, 25% glycerol, 0,65 mM DTT
- zahušťovací kolonka *AmiCon Ultra-4 (Millipore)* s propustností pro částice menší než 30 kDa
- zahušťovací kolonka *AmiCon Ultra-0.5 (Millipore)* s propustností pro částice menší než 30 kDa
- kolona *Superose 6 Column (GE Healthcare)*
- zařízení pro kapalinovou chromatografii (FPLC) *ÅKTA (GE Healthcare)*
- 2x redukující vzorkový pufr (viz oddíl VI. 1.)

Postup:

- Buňky HEK293T pěstované na dvaceti 15cm kultivačních miskách byly omyty PBS a sklizeny pomocí škrabky. Následně z nich byl nativní lýzí připraven jaderný lyzáat (viz oddíl IX. 1. 1.) s objemem lyzačních roztoků odpovídajícím většímu objemu buněčné pelety.
- Jaderný lyzáat byl koncentrován pomocí centrifugace v zahušťovací kolonce *AmiCon Ultra-4* na objem 1,5 ml a následně pomocí FPLC frakcionován v koloně *Superose 6*, která byla předtím ekvilibrována pomocí omývacího pufru ke imunoprecipitaci po nativní lýzi (viz oddíl IX. 2.). Průtok v koloně byl nastaven na 0,25 ml/min, frakce byly jímány po 500 µl a vzhledem k objemu zahuštěného lyzátu byla tato frakcionace provedena třikrát (shodné frakce byly smíchány, a měly tak výsledný objem 1,5 ml).
- 1/3 objemu získaných frakcí byla odebrána stranou a zahuštěna v kolonkách *AmiCon Ultra-0.5* na objem 15 µl. Tyto frakce byly následně smíchány s 15 µl 2x redukujícího vzorkového pufru, 10 min inkubovány v 95 °C a poté použity k SDS-PAGE a následnému Western blottingu.

- Smícháním zbylého objemu (2/3) frakcí byly připraveny směsi k imunoprecipitaci. Směs I obsahovala frakce 2. – 6., směs II. frakce 7. – 11. a směs III frakce 12. – 16. Tyto směsi byly koncentrovány centrifugací v zahušťovací kolonce *Amicon Ultra-4* na objem 400 μ l a následně byly použity k imunoprecipitaci (viz oddíl IX. 2.). Předtím z nich bylo odebráno po 25 μ l, to bylo smícháno s 25 μ l 2x redukujícího vzorkového pufru a inkubováno 10 min v 95 °C. Tyto vzorky byly následně použity v SDS-PAGE společně se vzorky po imunoprecipitacích a vzorky připravenými zahuštěním 1/3 objemu frakcí po gelové filtraci.

IX. 2. Vlastní imunoprecipitace

Potřebné chemikálie:

- agarózové kuličky *Protein A/G PLUS-Agarose* (*Santa Cruz Biotechnology*)
- protilátky (anti-AFP, Daxx02 a Daxx03 u imunoprecipitací endogenních proteinů, anti-FLAG a anti-Myc u imunoprecipitací nadprodukovaných proteinů)
- omývací roztok:
 - u nativní lýze směs hypotonického a hypertonického lyzačního roztoku v poměru 2:1
 - u detergentové lýze směs lyzačního roztoku a vody v poměru 2:1 a s přidavkem DTT do výsledné koncentrace 0,65 mM
- 2x redukující vzorkový pufr (viz oddíl VI. 1.)

Postup:

- Na jednu imunoprecipitační reakci bylo použito nejméně 300 μ l buněčného lyzátu, 5 μ g protilátky a 50 μ l směsi agarózových kuliček (před použitím byly omyty omývacím pufrem).
- Nejprve byly smíchány lyzáty s protilátkami a inkubovány přes noc ve 4 °C na rotačním stojánku.
- Po této noční inkubaci byly lyzáty s protilátkami centrifugovány (13500 otáček/min, 4 °C, 10 min) a supernatanty smíchány s agarózovými kuličkami, s nimiž byly poté inkubovány 90 min ve 4 °C na rotačním stojánku.
- Následně byly vzorky ponechány na ledě, dokud se kuličky neusadily. Supernatanty byly odsáty a kuličky pětkrát omyty 500 μ l omývacího roztoku tak, že byly resuspendovány v omývacím roztoku, 10 min inkubovány na rotačním stojánku a poté centrifugovány (2000 otáček/min, 4 °C, 5 min).
- Omyté kuličky byly resuspendovány ve 30 μ l 2x redukujícího vzorkového pufru a poté 10 min inkubovány v 95 °C. Tím se uvolnily navázané proteinové komplexy.

- Nakonec byly kuličky odstraněny přes špičky s filtrem (obdobně, jako je to popsáno v oddíle VII.) a uvolněné proteinové komplexy analyzovány pomocí SDS-PAGE a Western blottingu společně s kontrolními vzorky, které obsahovaly lyzáty před imunoprecipitací.

X.

Celogenomová analýza změn genové exprese (DNA-čip, *microarray*)

DNA-čip je metoda, která umožňuje stanovit relativní koncentraci značného množství různých molekul DNA ve vzorku zároveň. Základem je destička, na niž jsou nanесeny tisíce až desítky tisíc různých specifických molekul DNA. Na ty se váží fluorescenčně značené komplementární molekuly DNA ze vzorku. Množství navázaných molekul DNA je skenováno pomocí laseru, který excituje fluorescenční barvivo. Metodu je možné použít například ke stanovení exprese značného množství genů zároveň (někdy až celogenomové exprese). Izolovaná mRNA je v tomto případě reverzně transkribována do cDNA, a při tomto procesu je také fluorescenčně označena. Připravená cDNA je následně hybridizována s komplementárními molekulami DNA na destičce.

Potřebné pomůcky a chemikálie:

- souprava pro izolaci RNA z buněk *RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen)*
- souprava *Human HT-12 v4 Expression BeadChip Kit (Illumina)*

Postup:

- Z buněk pěstovaných na 6-jamkové destičce byla pomocí soupravy *RNeasy* izolována celková RNA.
- Kvalita a integrita izolované RNA byly následně ověřeny pomocí kapilární elektroforézy v Servisní laboratoři funkční genomiky a bioinformatiky Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky (dále genomická servisní laboratoř).
- Z celkové RNA byla poté v genomické servisní laboratoři purifikována RNA obsahující polyA, a ta následně použita k celogenomové analýze genové exprese pomocí soupravy HT-12.
- Následné vyhodnocení genové exprese bylo provedeno pracovníky genomické servisní laboratoře.

XI.

Stanovení relativní genové exprese s použitím qRT-PCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR) slouží ke stanovení relativní koncentrace vybraných úseků DNA v různých vzorcích. Její podstatou je měření postupného nárůstu koncentrace DNA během PCR (například pomocí vazby fluorescenčního barviva *SYBR Green*), z čehož lze spočítat relativní koncentraci. Takto lze například stanovit relativní expresi vybraných genů. Z buněk je nejprve izolována RNA, následně reverzně transkribována do DNA, a ta je použita ke qRT-PCR.

Potřebné pomůcky a chemikálie:

- souprava pro izolaci RNA z buněk *RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN)*
- reverzní transkriptáza *RevertAid* a její pufr, inhibitor RNáz *RiboLock*, 10 mM směs deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP), směs náhodných hexamerů (vše *Fermentas*)
- směs na qRT-PCR *LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche)*
- priméry pro qRT-PCR (jejich seznam je uveden v tab. 3)
- cyklér pro qRT-PCR *LightCycler 480 (Roche)*

Postup:

- Buňky pěstované na 12-jamkové destičce byly omyty PBS a následně z nich byla izolována RNA pomocí soupravy *RNeasy*.
- Připravená RNA byla rozpuštěna ve 30 μ l vody, poté byla spektrofotometricky na přístroji *NanoDrop-1000 (Thermo Scientific)* stanovena její koncentrace a vzorky byly podle potřeby zředěny tak, aby měly stejnou koncentraci RNA.
- 0,5 – 1 μ g izolované RNA byl použit k reverzní transkripci pomocí reverzní transkriptázy *RevertAid*. Při ní byl dodržen postup doporučený výrobcem.
- Takto připravená DNA byla analyzována pomocí qRT-PCR. Každá reakční směs obsahující příslušnou cDNA a dvojici primérů byla namíchána ve třech kopiích (tzv. technické trojice / „triplikáty“).
- Výpočet relativní koncentrace mRNA vycházel z [310]. K tomu byl použit následující vzorec:

$$\text{relativní koncentrace mRNA} = 2^{Cp(\text{kontrola}) - Cp(\text{vzorek})}$$

Výsledné hodnoty byly normalizovány pomocí relativních koncentrací tzv. „house-keeping“ genů (GAPDH, SDH, RPL37A, β -actin) tak, že byl u příslušného vzorku vypočítán průměr těchto relativních koncentrací, a tímto průměrem byla poté vydě-

lena relativní koncentrace mRNA vybraného genu. Výsledná relativní koncentrace mRNA byla spočítána jako průměr normalizovaných výsledků v jedné trojici. Z každé trojice byly též vypočítány směrodatné odchylky.

XII.

Imunocytochemie

Potřebné pomůcky a chemikálie:

- podložní a krycí sklička (*KnittelGlass*)
- fixační roztok: 3% paraformaldehyd v PBS
- permeabilizační roztok: 0,5% Triton X-100 v PBS
- blokovací roztok: 10% lidské sérum (*Sigma Aldrich*)
- primární protilátky v PBS (ředěny dle doporučení výrobce; primární protilátky připravené v autorově laboratoři byly ředěny na koncentraci 5 µg/ml)
- sekundární protilátky v PBS (konjugované s fluorescenčním barvivem, ředěny 1:500)
- 1,25 µM DAPI v PBS
- roztok *ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen)*
- bezbarvý lak na nehty
- konfokální mikroskop *Leica TCS SP5*

Postup:

- Krycí sklička byla umístěna na dno jamek 24-jamkové kultivační destičky a 5 min sterilizována 96% etanolem. Po sterilizaci byl etanol odsát, jamky se skličky omyty PBS a poté do nich byly nasazeny buňky. Ty byly následně transfektovány, transdukovány či inkubovány ve vybraných chemikáliích.
- Připravené buňky byly přímo v jamkách kultivační destičky nejprve 10 – 20 min fixovány ve 250 µl fixačního roztoku, poté 10 – 20 min permeabilizovány ve 250 µl permeabilizačního roztoku a nakonec 20 min – 1 hod. blokovány ve 250 µl blokovacího roztoku. Před fixací, permeabilizací, blokováním a po blokování byly buňky 2x omyty 1 ml PBS.
- Následně byly buňky inkubovány 1 hod. ve 250 µl primární protilátky, 1 hod. ve 250 µl sekundární protilátky a 5 min ve 250 µl DAPI. Po každé této inkubaci byly opět 2x omyty 1 ml PBS.
- Na podložní sklička byly naneseny kapky (5 µl) roztoku *ProLong Gold* a na tyto kapky byla položena sklička s buňkami (strana s buňkami na kapku). Okraje kry-

cích sklíček byly zamáznuty bezbarvým lakem na nehty a sklíčka ponechána v temnu, dokud nezaschla.

- Připravené vzorky byly analyzovány pomocí konfokální mikroskopie.

Název oligonukleotidu	Sekvence	Název oligonukleotidu	Sekvence
Brg1_qRT_fwd	GTATGGGAGGGCCCAACA	IFIH1_qRT_fwd	AGGCACCATGGGAAGTGAT
Brg1_qRT_rev	ATTCGCCATGGGTCCTTC	IFIH1_qRT_rev	GGTAAGGCGCTGAGCTGGAG
Daxx_qRT_fwd	GCCTGGTACTTGCAAGCAA	IFIT1_qRT_fwd	AGAACGGCTGCCAATTACAG
Daxx_qRT_rev	ATTCTGGAGGCCAGGGAGAAG	IFIT1_qRT_rev	GCTCCAGACTATCCTTGACCTG
beta-actin_qRT_fwd	GGCATCTCACCTGAAGTA	IFIT2_qRT_fwd	TGGTGGCAGAAAGGAGAAGAT
beta-actin_qRT_rev	AGGTGTGGTGGCAGATTTTC	IFIT2_qRT_rev	GTAGGCTGCTCCTCAAGGAA
GAPDH_qRT_fwd	CACCACACTGAATCTCCCTC	IFIT3_qRT_fwd	CAGAACTGCAGGGAACAGC
GAPDH_qRT_rev	CCCCTCTTCAAGGGGCTACT	IFIT3_qRT_rev	GCATTTACAGCTGTGGAAGG
RPL37A_qRT_fwd	AGGAACCACAGTGCCAGATCC	IL1RL1_qRT_fwd	TTGTCCCTACATTGACCTCTACAA
RPL37A_qRT_rev	ATTGAAATCAGCCAGCAGCGC	IL1RL1_qRT_rev	GATCCTTGAAAGGCTGACAA
SDH_qRT_fwd	AGATTGGCACCTAGTGGCTG	IRF7_qRT_fwd	AGCTGTGCTGGCGAGAAG
SDH_qRT_rev	ACAAAGGTAAGTGCCACGCT	IRF7_qRT_rev	CATGTGTGTGCCAGGAA
ABCA1_qRT_fwd	TGCACATGTGAAAACCCAG	IRS1_qRT_fwd	TATGCCAGCATCAGTTTCCA
ABCA1_qRT_rev	AATGGTGACACAAAGCGATT	IRS1_qRT_rev	TTTGTGAGGTCATTTAGGCTT
ABLIM2_qRT_fwd	TGGAAGCTTGGACCCAGATA	ISG20_qRT_fwd	CACCCCTCAGCAGCATGGT
ABLIM2_qRT_rev	GTGTCTGCATCCCCCTTG	ISG20_qRT_rev	TGGAAGCTGCTTCCAGGT
ACSS1_qRT_fwd	CCCAGTTTATCCCAATGCTG	ITPKA_qRT_fwd	CTGCTGAGCGACAGTGAAG
ACSS1_qRT_rev	GGGCGCCATAGAACTGATT	ITPKA_qRT_rev	TCTGCCAGTGGTTTTCTGAC
ALDH1A3_qRT_fwd	AACCCCTGCATCGTGTGT	KITLG_qRT_fwd	GCCTGCCTTTCTTTATG
ALDH1A3_qRT_rev	TGGTTGAAGAACAACCTCCTGA	KITLG_qRT_rev	CCTTCAGTTTTGACGAGAGGA
ASK1_qRT_fwd	CACGTGATGACTTAAATGCTTG	LIPG_qRT_fwd	CCCTTTATGGCACTAATGCAG
ASK1_qRT_rev	AGTCAATGATAGCCTCCACAGT	LIPG_qRT_rev	GCTCGATCCGCTCCACTAT
BMF_qRT_fwd	AGTTCCACCCTGGCTCATGT	MCM6_qRT_fwd	CAGCTAAGAGCCAATTTCTCAAG
BMF_qRT_rev	TCTTCTCCATTCAAAGCAAGG	MCM6_qRT_rev	GGACGCTTTACCCTGGTGT
C1orf97_qRT_fwd	GTCACCTTTCCAAGAGGGACT	MEIS1_qRT_fwd	GCATGAATATGGGATGGA
C1orf97_qRT_rev	AAACGCTGAGCTTGGAAATC	MEIS1_qRT_rev	CATACCTCCCTGGCATCTTTG
CALLA_qRT_fwd	GCGAAGCTTGACCCGAGAG	MEKK4_qRT_fwd	GCCTTGAGAGTGACCCAAAG
CALLA_qRT_rev	TGCCCATCACCTAAAATCGT	MEKK4_qRT_rev	GCTTCATCTTCATCTGTGCAA
CCND2_qRT_fwd	GGACATCCCAACCCTACATGC	MELK_qRT_fwd	CAGGTGTCAATTAGCCCTGAGA
CCND2_qRT_rev	CGCACTTCTGTTCTCACAG	MELK_qRT_rev	TGGCTCCTTTCTTTTGG
CCNE1_qRT_fwd	GGCCAAAATCGACAGGAC	MLL11_qRT_fwd	AACACGCCAGTAATTGATTGATA
CCNE1_qRT_rev	GGGTCTGCACAGACTGCAT	MLL11_qRT_rev	AGCTCCGACAGATCCAGTTC
CCNF_qRT_fwd	GGGAACCTGAAGCTCTTTGA	MMP1_qRT_fwd	TGATCCAGGTTATCCCAA
CCNF_qRT_rev	GTAGGCTATGCCAGCTTCA	MMP1_qRT_rev	AACTTTGTGGCAATTCAG
CD44_qRT_fwd	AAGGTGGAGCAACACCAACC	MMP7_qRT_fwd	CTTTCCAGGATGATATAAAGGCA
CD44_qRT_rev	TGGAATTTGGGGTGCTCTTA	MMP7_qRT_rev	TGAATGGATGTTCTGCCGTAAG
CDC20_qRT_fwd	CATTCCGATCTGGAATGTGT	MSH3_qRT_fwd	CTTGCCGAGCAACACAGG
CDC20_qRT_rev	GAGACCAGAGGATGGAGCAC	MSH3_qRT_rev	TGACTCGAATTTCTGTATCC
CRYAB_qRT_fwd	GATGTGATGAGGTGCATGG	NQO1_qRT_fwd	CAGCTCACCAGAGCCTAGT
CRYAB_qRT_rev	GTGGAAGCTCCCTGGAGATGA	NQO1_qRT_rev	GAGTGAGCCAGTCCGATCAGTG
CSF1_fwd	AGCAGGAGTATCACCAGGGA	OPN3_qRT_fwd	CCTCCTTTGTGCTTTTCTATTTC
CSF1_rev	TAATTTGGCAGCAGGCTCTCC	OPN3_qRT_rev	TCTCCACACAACGAAGCAT
CST6_qRT_fwd	GGGAGCAACAGCATCTACT	PRODH_qRT_fwd	AGACCCCTGGAGTGGCTTG
CST6_qRT_rev	CCATCTCCATCGTCAGGAAG	PRODH_qRT_rev	CTTGGACAGCTTTGGTCTG
CXCL10_qRT_fwd	GAAAGCAGTTAGCAAGGAAAGGT	RANTES_qRT_fwd	TACCATGAAGGTCTCCGCGCA
CXCL10_qRT_rev	GACATATACTCCATGTAGGGAAGTGA	RANTES_qRT_rev	AAAGCAGCAGGCTGGGTGCTCC
CYP4B1_qRT_fwd	ACGTTGGCTAAGGCTATGGA	S100A2_qRT_fwd	GGGCCCACATATAAATCCT
CYP4B1_qRT_rev	GCCCAGGACACCCTTTG	S100A2_qRT_rev	CAGAGAAGTGACATCATGGA
ETNK2_qRT_fwd	GCTATGAGTACATGACGGGTGT	S100A3_qRT_fwd	TCTGGTTGAGTTCCTGACTG
ETNK2_qRT_rev	TGCCATTTCTAAGGCGAATTAAC	S100A3_qRT_rev	TGGAAGGTGCACAGCAGT
FABP5_qRT_fwd	GCAGACCCTCTCTGCAC	SCEL_qRT_fwd	TGAAACCTTCAGCTCTTAGAACA
FABP5_qRT_rev	TCGCAAGGCTATTTCCACTC	SCEL_qRT_rev	TTCCATCTTGTTTTCAGACACAT
FBXO32_qRT_fwd	GCAGCAGCTGAACAACATTC	SDC1_qRT_fwd	AGGATGGAGGCTCTCTGCTC
FBXO32_qRT_rev	CACAAGGCGAGGTCAAGTAA	SDC1_qRT_rev	CCGAGGTTTCAAAGGTGAAGT
FGFBP1_qRT_fwd	ACTGGATCCGTGTGCTCAG	SERPIN7_qRT_fwd	GCCATTTCAAATCTCCCAAG
FGFBP1_qRT_rev	GAGCAGGCTGAGGCTACAGA	SERPIN7_qRT_rev	CAAATTTGAAGTCTCCCTGCTG
FOS_qRT_fwd	CTACCACTCACCCGAGACT	SFN_qRT_fwd	GACACAGAGTCCGGTCCATG
FOS_qRT_rev	AGTCCGTGCAGAAGTCCCT	SFN_qRT_rev	ATGGCTCTGGGACACAC
FOXO3_qRT_fwd	CTTCAAGGATAAGGGCGACA	SNCAIP_qRT_fwd	ACATTCGCCCTTGACCTCACT
FOXO3_qRT_rev	CGACTATGCAGTGACAGGTTG	SNCAIP_qRT_rev	CATTTTTCTATTGATGCTATTGCTG
FU_qRT_fwd	CAAGGGGTGACCTTTGACC	SOX15_qRT_fwd	AAGTCTCTCGCAACGACT
FU_qRT_rev	GGTGGAGTCAACCGAACCT	SOX15_qRT_rev	GAAGCGTCGATCCTGAAAT
GHR_fwd	CGTTACCTGAGCGAGAGA	SPARC_qRT_fwd	GTACATCGCCCTGGATGAGT
GHR_rev	TGAGTCCATTCTTGAGTGTCC	SPARC_qRT_rev	CGATATCCTCTGCTTTGATGC
HMGA1_qRT_fwd	GGAAAAAGCAGCGCACTGAG	SPINK6_qRT_fwd	GTGCCCTCTGAAGGCCATAGT
HMGA1_qRT_rev	CTTCGCTGGGCTCCTTCT	SPINK6_qRT_rev	TTTTCCAGGATGCTTTAGGC
HSB-1_qRT_fwd	GTTGGGAGGAGACAGATCA	STAT1_qRT_fwd	TGAGTTGATTTCTGTGCTGAAGTT
HSB-1_qRT_rev	TGTTGGTGAAGGGTCTTTCTT	STAT1_qRT_rev	ACACCTCGTCAAACCTCTCAG
IFI6_qRT_fwd	CCTGCTGCTCTTCACTTGC	Transgelin_qRT_fwd	AAGAATGATGGGCACTACCG
IFI6_qRT_rev	CCGAGCACTTTTTCTACCTG	Transgelin_qRT_rev	ACTGATGATCTGCCGAGGTC
IFI27_qRT_fwd	CCAAGCTTAAGACGGTGAGG	TRIP13_qRT_fwd	GCTCATGGCTTRIP13
IFI27_qRT_rev	CCGTGGCTAGAGAGTAAGAGA	TRIP13_qRT_rev	GTCCACTGCCAGAGACAGG
IFI35_qRT_fwd	GACCCGAGACCCATGCTCA	TUBA1B_qRT_fwd	TTACCTCGACTCTTAGCTGCTG
IFI35_qRT_rev	CCCACAGCCTCATCTTGAGT	TUBA1B_qRT_rev	GGATGGAGATGCACCTCAGC
IFI44_qRT_fwd	GTGAGCCTGTGAGGTCCAA	ZBTB16_qRT_fwd	GCACAGTTTTCGAAGGAGGA
IFI44_qRT_rev	TCCTTTACAGGGTCCAGCTC	ZBTB16_qRT_rev	CAGAAGACGGCCATGTCA
IFI44L_qRT_fwd	TGACACTATGGGCTAGATGG		
IFI44L_qRT_rev	TTGGTTACGGGAATTAACCTGA		

Tab. 3 – Seznam oligonukleotidů (primérů) použitých ke qRT-PCR

V seznamu jsou uvedeny dvojice primérů, které byly použity ke zjištění relativní míry exprese pomocí qRT-PCR. První část názvu oligonukleotidu značí název příslušného genu, „fwd“ je „forward“, „rev“ je „reverse“.

Výsledky

I.

Multifunkční adaptérový protein Daxx interaguje s ATPázou remodelující chromatin Brg1

I. 1. Vyhledání nových potenciálních interakčních partnerů proteinu Daxx v kvasinkovém dvojhybridním systému

K nalezení nových interakčních partnerů proteinu Daxx, jež by mohly pomoci k lepšímu porozumění jeho funkce, byl použit kvasinkový dvojhybridní systém (Y2H). V něm coby „návnada“ posloužila část lidského proteinu Daxx, která obsahovala jeho prvních 595 aminokyselin (kompletní Daxx má aminokyselin 740). Použitý fragment tak postrádal C-koncový úsek, obsahující oblast bohatou na aminokyseliny serin, prolin a treonin a SUMO-vazebný motiv [11]. V této části byla lokalizována většina interakcí proteinu Daxx s dalšími proteiny, které byly známy v době provedení vyhledávání za pomoci Y2H, a záměrem proto bylo tyto již známé interakce vyloučit. Analýza provedená na základě sekvencí dostupných v databázi *NCBI Protein* navíc naznačila, že je fragment použitý v Y2H evolučně konzervovanější než C-konec proteinu Daxx (není ukázáno), jak později potvrdila i studie Escobara-Cabrery a kol., kteří tuto oblast proteinu Daxx strukturně charakterizovali [8].

V Y2H (viz Metodika, oddíl V.) bylo následně identifikováno celkem 24 potenciálních interakčních partnerů proteinu Daxx (jejich seznam je uveden v tab. 4). Většinou se jedná o proteiny jaderné a značná část z nich je asociována s chromatinem. Mezi těmito nalezenými potenciálními interakčními partnery proteinu Daxx byly i ATPáza remodelující chromatin ATRX a protein asociovaný s DNA-metyltransferázou 1 DMAP1. Interakce proteinu Daxx s těmito proteiny byla popsána již dříve [207, 247] (viz též Úvod, oddíly III. 5. 2. a III. 6.), což naznačuje, že i ostatní identifikované potenciální interakce s proteinem Daxx mohou být relevantní.

I. 2. Výběr proteinů k dalším analýzám

Z potenciálních interakčních partnerů proteinu Daxx, které jsou uvedeny v tab. 4, bylo k dalším analýzám vybráno 7 proteinů. Výběr byl učiněn na základě tehdejšího stavu poznání, s ohledem na předpokládanou funkci proteinu Daxx a vycházel také z analýz

Protein	Funkce	ID	Počet klonů
ABRA1/CCDC98	podjednotka komplexu BRCA1-A, podílí se na opravě dvojřetězcových zlomů v DNA	84142	3
ATRX	ATPáza remodelující chromatin, potencionální nádorový supresor	546	2
BAP1	ubikvitin-hydroláza asociovaná s BRCA1, potencionální nádorový supresor	8314	1
BCAS2/DAM1	amplifikován u prsních nádorů, inhibitor transkripčního faktoru p53	10286	1
BRG1	ATPáza remodelující chromatin, potencionální nádorový supresor	6597	3
DMAP1	protein asociovaný s DNA-metyltransferázou, podílí se na regulaci struktury chromatinu či opravách poškozené DNA	55929	1
DNAJC14/LIP6/DRIP78	chaperon asociovaný s endoplazmatickým retikulem, v němž reguluje zadržování dopaminového receptoru D1	85406	1
EIF2B5	podjednotka komplexu EIF2B, který funguje jako faktor vyměňující GTP u translačního iniciačního faktoru EIF2	8893	1
FEZ2	součást dlouhých výběžků neuronů	9637	2
HAUS8	podjednotka komplexu HAUS (augmin), podílejí se v uspořádání mitotického vřeténka	93323	1
HNRNPC	ribonukleoprotein, který se podílí na úpravách nově syntetizované mRNA	3183	1
NDUFB9	podjednotka subkomplexu 9 NADH-dehydrogenázy-β	4715	2
NOB1/ART4	protein, který se podílí na úpravách nově syntetizované rRNA	28987	1
RPLP1	ribozómová podjednotka	6176	2
SAP30	podjednotka korepresorového komplexu mSin3A	8819	1
SNF8/EAP30	podjednotka komplexu ESCRT-II, který se podílí na vezikulárním transportu, rovněž asociuje s proteinem ELL, elongačním faktorem RNA-polymerázy II	11267	9
SNX30	člen proteinové rodiny <i>Sorting Nexin</i> , funkce není příliš popsána (účastní se např. třídění endozómů)	401548	2
TPR	vláknitý protein, součást "koše" jaderného póru, podílí se mj. i na regulaci struktury chromatinu a kontrolního bodu uspořádání mitotického vřeténka	7175	1
TRAF4AF1/SKAP	regulátor přechodu z metafáze do anafáze během mitózy, lokalizován do oblastí kinetochorů	90417	1
UBA1	enzym aktivující ubikvitin (E1)	7317	4
UBE2S	enzym konjugující ubikvitin (E2), ubikvitinyluje např. APC během dokončení mitózy	27338	1
UBN1	složka komplexu HIRA/ASF1, který se funguje jako histonový chaperon histonu 3.3	29855	1
UXT/ART27	protein účastní se regulace transkripce (váže mj. transkripční faktory NF-κB či estrogenový receptor)	8409	2
WDR74	protein asociovaný s jadérkem, neznámá funkce	54663	1

Tab. 4 – Seznam potencionálních interakčních partnerů proteinu Daxx

V seznamu jsou uvedeny všechny proteiny, které byly v Y2H nalezeny jako potencionální interakční partneři proteinu Daxx. „ID“ znamená identifikační číslo v databázi *NCBI Gene*. V posledním sloupci je uveden počet kvasinkových klonů, které při vyhledání interakčních partnerů v Y2H obsahovaly příslušný gen. Modře jsou zvýrazněny proteiny, u nichž byla již interakce s proteinem Daxx popsána, tučně proteiny vybrané k další analýze.

provedených v Y2H. Pokud při kontrolním párování kvasinek (viz Metodika, oddíl V.) narostlo výrazně méně kolonií, mohlo to znamenat, že nalezená potencionální interakce s proteinem Daxx byla pouhou falešnou pozitivitou. Takovéto proteiny byly tedy z následných analýz vyloučeny.

K dalším analýzám byly vybrány níže uvedené proteiny:

- **Abra1** (*Abraxas*): Podjednotka komplexu BRCA1-A, který je důležitý pro opravy dvojřetězcových zlomů v DNA [311]. V tomto komplexu se podílí na navedení pro-

teinu BRCA1 do místa poškození [312-314]. Nově popsaná interakce proteinů Abra1 a Daxx by tedy mohla rozšířit spektrum funkcí proteinu Daxx také na opravy DNA. Tomu by nasvědčoval i fakt, že je Daxx fosforylován kinázou ATM, která je rovněž aktivována poškozením DNA [114] (viz též Úvod, oddíl II. 5. 3.).

- **BAP1** (*BRCA1-associated protein 1*): Ubikvitin-hydroláza, která interaguje s proteinem BRCA1 a působí jako nádorový supresor, důležitý pro opravy dvojřetězcových zlomů v DNA [315-317]. Dále se BAP1 podílí na regulaci buněčného cyklu, neboť asociuje s transkripčním kofaktorem HCF1 a inhibuje ho, čímž potlačuje přechod z fáze G1 do S [318-320]. BAP1 tedy představuje další protein spojený s opravami DNA, který byl nalezen v Y2H jako potencionální interakční partner proteinu Daxx. Navíc by se jednalo již o druhou ubikvitin-hydrolázu (vedle proteinu Hausp, viz Úvod, zejména oddíl II. 5. 5.), která s proteinem Daxx interaguje.
- **Brg1** (*Brahma-related gene 1*): ATPáza remodelující chromatin, která se účastní širokého spektra buněčných pochodů souvisejících s regulací struktury chromatinu, včetně transkripce, oprav DNA či replikace [205]. Podílí se na regulaci exprese mnoha genů, řízených např. jadernými receptory, genů odpovědi na cytokiny, regulujících buněčnou diferenciaci (kupř. genů odpovědi na signální dráhu Wnt či homeotických genů, ale též genů zodpovídajících za pluripotenci zárodečných kmenových buněk), buněčný cyklus (regulovaných transkripčními faktory p53 či E2F nebo korepresorem pRB) a mnoha dalších [321-326]. Důležitost proteinu Brg1 podtrhuje i fakt, že myší embrya, která jeho expresi postrádají, hynou již několik dní po implantaci do dělohy [327]. Mimo to se Brg1 účastní i karcinogeneze (coby nádorový supresor i protein, který je pro její postup nezbytný) [328]. U proteinu Daxx by se zároveň jednalo o další ATPázu remodelující chromatin (vedle ATRX), která s ním interaguje.
- **Fez2** (*fasciculation and elongation protein zeta-2*): Podílí se na růstu axonů nervových buněk [329] a je také negativním regulátorem autofágie [330]. Jeho funkce byla v době výběru v podstatě neznámá a strukturní analýza ukázala, že obsahuje výrazné helikální motivy, podobně jako protein Daxx, u něhož se podílejí na interakcích s dalšími proteiny (viz Úvod, oddíl I. 2.).
- **SAP30** (*Sin3-associated protein 30*): Podjednotka korepresorového komplexu mSin3A, obsahujícího mj. i HDAC, s nímž se podílí na inhibici některých genů [331-333]. Komplex mSin3A se účastní také regulace buněčného cyklu, neboť aso-

ciuje s korepresorem pRb, který inhibuje expresi transkripčních faktorů z rodiny E2F [334]. SAP30 zajišťuje vazbu komplexu obsahujícího mSin3A a HDAC k dalším proteinům, DNA a histonům [333, 335, 336] a podílí se i na antivirové odpovědi [337, 338]. U proteinu Daxx by tak mohl dále rozšířit jeho známé korepresorové funkce.

- **Ubn1** (*Ubinuclein-1*): Součást histonového chaperonového komplexu HIRA/ASF1, u něhož se podílí na vazbě histonu-3.3 [339, 340]. Sice již bylo publikováno, že komplexy histonových chaperonů pro histon 3.3 HIRA/ASF1 a Daxx/ATRX mají zcela odlišné složení a žádná z identifikovaných podjednotek jednoho komplexu není součástí komplexu druhého [260], nelze ovšem vyloučit, že se jejich funkce za některých doposud neidentifikovaných podmínek přeci jenom překrývají, a Daxx a Ubn1 spolu tudíž interagují i funkčně.
- **UXT**: Protein produkovaný prakticky ve všech tkáních (odtud i jeho jméno *ubiquitously expressed transcript*) [341]. Kromě jiného se účastní aktivace androgenního receptoru [342] a transkripčního faktoru NF- κ B [343]. U obou těchto proteinů Daxx působí jakožto korepresor (viz Úvod, oddíl III. 5.). Dále bylo popsáno, že je UXT součástí centrozómu a jeho odstranění pomocí RNAi způsobí buněčnou smrt [344]. Ta může souviset i s tím, že UXT inhibuje apoptózu způsobenou aktivací receptoru smrti TNFR [345].

I. 3. Ověření interakce proteinu Daxx s vybranými potencionálními interakčními partnery

U výše zmíněných vybraných proteinů byly jejich kódující úseky přeneseny do vektorů pro expresi v savčích buňkách (u Brg1 se zpočátku jednalo pouze o fragment získaný v Y2H, zahrnující aminokyseliny 264-585, který byl nazván „klon 3“ podle označení kvasinkového klonu, z něhož byl izolován).

Takto připravené plazmidy byly použity k potvrzení interakce vybraných proteinů s proteinem Daxx také v jiných systémech, než je Y2H, který je sám o sobě dosti umělý a v něm nalezené potencionální interakce nemusejí odpovídat skutečným poměrům existujícím v savčích buňkách. Vzhledem k tomu, že postup optimalizace buněčné lýze a následné imunoprecipitace nebyl zpočátku příliš úspěšný (není ukázáno), byl nejprve proveden tzv. „GST-pulldown“, založený na interakci proteinu s připojenou afinitní kotvou „GST“, který je produkován v baktériích, s proteiny připravenými *in vitro*,

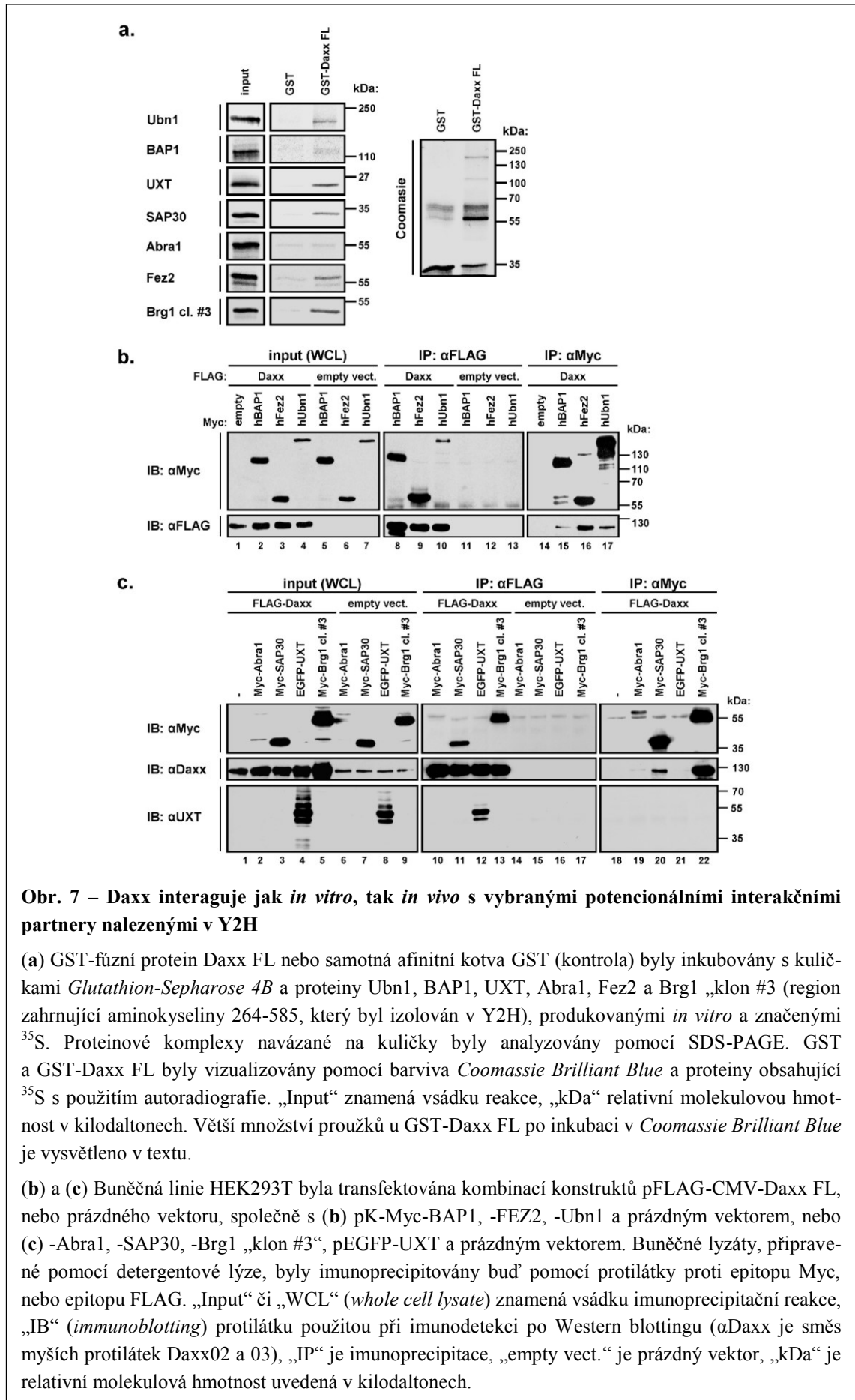
jež obsahují radioaktivní síru ^{35}S (viz Metodika, oddíl VIII.). GST-fúzní protein Daxx nebo kontrolní protein (samotná afinitní kotva „GST“) byly v tomto systému inkubovány s výše uvedenými vybranými proteiny, značenými sírou ^{35}S . Následná analýza s využitím autoradiografie ukázala, že tyto proteiny interagovaly především s GST-fúzním proteinem Daxx a pouze minimálně s kontrolou (viz obr. 7a). Tato slabá interakce s kontrolou mohla být způsobena např. nedostatečným omytím glutathion-sepharózového nosiče s navázanými proteinovými komplexy. Rozdíly v interakci mezi kontrolou a GST-fúzním proteinem Daxx byly nicméně natolik výrazné, že byla i v tomto umělém systému dále potvrzena interakce proteinu Daxx s vybranými proteiny.

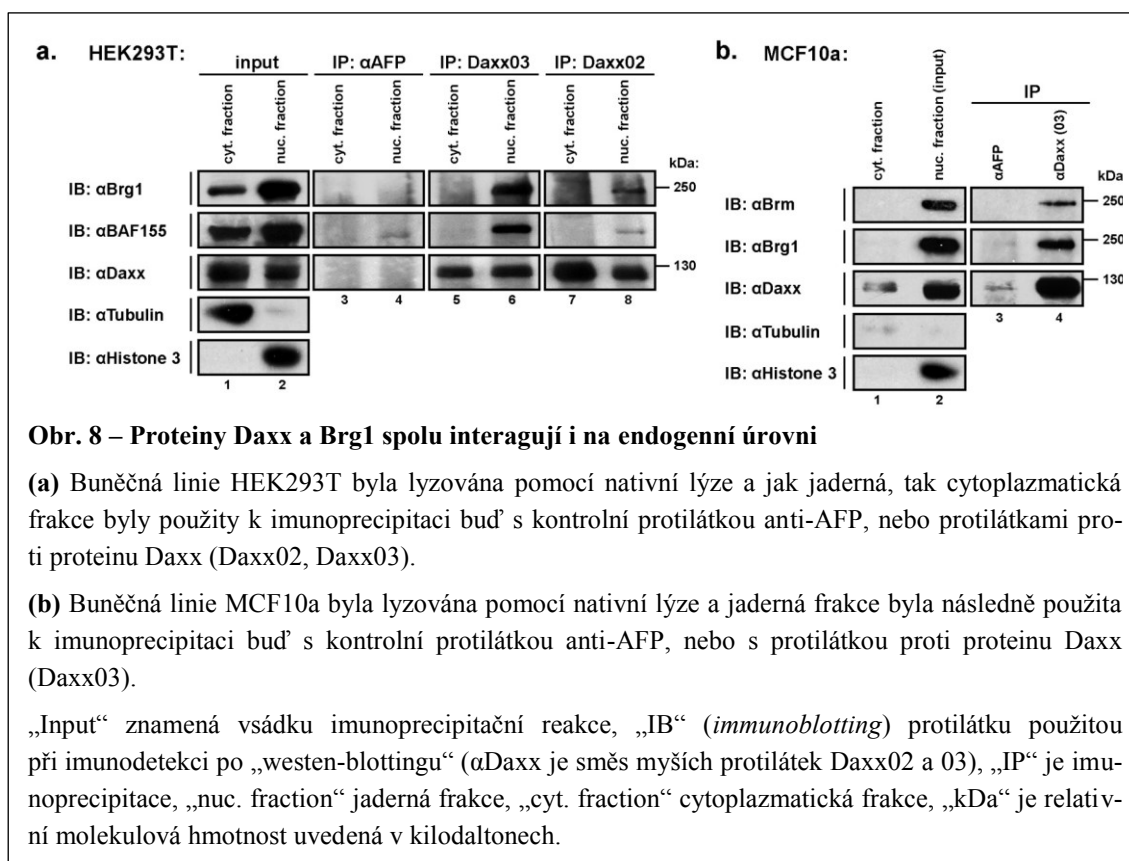
Ani to však nemusí znamenat, že spolu uvedené proteiny v savčích buňkách opravdu interagují. Protože se posléze podařilo optimalizovat podmínky transfekce, buněčné lýze a imunoprecipitace, byla pro další potvrzení interakcí vybraných proteinů s proteinem Daxx, tentokrát *in vivo*, použita lidská buněčná linie HEK293T. Ta byla transfekována konstrukty pro expresi vybraných proteinů společně s konstruktem pro expresi proteinu Daxx nebo kontrolním vektorem a následně byla provedena imunoprecipitace z jejich lyzátů (viz Metodika, oddíly IX. 1. 2. a IX. 2.). Při ní byla interakce proteinu Daxx s vybranými proteiny rovněž detekována (viz obr. 7b, sloupce 8 – 10 a 15 – 17 v porovnání se sloupci 11 – 14, a obr. 7c, sloupce 10 – 13 a 19 – 22 v porovnání se sloupci 14 – 18). To naznačuje, že by mohla existovat také *in vivo* u endogenních proteinů.

I. 4. Analýza interakce proteinu Daxx s vybranými proteiny na endogenní úrovni

Po dalším potvrzení interakce proteinu Daxx s jeho vybranými potencionálními partnery *in vitro* pomocí „GST-pulldownu“ a *in vivo* za použití imunoprecipitace proteinů nadprodukovaných v lidských buňkách byla také učiněna série pokusů, jejichž cílem bylo interakci prokázat rovněž u proteinů, jež jsou v buňce produkovány přirozeně (tzv. endogenně). Prokázaná interakce nadprodukovaných proteinů totiž ještě nemusí znamenat, že k ní dochází i v buňce za běžných, fyziologických podmínek. Nadprodukované proteiny např. nemusejí mít správnou konformaci, popřípadě se mohou vyskytovat v nesprávných buněčných strukturách.

K imunoprecipitaci endogenních proteinů bylo vyzkoušeno několik postupů buněčné lýze a nakonec se endogenní Daxx podařilo imunoprecipitovat s ATPázou remodelující chromatin Brg1 (viz obr. 8). Tato jejich interakce na endogenní úrovni byla ověřena

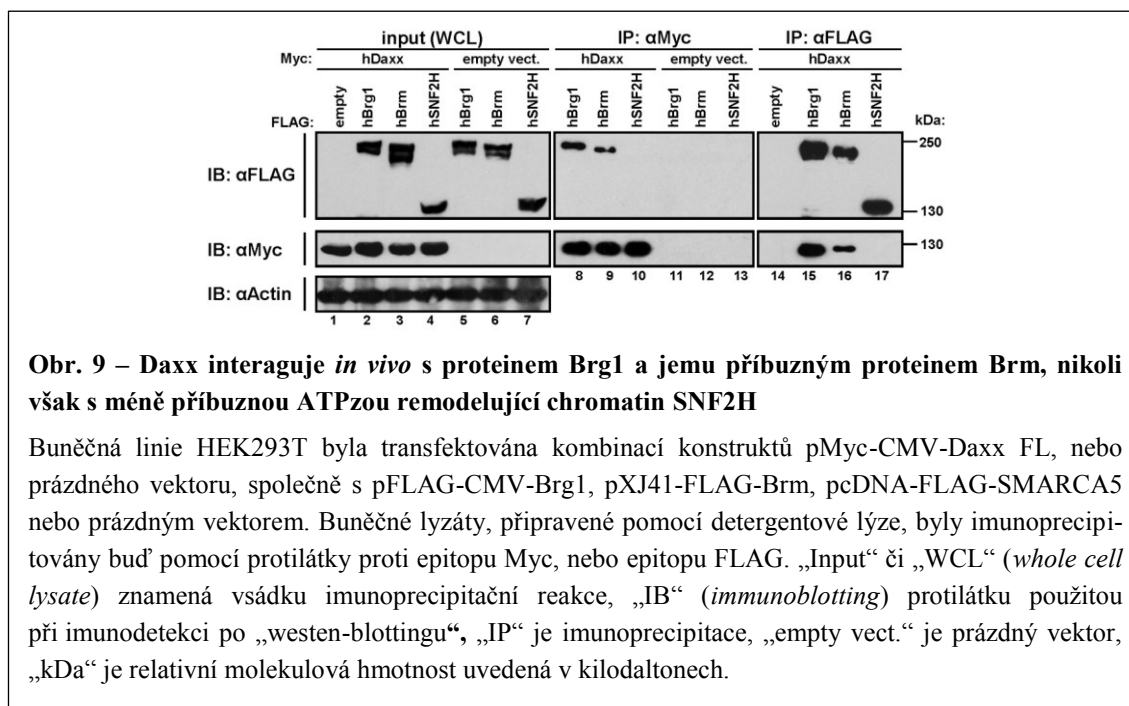




nejen u značně odvozené lidské buněčné linie HEK293T (viz obr. 8a), ale též u linie immortalizovaných lidských primárních epitelových buněk MCF10a (viz obr. 8b) a několika dalších (není ukázáno).

Pro přípravu buněčného lyzátu se nejvíce osvědčila metoda tzv. nativní lýze (viz Metodika, oddíl IX. 1. 1.), při níž je pomocí hypotonického roztoku nejprve připraven lyzáat (frakce) obsahující pouze cytoplazmatické proteiny a poté pomocí hypertonického roztoku lyzována jádra. Tato metoda byla dále optimalizována tak, že byla buněčná jádra dezintegrována pomocí sonikace, což zvýšilo výtěžek jaderných proteinů, a také tím, že byl do lyzačních roztoků přidán dithiothreitol, což zvyšovalo specifitu (není ukázáno). Nativní lýze je zřejmě pro detekci interakce proteinů Daxx a Brg1 nezbytná, protože pokud byly buňky lyzovány v roztocích obsahujících detergenty, tato interakce pozorována nebyla (není ukázáno). Detergenty tedy možná narušují helikální struktury proteinu Daxx, a tím jeho asociaci s některými proteiny potlačují.

Navzdory dalším optimalizacím se nicméně na endogenní úrovni nepodařilo prokázat interakci proteinu Daxx s ostatními vybranými potencionálními interakčními partnery (není ukázáno). Proto byly jejich další analýzy přerušeny. U některých z těchto proteinů



byly sice již mezitím připraveny konstrukty např. pro expresi jejich zkrácených variant (fragmentů), jež by se daly využít k identifikaci jejich částí, které zprostředkovávají interakci s proteinem Daxx, ale tyto proteiny byly i z kapacitních důvodů ponechány v záloze pro případné pozdější experimenty.

Následné analýzy se proto zaměřily na ATPázu remodelující chromatin Brg1, důležitý molekulární nástroj podílející se na mnoha buněčných pochodech spojených s regulací struktury chromatinu [205].

I. 5. Daxx interaguje s ATPázou remodelující chromatin Brg1 a jí příbuzným proteinem Brm

Jak již bylo uvedeno výše, byla interakce proteinů Daxx a Brg1 potvrzena na endogenní úrovni za použití tzv. nativní lýze a následné imunoprecipitace (viz Metodika, oddíl IX. 1. 1. a IX. 2.). U buněčné linie HEK293T byly k imunoprecipitaci použity jak cytoplazmatická, tak jaderná frakce, které byly inkubovány se dvěma různými protilátkami proti proteinu Daxx (Daxx02, Daxx03) nebo s kontrolní, irelevantní protilátkou (anti-AFP). Následná imunodetekce ukázala, že k interakci proteinů Daxx a Brg1 dochází v jádře, jak by bylo možné očekávat u proteinů regulujících strukturu chromatinu (viz obr. 8a, sloupce 6 a 8 v porovnání se sloupci 5 a 7). Pro kontrolu, že byly jaderná a cytoplazmatická frakce od sebe skutečně odděleny, byly při této imunodetekci použity také protilátky proti tubulinu (cytoplazmatický) a histonu-3.3 (jaderný). Společně

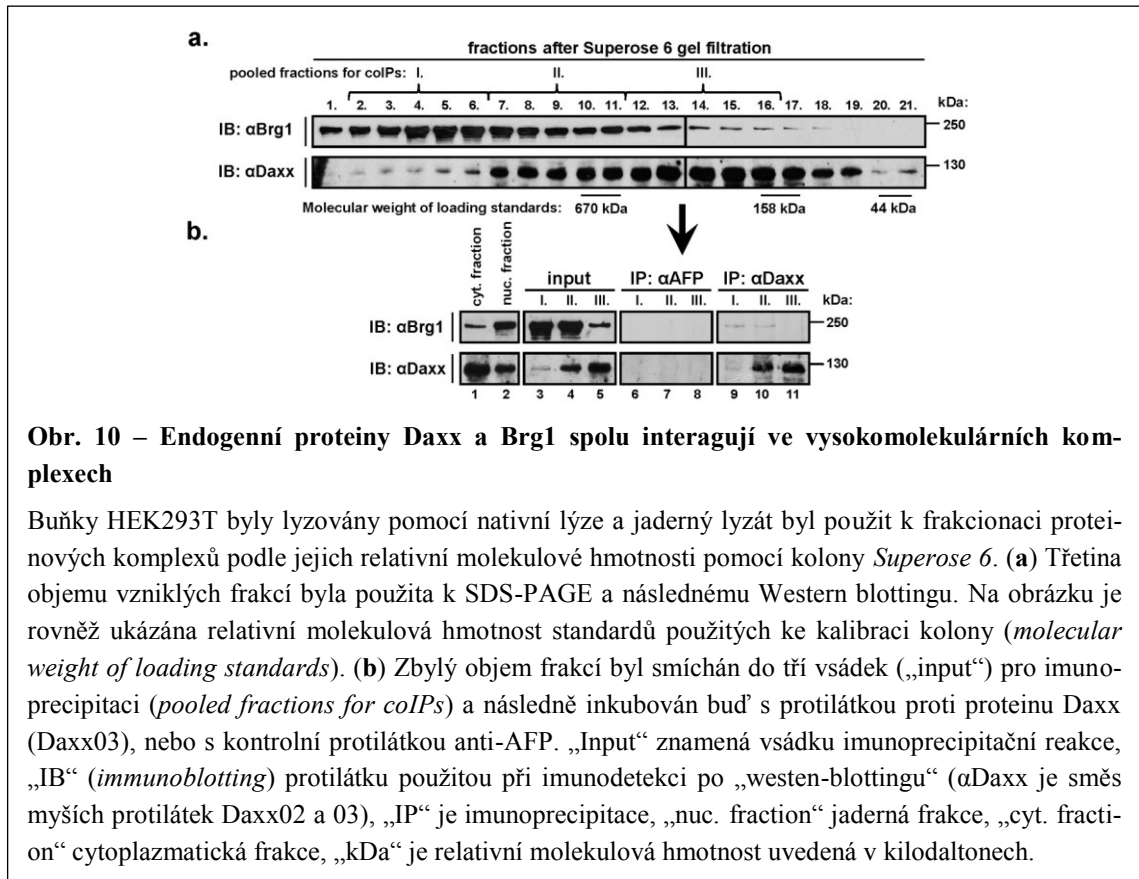
s proteinem Daxx se navíc podařilo imunoprecipitovat rovněž protein BAF155, který je nedílnou součástí proteinového komplexu Brg1 [205]. To naznačovalo, že byly imunoprecipitovány celé proteinové komplexy a nikoli pouze náhodně (uměle) uvolněné proteiny.

Obdobného výsledku bylo dosaženo také po nativní lýzi buněčné linie MCF10a. Zde byla po imunoprecipitaci jaderné frakce s protilátkou proti proteinu Daxx (Daxx03) zjištěna nejen interakce proteinu Daxx s proteinem Brg1, ale také s jemu blízkou příbuznou ATPázou remodelující chromatin Brm (viz obr. 8b, sloupec 4), což dále potvrzovalo fyziologickou relevanci této interakce.

Paralelně s imunoprecipitacemi endogenních proteinů byl také připraven konstrukt pro expresi celého proteinu Brg1 (Brg1 FL), neboť byl při původní imunoprecipitaci nadprodukovaných proteinů použit pouze jeho fragment, obsahující aminokyseliny 264-585 (tzv. „klon 3“), který byl získán v Y2H (viz oddíl II. 3.). Zároveň s ním byly připraveny také konstrukty pro expresi dalších ATPáz remodelujících chromatin, blízkou příbuzného proteinu Brm (Brahma) a méně příbuzného proteinu SNF2H (SMARCA5) (viz Úvod, oddíl III. 4. 2). Těmito nově připravenými konstrukty byly poté v kombinaci s konstruktem pro expresi proteinu Daxx transfektovány buňky HEK293T. Následná imunoprecipitace (viz Metodika, oddíly IX. 1. 2. a IX. 2.) potvrdila, že nadprodukovaný protein Daxx interaguje nejen s proteinem Brg1, ale i s jemu příbuzným Brm, nikoli však se SNF2H (viz obr. 9, sloupce 8, 9, 15 a 16 v porovnání se sloupci 10 a 17). Daxx je tedy interakčním partnerem obou blízkou si příbuzných ATPáz remodelujících chromatin Brg1 i Brm.

I. 6. Daxx a Brg1 spolu interagují v jaderných proteinových komplexech s vyšší relativní molekulovou hmotností

Vzhledem k tomu, že se s proteinem Daxx podařilo imunoprecipitovat rovněž BAF155, podjednotku remodelačního komplexu Brg1 (viz obr. 8b), bylo následně prověřeno, zda spolu Daxx a Brg1 interagují v rámci větších proteinových komplexů. K tomu byla provedena gelová filtrace jaderných lyzátů buněk HEK293T pomocí FPLC s kolonou obsahující polymer *Superose 6* (viz Metodika, oddíl IX. 1. 3.). Při tomto procesu velké proteiny či proteinové komplexy kolonou rychle protečou, zatímco malé jsou zadržovány uvnitř dutin či ve spleti vláken polymeru, a putují tedy pomaleji. Pomocí gelové filtrace lze tedy postupně izolovat proteinové frakce podle velikosti proteinů či jejich komplexů, které obsahují.



Obr. 10 – Endogenní proteiny Daxx a Brg1 spolu interagují ve vysokomolekulárních komplexech

Buňky HEK293T byly lyzovány pomocí nativní lýze a jaderný lyzát byl použit k frakcionaci proteinových komplexů podle jejich relativní molekulové hmotnosti pomocí kolony *Superose 6*. **(a)** Třetina objemu vzniklých frakcí byla použita k SDS-PAGE a následnému Western blottingu. Na obrázku je rovněž ukázána relativní molekulová hmotnost standardů použitých ke kalibraci kolony (*molecular weight of loading standards*). **(b)** Zbylý objem frakcí byl smíchán do tří vsádek („input“) pro imunoprecipitaci (*pooled fractions for coIPs*) a následně inkubován buď s protilátkou proti proteinu Daxx (Daxx03), nebo s kontrolní protilátkou anti-AFP. „Input“ znamená vsádku imunoprecipitační reakce, „IB“ (*immunoblotting*) protilátku použitou při imunodetekci po „westen-blottingu“ (α Daxx je směs myších protilátek Daxx02 a 03), „IP“ je imunoprecipitace, „nuc. fraction“ jaderná frakce, „cyt. fraction“ cytoplazmatická frakce, „kDa“ je relativní molekulová hmotnost uvedená v kilodaltech.

Gelová filtrace ukázala, že se protein Brg1 podle očekávání vyskytuje především ve frakcích odpovídajících vyšší relativní molekulové hmotnosti (více než 670 kDa), v nichž je pravděpodobně asociován s ostatními podjednotkami svého chromatinového remodelačního komplexu (viz obr. 10a, frakce 2. – 11.). Naproti tomu většina proteinu Daxx byla přítomna ve frakcích odpovídajících nižší relativní molekulové hmotnosti (viz obr. 10a, frakce 7. – 17.). Při následné imunoprecipitaci těchto frakcí se nicméně ukázalo, že spolu proteiny Daxx a Brg1 interagují pouze ve frakcích s vyšší relativní molekulovou hmotností (viz obr. 10b). K této imunoprecipitaci, provedené pomocí protilátky proti proteinu Daxx (Daxx03) nebo kontrolní protilátky (anti-AFP), byly použity smíchané frakce 2. – 6. (směs I.), 7. – 11. (směs II.) a 12. – 16. (směs III.), zahuštěné na menší objem s vyšší koncentrací obsažených proteinů pro zvýšení účinnosti imunoprecipitace. Interakce proteinů Daxx a Brg1 byla sice pozorována jak ve směsi I., obsahující frakce odpovídající nejvyšší relativní molekulové hmotnosti, tak ve směsi II. (viz obr. 10b, sloupce 9 a 10), avšak ve směsi I. stačilo k imunoprecipitaci Brg1 podstatně menší množství proteinu Daxx než ve směsi II. To naznačuje, že forma proteinu Daxx, která interaguje s Brg1, je výrazněji zastoupena ve frakcích odpovídajících vyšší relativní molekulové hmotnosti.

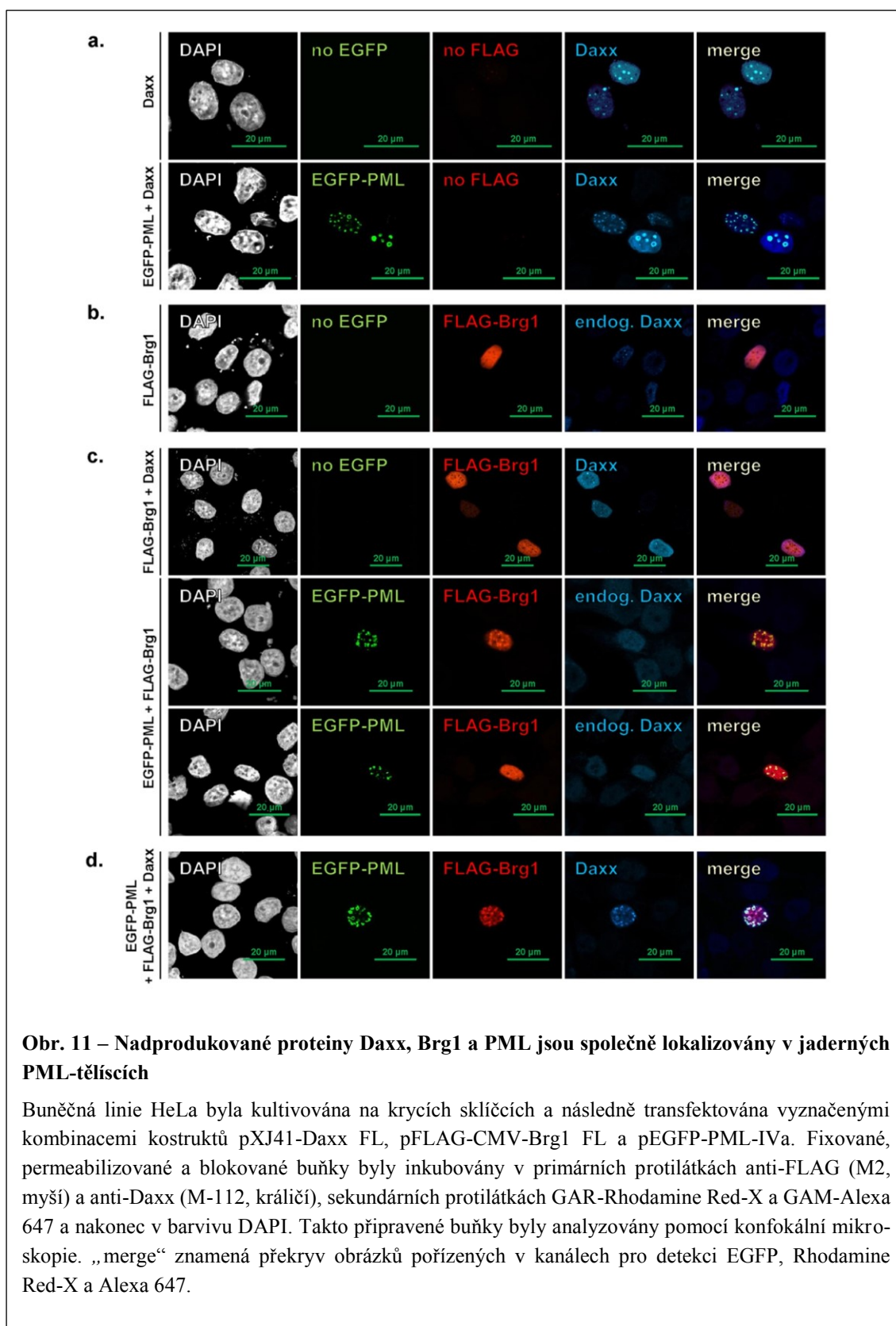
Z výsledků imunoprecipitace i gelové filtrace tedy vyplývá, že Daxx přednostně interaguje s Brg1 vázaným v proteinových komplexech s vyšší relativní molekulovou hmotností.

I. 7. Lokalizace proteinů Daxx a Brg1 v jaderných PML-tělíscích

Dalším ověřením interakce dvou proteinů by rovněž mohla být jejich lokalizace v týchž buněčných strukturách. Ke sledování lokalizace proteinů Daxx a Brg1 v transfektované buněčné linii HeLa byla využita konfokální mikroskopie (viz Metodika, oddíl XII.). Při ní se však ukázalo, že je protein Brg1 v jádře rozptýlen zcela volně a žádné zřetelnější struktury netvoří (viz obr. 11b). K této konfokální mikroskopii byl použit nadprodukovaný protein Brg1 s afinitní kotvou FLAG, neboť nebyla k dispozici vhodná protilátka, která by dobře vážala endogenní protein v jeho nativní formě a zároveň nevytvářela příliš výrazné nespecifické pozadí.

Oproti proteinu Brg1 je sice Daxx také volně rozptýlen v jádře, ale mimo to zde vytváří zřetelné bodové útvary (viz obr. 11a, vrchní řádek). Pravděpodobně se jedná o PML-tělíska, neboť je známo, že je Daxx jejich součástí [6] (viz též Úvod, oddíl III.). To dokládá i společná nadprodukce PML a proteinu Daxx, při níž se oba proteiny nacházely v týchž bodových útvarech (viz obr. 11a, spodní řádek).

Protože byla v PML-tělíscích již dříve nalezena ATPáza remodelující chromatin ATRX, jejíž vazbu do těchto tělísek zprostředkovává právě Daxx [37, 207], bylo následně ověřeno, zda není v PML-tělíscích přítomen také Brg1. Společná nadprodukce proteinů Daxx a Brg1 v buněčné linii HeLa neměla na distribuci Brg1 žádný vliv, ale u proteinu Daxx byl pozorován menší počet bodových útvarů, což mohlo být způsobeno tím, že byl Daxx vyvazován proteinem Brg1, a méně se ho tedy vázalo do PML-tělísk (viz obr. 11c, vrchní řádek). Pokud byl však s proteinem Brg1 zároveň nadprodukován PML, v některých buňkách byl Brg1 zřetelně lokalizován v PML-tělíscích, zatímco v jiných zůstával volně rozptýlen v jádře (viz obr. 11c, prostřední a spodní řádek). Po společné nadprodukci proteinů Daxx, Brg1 a PML počet buněk, v nich se Brg1 nacházel v PML-tělíscích, dále vzrostl a naopak zřetelně ubylo buněk, v nichž byl Brg1 v jádře volně rozptýlen (viz obr. 11d). To naznačuje, že je, podobně jako v případě ATRX, protein Brg1 vázán do PML-tělísk prostřednictvím proteinu Daxx. Přítomnost Brg1 v PML tělíscích bez nadprodukce proteinu Daxx by pak bylo možné vysvětlit jeho vazbou přes endogenní Daxx, a proto byl také v těchto buňkách protein Brg1 asociován



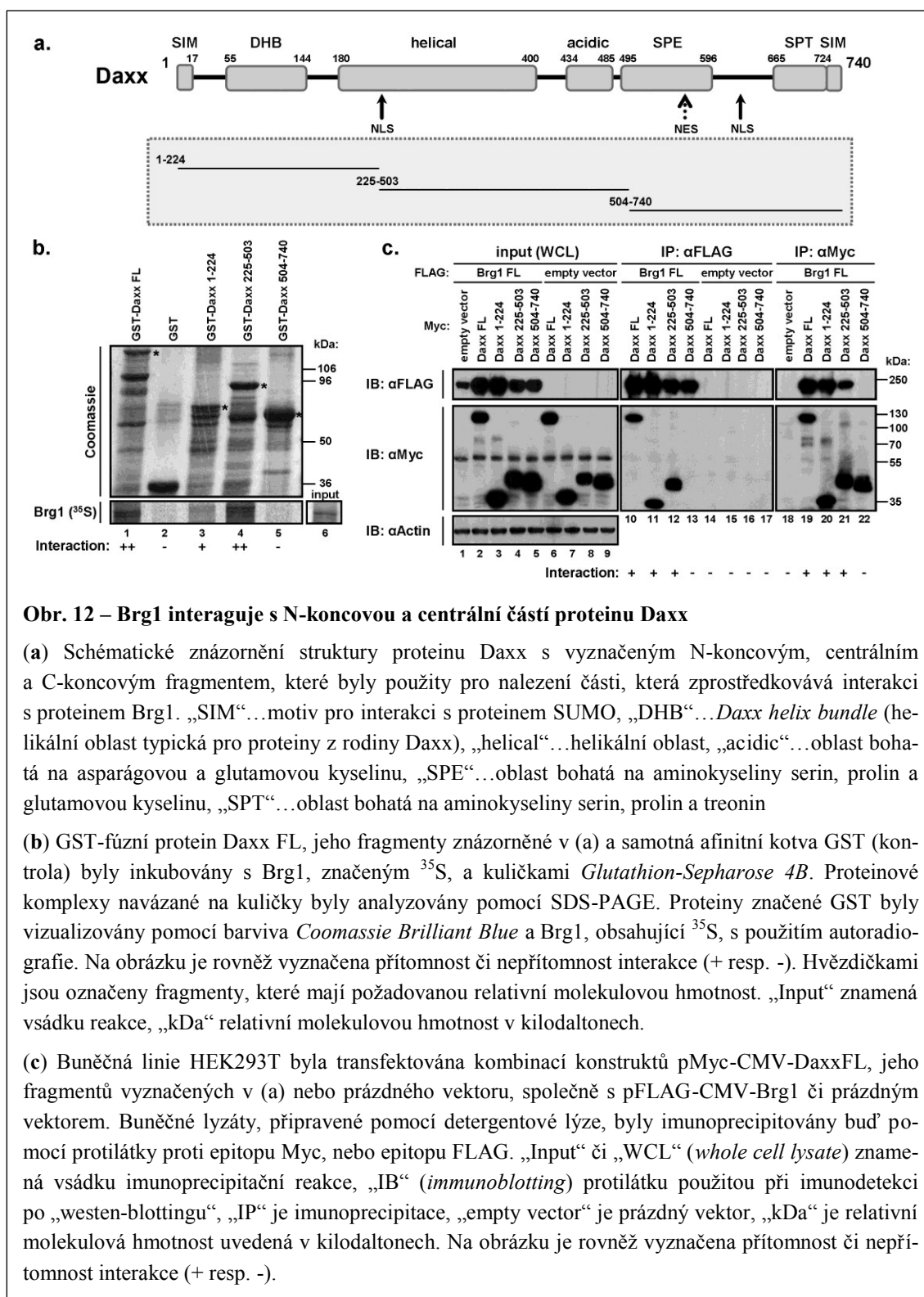
PML-tělísky méně často. Výsledky konfokální mikroskopie tedy podpořily výsledky imunoprecipitace nadprodukovaných proteinů.

I. 8. Vazbu s Brg1 zprostředkovává více částí proteinu Daxx

Po potvrzení interakce mezi proteiny Daxx a Brg1 se další analýzy zaměřily na identifikaci částí obou proteinů, jež ji zprostředkovávají. První takovéto mapování bylo provedeno již v Y2H, kde byly vedle mutanty proteinu Daxx, která obsahovala aminokyseliny 1-595 a byla použita v původním vyhledání potenciálních interakčních partnerů proteinu Daxx (viz oddíl I. 1.), připraveny zkrácené mutanty 1-224 a 1-503 a za použití párování kvasinek (viz Metodika, oddíl V. 2. 3.) zkoumána jejich interakce s fragmentem Brg1 získaným v Y2H (tzv. „klon #3“, obsahující aminokyseliny 264-585, viz oddíl I. 2.). Toto párování kvasinek ukázalo, že s Brg1-„klonem #3“ interagovaly všechny použité fragmenty proteinu Daxx (tj. FL, 1-595, 1-503 a 1-224), což by naznačovalo, že se oblast pro interakci s Brg1 nachází v N-koncové části, zahrnující aminokyseliny 1-224 (není ukázáno).

Pro lepší lokalizaci této interakční oblasti byly následně připraveny konstrukty pro expresi různých fragmentů proteinu Daxx v savčích buňkách (rozsah některých z nich se vzájemně překrýval). Tyto fragmenty byly nadprodukovány s Brg1 FL v buněčné linii HEK293T a poté imunoprecipitovány (viz Metodika, oddíl IX. 1. 2. a IX. 2.). Imunoprecipitace byly provedeny opakovaně a se stále širším spektrem fragmentů proteinu Daxx, které byly postupně připravovány. Výsledek byl však stále tentýž – všechny použité fragmenty proteinu Daxx interagovaly s Brg1 s výjimkou C-koncového fragmentu, který obsahuje aminokyseliny 504-740. Právě v této oblasti je popsána přibližně polovina interakcí proteinu Daxx s ostatními proteiny (viz Úvod, obr. 1), a proto také byla z fragmentu použitého v Y2H ke hledání nových potencionálních interakčních partnerů odstraněna (viz oddíl I. 1.). Bylo tedy možné očekávat, že tato část proteinu Daxx s Brg1 interagovat nebude.

Výsledky všech provedených imunoprecipitací nejsou ukázány, pro větší názornost byla vybrána imunoprecipitace s fragmenty pokrývajícími přibližně první, druhou a třetí třetinu proteinu Daxx (viz obr. 12a), které byly nadprodukovány společně s celým proteinem Brg1 (FL). Jak je zřejmé, s proteinem Brg1 opět interagoval celý protein Daxx (FL) a dále nejen první třetina proteinu Daxx (aminokyseliny 1-224), nýbrž i druhá třetina (aminokyseliny 225-503). Naproti tomu C-koncový fragment (aminokyseliny



Obr. 12 – Brg1 interaguje s N-koncovou a centrální částí proteinu Daxx

(a) Schématické znázornění struktury proteinu Daxx s vyznačeným N-koncovým, centrálním a C-koncovým fragmentem, které byly použity pro nalezení části, která zprostředkovává interakci s proteinem Brg1. „SIM“...motiv pro interakci s proteinem SUMO, „DHB“...*Daxx helix bundle* (helikální oblast typická pro proteiny z rodiny Daxx), „helical“...helikální oblast, „acidic“...oblast bohatá na asparágovou a glutamovou kyselinu, „SPE“...oblast bohatá na aminokyseliny serin, prolin a glutamovou kyselinu, „SPT“...oblast bohatá na aminokyseliny serin, prolin a treonin

(b) GST-fúzní protein Daxx FL, jeho fragmenty znázorněné v (a) a samotná afinitní kotva GST (kontrola) byly inkubovány s Brg1, značeným ^{35}S , a kuličkami *Glutathion-Sepharose 4B*. Proteinové komplexy navázané na kuličky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Proteiny značené GST byly vizualizovány pomocí barviva *Coomassie Brilliant Blue* a Brg1, obsahující ^{35}S , s použitím autoradiografie. Na obrázku je rovněž vyznačena přítomnost či nepřítomnost interakce (+ resp. -). Hvězdičkami jsou označeny fragmenty, které mají požadovanou relativní molekulovou hmotnost. „Input“ znamená vsádku reakce, „kDa“ relativní molekulovou hmotnost v kilodaltech.

(c) Buněčná linie HEK293T byla transfektována kombinací konstruktů pMyc-CMV-DaxxFL, jeho fragmentů vyznačených v (a) nebo prázdného vektoru, společně s pFLAG-CMV-Brg1 či prázdným vektorem. Buněčné lyzáty, připravené pomocí detergentové lýze, byly imunoprecipitovány buď pomocí protilátky proti epitopu Myc, nebo epitopu FLAG. „Input“ či „WCL“ (*whole cell lysate*) znamená vsádku imunoprecipitační reakce, „IB“ (*immunoblotting*) protilátku použitou při imunodetekci po „western-blottingu“, „IP“ je imunoprecipitace, „empty vector“ je prázdný vektor, „kDa“ je relativní molekulová hmotnost uvedená v kilodaltech. Na obrázku je rovněž vyznačena přítomnost či nepřítomnost interakce (+ resp. -).

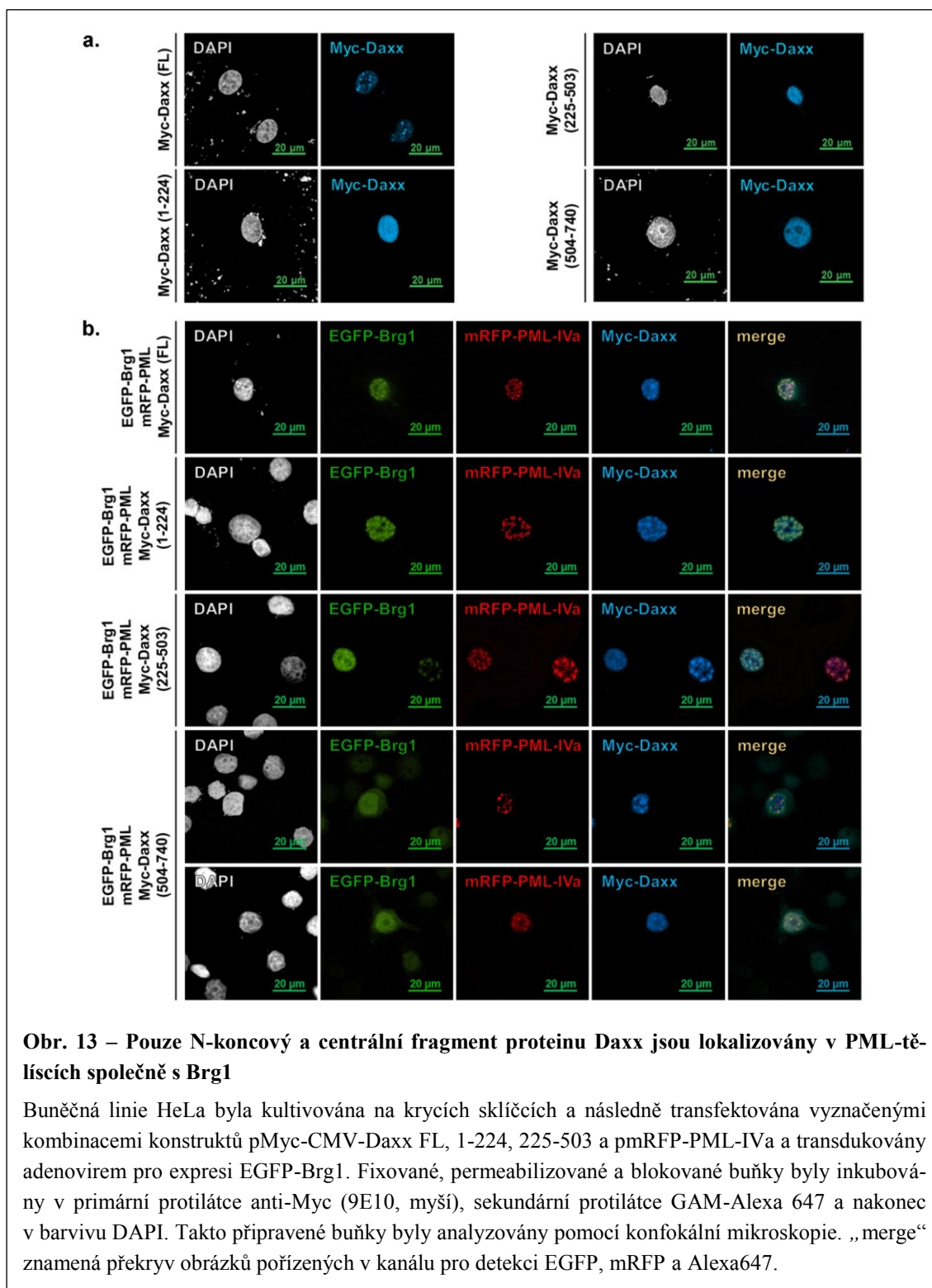
504-740) ve shodě s předchozími experimenty neinteragoval (viz obr. 12c, sloupce 10, 11, 12 a 19, 20, 21 v porovnání se sloupci 13 a 22).

To, že C-koncový fragment proteinu Daxx neinteraguje s Brg1, přitom není způsobeno tím, že by se tento fragment špatně dostával do jádra. K fragmentům obsahujícím ami-

nokyseliny 1-224 a 225-503 byl při jejich přípravě uměle připojen jaderný lokalizační signál z velkého T-antigenu viru SV40 a fragment 504-740 obsahuje vlastní jaderný lokalizační signál proteinu Daxx [9]. Jaderná lokalizace všech použitých fragmentů proteinu Daxx byla potvrzena i za pomoci konfokální mikroskopie (viz obr. 13a).

Pro ověření výsledku imunoprecipitací byl ještě proveden tzv. „GST-pulldown“ (viz Metodika, oddíl VIII.). Fragменты proteinu Daxx, které byly použity při imunoprecipitaci, byly nejprve vloženy do standardního vektoru pET42b (*Clontech*), obsahujícího sekvence pro N-koncovou afinitní kotvu GST a N- i C-koncovou afinitní kotvu 6xHis. Proteiny, produkované v bakteriálním systému, byly izolovány pomocí TALONu přes afinitní kotvu 6xHis a poté inkubovány s kuličkami *Glutathion-Sepharose 4B*. Následná SDS-PAGE spojená s vizualizací GST-fúzních proteinů pomocí barviva *Coomassie Brilliant Blue* však ukázala, že jsou ve směsi purifikovaných proteinů přítomny nejen GST-fúzní fragmenty proteinu Daxx s očekávanou relativní molekulovou hmotností, ale též několik fragmentů menších. To mohla být buď kontaminace bakteriálními proteiny, nebo degradační produkty samotného proteinu Daxx, izolované pomocí N-koncové afinitní kotvy 6xHis a následně N-koncové kotvy GST. Druhé možnosti by nasvědčovalo i to, že se tyto fragmenty nepodařilo eliminovat ani s použitím důkladnějších metod k omytí TALONu i glutathion-sepharózy (není ukázáno). Proto byl z vektoru pET42b připraven nový vektor, nazvaný pGTH, v němž byla N-koncová afinitní kotva 6xHis odstraněna, a do tohoto vektoru poté vloženy fragmenty proteinu Daxx. Izolace přes C-koncovou afinitní kotvu 6xHis a poté přes N-koncovou kotvu GST měla zajistit, že se budou izolovat pouze požadované fragmenty, nikoli degradační produkty. Následná SDS-PAGE však ukázala, že se sice poněkud přibýlo fragmentů proteinu Daxx s očekávanou relativní molekulovou hmotností, ale menší fragmenty se odstranit nepodařilo (viz obr. 12b). Buď se tedy opravdu jedná o kontaminaci bakteriálními proteiny (např. silně navázanými chaperony, které se uvolní až při denaturaci za použití SDS a teploty 95 °C), nebo jsou degradační produkty proteinu Daxx schopné oligomerizace.

Protože se nakonec nežádoucí fragmenty kontaminující izolované GST-fúzní proteiny odstranit nepodařilo, byly tyto proteiny zředěny tak, aby fragmenty s očekávanou relativní molekulovou hmotností měly přibližně stejnou koncentraci, a ty poté byly inkubovány s Brg1, značeným ³⁵S, a kuličkami glutathion-sepharózy. Následná analýza interakce mezi GST-značenými proteiny a Brg1 potvrdila výsledek imunoprecipitace.



S Brg1 opět interagoval celý protein Daxx (FL) a nejen jeho N-koncový fragment, nýbrž i centrální, zatímco C-koncový fragment neinteragoval (viz obr. 12b, sloupce 1, 3 a 4 v porovnání se sloupcem 5).

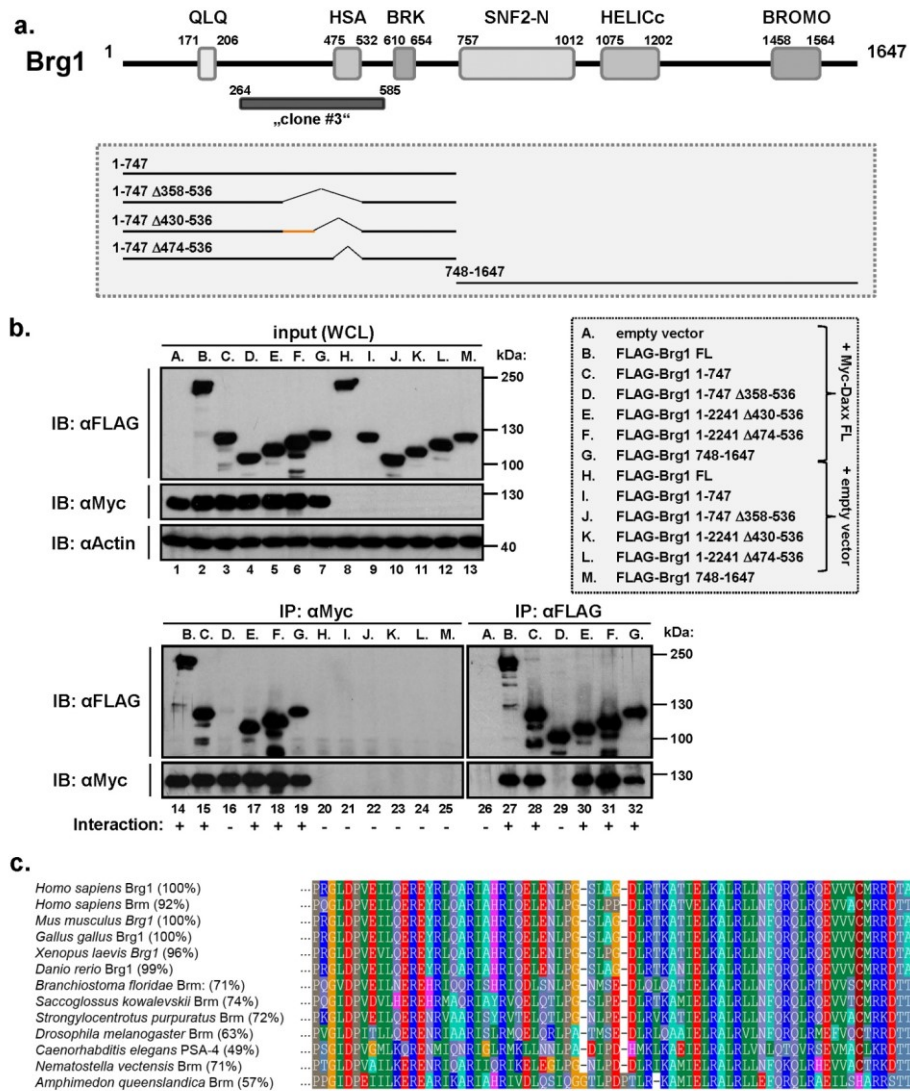
Výsledky imunoprecipitace a „GST-pulldownu“ potvrdila i konfokální mikroskopie (viz Metodika, oddíl XII.). V buněčné linii HeLa byly nadprodukovány proteiny PML-IVa, Brg1 a Daxx FL a jeho fragmenty použité při imunoprecipitaci a „GST-pulldownu“. Následná konfokální mikroskopie ukázala, že jsou všechny použité části proteinu Daxx přítomny v jaderných těliscích tvořených nadprodukováným proteinem PML-IVa, včetně fragmentu obsahujícího aminokyseliny 225-503, který postrádá SUMO-vazebný motiv (viz obr. 13b). Brg1 však bylo možné nalézt v PML-těliscích pouze po nadprodukcí celého proteinu Daxx (FL) a jeho N-koncové či centrální části a naopak se v nich Brg1 prakticky nevyskytoval po nadprodukcí C-koncové části proteinu Daxx (viz obr. 13b, 1., 2. a 3. řádek v porovnání se spodními dvěma řádky).

Z imunoprecipitací, „GST-pulldownů“ i konfokální mikroskopie tedy vyplývá, že existuje více částí proteinu Daxx, které zprostředkovávají interakci s Brg1, a tyto části se nacházejí v N-koncové a centrální části, která je evolučně více konzervována a obsahuje několik helikálních motivů (viz obr. 12a) [8].

I. 9. Vazbu proteinu Daxx také zprostředkovává více částí proteinu Brg1

Obdobně jako u proteinu Daxx byla hledána také oblast Brg1, která zprostředkovává interakci obou proteinů. I v tomto případě byly připraveny různé konstrukty pro expresi v savčích buňkách, které byly nadprodukovány společně s celým proteinem Daxx (FL) a následně imunoprecipitovány (viz Metodika, oddíl IX. 1. 2. a IX. 2.). U Brg1 ale nebyly produkovány jeho jednotlivé fragmenty, neboť v původním Y2H (viz oddíl I. 1.) nebyl získán celý protein, nýbrž pouze „klon #3“, obsahující aminokyseliny 264-585. Proto byly připraveny různé delece kompletního proteinu (aminokyseliny 1-1647) v oblasti „klonu #3“. Všechny takto připravené mutanty však s proteinem Daxx interagovaly, dokonce i mutanta, která oblast „klonu #3“ zcela postrádala (není ukázáno).

Uvedené výsledky naznačovaly, že v Brg1 existuje ještě jedna oblast, která zprostředkovává interakci s proteinem Daxx. Proto byly následně připraveny konstrukty pro expresi buď N-koncové (aminokyseliny 1-747), nebo C-koncové (aminokyseliny 748-1647) poloviny Brg1, a tyto fragmenty byly poté imunoprecipitovány s celým proteinem Daxx (FL). Imunoprecipitace jasně ukázala, že obě poloviny jsou schopny s proteinem Daxx interagovat (viz obr. 14b, sloupce 15, 19, 28 a 32), a že tedy také v Brg1, podobně jako u proteinu Daxx, existuje více oblastí, které zprostředkovávají interakci obou proteinů.



Obr. 14 – Brg1 obsahuje více oblastí zprostředkávajících interakci s proteinem Daxx

(a) Schématické znázornění struktury proteinu Brg1 (podle internetové aplikace *Entrez BLAST*) s vyznačeným fragmentem získaným v Y2H při vyhledávání potencionálních interakčních partnerů proteinu Daxx (tzv. „klon #3“). Na obrázku jsou dále znázorněny mutanty proteinu Brg1 použité při identifikaci oblasti, která zprostředkovává interakci s proteinem Daxx (předpokládaná N-koncová oblast je vyznačena oranžově). QLQ...oblast obsahující motiv glutamin/leucin/glutamin, HSA...*helicase/SANT-associated domain* (doména zprostředkávající protein-proteinové interakce), BRK...*BRM and KIS domain* (doména zprostředkávající protein-proteinové interakce), „SNF2-N“+„HELICc“...vlastní ATPázová doména, „BROMO“...BROMO-doména (doména zprostředkávající mj. vazbu acetylovaných histonů)

(b) Buněčná linie HEK293T byla transfektována kombinací konstruktů pMyc-CMV-Daxx FL nebo prázdného vektoru společně s pFLAG-CMV-Brg1 FL, jeho mutanty vyznačenými v (a) či prázdným vektorem. Buněčné lyzáty, připravené pomocí detergentové lýze, byly imunoprecipitovány buď pomocí protilátky proti epitopu Myc, nebo epitopu FLAG. „Input“ či „WCL“ (*whole cell lysate*) znamená vsádku imunoprecipitační reakce, „IB“ (*immunoblotting*) protilátku použitou při imunodetekci po „westen-blottingu“, „IP“ je imunoprecipitace, „empty vector“ je prázdný vektor, „kDa“ je relativní molekulová hmotnost uvedená v kilodaltech. Na obrázku je rovněž vyznačena přítomnost či nepřítomnost interakce (+ resp. -).

(c) Srovnání ukazující, že je identifikovaná oblast proteinu Brg1, která zprostředkovává interakci s proteinem Daxx, evolučně vysoce konzervovaná. Analýza byla provedena pomocí softwaru *BioEdit Alignment Editor*.

Vzhledem k velikosti proteinu Brg1 již nebyla interakční oblast nacházející se v jeho C-koncové polovině přesně lokalizována a další analýzy se zaměřily na důkladnější vymezení interakční oblasti nacházející se uvnitř sekvence „klonu #3“. V N-koncové polovině Brg1 byly proto připraveny deleční mutanty cílené dovnitř „klonu #3“, a tyto mutanty byly následně imunoprecipitovány s celým proteinem Daxx (FL). Při imunoprecipitaci bylo zjištěno, že zatímco ještě mutanta s delecí aminokyselin 430-536 s proteinem Daxx interaguje, mutanta s delecí aminokyselin 358-536 již nikoli (viz obr. 14b, sloupce 17 a 30 v porovnání se sloupci 16 a 29). N-koncová interakční oblast proteinu Brg1 tedy musí být vymezena aminokyselinami 358-430 (viz obr. 14a, oranžová úsečka). Srovnání sekvencí s odpovídající oblastí lidského proteinu Brm a týchž oblastí proteinů homologních s Brg1 u dalších živočišných druhů (od žahavců po myš) ukázalo, že je tato oblast evolučně vysoce konzervována (viz obr. 14c).




I. 10. Celogenomová analýza exprese genů regulovaných proteiny Daxx a Brg1

Kromě analýzy interakce proteinů Daxx a Brg1 byla zjišťována také její možná funkce. Její hledání vycházelo z předpokladu, že jak Daxx, tak Brg1 regulují transkripci některých genů, a mohly by tedy existovat geny, které oba proteiny regulují společně.

K nalezení takovýchto genů byla použita metoda tzv. DNA-čipu (*microarray*), umožňující porovnávat expresi širokého spektra genů za různých podmínek. Vyhledání genů regulovaných proteiny Daxx a Brg1 bylo provedeno u buněčné linie immortalizovaných epitelových buněk prsní žlázy MCF10a, která byla transdukována konstrukty pro produkci shRNA. Jednak to byl kontrolní plazmid (prázdný vektor), jednak plazmidy produkující vlásenky snižující expresi proteinu Daxx (vlásenky shDaxx #3 nebo shDaxx #6) či Brg1 (shBrg1 #2 nebo shBrg1 #5). U takto připravených buněk byla poté pomocí metody DNA-čipu porovnáována celková genová exprese (viz Metodika, odíl X.).

Ze získaného souboru genů, jejichž exprese se u jednotlivých transduktantů lišila, bylo k dalším analýzám vybráno 50 genů. Jednalo se o ty geny, jejichž exprese se v porovnání s kontrolou u všech vlásenek pro snížení exprese proteinů Daxx a Brg1 buď snižovala, anebo zvyšovala. Seznam těchto genů je uveden v tab. 5, v níž je také vyznačeno, zda se jejich exprese oproti kontrole zvýšila, anebo snížila.

Gen	ID	Název genu	DNA-čip	qRT-PCR				
				shDaxx #3	shDaxx #6	shBrg1 #2	shBrg1 #4	shBrg1 #5
ABCA1	19	ATP binding cassette subfamily A member 1						
ABLM2	84448	actin binding LIM protein family member 2						
ACSS1	84532	acyl-CoA synthetase short-chain family member						
ALDH1A3	220	aldehyde dehydrogenase 1 family member A3						
BMF	90427	Bcl2 modifying factor						
C1orf97	84791	long intergenic non-protein coding RNA 467						
CCND2	894	cyclin D2						
CCNE1	898	cyclin E1						
CCNF	899	cyclin F						
CST6	1474	cystatin E/M						
CYP4B1	1580	cytochrome P450 family 4 subfamily B member 1						
ETNK2	55224	ethanolamine kinase 2						
FABP5	2171	fatty acid binding protein 5						
FBXO32	114907	F-box protein 32						
FGFBP1	9982	fibroblast growth factor binding protein 1						
HMGA1	3159	high mobility group AT-hook 1						
IFI6	2537	interferon, alpha-inducible protein 6						
IFI27	3429	interferon, alpha-inducible protein 27						
IFI35	3430	interferon induced protein 35						
IFI44	10561	interferon induced protein 44						
IFI44L	10964	interferon induced protein 44 like						
IFIH1	64135	interferon induced, with helicase C domain 1						
IFIT1	3434	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1						
IFIT2	3433	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2						
IFIT3	3437	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3						
IL1RL1	9173	interleukin 1 receptor-like 1						
IRF7	3665	interferon regulatory factor 7						
ISG20	3669	interferon stimulated exonuclease gene 20 kDa						
ITPKA	3706	inositol-trisphosphate 3-kinase A						
KITLG	4254	KIT ligand						
LIPG	9388	lipase, endothelial						
MCM6	4175	minichromosome maintenance complex component 6						
MEIS1	4211	Meis homeobox 1						
MELK	9833	maternal embryonic leucine zipper kinase						
MLLT11	10962	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 11						
NQO1	1728	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1						
OPN3	23596	opsin 3						
PRODH	5625	proline dehydrogenase (oxidase) 1						
S100A2	6273	S100 calcium binding protein A2						
S100A3	6274	S100 calcium binding protein A3						
SCEL	8796	sciellin						
SDC1	6382	syndecan 1						
SERPINB7	8710	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7						
SFN	2810	stratifin						
SNCAIP	9627	synuclein alpha interacting protein						
SOX15	6665	SRY-box 15						
SPINK6	404203	serine peptidase inhibitor, Kazal type 6						
TRIP13	9319	thyroid hormone receptor interactor 13						
TUBA1B	10376	tubulin alpha 1b						
ZBTB16	7704	zinc finger and BTB domain containing 16						

 zvýšení exprese oproti kontrole
 snížení exprese oproti kontrole
 žádná změna exprese

Tab. 5 – Analýza genů potenciálně regulovaných proteiny Daxx a Brg1 v buněčné linii MCF10a, které byly nalezeny pomocí celogenomové analýzy změn genové exprese

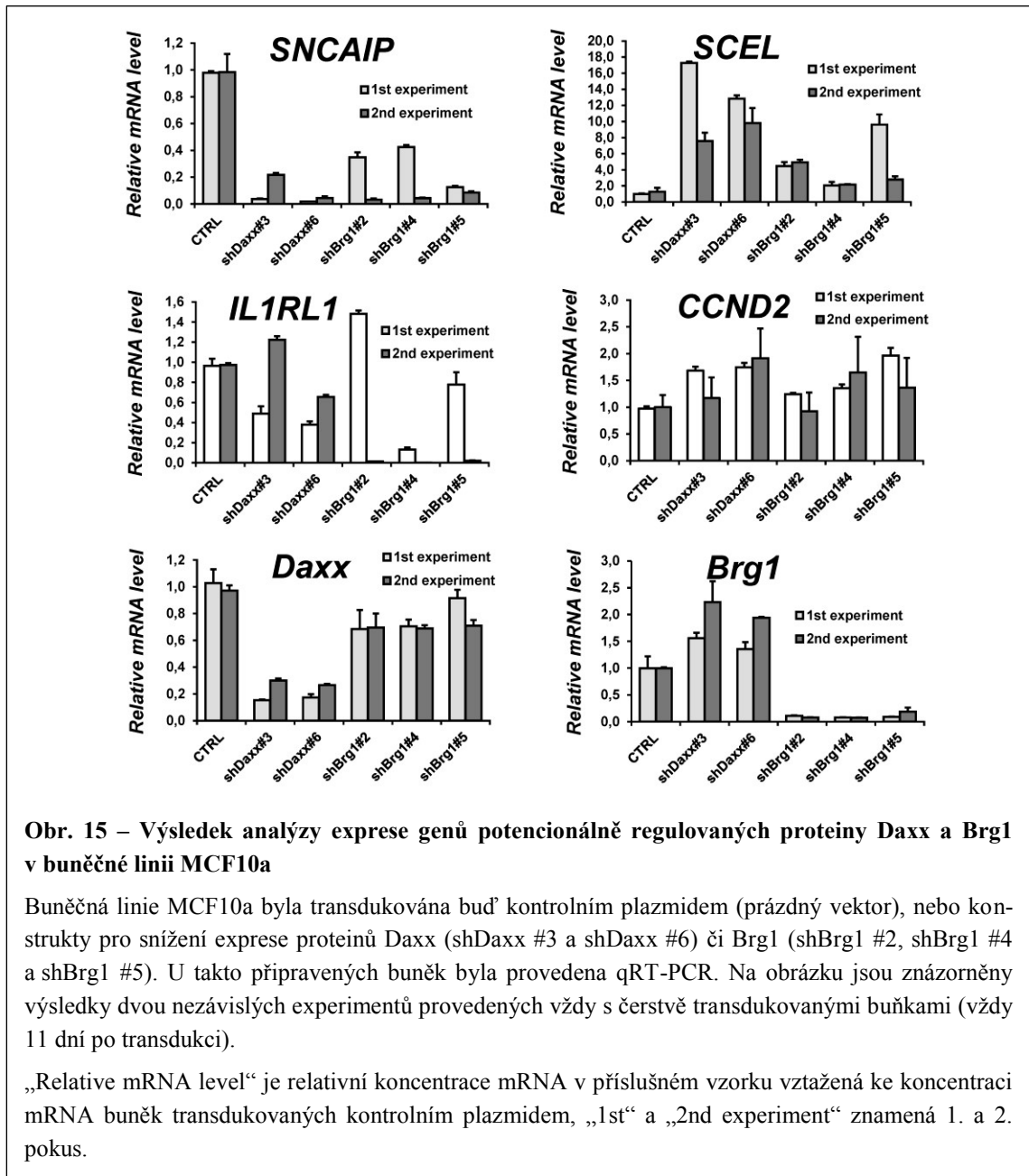
Tab. 5 – Analýza genů potencionálně regulovaných proteiny Daxx a Brg1 v buněčné linii MCF10a, které byly nalezeny pomocí celogenomové analýzy změn genové exprese

V levé části tabulky je uveden seznam genů, které byly vybrány k dalším analýzám po celogenomovém vyhledání genů regulovaných proteiny Daxx a Brg1 pomocí metody DNA-čipu, jejich identifikační čísla v databázi *Entrez Gene* a význam jejich zkratk. V dalším sloupci je barevně vyznačeno, zda po snížení exprese proteinu Daxx nebo Brg1 v DNA-čipu transkripce příslušného genu vzrostla (zeleně), anebo poklesla (červeně). V posledním sloupci je znázorněn výsledek analýzy exprese vybraných genů pomocí qRT-PCR (je-li u příslušného genu vyznačeno více řádků, znamená to, že u něho byla qRT-PCR provedena opakovaně, s nově transdukovanými buňkami). K této analýze byla, stejně jako u metody DNA-čipu, použita buněčná linie MCF10a, transdukovaná buď kontrolním plazmidem, anebo konstrukty k produkci uvedených vlásenek shRNA pro snížení exprese proteinu Daxx nebo Brg1. V tabulce je vyznačeno, zda se u příslušného transduktantu s nižší expresí proteinu Daxx nebo Brg1 transkripce vybraného genu oproti kontrole zvýšila (zeleně), snížila (červeně), případně zda zůstala beze změny (žlutě).

Výsledek celogenomové analýzy změn genové exprese byl poté ověřován pomocí qRT-PCR (viz Metodika, oddíl XI.). K ní byla použita buněčná linie MCF10a, která byla opět transdukována buď kontrolním plazmidem, anebo konstrukty pro snížení exprese proteinu Daxx či Brg1. Výsledek této qRT-PCR, tj. zda byla u jednotlivých transduktantů exprese příslušného genu v porovnání s kontrolou snížena, zvýšena, případně zda zůstala beze změny, je také vyznačen v tab. 5. V prvním experimentu byly takto analyzovány všechny vybrané geny a u těch, kde se výsledek shodoval s výsledkem celogenomové analýzy změn genové exprese, byla qRT-PCR ještě nejméně jedenkrát zopakována s použitím nově transdukovaných buněk.

Analýza pomocí qRT-PCR ukázala, že se u naprosté většiny vybraných genů potencionálně regulovaných proteiny Daxx a Brg1 jednalo o falešně pozitivní výsledek celogenomové analýzy změn genové exprese. Např. exprese genů podílejících se na regulaci buněčného cyklu (cyklin-D, cyklin-E, MCM6) pravděpodobně závisela spíše na kulturačních podmínkách buněk a nikoli na proteinech Daxx či Brg1. Obdobně též zvýšená exprese některých genů regulovaných interferony (IRF7, ISG20 a geny, jejichž zkratka v tab. 5 začíná písmeny IFI) byla pravděpodobně způsobena samotnou transdukcí, která spustila antivirovou odpověď. Jediným genem, jehož transkripce byla reprodukovatelně ovlivněna snížením exprese jak proteinu Daxx, tak Brg1, tak nakonec zůstal SNCAIP.

Výsledek qRT-PCR je znázorněn i na obr. 15. Na něm jsou pro ilustraci ukázány výsledky dvou nezávislých experimentů (s využitím pokaždé nově transdukované buněčné linie MCF10a). U genu SCEL (Sciellin) je vidět, že zatímco v prvním pokusu jeho exprese vzrostla u všech shRNA proti proteinům Daxx a Brg1, ve druhém pokusu byl její nárůst zřetelný pouze u obou shRNA proti proteinu Daxx a jedné shRNA proti Brg1.



U dalších dvou shRNA proti Brg1 exprese Sciellinu vzostla pouze nepatrně. V případě regulace exprese Sciellinu tedy nelze vyloučit, že se u Brg1 jedná pouze o nespecifický účinek shRNA. U cyklinu-D2 je poté obtížné rozhodnout, zda má snížení hladiny proteinu Daxx či Brg1 na jeho expresi jakýkoli vliv a u genu IL1RL1 je zřejmé, že na míru jeho exprese výrazněji působí jiné vlivy. Jediným genem, který je reprodukovatelně regulován jak proteinem Daxx, tak Brg1, je SNCAIP, jehož exprese klesá, jestliže je hladina obou proteinů v buněčné linii MCF10a snížena.

I. 11. Identifikace genů, které jsou v buněčné linii MCF10a regulovány proteinem Daxx

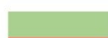


Z tab. 5 je patrné, že ověření výsledků celogenomové analýzy genové exprese pomocí qRT-PCR nebylo úspěšné především u buněk, v nichž byla snížena exprese proteinu Brg1. Změna exprese vybraných genů závisela spíše na kultivačních podmínkách, případně zůstávala víceméně beze změny. Naproti tomu snížení exprese proteinu Daxx výsledek celogenomové analýzy změn genové exprese u některých genů potvrzovalo.

Na základě tohoto zjištění bylo proto výsledků DNA-čipu využito také k identifikaci genů, které v buněčné linii MCF10a reguluje samotný protein Daxx (bez účasti Brg1). V tab. 6 je uveden seznam vybraných genů, jejichž exprese byla opět ověřována pomocí qRT-PCR (obdobně jako v tab. 5 je vyznačeno, zda se exprese těchto genů po snížení hladiny proteinu Daxx oproti kontrole snížila či zvýšila). K této analýze byla znovu využívána buněčná linie MCF10a, transdukovaná buď kontrolním plazmidem, anebo konstrukty produkujícími shRNA pro snížení exprese proteinu Daxx (shDaxx #3 a shDaxx #6). První qRT-PCR byla opět provedena u všech vybraných genů a následně byla u těch, kde dopadla slibně, alespoň jedenkrát zopakována (vždy s nově transdukovanými buňkami). Výsledek analýzy je uveden v tab. 6 a u některých genů též pro ilustraci na obr. 16 (zde je opět uveden výsledek dvou nezávislých pokusů).

Jak je zřejmé, výsledek DNA-čipu se u několika genů podařilo reprodukovatelně potvrdit. Snížení hladiny proteinu Daxx v buněčné linii MCF10a způsobilo nárůst exprese genů SPINK6, SOX15 a SCEL a pokles exprese genů MMP7, SNCAIP a Ask1. SNCAIP v tomto případě představoval pozitivní kontrolu, vzhledem k tomu, že u něho bylo již dříve zjištěno, že je regulován nejen proteinem Daxx, nýbrž i Brg1 (viz předchozí podkapitulu). Překvapivě se jevílo zjištění, že je Daxx potřeba pro expresi kinázy Ask1. Jak bylo popsáno v Úvodu (viz oddíl II.), Daxx s touto kinázou přímo interaguje, a tím se podílí na její aktivaci. Je tedy možné, že další úrovní regulace kinázy Ask1, jíž se účastní protein Daxx, je ovlivnění její transkripce.

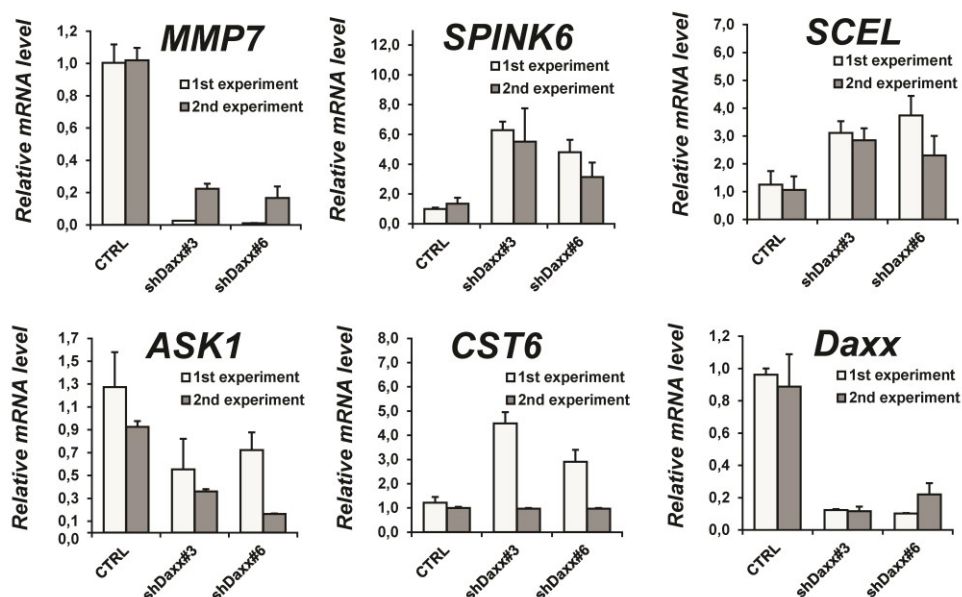
Od dalších analýz vycházejících z výše uvedených zjištění bylo však posléze upuštěno, neboť se netýkaly společné úlohy proteinů Daxx a Brg1.

Gen	ID	Název genu	Microarray	qRT-PCR	
				shDaxx #3	shDaxx #6
ASK1	4217	apoptotic signal-regulating kinase 1			
CALLA	4311	membrane metallo-endopeptidase			
CDC20	991	cell division cycle 20			
CST6	1474	cystatin E/M			
CXCL10	3627	chemokine (C-X-C motif) ligand 10			
FU	27148	fused			
FOS	2353	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog			
FOXO3	2309	forkhead box O3			
GHR	2690	growth hormone receptor			
HSB-1	30011	SH3-domain kinase binding protein 1			
IRS1	3667	insulin receptor substrate 1			
LIPG	9388	lipase, endothelial			
MEKK4	4216	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4			
MLLT11	10962	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 11			
MMP7	4316	matrix metalloproteinase 7			
MSH3	4437	mutS homolog 3			
NQO1	1728	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1			
RANTES	6352	chemokine (C-C motif) ligand 5			
SCEL	8796	sciellin			
SERPINB7	8710	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7			
SNCAIP	9627	synuclein alpha interacting protein			
SOX15	6665	SRY-box 15			
SPINK6	404203	serine peptidase inhibitor, Kazal type 6			
STAT1	6772	signal transducer and activator of transcription 1			
ZBTB16	7704	zinc finger and BTB domain containing 16			

	zvýšení exprese oproti kontrole
	snížení exprese oproti kontrole
	žádná změna exprese

Tab. 6 – Analýza genů potencionálně regulovaných proteinem Daxx v buněčné linii MCF10a, které byly nalezeny pomocí metody DNA-čipu

V levé části tabulky je uveden seznam genů potencionálně regulovaných proteinem Daxx, které byly vybrány k dalším analýzám na základě výsledku DNA-čipu, jejich identifikační čísla v databázi *Entrez Gene* a význam jejich zkratk. V dalším sloupci je barevně vyznačeno, zda transkripce příslušného genu v DNA-čipu po snížení exprese proteinu Daxx vzrostla (zeleně), anebo poklesla (červeně). V posledním sloupci je znázorněn výsledek analýzy exprese vybraných genů pomocí qRT-PCR (je-li u příslušného genu vyznačeno více řádků, znamená to, že byla u něho qRT-PCR provedena opakovaně, s nově transdukovánými buňkami). K této analýze byla stejně jako u DNA-čipu použita buněčná linie MCF10a, transdukována buď kontrolním plazmidem, anebo konstrukty k produkci uvedených vlásenek shRNA pro snížení exprese proteinu Daxx. V tabulce je vyznačeno, zda se u příslušného transduktantu s nižší expresí proteinu Daxx transkripce vybraného genu oproti kontrole zvýšila (zeleně), snížila (červeně), případně zda zůstala beze změny (žlutě).



Obr. 16 – Výsledek analýzy genů potenciálně regulovaných proteinem Daxx v buněčné linii MCF10a

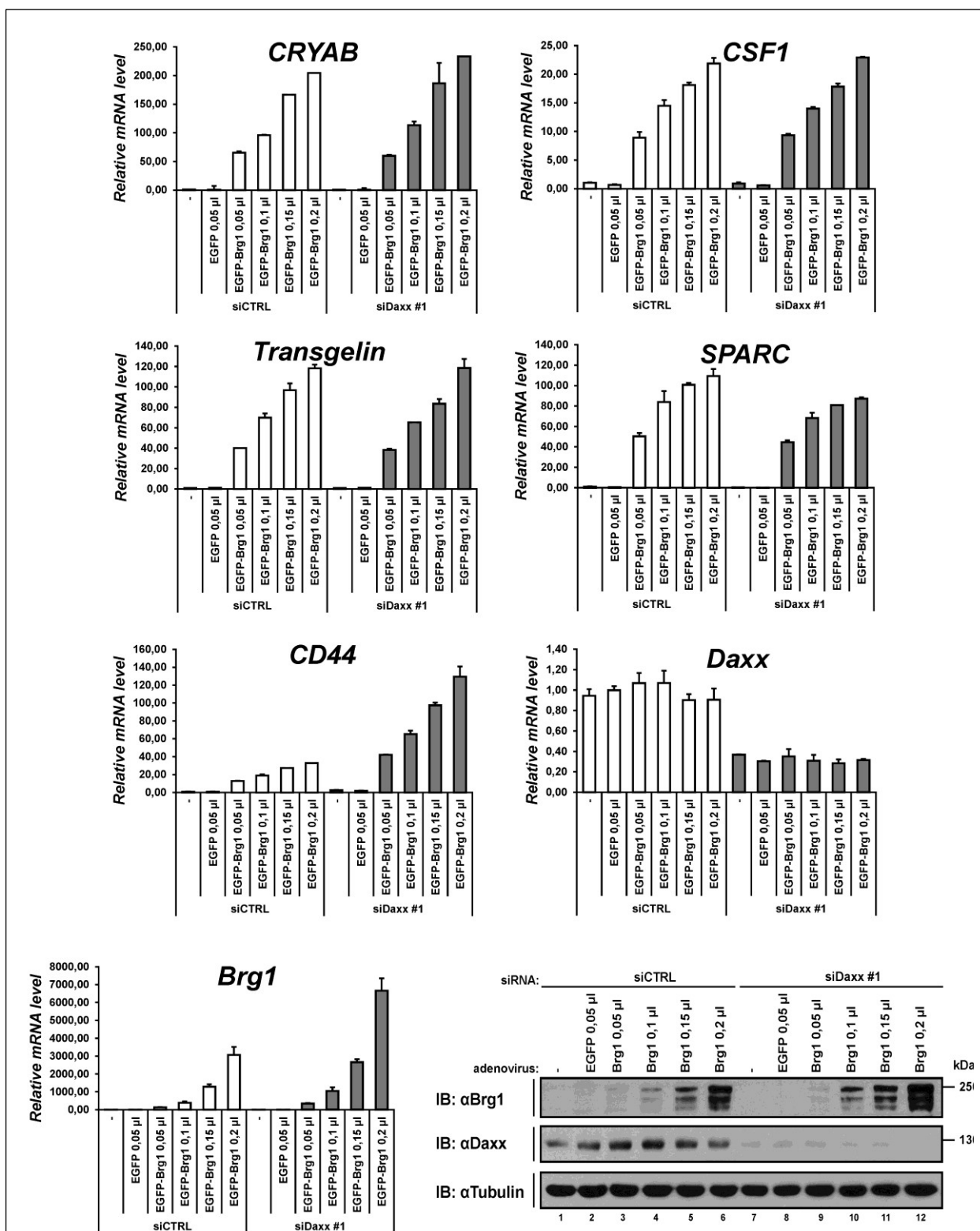
Buněčná linie MCF10a byla transdukována buď kontrolním plazmidem (prázdný vektor), nebo konstrukty pro snížení exprese proteinu Daxx (shDaxx #3 a shDaxx #6). U takto připravených buněk byla provedena qRT-PCR. Na obrázku jsou znázorněny výsledky dvou nezávislých experimentů provedených vždy s čerstvě transdukovánými buňkami (vždy 11 dní po transdukci).

„Relative mRNA level“ je relativní koncentrace mRNA v příslušném vzorku vztažená ke koncentraci mRNA buněk transdukováných kontrolním plazmidem, „1st“ a „2nd experiment“ znamená 1. a 2. pokus.

I. 12. Daxx inhibuje expresi některých genů regulovaných proteinem Brg1 v buněčné linii SW13

Souběžně s ověřováním výsledků celogenomové analýzy změn genové exprese u buněčné linie MCF10a byl hledán také jiný model, v němž by bylo možné objasnit funkční dopad interakce proteinů Daxx a Brg1. Tím se nakonec stala buněčná linie SW13, pocházející z lidského adenokarcinomu nadledvinek, která postrádá expresi proteinu Brg1. U této buněčné linie popsali Yamamichi-Nischina a kol., že obnovení exprese Brg1 vede k aktivaci exprese některých genů [346].

Při optimalizaci pokusných podmínek bylo zjištěno, že je buněčná linie SW13 značně citlivá na nejrůznější formy stresu. Velmi těžce snášela např. vysoké populační hustoty (konfluenci) a také transfekci plazmidovou DNA, po níž většina buněk hynula. Transfektovaných přeživalo pouze málo, což se pro účely experimentů jevílo nevhodným. K obnovení exprese proteinu Brg1 bylo proto využito adenovirového systému, který se ukázal jako vysoce účinný a nezpůsobil hromadné hnutí buněk (viz Metodika, oddíl



Obr. 17 – Analýza exprese vybraných genů v buněčné linii SW13 po obnovení exprese Brg1 a snížení exprese proteinu Daxx

Buněčná linie SW13 byla transfektována siRNA (kontrolní siCTRL a siDaxx #1 pro snížení exprese proteinu Daxx) a poté transdukována rekombinantními adenoviry (v množství 0,05, 0,1, 0,15 či 0,2 μl) pro expresi buď EGFP, nebo EGFP-značeného Brg1, případně byla ponechána bez transdukce. U takto připravených buněk byla provedena jednak SDS-PAGE s následným Western blottingem (viz pravý dolní roh), jednak qRT-PCR.

„IB“ (*immunoblotting*) protilátka použitá při imunodetekci po Western blottingu (αDaxx je směs myších protilátek Daxx02 a 03), „Relative mRNA level“ je relativní koncentrace mRNA v příslušném vzorku vztažená ke koncentraci mRNA buněk transdukových adenovirem pro expresi pouze EGFP a transfektovaných siCTRL.

genů popsaných v práci Yamamichi-Nishiny a kol. [346] v porovnání s transdukcí kontrolním virem pro expresi EGFP (viz obr. 17). V tomto modelovém systému bylo následně pomocí qRT-PCR zjišťováno, jaký vliv na expresi těchto genů má snížení hladiny proteinu Daxx. Nejvíce se přitom osvědčila transfekce siRNA provedená ve dvou po sobě jdoucích dnech a následná adenovirová transdukce.

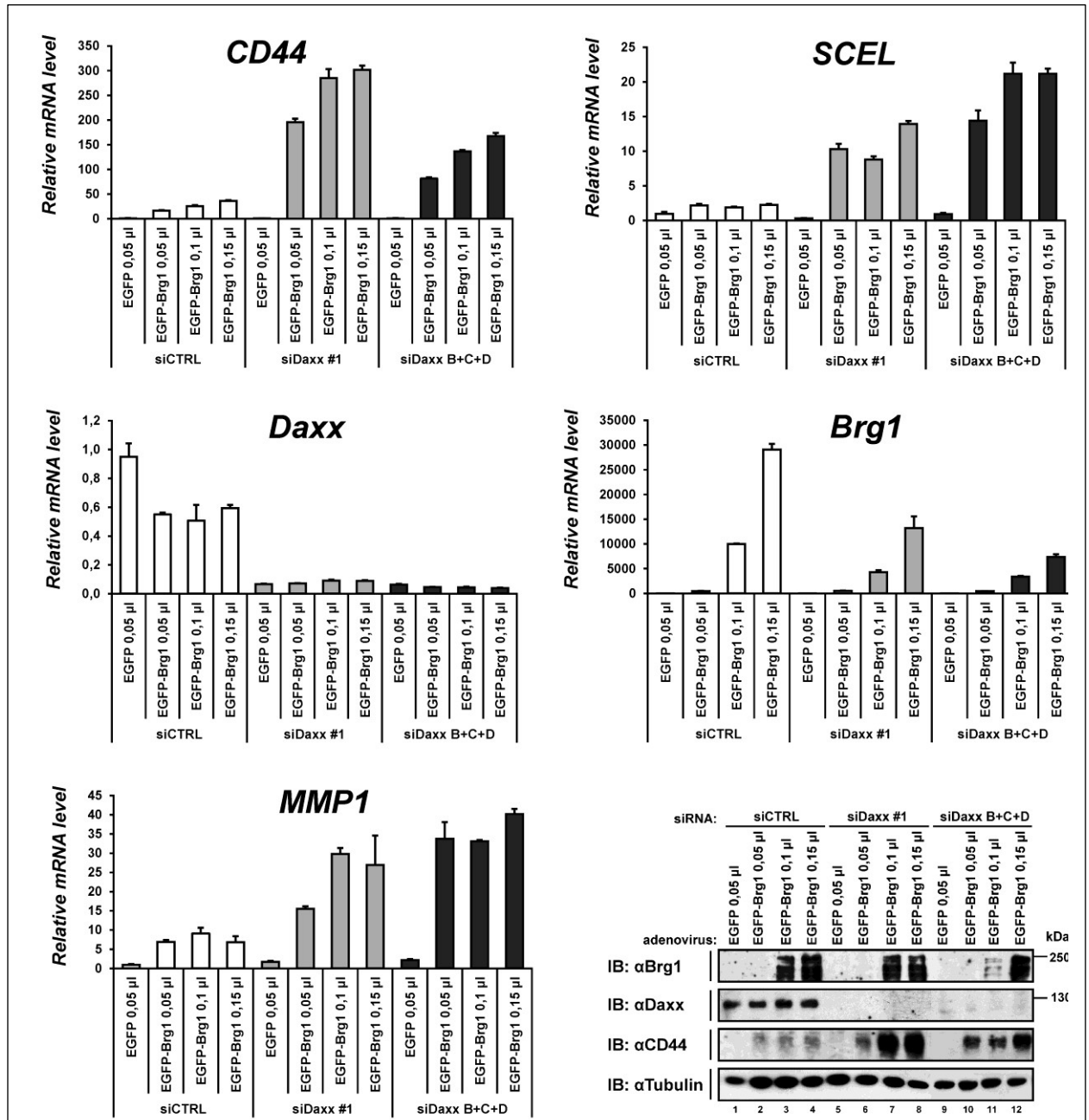
Opakovaná analýza s využitím výše popsaného modelového systému ukázala, že snížení exprese proteinu Daxx pomocí siRNA nemělo na expresi genů regulovaných Brg1 prakticky žádný vliv s výjimkou CD44, jehož exprese po snížení hladiny proteinu Daxx zřetelně vzrostla (viz obr. 17). Problematické však bylo, že se u transfekcí kontrolní siRNA a u transfekcí siRNA snižující hladinu proteinu Daxx prakticky nikdy nepodařilo dosáhnout shodné exprese Brg1 z adenovirového vektoru (na obr. 17 graf vlevo dole a výsledek SDS-PAGE vpravo dole). V obr. 17 je proto třeba porovnat transdukcii s použitím 0,2 μ l adenoviru pro expresi EGFP-Brg1 u transfekce kontrolní siRNA a transdukcii pomocí 0,15 μ l adenoviru u transfekce siRNA pro snížení exprese proteinu Daxx. V tomto případě by bylo možné po snížení buněčné koncentrace proteinu Daxx pozorovat pokles exprese genů Transgelin, SPARC a CSF1, ale tento pokles byl příliš malý a v dalších pokusech se ho již nepodařilo zopakovat, přičemž některé z nich poskytovaly i opačné výsledky (není ukázáno).

Jedním z opakovaně prokázaných výsledků tak zůstalo zvýšení exprese CD44, je-li do buněk navrácen Brg1, a její další nárůst, pokud je zároveň snížena exprese proteinu Daxx. Během dalších pokusů bylo zjištěno, že je obdobně regulován také MMP1, který lze považovat za pozitivní kontrolu (potvrzení funkčnosti modelu), neboť bylo již dříve publikováno, že je tento gen, pro jehož expresi v buněčné linii SW13 je nezbytný Brg1 [346] (v uvedeném odborném článku je označen jako kolagenáza), inhibován proteinem Daxx [219, 226].

Posléze byla v modelovém systému využívajícím buněčnou linii SW13 testována také exprese některých genů, které byly v téže době analyzovány v buněčné linii MCF10a (viz oddíl I. 10.). Důvodem byla úvaha, že jsou obě linie odvozeny z epitelu (linie SW13 z nadledvinek, linie MCF10a z prsní žlázy), a mohly by tedy mít aktivní obdobné geny. Tento předpoklad se potvrdil u genu SCEL (Sciellin), jehož exprese vzrůstala, jestliže byl do buněk navrácen Brg1, a k jejímu dalšímu zvýšení přispělo snížení hladiny proteinu Daxx.

Na obr. 18 je znázorněno shrnutí výše uvedených zjištění. U Brg1 se po transdukci opět nepodařilo dosáhnout srovnatelné exprese v buňkách transfektovaných kontrolní siRNA a buňkách po transfekci siRNA snižující hladinu proteinu Daxx (siDaxx #1 a siDaxx B+C+D). Tentokrát byla exprese Brg1 nižší u buněk s nižší hladinou proteinu Daxx (viz obr. 18, prostřední graf ve spodním řádku). Navzdory tomu však byla exprese genů CD44, SCEL a MMP1 výrazně vyšší, jestliže byl Daxx odstraněn, jakkoli bylo Brg1 produkováno méně než po transfekci kontrolní siRNA. Toto zjištění potvrdila i SDS-PAGE a následná imunodekce pomocí protilátky proti proteinu CD44 (viz obr. 18 vpravo dole).

Uvedené výsledky, které byly několikrát zopakovány (reprodukovány), ukazují, že je úloha proteinu Daxx při buněčných pochodech, jichž se účastní Brg1, také velice komplexní. Zatímco v buněčné linii MCF10a byla exprese jak proteinu Daxx, tak Brg1 nezbytná pro expresi genu SNCAIP, v buněčné linii SW13 Daxx působil na geny, jež pro svou expresi potřebují přítomnost Brg1, inhibičně.



Obr. 18 – Snížení exprese proteinu Daxx v buněčné linii SW13 vede ke zvýšení exprese některých genů regulovaných Brg1

Buněčná linie SW13 byla transfektována siRNA (kontrolní siCTRL a siRNA ke snížení exprese proteinu Daxx siDaxx #1 a siDaxx B+C+D) a poté transdukována rekombinantními adenoviry (v množství 0,05, 0,1 či 0,15 µl) pro expresi buď EGFP, nebo EGFP-značeného Brg1. U takto připravených buněk byla provedena jedná SDS-PAGE s následným Western blottingem (viz pravý dolní roh), jedná qRT-PCR.

„IB“ (*immunoblotting*) značí protilátku použitou při imunodetekci po „westen-blottingu“ (anti-Daxx je směs myších protilátek Daxx02 a 03), „Relative mRNA level“ je relativní koncentrace mRNA v příslušném vzorku vztahovaná ke koncentraci mRNA buněk transdukových adenovirem pro expresi pouze EGFP a transfektovaných siCTRL

II.

Další výzkumné projekty a z nich vycházející odborné články, na nichž se autor této dizertační práce podílel

II. 1. Souhra mezi proteiny Daxx, p53, kinázou ATM a fosfatázou Wip1 po poškození DNA (Bražina a kol., Cell Cycle, 2015) [347]

II. 1. 1. Překlad anglického abstraktu článku

Daxx (*death-domain associated protein 6*) je histonový chaperon, regulátor apoptózy a transkripce a také předpokládaný modulátor genové exprese regulované proteinem p53. Po poškození DNA je Daxx fosforylován, ale regulace této modifikace či její vztah k proteinu p53 doposud nebyly známy. V této práci je ukázáno, že je Daxx v lidských buňkách po poškození DNA působením ionizujícího záření či genotoxických chemikálií etopozidu a neokarzinostatinu rychle fosforylován prostřednictvím kinázy ATM. Pomocí místně řízené mutagenese bylo zjištěno, že je hlavní místo fosforylovanou aminokyselinou serin 564. Imunofluorescence poté ukázala, že se Daxx s fosforylovaným serinem 564 nachází převážně v jaderných PML-tělíscích.

Další analýzy jak u různých buněčných linií, tak *in vitro* poté odhalily, že je serin 564 proteinu Daxx defosforylován fosfatázou Wip1. V souladu s faktem, že je Wip1 jedním z onkogenů, byla silnější defosforylace proteinu Daxx pozorována v nádorových buněčných liniích, které buď obsahovaly mutaci proteinu Wip1 způsobující jeho trvalou aktivaci, anebo v nich byla exprese této fosfatázy trvale zvýšena.

Ačkoli však odstranění fosfatázy Wip1 pomocí siRNA způsobovalo zvýšenou fosforylací proteinu Daxx jak před poškozením DNA, tak po něm, a rovněž tak byla pozorována vyšší stabilita i transkripční aktivita proteinu p53, odstranění proteinu Daxx nemělo na stabilitu ani transkripční aktivitu proteinu p53, sledovanou u genů Gadd45a, Noxa, Mdm2, p21, Puma, Sesn2, Tigar a Wip1 žádný vliv. Tento výsledek potvrdilo i zopakování pokusu u buněk, v nichž byl s použitím metody TALEN proveden genový „knock-out“, a protein Daxx byl tak zcela odstraněn. To naznačuje, že pro genovou expresi regulovanou proteinem p53 po poškození DNA není Daxx potřeba ani fosforylovaný v serinu 564, ani bez této modifikace.

V této práci byla tedy identifikována kináza ATM a fosfatáza Wip1 jako navzájem opačně působící regulátory fosforylace serinu 564 proteinu Daxx. Zároveň ale bylo zjiš-

těno (v rozporu s dřívějšími zjištěními), že funkce proteinu Daxx jak fosforylovaného, tak defosforylovaného, nikterak nesouvisí s genovou expresí, kterou reguluje transkripční faktor p53.

II. 1. 2. Podíl autora této dizertační práce

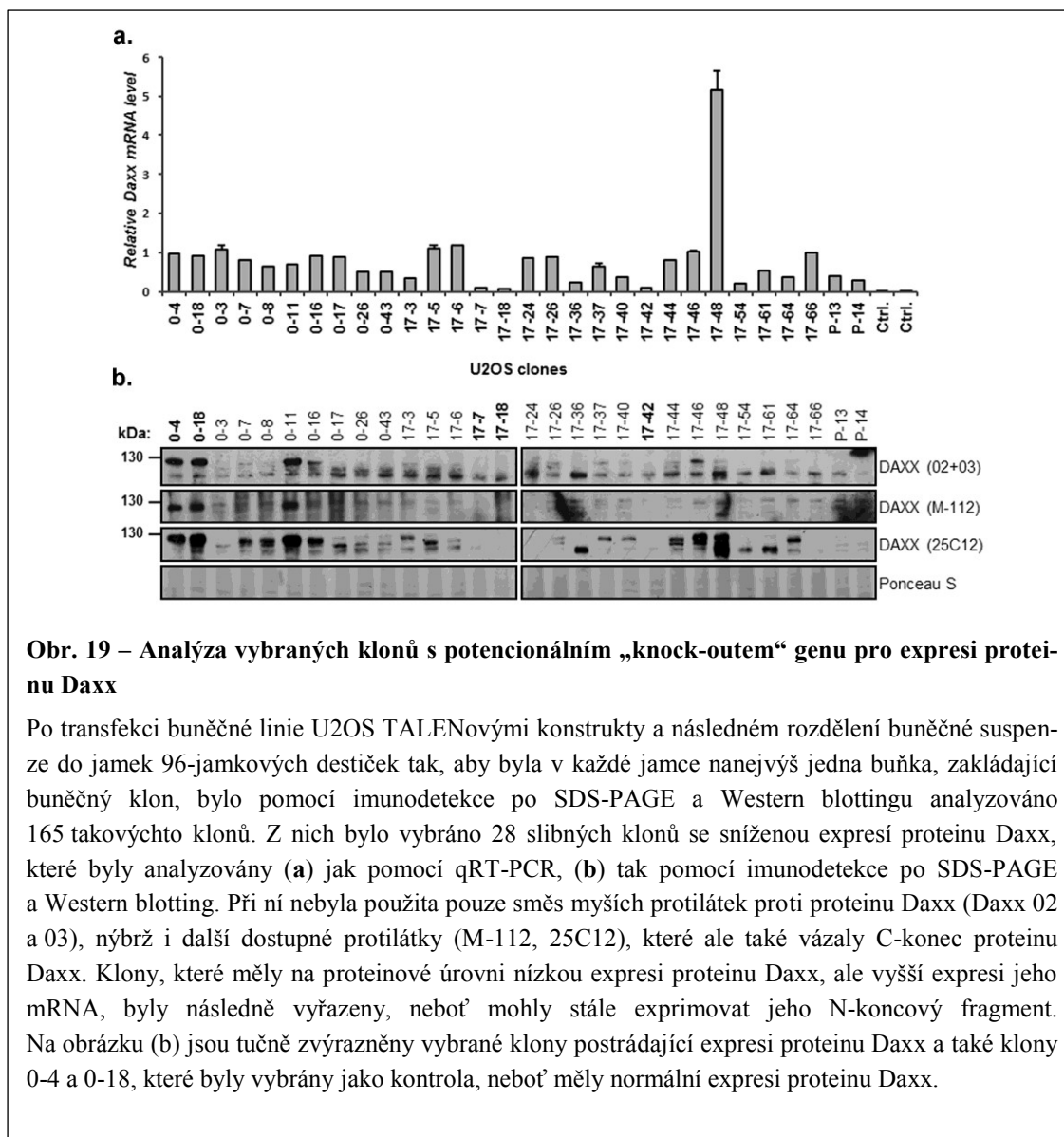
V počátcích tohoto projektu autor práce připravil konstrukty pFLAG-CMV-5a-Daxx FL a Daxx 504-704 a většinu bodových mutací proteinu Daxx (záměnu serinu 564, serinu 707 a treoninu 726 za alanin a také kombinaci těchto záměn, viz Metodika, oddíly III. 1. 2. a III. 1. 3. a seznam plazmidů v oddílu III. 2. 1.).

V rámci projektu také autor práce provedl cílenou genovou delecí (genový „knock-out“) za pomoci metody TALEN v buněčné linii U2OS. Jednalo se o jeden z prvních „knock-outů“ genu pro expresi proteinu Daxx, který byl proveden v buněčné linii (před zdokonalením metody genového „knock-outu“ byl Daxx odstraněn pouze v myších zárodečných kmenových buňkách za účelem zjištění úlohy tohoto proteinu při zárodečném vývinu [35, 37]).

Podrobný postup přípravy genového „knock-outu“ je popsán v Metodice (oddíl IV. 5.). Buněčná linie U2OS při ní byla transfektována konstrukty pro expresi TALENových nukleáz a buňky následně rozděleny do 96-jamkových kultivačních destiček tak, aby v každé jamce byla maximálně jedna buňka, která tudíž dala vznik jednomu buněčnému klonu. Tyto klony byly poté pěstovány dále a exprese proteinu Daxx v nich byla postupně analyzována nejprve pomocí imunodetekce po SDS-PAGE a Western blottingu a poté s použitím qRT-PCR.

První takto provedená příprava genového „knock-outu“ nevedla ke kýženému výsledku. Bylo při ní analyzováno celkem 72 získaných buněčných klonů a pouze v jediném z nich bylo zjištěno pravděpodobné poškození genu pro expresi proteinu Daxx. Bohužel však bylo heterozygotní, neboť byla exprese proteinu Daxx pouze zřetelně snížena, nikoli však potlačena (není ukázáno).

Celý postup byl proto následně zopakován. Podruhé bylo analyzováno 165 získaných buněčných klonů a nakonec z nich byly vybrány tři (označené 17-7, 17-8 a 17-42), v nichž byla exprese proteinu Daxx zcela potlačena, a dva kontrolní (0-4 a 0-18), které měly expresi proteinu Daxx na původní úrovni. Na obr. 19 je ukázána analýza 28 klonů s nízkou či nezjistitelnou expresí proteinu Daxx v porovnání s klony 0-4 a 0-18. Klony, u nichž nebyla pozorována exprese proteinu Daxx při imunodetekci po SDS-PAGE



Obr. 19 – Analýza vybraných klonů s potencionálním „knock-outem“ genu pro expresi proteinu Daxx

Po transfekci buněčné linie U2OS TALENovými konstrukty a následném rozdělení buněčné suspenze do jamek 96-jamkových destiček tak, aby byla v každé jamce nanejvýš jedna buňka, zakládající buněčný klon, bylo pomocí imunodetekce po SDS-PAGE a Western blottingu analyzováno 165 takovýchto klonů. Z nich bylo vybráno 28 slibných klonů se sníženou expresí proteinu Daxx, které byly analyzovány (a) jak pomocí qRT-PCR, (b) tak pomocí imunodetekce po SDS-PAGE a Western blotting. Při ní nebyla použita pouze směs myších protilátek proti proteinu Daxx (Daxx 02 a 03), nýbrž i další dostupné protilátky (M-112, 25C12), které ale také vázaly C-konec proteinu Daxx. Klony, které měly na proteinové úrovni nízkou expresi proteinu Daxx, ale vyšší expresi jeho mRNA, byly následně vyřazeny, neboť mohly stále exprimovat jeho N-koncový fragment. Na obrázku (b) jsou tučně zvýrazněny vybrané klony postrádající expresi proteinu Daxx a také klony 0-4 a 0-18, které byly vybrány jako kontrola, neboť měly normální expresi proteinu Daxx.

a Western blottingu, byly vyřazeny v případě, že byla v qRT-PCR zaznamenána vyšší transkripce mRNA. Štěpné místo TALENové endonukleázy se totiž nacházelo až v exonu 4 genu pro expresi proteinu Daxx, tedy v překládané oblasti, a existovalo proto nebezpečí, že bude buněčná linie s vysokou expresí příslušné mRNA produkovat zkrácený, N-koncový fragment proteinu Daxx.

Připravené buněčné klony 0-4, 0-18, 17-7, 17-18 a 17-42 autor dizertace předal k dalším experimentům.

II. 2. Inhibice vakuolární ATPázy má tlumivý účinek na aktivaci kaspázy-8 způsobenou vazbou ligandu TRAIL na receptor a ovlivňuje přepravu receptozómů u receptoru pro ligand TRAIL (Horová a kol., FEBS Journal, 2013) [349]

II. 2. 1. Překlad anglického abstraktu článku

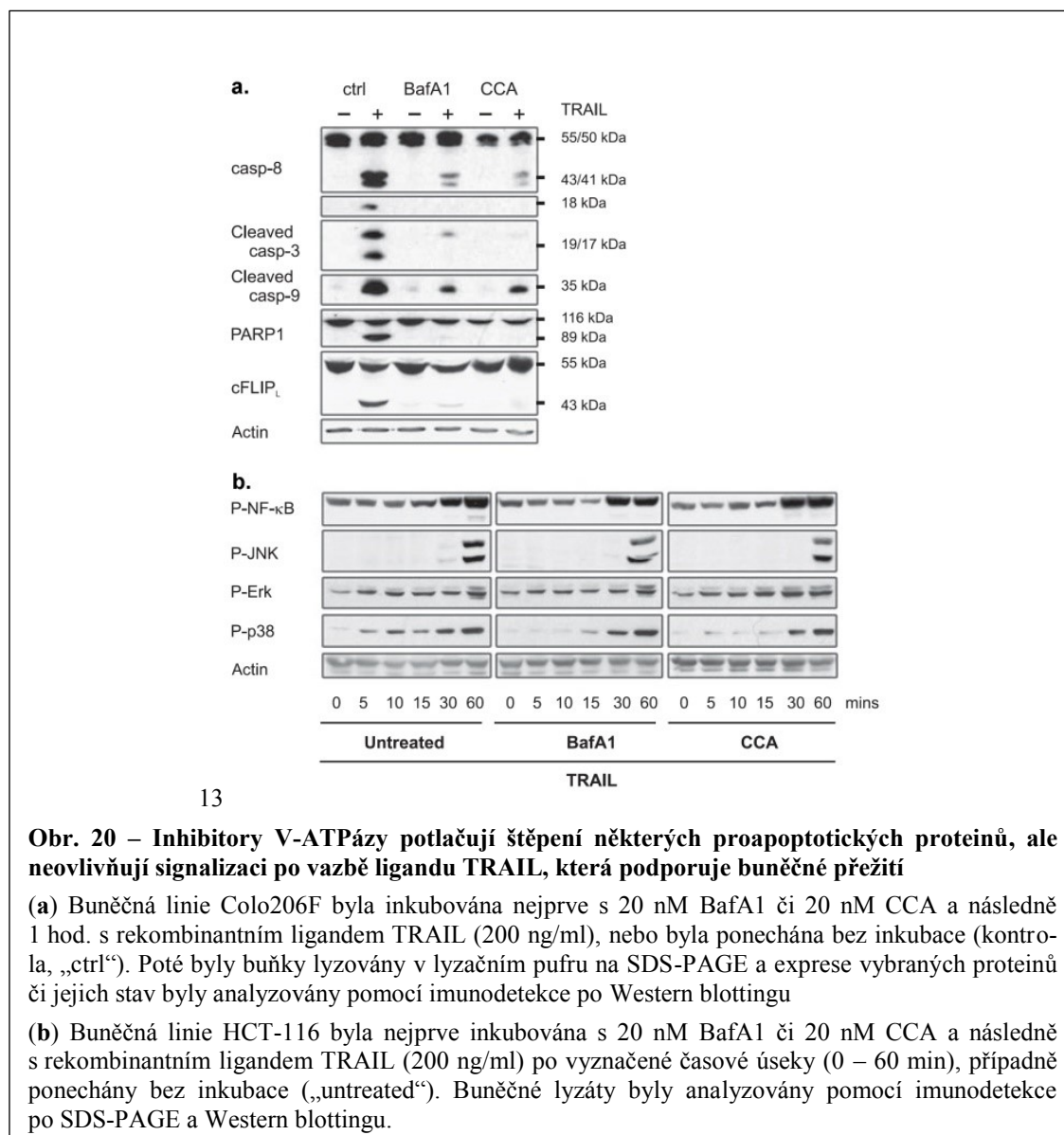
TRAIL (ligand vyvolávající apoptózu příbuzný faktoru nekrotizujícímu nádory) je membránově vázaný ligand z proteinové rodiny TNF, který poutá značný zájem tím, že po vazbě na své receptory vyvolává buněčnou smrt především u nádorových buněk, zatímco primární buňky jsou vůči jeho působení odolné. Podstata tohoto jevu (rozdíly v signálních drahách) však prozatím není zcela pochopena.

Autoři práce se zaměřili na zablokování vakuolární ATPázy (V-ATPázy) pomocí činidel bafilomycinu-A1 (BafA1) nebo konkanamycinu-A (CCA), které potlačuje okyselení endozómů. Inkubace vybraných nádorových buněčných linií (převážně odvozených z kolorektálních karcinomů) s těmito inhibitory vedla ke zřetelnému snížení citlivosti takto ovlivněných buněk k apoptóze vyvolané vazbou ligandu TRAIL. Zároveň byla méně štěpena kaspáza-8 a bylo pozorováno omezené skládání proteinových komplexů na receptorech pro ligand TRAIL a jejich přeprava. Beze změn naopak zůstala aktivace transkripčního faktoru NF- κ B či signalizace prostřednictvím MAP-kináz / stresových kináz. Rovněž tak nebyla pozorována permeabilizace lyzozómů či účast kyselé sfingomyelinázy. Také množství receptorů pro ligand TRAIL na buněčném povrchu nebylo uvedenými inhibitory nikterak ovlivněno. Inhibiční efekt BafA1 byl však potlačen snížením exprese proteinu c-FLIP, inhibitoru kaspázy-8, pomocí siRNA.

Výše uvedená data tedy poskytují první důkaz, že okyselení endozómů představuje důležitý způsob regulace počáteční fáze signalizace receptoru pro ligand TRAIL.

II. 2. 2. Podíl autora této dizertační práce

Autor práce v průběhu projektu vypomohl s některými SDS-PAGE a následnými imunodetekcemi po Western blottingu. Podílel se také na experimentech vyznačených na obr. 21. Při nich bylo ukázáno, že inhibitory BafA1 a CCA potlačují štěpení proapoptotických proteinů po vazbě ligandu TRAIL na receptor (viz obr. 20a), ale nemají žádný vliv na signální dráhy, které podporují spíše buněčné přežití (viz obr. 20b).



13

Obr. 20 – Inhibitory V-ATPázy potlačují štěpení některých proapoptických proteinů, ale neovlivňují signalizaci po vazbě ligandu TRAIL, která podporuje buněčné přežití

(a) Buněčná linie Colo206F byla inkubována nejprve s 20 nM BafA1 či 20 nM CCA a následně 1 hod. s rekombinantním ligandem TRAIL (200 ng/ml), nebo byla ponechána bez inkubace (kontrola, „ctrl“). Poté byly buňky lyzovány v lyzačním pufru na SDS-PAGE a exprese vybraných proteinů či jejich stav byly analyzovány pomocí imunodetekce po Western blottingu

(b) Buněčná linie HCT-116 byla nejprve inkubována s 20 nM BafA1 či 20 nM CCA a následně s rekombinantním ligandem TRAIL (200 ng/ml) po vyznačené časové úseky (0 – 60 min), případně ponechány bez inkubace („untreated“). Buněčné lyzáty byly analyzovány pomocí imunodetekce po SDS-PAGE a Western blottingu.

II. 3. Specifická inhibice jednotlivých proteinů z rodiny Bcl-2 pomocí chemikálií ABT-199 a homoharringtonin odhalila existenci podskupin difúzních velkobuněčných B-lymfomů, závislých buď na Bcl-2, nebo na Mcl-1 (Klánová a kol., Clinical Cancer Research, 2015) [350]

II. 3. 1. Překlad anglického abstraktu článku

Účel: Prozkoumat úlohu proteinů Bcl-2, Mcl-1 a Bcl-X_L při přežívání buněk DLBCL (*diffused large B-cell lymphoma*, difúzní velkobuněčný B-lymfom).

Rozvržení experimentů: Imunohistochemická analýza 105 vzorků DLBCL a analýza pomocí imunodetekce po SDS-PAGE a Western blottingu 18 buněčných linií DLBCL zaměřená na expresi proteinů Bcl-2, Mcl-1 a Bcl-X_L. Specifická inhibice těchto proteinů

pomocí chemikálií ABT-199, homoharringtonin (HHT) a ABT-137. Analýza klonů DLBCL s uměle pozměněnou expresí Bcl-2, Mcl-1 a Bcl-X_L. Imunoprecipitace komplexů Mcl-1 z vybraných buněčných linií DLBCL. Experimentální terapie využívající inhibice Bcl-2 a Mcl-1 s použitím ABT-199 a HHT, buď jednotlivě, nebo v kombinaci, *in vitro*, nebo *in vivo* v myších buněčných modelech založených na xenotransplantátech buněčných linií DLBCL.

Výsledky: Pomocí cílení proteinů Bcl-2, Mcl-1 a Bcl-X_L s použitím výše uvedených chemikálií bylo ukázáno, že u DLBCL mohou být rozlišeny dvě podskupiny, jednak nádory závislé na Bcl-2 a jednak na Mcl-1. Naopak funkce Bcl-X_L u DLBCL tak zřejmá není. Tato zjištění byla potvrzena rovněž na molekulární úrovni za pomoci expresní analýzy klonů DLBCL s uměle pozměněnou expresí Bcl-2, Mcl-1 a Bcl-X_L i experimentů založených na imunoprecipitaci. Ve studii bylo dále ukázáno, že pokud jsou zároveň inhibovány jak Bcl-2, tak Mcl-1 současným působením ABT-199 i HHT, způsobí to výraznou syntetickou letalitu u většiny buněčných linií DLBCL, které produkují Bcl-2. Uvedená cytotoxická souhra ABT-199 a HHT byla potvrzena také *in vivo* pomocí myších buněčných modelů DLBCL založených na xenotransplantátech.

Shrnutí: Vzhledem k tomu, že je HHT klinicky schváleným protileukemickým léčivem a ABT-199 je nyní prověřováno v pokročilých fázích různých klinických testů, zjištění této studie mohou být využitelná při klinických zkouškách u pacientů s agresivním onemocněním DLBCL.

II. 3. 2. Podíl autora této dizertační práce

Autor práce připravil většinu linií DLBCL s uměle pozměněnou (zvýšenou pomocí nadprodukce či sníženou za pomoci shRNA) expresí proteinů Bcl-2, Mcl-1 a Bcl-X_L. K tomu využíval dodané lentiviry určené k transdukci konstrukty pro expresi příslušné shRNA či příslušných proteinů. Změněnou expresi zkoumaných proteinů ověřoval pomocí imunodetekce po SDS-PAGE a Western blottingu a následně buněčné linie předával k dalším pokusům.

Diskuze

Z doposud publikovaných dat vyplývá, že je Daxx multifunkční, převážně jaderný protein, který se účastní reakce na buněčný stres, apoptotické signalizace, regulace transkripce i dalších buněčných pochodů. U většiny z nich je jeho úloha značně komplexní, spočívající nejen v ovlivnění posttranslačních modifikací zúčastněných proteinů, ale i ve změně struktury chromatinu, která může následně způsobovat změny genové exprese. Tato komplexní úloha proteinu Daxx je jedním z možných vysvětlení, proč byl někdy pozorován jeho inhibiční účinek na příslušné buněčné pochody a jindy zase aktivní. Dalším z důvodů může být i výběr modelových experimentálních systémů, často nádorových buněčných linií, které mívají své signální dráhy různě pozměněny.

Na transkripci Daxx působí převážně inhibičně, prostřednictvím toho, že do regulačních oblastí genů přivede modifikující enzymy, např. HDAC či DNMT (viz Úvod, oddíl III. 5. 2.). Mimoto byl Daxx, v komplexu s ATPázou remodelující chromatin ATRX, popsán coby histonový chaperon pro histon-3.3, důležitý pro udržování trvalé represe některých genů endogenního i virového původu a konstitučního heterochromatinu zejména v oblasti centromer a telomer. Nádory, které mají proteiny Daxx nebo ATRX mutované, vykazují chromozómové změny a využívají proces alternativního prodlužování telomer (viz Úvod, oddíl III. 6.).

Skutečná role proteinu Daxx v kontextu mnohobuněčného organismu však zůstává spíše nejasná. Např. bylo pozorováno, že myší zárodky, u nichž byl Daxx odstraněn pomocí techniky cílené genové delece („knock-out“), hynou v důsledku těžkých vývojových poruch již deset dní po implantaci do dělohy [35].

Záměrem této práce bylo prohloubit dosavadní znalosti o tomto multifunkčním proteinu prostřednictvím identifikace a charakterizace jeho doposud nepopsaných interakčních partnerů. V kvasinkovém dvojhybridním systému (Y2H) bylo nalezeno 24 potenciálních interakčních partnerů proteinu Daxx, převážně jaderných proteinů, jejichž funkce většinou souvisejí s regulací chromatinu (viz tab. 4). U dvou takto nalezených proteinů, ATPázy remodelující chromatin ATRX a proteinu DMAP1, asociovaného s DNMT1, byla již interakce s proteinem Daxx popsána (viz Úvod a zejména oddíly III. 5. 2. a III. 6.), což podporuje relevanci výsledků vyhledání interakčních partnerů v Y2H. Interakce některých těchto nově nalezených proteinů s proteinem Daxx byla navíc potvr-

zena jak *in vitro* pomocí „GST-pulldownu“, tak *in vivo* za pomoci imunoprecipitace po jejich nadprodukci. Mezi těmito vybranými proteiny byly mj. dva proteiny účastníci se oprav DNA (BAP1 a Abra1), podjednotka histonového chaperonu pro histon-3.3 HIRA/ASF1 (Ubn1), podjednotka korepresorového komplexu mSin3A (SAP30) a ATPáza remodelující chromatin Brg1 (viz obr. 7). Toto zjištění tedy zjevně rozšiřuje poznání týkající se doposud známých funkcí proteinu Daxx, které souvisejí s regulací struktury chromatinu, transkripce či opravami DNA. Protein Ubn1 sice již identifikován v komplexu histonového chaperonu HIRA/ASF1 s odlišným podjednotkovým složením, než má komplex Daxx/ATRX [260], nicméně je možné, že jsou funkce obou histonových chaperonů za některých doposud neidentifikovaných podmínek provázané.

K dalším experimentům byl následně vybrán protein Brg1, neboť se jednalo již o druhou ATPázu remodelující chromatin, která interaguje s proteinem Daxx a která má navíc důležitou úlohu při regulaci transkripce, opravách DNA a dalších pochodech spjatých s chromatinem [205]. Interakce proteinů Daxx a Brg1 byla opakovaně potvrzena nejen *in vitro* za pomoci „GST-pulldownu“, ale i *in vivo* jak u nadprodukovaných, tak u endogenních proteinů (viz obr. 8 a 9). Oba proteiny se také podařilo společně imunoprecipitovat po gelové filtraci z frakcí obsahujících komplexy s relativní molekulovou hmotností 1 – 1,5 kDa (viz obr. 10). Rovněž tak byla pozorována společná lokalizace proteinů Daxx a Brg1 v jaderných PML-tělíscích (viz obr. 11). Takováto lokalizace v PML-tělíscích závislá na proteinu Daxx byla popsána rovněž u ATPázy remodelující chromatin ATRX a je zřejmě jedním ze způsobů regulace tohoto proteinu (viz Úvod, oddíl III. 6. 1.). Obdobnou funkci by tudíž mohla mít i u Brg1.

Vzájemná interakce proteinů Daxx a Brg1 byla také analyzována za pomoci exprese jejich forem, které mají některé své části odstraněny. Cílem bylo nalézt takové úseky obou proteinů, které tuto interakci zprostředkovávají. Jak se však ukázalo, je Brg1 vázán jak N-koncovou, tak centrální třetinou proteinu Daxx (viz obr. 12), pouze jeho C-koncová část se na interakci nepodílí. Takovéto zjištění ovšem nebylo příliš překvapivé, neboť i s některými dalšími proteiny Daxx interaguje prostřednictvím více svých částí, jak vyplývá z obr. 1. Tato multifokální interakce byla pozorována např. u kinázy Ask1, transkripčního faktoru p53, apoptotického regulátoru CHIP a dalších. Navíc bylo u histonu-3.3 popsáno, že se Daxx okolo něho svým aminokyselinovým řetězcem ovíjí [351, 352]. Lze proto předpokládat, že by mohl Daxx obdobným způsobem vázat i další proteiny.

Tuto hypotézu by podporovalo i zjištění, že také protein Brg1 váže Daxx prostřednictvím více svých částí (viz obr. 14), a je proto možné, že různé části proteinu Daxx interagují s různými částmi proteinu Brg1. Vzhledem k velikosti Brg1 se další analýzy interakce obou proteinů zaměřily na identifikaci N-koncové oblasti Brg1, s níž interaguje Daxx. Právě z této oblasti totiž pochází fragment nazvaný „klon 3“, který byl nalezen v Y2H. Při uvedených analýzách byla identifikována oblast Brg1 mezi doménami QLQ a HSA, která za interakci s proteinem Daxx odpovídá v N-koncové polovině proteinu Brg1 (viz obr. 14). Přibližně stejná oblast se podílí i na interakci proteinu Brg1 s proteinem BAF250 a je pravděpodobně nezbytná pro transkripční aktivaci glukokortikoidového receptoru prostřednictvím Brg1 [353].

Kromě analýzy interakce proteinů Daxx a Brg1 byla rovněž hledána její funkce. Zatímco Daxx působí coby adaptérový protein u nejrůznějších buněčných pochodů, úloha Brg1 souvisí se změnami struktury chromatinu. Oba proteiny regulují i genovou expresi, a proto byla testována hypotéza, že by mohly existovat geny, které oba proteiny regulují společně. K jejich nalezení byly použity dva modelové systémy. Jedním z nich byla buněčná linie SW13, která postrádá expresi Brg1 a u níž bylo popsáno, že její obnovení způsobí aktivaci některých genů [346]. U buněčné linie SW13 s nadprodukovaným proteinem Brg1 bylo tedy zkoumáno, jak transkripci těchto genů ovlivní umělé snížení exprese proteinu Daxx pomocí RNAi. Následně bylo zjištěno, že exprese genů CD44, SCEL a MMP1 po nadprodukci Brg1 dále vzrůstá, je-li exprese proteinu Daxx potlačena, což naznačuje represivní účinek proteinu Daxx na genovou expresi regulovanou ATPázou remodelující chromatin Brg1 (viz obr. 18). Inhibiční účinek proteinu Daxx na expresi genu MMP1 byl navíc popsán již dříve [219], a lze se proto domnívat, že také inhibice aktivity genů SCEL a CD44 představuje relevantní zjištění.

Je nicméně otázkou v čem výše uvedený represivní účinek proteinu Daxx spočívá. Daxx by např. mohl prostřednictvím své interakce s Brg1 modulovat jeho remodelační aktivitu. Nebo může Daxx Brg1 inhibovat tak, že jej vyvazuje v jiných buněčných strukturách, čímž mu brání v přístupu do promotoru. Takovýmito strukturami by mohla být např. jaderná PML-tělíska, u nichž bylo zjištěno, že je do nich Brg1 prostřednictvím proteinu Daxx vázán (viz obr. 11). Bylo by proto vhodné zjistit, jaký vliv na expresi genů SCEL, CD44 a MMP1 má protein PML. Takovéto pokusy sice byly autorem práce učiněny, bohužel však nevedly k uspokojivému výsledku. Ukázalo se totiž, že u buněč-

né linie SW13 nelze provést kombinovanou expresi PML a Brg1, a zkoumat tak vliv proteinu PML na transkripci genů, které Brg1 reguluje, neboť jsou tyto buňky značně citlivé na nejrůznější formy buněčného stresu včetně transfekce plazmidovou DNA. Buňky po transfekci rychle hynuly, a nejvýrazněji to postihlo právě ty, které nadprodukovaly dva proteiny zároveň.

Kromě naznačeného přímého účinku proteinu Daxx na aktivitu Brg1 ovšem nelze pominout ani možnost, že inhibiční účinek proteinu Daxx na expresi genů CD44, MMP1 a SCE1 s interakcí mezi oběma proteiny nesouvisí. Daxx by např. mohl do promotorů uvedených genů přivést HDAC či DNMT nebo by pouhým ovlivněním příslušné signální dráhy mohl buď nepřímo působit i na aktivitu Brg1, anebo na expresi uvedených genů. V takovémto případě by to ovšem o funkci interakce mezi proteiny Daxx a Brg1 nevyovídalo vůbec nic.

Druhým buněčným modelem, který byl vybrán k hledání funkce interakce proteinů Daxx a Brg1, byla buněčná linie MCF10a, u níž byla za pomoci shRNA snižována exprese jednoho nebo druhého proteinu. Nejprve byla u takto ovlivněných buněk provedena celogenomová analýza změn genové exprese (tzv. DNA-čip) a poté jeho výsledek ověřován za použití qRT-PCR. Z 50 vybraných genů, jejichž exprese byla obdobně ovlivněna, nakonec zůstal jediný, u něhož bylo opakovaně potvrzeno, že je jeho exprese regulována proteiny Daxx a Brg1. Snižování exprese jednoho či druhého proteinu způsobilo pokles exprese genu SNCAIP, což naznačuje, že jsou oba proteiny pro jeho expresi potřebné (viz obr. 15).

Opět může existovat více způsobů, jimiž by proteiny Daxx a Brg1 gen SNCAIP regulovaly. Daxx by např. mohl jakožto adaptér (koaktivátor) zprostředkovat interakci některého transkripčního faktoru s proteinem Brg1, jehož remodelační aktivita by poté přispěla k aktivaci transkripce. Nebo by to mohl být naopak Brg1, který by v promotoru genu SNCAIP napomáhal funkci proteinu Daxx coby histonového chaperonu pro histon-3.3. Obdobná kooperace s proteinem Daxx byla již popsána u ATPázy remodelující chromatin ATRX (viz Úvod, oddíl III. 6.). Komplex Daxx/ATRX se ovšem podílí na udržování represivního stavu některých typů heterochromatinu, zatímco zde by se jednalo o navození takového stavu chromatinu, který by umožňoval transkripci mRNA. Histonový chaperon Daxx by tedy v komplexu s Brg1 fungoval jako transkripční koaktivátor.

Nicméně ani v tomto buněčném modelu nelze vyloučit možnost, která byla zmíněna výše u buněčné linie SW13. Účinek proteinů Daxx a Brg1 na expresi SNCAIP opět nemusí záviset na jejich vzájemné interakci, neboli se může znovu jednat o navzájem nezávislý vliv proteinu Daxx či proteinu Brg1.

Vedle regulace genové exprese by se proteiny Daxx a Brg1 mohly společně podílet i na jiných buněčných pochodech. Jedním z nich by mohlo být vytváření takových chromatinových struktur, které umožní opravit poškozenou DNA. U Brg1 již bylo zjištěno, že se oprav DNA, např. dvojřetězcových zlomů, účastní [354-358]. Jak Brg1, tak Daxx jsou navíc po poškození DNA fosforylovány kinázou ATM [114, 359] (viz též Výsledky, oddíl II. 1.). U proteinu Daxx funkce této posttranslační modifikace sice není příliš objasněna, ale u Brg1 bylo popsáno, že napomáhá k opravám DNA. Další možností je, že je to naopak Brg1, který napomáhá funkci proteinu Daxx coby histonového chaperonu, obdobně jako ATPáza remodelující chromatin ATRX. Jak bylo popsáno v Úvodu (viz oddíl II. 6. 1.), Daxx je sám o sobě schopen vkládat histon-3.3 do příslušných míst v chromatinu a ATRX mu zřejmě slouží k navedení do těchto míst a patrně též k rozvolnění některých chromatinových struktur, aby vůbec vložení histonu-3.3 mohlo proběhnout. Brg1 by tedy mohl mít obdobnou funkci, ale např. v jiných oblastech chromatinu. V tomto směru by tedy byly užitečné další experimenty, které by umožnily analyzovat i funkce obou proteinů, jež se netýkají genové exprese.

Výsledků celogenomové analýzy změn genové exprese u buněčné linie MCF10a bylo využito nejen k nalezení genů, které jsou společně regulovány proteiny Daxx a Brg1, ale také genů regulovaných pouze proteinem Daxx s cílem rozšířit poznání jeho buněčných funkcí. Za pomoci qRT-PCR bylo takovýchto genů identifikováno několik. U genů SPINK6 a SCEL umělé snížení množství proteinu Daxx vedlo k nárůstu jejich exprese, což naznačuje, že má Daxx na jejich expresi inhibiční účinek (viz obr. 16). Ten opět může být přímý, spočívající v tom, že korepresor Daxx přivede do jejich promotoru HDAC, DNMT či jiné enzymy vytvářející inhibiční stav chromatinu, nebo nepřímý, kdy by se Daxx pouze podílel na regulaci signální dráhy, která by ovlivňovala expresi uvedených genů. V buněčné linii MCF10a také byly nalezeny dva geny, jejichž exprese po odstranění proteinu Daxx naopak klesala. Jedním z nich je MMP7, druhým kináza Ask1 (viz obr. 16). U té bylo již popsáno, že se Daxx podílí na její aktivaci (viz Úvod, zejména oddíly II. 2. a II. 5. 2., a také obr. 3). Doposud však nebylo známo, že by rov-

něž reguloval její expresi. Možná tedy byla odhalena další úroveň regulace kinázy Ask1 prostřednictvím proteinu Daxx.

Z výše uvedených dosažených výsledků tedy vyplývá, že byla v této práci nalezena ATPáza remodelující chromatin Brg1 jakožto nový interakční partner proteinu Daxx. Toto zjištění dále rozšířilo poznání funkcí proteinu Daxx spojených s regulací struktury chromatinu. Způsob, jímž Daxx působí na Brg1, prozatím zůstává neznámý a doposud není jasná ani funkce proteinového komplexu Daxx/Brg1. U buněčné linie SW13 bylo nicméně pozorováno, že Daxx inhibuje transkripci, kterou Brg1 napomáhá aktivovat. Naproti tomu u buněčné linie MCF10a se oba proteiny podílejí na aktivaci exprese genu SNCAIP. Mimo regulaci transkripce by se oba proteiny mohly podílet i na jiných buněčných pochodech spojených s ovlivněním struktury chromatinu, např. na opravách DNA či na udržování chromatinové struktury v některých chromozómových oblastech, jak již bylo popsáno u proteinu Daxx v komplexu s ATPázou remodelující chromatin ATRX, s níž Daxx působí coby histonový chaperon.

Z výsledků této práce také vyplývá, že Daxx reguluje expresi některých proteinů, které se podílejí na přestavbách extracelulární matrix a mezibuněčné adhezi. Např. membránový protein CD44, jehož expresi v buněčné linii SW13 Daxx inhibuje, se ukazuje jakožto důležitý integrátor signálů z vněbuněčného prostředí, extracelulární matrix, růstových faktorů i adhezivních molekul, který se podílí i na rozvoji nádorového bujení [360]. Obdobně se přestavbě extracelulární matrix účastní také matrixové metaloproteázy (MMP), a takovéto změny rovněž doprovázejí rozvoj nádorů [361]. Není bez zájmovosti, že Daxx reguluje expresi matrixových metaloproteáz v závislosti na buněčném typu – inhibuje expresi proteázy MMP1 v buněčné linii SW13, ale je nezbytný pro expresi MMP7 v buněčné linii MCF10a. U proteinu Daxx bylo popsáno, že je mutován v některých typech nádorů, u nichž narušení jeho funkce vede k alternativnímu prodlužování telomer (viz Úvod, oddíl III. 6. 3.). Z výsledků této práce by nicméně mohlo vyplývat i to, že se na karcinogenezi po narušení funkce proteinu Daxx může podílet také změna exprese proteinů regulujících extracelulární matrix a mezibuněčnou adhezi. Další výzkumy v tomto směru by proto byly užitečné.

Závěr

V této práci byly zjištěny následující skutečnosti:

- V kvasinkovém dvojhybridním systému bylo nalezeno 24 potencionálních interakčních partnerů proteinu Daxx, většinou jaderných proteinů účastnících se buněčných pochodů spojených s chromatinem.
- Interakce proteinu Daxx byla průkazně potvrzena u ATPázy remodelující chromatin Brg1.
- Tuto interakci zprostředkovává více částí obou proteinů.
- Daxx a Brg1 jsou společně lokalizovány v jaderných PML-tělíscích.
- V buněčné linii SW13 má Daxx represivní účinek na genovou expresi regulovanou Brg1, v buněčné linii MCF10a se oba proteiny společně podílejí na aktivaci transkripce genu SNCAIP.
- Daxx reguluje expresi některých genů spojených s remodelací extracelulární matrix a mezibuněčnou adhezí. To by mohlo mít vztah ke karcinogenezi u nádorů, které mají Daxx mutovaný.

Seznam použité literatury

1. Kuhn, M., Von Wartburg, A., *Podophyllum- Lignane: Struktur und Absolutkonfiguration von Podorhizol- β -D-glucosid (= Lignan F). 19. Mitt. über mitosehemmmende Naturstoffe [1]*. Helvetica Chimica Acta, 1967. **50**(6): p. 1546-1565.
2. Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y., Baltimore, D., *Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1067-76.
3. Kiriakidou, M., Driscoll, D. A., Lopez-Guisa, J. M., Strauss, J. F. (III.), *Cloning and expression of primate Daxx cDNAs and mapping of the human gene to chromosome 6p21.3 in the MHC region*. DNA and Cell Biology, 1997. **16**(11): p. 1289-98.
4. Herberg, J.A., Beck, S., Trowsdale, J., *TAPASIN, DAXX, RGL2, HKE2 and four new genes (BING 1, 3 to 5) form a dense cluster at the centromeric end of the MHC*. Journal of Molecular Biology, 1998. **277**(4): p. 839-57.
5. Pluta, A.F., Earnshaw, W. C., Goldberg, I. G., *Interphase-specific association of intrinsic centromere protein CENP-C with HDaxx, a death domain-binding protein implicated in Fas-mediated cell death*. Journal of Cell Science, 1998. **111**(Pt 14): p. 2029-41.
6. Ishov, A.M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T., Strauss, J. F. (III.), Maul, G. G., *PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein Daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1*. Journal of Cell Biology, 1999. **147**(2): p. 221-34.
7. Wethkamp, N., Hanenberg, H., Funke, S., Suschek, C. V., Wetzel, W., Heikaus, S., Grinstein, E., Ramp, U., Engers, R., Gabbert, H. E., Mahotka, C., *Daxx-beta and Daxx-gamma, two novel splice variants of the transcriptional co-repressor Daxx*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(22): p. 19576-88.
8. Escobar-Cabrera, E., Lau, D. K., Giovinazzi, S., Ishov, A. M., McIntosh, L. P., *Structural characterization of the DAXX N-terminal helical bundle domain and its complex with Rassf1C*. Structure, 2010. **18**(12): p. 1642-53.
9. Yeung, P.L., Chen, L. Y., Tsai, S. C., Zhang, A., Chen, J. D., *Daxx contains two nuclear localization signals and interacts with importin alpha3*. Journal of Cellular Biochemistry, 2008. **103**(2): p. 456-70.
10. Song, J.J., Lee, Y. J., *Tryptophan 621 and Serine 667 Residues of Daxx Regulate Its Nuclear Export during Glucose Deprivation*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(29): p. 30573-8.
11. Lin, D.Y., Huang, Y. S., Jeng, J. C., Kuo, H. Y., Chang, C. C., Chao, T. T., Ho, C. C., Chen, Y. C., Lin, T. P., Fang, H. I., Hung, C. C., Suen, C. S., Hwang, M. J., Chang, K. S., Maul, G. G., Shih, H. M., *Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors*. Molecular Cell, 2006. **24**(3): p. 341-54.
12. Santiago, A., Godsey, A. C., Hossain, J., Zhao, L. Y., Liao, D., *Identification of two independent SUMO-interacting motifs in Daxx: evolutionary conserva-*

- tion from *Drosophila* to humans and their biochemical functions. *Cell Cycle*, 2009. **8**(1): p. 76-87.
13. Escobar-Cabrera, E., Okon, M., Lau, D. K., Dart, C. F., Bonvin, A. M., McIntosh, L. P., *Characterizing the N- and C-terminal Small ubiquitin-like modifier (SUMO)-interacting motifs of the scaffold protein DAXX*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. **286**(22): p. 19816-29.
 14. Taylor, R.C., Cullen, S. P., Martin, S. J., *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. *Nature Reviews / Molecular and Cellular Biology*, 2008. **9**(3): p. 231-41.
 15. Pereira, W.O., Amarante-Mendes, G. P., *Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal?* *Scandinavian Journal of Immunology*, 2011. **73**(5): p. 401-7.
 16. Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., Baradaran, B., *Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2015. **16**(6): p. 2129-44.
 17. Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F., Vousden, K. H., *p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill*. *Nature Reviews: Molecular and Cellular Biology*, 2015. **16**(7): p. 393-405.
 18. Joza, N., Kroemer, G. Penninger, J. M., *Genetic analysis of the mammalian cell death machinery*. *TRENDS in Genetics*, 2002. **18**(3): p. 142-9.
 19. Chang, H.Y., Yang, X., Baltimore, D., *Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: requirement of FADD binding for apoptosis but not Jun N-terminal kinase activation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. **96**(4): p. 1252-6.
 20. Kim, Y.-Y., Park, B.-J., Seo, G.-J., Lim, J.-Y., Lee, S.-M., Kimm, K.-C., Park, C., Kim, J., Park, S. I., *Long form of cellular FLICE-inhibitory protein interacts with Daxx and prevents Fas-induced JNK activation*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003. **312**(2): p. 426-33.
 21. Dhanasekaran, D.N., Reddy, E. P., *JNK signaling in apoptosis*. *Oncogene*, 2008. **27**(48): p. 6245-51.
 22. Chang, H.Y., Nishitoh, H., Yang, X., Ichijo, H., Baltimore, D., *Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx*. *Science*, 1998. **281**(5384): p. 1860-3.
 23. Song, J.J., Lee, Y. J., *Daxx Deletion Mutant (Amino Acids 501–625)-Induced Apoptosis Occurs Through the JNK/p38-Bax-dependent Mitochondrial Pathway*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2004. **92**(6): p. 1257-70.
 24. Charette, S.J., Lambert, H., Landry, J., *A kinase-independent function of Ask1 in caspase-independent cell death*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(39): p. 36071-4.
 25. Torii, S., Egan, D. A., Evans, R. A., Reed, J. C., *Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs)*. *EMBO Journal*, 1999. **18**(21): p. 6037-49.
 26. Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D., Pandolfi, P. P., *Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis*. *Journal of Experimental Medicine*, 2000. **191**(4): p. 631-40.

27. Meinecke, I., Cinski, A., Baier, A., Peters, M. A., Dankbar, B., Wille, A., Drynda, A., Mendoza, H., Gay, R. E., Hay, R. T., Ink, B., Gay, S., Pap, T., *Modification of nuclear PML protein by SUMO-1 regulates Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(12): p. 5073-8.
28. Villunger, A., Huang, D. C., Holler, N., Tschopp, J., Strasser, A., *Fas ligand-induced c-Jun kinase activation in lymphoid cells requires extensive receptor aggregation but is independent of DAXX, and Fas-mediated cell death does not involve DAXX, RIP, or RAIDD*. Journal of Immunology, 2000. **165**(3): p. 1337-43.
29. Hofmann, T.G., Möller, A., Hehner, S. P., Welsch, D., Droge, W., Schmitz, M. L., *CD95-induced JNK activation signals are transmitted by the death-inducing signaling complex (DISC), but not by Daxx*. International Journal of Cancer, 2001. **93**(2): p. 185-91.
30. Raoul, C., Barthelemy, C., Couzinet, A., Hancock, D., Pettmann, B., Hueber, A. O., *Expression of a dominant negative form of Daxx in vivo rescues motoneurons from Fas (CD95)-induced cell death*. Journal of Neurobiology, 2005. **62**(2): p. 178-88.
31. Leal-Sanchez, J., Couzinet, A., Rossin, A., Abdel-Sater, F., Chakrabandhu, K., Luci, C., Anjuere, F., Stebe, E., Hancock, D., Hueber, A. O., *Requirement for Daxx in mature T-cell proliferation and activation*. Cell Death and Differentiation, 2007. **14**(4): p. 795-806.
32. Chen, L.-Y., Chen, J. D., *Daxx Silencing Sensitizes Cells to Multiple Apoptotic Pathways*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(20): p. 7108-21.
33. Sharma, R., Sharma, A., Dwivedi, S., Zimniak, P., Awasthi, S., Awasthi, Y. C., *4-Hydroxynonenal self-limits fas-mediated DISC-independent apoptosis by promoting export of Daxx from the nucleus to the cytosol and its binding to Fas*. Biochemistry, 2008. **47**(1): p. 143-56.
34. Chaudhary, P., Sharma, R., Sharma, A., Vatsyayan, R., Yadav, S., Singhal, S. S., Rauniyar, N., Prokai, L., Awasthi, S., Awasthi, Y. C., *Mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal induced pro- and anti-apoptotic signaling*. Biochemistry, 2010. **49**(29): p. 6263-75.
35. Michaelson, J.S., Bader, D., Kuo, F., Kozak, C., Leder, P., *Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development*. Genes & Development, 1999. **13**(15): p. 1918-23.
36. Michaelson, J.S., Leder, P., *RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX*. Journal of Cell Science, 2003. **116**(Pt 2): p. 345-52.
37. Ishov, A.M., Vladimirova, O. V., Maul, G. G., *Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX*. Journal of Cell Science, 2004. **117**(Pt 17): p. 3807-20.
38. Pan, W.W., Yi, F. P., Cao, L. X., Liu, X. M., Shen, Z. F., Bu, Y. Q., Xu, Y., Fan, H. Y., Song, F. Z., *DAXX silencing suppresses mouse ovarian surface epithelial cell growth by inducing senescence and DNA damage*. Gene, 2013. **526**(2): p. 287-94.

39. Charette, S.J., Lavoie, J. N., Lambert, H., Landry, J., *Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27*. Molecular and Cellular Biology, 2000. **20**(20): p. 7602-12.
40. Ko, Y.-G., Kang, Y.-S., Park, H., Seol, W., Kim, J., Kim, T., Park, H.-S., Choi, E.-J., Kim, S., *Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 Controls the Proapoptotic Function of Death-associated Protein (Daxx) in the Cytoplasm*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(42): p. 39103-6.
41. Song, J.J., Lee, Y. J., *Catalase, but not MnSOD, Inhibits Glucose Deprivation-Activated ASK1-MEK-MAPK Signal Transduction Pathway and Prevents Relocalization of Daxx: Hydrogen Peroxide as a Major Second Messenger of Metabolic Oxidative Stress*. Journal of Cellular Biochemistry, 2003. **90**(2): p. 304-14.
42. Xiong, G., Li, L., Sun, S., Li, T., Liao, D., Shu, C., Tuo, Q., *Subcellular localization of DAXX influence ox-LDL induced apoptosis in macrophages*. Molecular Biology Reports, 2014. **41**(11): p. 7183-90.
43. Song, J.J., Lee, Y. J., *Role of the ASK1-SEK1-JNK1-HIPK1 Signal in Daxx Trafficking and ASK1 Oligomerization*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(47): p. 47245-52.
44. Ecsedy, J.A., Michaelson, J. S., Leder, P., *Homeodomain-Interacting Protein Kinase 1 Modulates Daxx Localization, Phosphorylation, and transcriptional Activity*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(3): p. 950-60.
45. Silke, J., Rickard, J. A., Gerlic, M., *The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation*. Nature Immunology, 2015. **16**(7): p. 689-97.
46. Lee, Y.S., Dayma, Y., Park, M. Y., Kim, K. I., Yoo, S. E., Kim, E., *Daxx is a key downstream component of receptor interacting protein kinase 3 mediating retinal ischemic cell death*. FEBS Letters, 2013. **587**(3): p. 266-71.
47. Ulrich, H.D., *The SUMO system: an overview*. Methods in Molecular Biology, 2009. **497**: p. 3-16.
48. Enserink, J.M., *Sumo and the cellular stress response*. Cell Division, 2015. **10**(4).
49. Ryu, S.W., Chae, S. K., Kim, E., *Interaction of Daxx, a Fas binding protein, with sentrin and Ubc9*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **279**(1): p. 6-10.
50. Jang, M.-S., Ryu, S. W., Kim, E., *Modification of Daxx by small ubiquitin-related modifier-1*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **295**(2): p. 495-500.
51. Chen, A., Wang, P. Y., Yang, Y. C., Huang, Y. H., Yeh, J. J., Chou, Y. H., Cheng, J. T., Hong, Y. R., Li, S. S., *SUMO regulates the cytoplasmic nuclear transport of its target protein Daxx*. Journal of Cellular Biochemistry, 2006. **98**(4): p. 895-911.
52. Muromoto, R., Ishida, M., Sugiyama, K., Sekine, Y., Oritani, K., Shimoda, K., Matsuda, T., *Sumoylation of Daxx regulates IFN-induced growth suppression of B lymphocytes and the hormone receptor-mediated transactivation*. Journal of Immunology, 2006. **177**(2): p. 1160-70.

53. McEwan, W.A., James, L. C., *TRIM21-dependent intracellular antibody neutralization of virus infection*. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2015. **167**: p. 167-87.
54. Imai, Y., Kimura, T., Murakami, A., Yajima, N., Sakamaki, K., Yonehara, S., *The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis*. Nature, 1999. **398**(6730): p. 777-85.
55. Milovic-Holm, K., Kriehoff, E., Jensen, K., Will, H., Hofmann, T. G., *FLASH links the CD95 signaling pathway to the cell nucleus and nuclear bodies*. EMBO Journal, 2007. **26**(2): p. 391-401.
56. Tanaka, M., Kamitani, T., *Cytoplasmic relocation of Daxx induced by Ro52 and FLASH*. Histochemistry and Cell Biology, 2010. **134**(3): p. 297-306.
57. Junn, E., Taniguchi, H., Jeong, B. S., Zhao, X., Ichijo, H., Mouradian, M. M., *Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(27): p. 9691-6.
58. Jung, Y.S., Kim, H. Y., Lee, Y. J., Kim, E., *Subcellular localization of Daxx determines its opposing functions in ischemic cell death*. FEBS Letters, 2007. **581**(5): p. 843-52.
59. Niu, Y.L., Li, C., Zhang, G. Y., *Blocking Daxx trafficking attenuates neuronal cell death following ischemia/reperfusion in rat hippocampus CA1 region*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2011. **515**(1-2): p. 89-98.
60. Lindsay, C.R., Giovinazzi, S., Ishov, A. M., *Daxx is a predominately nuclear protein that does not translocate to the cytoplasm in response to cell stress*. Cell Cycle, 2009. **8**(10): p. 1544-51.
61. Kubiczková, L., Sedlaříková, L., Hájek, R., Ševčíková, S., *TGF- β - an excellent servant but a bad master*. Journal of Translational Medicine, 2012. **10**(183).
62. Perlman, R., Schiemann, W. P., Brooks, M. W., Lodish, H. F., Weinberg, R. A., *TGF- β -induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation*. Nature Cell Biology, 2001. **3**(8): p. 708-14.
63. Hofmann, T.G., Stollberg, N., Schmitz, M. L., Will, H., *HIPK2 Regulates Transforming Growth Factor- β -Induced c-Jun NH2-Terminal Kinase Activation and Apoptosis in Human Hepatoma Cells*. Cancer Research, 2003. **63**(23): p. 8271-7.
64. Engelhardt, O.G., Boutell, C., Orr, A., Ullrich, U., Haller, O., Everettb, R. D., *The homeodomain-interacting kinase PKM (HIPK-2) modifies ND10 through both its kinase domain and a SUMO-1 interaction motif and alters the posttranslational modification of PML*. Experimental Cell Research, 2003. **283**(1): p. 36-50.
65. Chang, C.-C., Lin, D.-Y., Fang, H.-I., Chen, R.-H., Shih, H.-M., *Daxx mediates the SUMO-dependent transcriptional repression of Smad4*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **35**(Pt 6): p. 1397-400.
66. Čermák, L., Šimová, Š., Pintzas, A., Hořejší, V., Anděra, L., *Molecular Mechanisms Involved in CD43-mediated Apoptosis of TF-1 Cells: Roles of transcription, Daxx expression and adhesion molecules*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(10): p. 7955-61.

67. Hoeflich, K.P., Yeh, W. C., Yao, Z., Mak, T. W., Woodgett, J. R., *Mediation of TNF receptor-associated factor effector functions by apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1)*. *Oncogene*, 1999. **18**(42): p. 5814-20.
68. Kitamura, T., Fukuyo, Y., Inoue, M., Horikoshi, N. T., Shindoh, M., Rogers, B. E., Usheva, A., Horikoshi, N., *Mutant p53 disrupts the stress MAPK activation circuit induced by ASK1-dependent stabilization of Daxx*. *Cancer Research*, 2009. **69**(19): p. 7681-8.
69. Fukuyo, Y., Kitamura, T., Inoue, M., Horikoshi, N. T., Higashikubo, R., Hunt, C. R., Usheva, A., Horikoshi, N., *Phosphorylation-dependent Lys63-linked polyubiquitination of Daxx is essential for sustained TNF- α -induced ASK1 activation*. *Cancer Research*, 2009. **69**(19): p. 7512-7.
70. Park, J., Lee, J. H., La, M., Jang, M. J., Chae, G. W., Kim, S. B., Tak, H., Jung, Y., Byun, B., Ahn, J. K., Joe, C. O., *Inhibition of NF-kappaB acetylation and its transcriptional activity by Daxx*. *Journal of Molecular Biology*, 2007. **368**(2): p. 388-97.
71. Hayden, M.S., Ghosh, S., *Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines*. *Seminars in Immunology*, 2014. **26**(3): p. 253-66.
72. Gongora, R., Stephan, R. P., Zhang, Z., Cooper, M. D., *An essential role for Daxx in the inhibition of B lymphopoiesis by type I interferons*. *Immunity*, 2001. **14**(6): p. 727-37.
73. Shimoda, K., Kamesaki, K., Numata, A., Aoki, K., Matsuda, T., Oritani, K., Tamiya, S., Kato, K., Takase, K., Imamura, R., Yamamoto, T., Miyamoto, T., Nagafuji, K., Gondo, H., Nagafuchi, S., Nakayama, K., Harada, M., *Cutting edge: tyk2 is required for the induction and nuclear translocation of Daxx which regulates IFN- α -induced suppression of B lymphocyte formation*. *Journal of Immunology*, 2002. **169**(9): p. 4707-11.
74. Aoki, K., Shimoda, K., Oritani, K., Matsuda, T., Kamezaki, K., Muromoto, R., Numata, A., Tamiya, S., Haro, T., Ishikawa, F., Takase, K., Yamamoto, T., Yumioka, T., Miyamoto, T., Nagafuji, K., Gondo, H., Nagafuchi, S., Nakayama, K., Harada, M., *Limitin, an interferon-like cytokine, transduces inhibitory signals on B-cell growth through activation of Tyk2, but not Stat1, followed by induction and nuclear translocation of Daxx*. *Experimental Hematology*, 2003. **31**(12): p. 1317-22.
75. Oritani, K., Kanakura, Y., *IFN-zeta/ limitin: a member of type I IFN with mild lympho-myelosuppression*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2005. **9**(2): p. 244-54.
76. Ishida, N., Oritani, K., Shiraga, M., Yoshida, H., Kawamoto, S., Ujiie, H., Masaie, H., Ichii, M., Tomiyama, Y., Kanakura, Y., *Differential effects of a novel IFN-zeta/limitin and IFN- α on signals for Daxx induction and Crk phosphorylation that couple with growth control of megakaryocytes*. *Experimental Hematology*, 2005. **33**(4): p. 495-503.
77. Qiu, H., Fan, Y., Joyee, A. G., Wang, S., Han, X., Bai, H., Jiao, L., Van Rooijen, N., Yang, X., *Type I IFNs enhance susceptibility to Chlamydia muridarum lung infection by enhancing apoptosis of local macrophages*. *Journal of Immunology*, 2008. **181**(3): p. 2092-102.

78. Yun, H.J., Yoon, J. H., Lee, J. K., Noh, K. T., Yoon, K. W., Oh, S. P., Oh, H. J., Chae, J. S., Hwang, S. G., Kim, E. H., Maul, G. G., Lim, D. S., Choi, E. J., *Daxx mediates activation-induced cell death in microglia by triggering MST1 signaling*. EMBO Journal, 2011. **30**(12): p. 2465-76.
79. Kawai, T., Akira, S., Reed, J. C., *ZIP kinase triggers apoptosis from nuclear PML oncogenic domains*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(17): p. 6174-86.
80. Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., Samali, A., *Cellular stress responses: cell survival and cell death*. International Journal of Cell Biology, 2010(2010:214074).
81. Murray-Zmijewski, F., Slee, E. A., Lu, X., *A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress*. Nature Reviews / Molecular and Cellular Biology, 2008. **9**(9): p. 702-12.
82. Kruse, J.P., Gu, W., *Modes of p53 regulation*. Cell, 2009. **137**(4): p. 609-22.
83. Hofmann, T.G., Möller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Dröge, W., Will, H., Schmitz, M. L., *Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2*. Nature Cell Biology, 2002. **4**(1): p. 1-10.
84. D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., Piaggio, G., Fanciulli, M., Appella, E., Soddu, S., *Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis*. Nature Cell Biology, 2002. **4**(1): p. 11-9.
85. Di Stefano, V., Mattiussi, M., Sacchi, A., D'Orazi, G., *HIPK2 inhibits both MDM2 gene and protein by, respectively, p53-dependent and independent regulations*. FEBS Letters, 2005. **579**(25): p. 5473-80.
86. Rinaldo, C., Prodosmo, A., Mancini, F., Iacovelli, S., Sacchi, A., Moretti, F., Soddu, S., *MDM2-regulated degradation of HIPK2 prevents p53Ser46 phosphorylation and DNA damage-induced apoptosis*. Molecular Cell, 2007. **25**(5): p. 739-50.
87. Zhang, X.P., Liu, F., Wang, W., *Interplay between Mdm2 and HIPK2 in the DNA damage response*. Journal of the Royal Society / Interface, 2014. **11**(96).
88. Burton, G.J., Jauniaux, E., *Oxidative stress*. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, 2011. **25**(4): p. 287-89.
89. Ray, P.D., Huang, B. W., Tsuji, Y., *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. Cellular Signalling, 2012. **24**(5): p. 981-90.
90. Maryanovich, M., Gross, A., *A ROS rheostat for cell fate regulation*. Trends in Cell Biology, 2013. **23**(3): p. 129-34.
91. Schieber, M., Chandel, N. S., *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. Current Biology, 2014. **24**(10): p. R453-62.
92. Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., Ichijo, H., *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1*. EMBO Journal, 1998. **17**(9): p. 2596-606.

93. Song, J.J., Rhee, J. G., Suntharalingam, M., Walsh, S. A., Spitz, D. R., Lee, Y. J., *Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H₂O₂*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(48): p. 46566-75.
94. Song, J.J., Lee, Y. J., *Effect of Glucose Concentration on Activation of the ASK1–SEK1–JNK1 Signal Transduction Pathway*. Journal of Cellular Biochemistry, 2003. **89**(4): p. 653-62.
95. Akterin, S., Cowburn, R. F., Miranda-Vizuete, A., Jiménez, A., Bogdanovic, N., Winblad, B., Cedazo-Minguez, A., *Involvement of glutaredoxin-1 and thioredoxin-1 in beta-amyloid toxicity and Alzheimer's disease*. Cell Death and Differentiation, 2006. **13**(9): p. 1454-65.
96. Bi, F.F., Xiao, B., Hu, Y. Q., Tian, F. F., Wu, Z. G., Ding, L., Zhou, X. F., *Expression and localization of Fas-associated proteins following focal cerebral ischemia in rats*. Brain Research, 2008. **1191**: p. 30-8.
97. Ma, Q., Devarajan, P., *Induction of proapoptotic Daxx following ischemic acute kidney injury*. Kidney International, 2008. **74**(3): p. 310-8.
98. Khelifi, A.F., Stagno D'Alcontres, M., Salomoni, P., *Daxx is required for stress-induced cell death and JNK activation*. Cell Death and Differentiation, 2005. **12**(7): p. 724-33.
99. Kim, K.S., Hwang, H. A., Chae, S. K., Ha, H., Kwon, K. S., *Upregulation of Daxx mediates apoptosis in response to oxidative stress*. Journal of Cellular Biochemistry, 2005. **96**(2): p. 330-8.
100. Karunakaran, S., Diwakar, L., Saeed, U., Agarwal, V., Ramakrishnan, S., Iyengar, S., Ravindranath, V., *Activation of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) and translocation of death-associated protein, Daxx, in substantia nigra pars compacta in a mouse model of Parkinson's disease: protection by alpha-lipoic acid*. FASEB Journal, 2007. **21**(9): p. 2226-36.
101. Saeed, U., Karunakaran, S., Meka, D. P., Koumar, R. C., Ramakrishnan, S., Joshi, S. D., Nidadavolu, P., Ravindranath, V., *Redox activated MAP kinase death signaling cascade initiated by ASK1 is not activated in female mice following MPTP: novel mechanism of neuroprotection*. Neurotoxicity Research, 2009. **16**(2): p. 116-26.
102. Saeed, U., Ray, A., Valli, R. K., Kumar, A. M., Ravindranath, V., *DJ-1 loss by glutaredoxin but not glutathione depletion triggers Daxx translocation and cell death*. Antioxidants & Redox Signaling, 2010. **13**(2): p. 127-44.
103. Tang, J., Liu, J., Li, X., Zhong, Y., Zhong, T., Liu, Y., Wang, J. H., Jiang, Y., *PRAK interacts with DJ-1 and prevents oxidative stress-induced cell death*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2014: p. 735618.
104. Xiao, B., Bi, F. F., Hu, Y. Q., Tian, F. F., Wu, Z. G., Mujlli, H. M., Ding, L., Zhou, X. F., *Edaravone neuroprotection effected by suppressing the gene expression of the Fas signal pathway following transient focal ischemia in rats*. Neurotoxicity Research, 2007. **12**(3): p. 155-62.
105. Yaniv, G., Shilkrut, M., Larisch, S., Binah, O., *Hydrogen peroxide predisposes neonatal rat ventricular myocytes to Fas-mediated apoptosis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **336**(3): p. 740-6.

106. Zobalová, R., Swettenham, E., Chladová, J., Dong, L. F., Neužil, J., *Daxx inhibits stress-induced apoptosis in cardiac myocytes*. Redox Report, 2008. **13**(6): p. 263-70.
107. Kwon, T.R., Jeong, S. J., Lee, H. J., Lee, H. J., Sohn, E. J., Jung J. H., Kim, J. H., Jung, D. B., Lu, J., Kim, S. H., *Reactive oxygen species-mediated activation of JNK and down-regulation of DAXX are critically involved in penta-O-galloyl-beta-d-glucose-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia K562 cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012. **424**(3): p. 530-7.
108. Hakem, R., *DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly*. EMBO Journal, 2008. **27**(4): p. 589-605.
109. Farrell, A.W., Halliday, G. M., Lyons, J. G., *Chromatin structure following UV-induced DNA damage-repair or death?* International Journal of Molecular Sciences, 2011. **12**(11): p. 8063-85.
110. Roos, W.P., Kaina, B., *DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis*. Cancer Letters, 2013. **332**(2): p. 237-48.
111. Chapman, J.R., Taylor, M. R. G., Boulton, S. J., *Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice*. Molecular Cell, 2012. **47**(4): p. 497-510.
112. Shibata, A., Jeggo, P. A. , *DNA Double-strand Break Repair in a Cellular Context*. Clinical Oncology, 2014. **26**(5): p. 243-9.
113. Sirbu, B.M., Cortez, D., *DNA Damage Response: Three Levels of DNA Repair Regulation*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013. **5**(8): p. a012724.
114. Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E. R., 3rd, Hurov, K. E., Luo, J., Bakalarski, C. E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S. P., Elledge, S. J., *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1160-6.
115. Wu, S., Loke, H. N., Rehemtulla, A., *Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by Daxx*. Neoplasia, 2002. **4**(6): p. 486-92.
116. Kitagawa, D., Kajihō, H., Negishi, T., Ura, S., Watanabe, T., Wada, T., Ichijo, H., Katada, T., Nishina, H., *Release of RASSF1C from the nucleus by Daxx degradation links DNA damage and SAPK/JNK activation*. EMBO Journal, 2006. **25**(14): p. 3286-97.
117. Sudharsan, R., Azuma, Y., *The SUMO ligase PIAS1 regulates UV-induced apoptosis by recruiting Daxx to SUMOylated foci*. Journal of Cell Science, 2012. **125**(Pt 23): p. 5819-29.
118. Tang, J., Qu, L. K., Zhang, J., Wang, W., Michaelson, J. S., Degenhardt, Y. Y., El-Deiry, W. S., Yang, X., *Critical role for Daxx in regulating Mdm2*. Nature Cell Biology, 2006. **8**(8): p. 855-62.
119. Zhang, H., He, J., Li, J., Tian, D., Gu, L., Zhou, M., *Methylation of RASSF1A gene promoter is regulated by p53 and DAXX*. FASEB Journal, 2013. **27**(1): p. 232-42.

120. Zhao, L.Y., Liu, J., Sidhu, G. S., Niu, Y., Liu, Y., Wang, R., Liao, D., *Negative Regulation of p53 Functions by Daxx and the Involvement of MDM2*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(48): p. 50566-79.
121. Li, Q., Wang, X., Wu, X., Rui, Y., Liu, W., Wang, J., Wang, X., Liou, Y. C., Ye, Z., Lin, S. C., *Daxx cooperates with the Axin/HIPK2/p53 complex to induce cell death*. Cancer Research, 2007. **67**(1): p. 66-74.
122. Gostissa, M., Morelli, M., Mantovani, F., Guida, E., Piazza, S., Collavin, L., Brancolini, C., Schneider, C., Del Sal, G., *The transcriptional repressor hDaxx potentiates p53-dependent apoptosis*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(46): p. 48013-23.
123. Boehrer, S., Nowak, D., Hochmuth, S., Kim, S. Z., Trepohl, B., Afkir, A., Hoelzer, D., Mitrou, P. S., Weidmann, E., Chow, K. U., *Daxx overexpression in T-lymphoblastic Jurkat cells enhances caspase-dependent death receptor- and drug-induced apoptosis in distinct ways*. Cell Signalling, 2005. **17**(5): p. 581-95.
124. Ohiro, Y., Usheva, A., Kobayashi, S., Duffy, S. L., Nantz, R., Gius, D., Horikoshi, N., *Inhibition of stress-inducible kinase pathways by tumorigenic mutant p53*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(1): p. 322-34.
125. Kim, E.J., Park, J. S., Um, S. J., *Identification of Daxx interacting with p73, one of the p53 family, and its regulation of p53 activity by competitive interaction with PML*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(18): p. 5356-67.
126. Boehrer, S., Nowak, D., Schaaf, S., Bergmann, M., Brieger, A., Hoelzer, D., Mitrou, P. S., Weidmann, E., Chow, K. U., *In malignant myeloid cells expression of Daxx downregulates expression of p53 and of the inhibitors of apoptosis proteins*. Hematology Journal, 2004. **5**(6): p. 513-8.
127. Li, M., Brooks, C. L., Kon, N., Gu, W., *A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway*. Molecular Cell, 2004. **13**(6): p. 879-86.
128. Zhang, X., Gu, L., Li, J., Shah, N., He, J., Yang, L., Hu, Q., Zhou, M., *Degradation of MDM2 by the interaction between berberine and DAXX leads to potent apoptosis in MDM2-overexpressing cancer cells*. Cancer Research, 2010. **70**(23): p. 9895-904.
129. Li, J., Gu, L., Zhang, H., Liu, T., Tian, D., Zhou, M., Zhou, S., *Berberine represses DAXX gene transcription and induces cancer cell apoptosis*. Laboratory Investigation, 2013. **93**(3): p. 354-64.
130. Song, M.S., Song, S. J., Kim, S. Y., Oh, H. J., Lim, D. S., *The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex*. EMBO Journal, 2008. **27**(13): p. 1863-74.
131. Tang, J., Qu, L., Pang, M., Yang, X., *Daxx is reciprocally regulated by Mdm2 and Hausp*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010. **393**(3): p. 542-5.
132. Kim, W., Kim, M., Jho, E. H., *Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus*. Biochemical Journal, 2013. **450**(1): p. 9-21.
133. Hwang, J.R., Zhang, C., Patterson, C., *C-terminus of heat shock protein 70-interacting protein facilitates degradation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1-dependent apoptosis*. Cell Stress & Chaperones, 2005. **10**(2): p. 147-56.

134. McDonough, H., Charles, P. C., Hilliard, E. G., Qian, S. B., Min, J. N., Portbury, A., Cyr, D. M., Patterson, C., *Stress-dependent Daxx-CHIP interaction suppresses the p53 apoptotic program*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(21): p. 20649-59.
135. Kumar, N., Wethkamp, N., Waters, L. C., Carr, M. D., Klemptner, K. H., *Tumor suppressor protein Pcd4 interacts with Daxx and modulates the stability of Daxx and the Hipk2-dependent phosphorylation of p53 at serine 46*. Oncogenesis, 2013. **2**: p. e37.
136. Chang, C.C., Naik, M. T., Huang, Y. S., Jeng, J. C., Liao, P. H., Kuo, H. Y., Ho, C. C., Hsieh, Y. L., Lin, C. H., Huang, N. J., Naik, N. M., Kung, C. C., Lin, S. Y., Chen, R. H., Chang, K. S., Huang, T. H., Shih, H. M., *Structural and functional roles of Daxx SIM phosphorylation in SUMO paralog-selective binding and apoptosis modulation*. Molecular Cell, 2011. **42**(1): p. 62-74.
137. Everett, R.D., Earnshaw, W. C., Pluta, A. F., Sternsdorf, T., Ainsztein, A. M., Carmena, M., Ruchaud, S., Hsu, W.-L., Orr, A., *A dynamic connection between centromeres and ND10 proteins*. Journal of Cell Science, 1999. **112**(Pt 20): p. 3443-54.
138. Lin, D.Y., Shih, H. M., *Essential role of the 58-kDa microspherule protein in the modulation of Daxx-dependent transcriptional repression as revealed by nucleolar sequestration*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(28): p. 25446-56.
139. Ivanchuk, S.M., Mondal, S., Rutka, J. T., *p14ARF interacts with DAXX: effects on HDM2 and p53*. Cell Cycle, 2008. **7**(12): p. 1836-50.
140. Tang, M., Li, Y., Zhang, Y., Chen, Y., Huang, W., Wang, D., Zaug, A. J., Liu, D., Zhao, Y., Cech, T. R., Ma, W., Songyang, Z., *Disease mutant analysis identifies a new function of DAXX in telomerase regulation and telomere maintenance*. Journal of Cell Science, 2015. **128**(2): p. 331-41.
141. Morozov, V.M., Gavrilova, E. V., Ogryzko, V. V., Ishov, A. M., *Dualistic function of Daxx at centromeric and pericentromeric heterochromatin in normal and stress conditions*. Nucleus, 2012. **3**(3): p. 276-85.
142. Dellaire, G., Eskiw, C. H., Dehghani, H., Ching, R. W., Bazett-Jones, D. P., *Mitotic accumulations of PML protein contribute to the re-establishment of PML nuclear bodies in G1*. Journal of Cell Science, 2006. **119**(Pt 6): p. 1034-42.
143. Kriehoff-Henning, E., Hofmann, G. T., *Role of nuclear bodies in apoptosis signalling*. Biochimica et Biophysica Acta, 2008. **1783**(11): p. 2185-94.
144. Lallemand-Breitenbach, V., de Thé, H., *PML nuclear bodies*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010. **2**(5): p. a000661.
145. Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P. S., Dejean, A., Pandolfi, P. P., *Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation*. Blood, 2000. **95**(9): p. 2748-52.
146. Ullmann, R., Chien, C. D., Avantaggiati, M. L., Muller, S., *An acetylation switch regulates SUMO-dependent protein interaction networks*. Molecular Cell, 2012. **46**(6): p. 759-70.
147. Geoffroy, M.-C., Chelbi-Alix, M. K., *Role of Promyelocytic Leukemia Protein in Host Antiviral Defense*. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2011. **31**(1): p. 145-58.

148. Weidtkamp-Peters, S., Lenser, T., Negorev, D., Gerstner, N., Hofmann, T. G., Schwanitz, G., Hoischen, C., Maul, G., Dittrich, P., Hemmerich, P., *Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies*. Journal of Cell Science, 2008. **121**(16): p. 2731-43.
149. Engelhardt, O.G., Ullrich, E., Kochs, G., Haller, O., *Interferon-induced antiviral Mx1 GTPase is associated with components of the SUMO-1 system and promyelocytic leukemia protein nuclear bodies*. Experimental Cell Research, 2001. **271**(2): p. 286-95.
150. Kukhanova, M.K., Korovina, A. N., Kochetkov, S. N., *Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors*. Biochemistry (Moscow), 2014. **79**(13): p. 1635-52.
151. Saffert, R.T., Kalejta, R. F., *Human cytomegalovirus gene expression is silenced by Daxx-mediated intrinsic immune defense in model latent infections established in vitro*. Journal of Virology, 2007. **81**(17): p. 9109-20.
152. Bigley, T.M., Reitsma, J. M., Mirza, S. P., Terhune, S. S., *Human cytomegalovirus pUL97 regulates the viral major immediate early promoter by phosphorylation-mediated disruption of histone deacetylase 1 binding*. Journal of Virology, 2013. **87**(13): p. 7393-40.
153. Lukashchuk, V., McFarlane, S., Everett, R. D., Preston, C. M., *Human cytomegalovirus protein pp71 displaces the chromatin-associated factor ATRX from nuclear domain 10 at early stages of infection*. Journal of Virology, 2008. **82**(24): p. 12543-54.
154. Newhart, A., Rafalska-Metcalf, I. U., Yang, T., Negorev, D. G., Janicki, S. M., *Single-cell analysis of Daxx and ATRX-dependent transcriptional repression*. Journal of Cell Science, 2012. **125**(Pt 22): p. 5489-501.
155. Hofmann, H., Sindre, H., Stamminger, T., *Functional interaction between the pp71 protein of human cytomegalovirus and the PML-interacting protein human Daxx*. Journal of Virology, 2002. **76**(11): p. 5769-83.
156. Ishov, A.M., Vladimirova, O. V., Maul, G. G., *Daxx-mediated accumulation of human cytomegalovirus tegument protein pp71 at ND10 facilitates initiation of viral infection at these nuclear domains*. Journal of Virology, 2002. **76**(15): p. 7705-12.
157. Cantrell, S.R., Bresnahan, W. A., *Interaction between the human cytomegalovirus UL82 gene product (pp71) and hDaxx regulates immediate-early gene expression and viral replication*. Journal of Virology, 2005. **79**(12): p. 7792-802.
158. Tang, Q., Maul, G. G., *Mouse cytomegalovirus immediate-early protein 1 binds with host cell repressors to relieve suppressive effects on viral transcription and replication during lytic infection*. Journal of Virology, 2003. **77**(2): p. 1357-67.
159. Saffert, R.T., Kalejta, R. F., *Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression*. Journal of Virology, 2006. **80**(8): p. 3863-71.
160. Cantrell, S.R., Bresnahan, W. A., *Human cytomegalovirus (HCMV) UL82 gene product (pp71) relieves hDaxx-mediated repression of HCMV replication*. Journal of Virology, 2006. **80**(12): p. 6188-91.

161. Hwang, J., Kalejta, R. F., *Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells*. *Virology*, 2007. **367**(2): p. 334-8.
162. Winkler, L.L., Hwang, J., Kalejta, R. F., *Ubiquitin-independent proteasomal degradation of tumor suppressors by human cytomegalovirus pp71 requires the 19S regulatory particle*. *Journal of Virology*, 2013. **87**(8): p. 4665-71.
163. Reeves, M., Woodhall, D., Compton, T., Sinclair, J., *Human cytomegalovirus IE72 protein interacts with the transcriptional repressor hDaxx to regulate LUNA gene expression during lytic infection*. *Journal of Virology*, 2010. **84**(14): p. 7185-94.
164. Salsman, J., Wang, X., Frappier, L., *Nuclear body formation and PML body remodeling by the human cytomegalovirus protein UL35*. *Virology*, 2011. **414**(2): p. 119-29.
165. Preston, C.M., Nicholl, M. J., *Role of the cellular protein hDaxx in human cytomegalovirus immediate-early gene expression*. *Journal of General Virology*, 2006. **87**(Pt 5): p. 1113-21.
166. Woodhall, D.L., Groves, I. J., Reeves, M. B., Wilkinson, G., Sinclair, J. H., *Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(49): p. 37652-60.
167. Tavalai, N., Papior, P., Rechter, S., Stamminger, T., *Nuclear domain 10 components promyelocytic leukemia protein and hDaxx independently contribute to an intrinsic antiviral defense against human cytomegalovirus infection*. *Journal of Virology*, 2008. **82**(1): p. 126-37.
168. Glass, M., Everett, R. D., *Components of promyelocytic leukemia nuclear bodies (ND10) act cooperatively to repress herpesvirus infection*. *Journal of Virology*, 2013. **87**(4): p. 2174-85.
169. Dağ, F., Dölken, L., Holzki, J., Drabig, A., Weingärtner, A., Schwerk, J., Lienenklaus, S., Conte, I., Geffers, R., Davenport, C., Rand, U., Köster, M., Weiß, S., Adler, B., Wirth, D., Messerle, M., Hauser, H., Cičin-Šain, L., *Reversible silencing of cytomegalovirus genomes by type I interferon governs virus latency*. *PLoS Pathogens*, 2014. **10**(2): p. e1003962.
170. Tsai, K., Thikmyanova, N., Wojcechowskyj, J. A., Delecluse, H. J., Lieberman, P. M., *EBV tegument protein BNRF1 disrupts DAXX-ATRAX to activate viral early gene transcription*. *PLoS Pathogens*, 2011. **7**(11): p. e1002376.
171. Tsai, K., Chan, L., Gibeault, R., Conn, K., Dheekollu, J., Domsic, J., Marmorstein, R., Schang, L. M., Lieberman, P. M., *Viral reprogramming of the Daxx histone H3.3 chaperone during early Epstein-Barr virus infection*. *Journal of Virology*, 2014. **88**(24): p. 14350-63.
172. Lukashchuk, V., Everett, R. D., *Regulation of ICP0-null mutant herpes simplex virus type 1 infection by ND10 components ATRX and hDaxx*. *Journal of Virology*, 2010. **84**(8): p. 4026-40.
173. Catez, F., Picard, C., Held, K., Gross, S., Rousseau, A., Theil, D., Sawtell, N., Labetoulle, M., Lomonte, P., *HSV-1 genome subnuclear positioning and associations with host-cell PML-NBs and centromeres regulate LAT locus transcription during latency in neurons*. *PLoS Pathogens*, 2012. **8**(8): p. e1002852.

174. Full, F., Jungnickl, D., Reuter, N., Bogner, E., Brulois, K., Scholz, B., Stürzl, M., Myoung, J., Jung, J. U., Stamminger, T., Ensser, A., *Kaposi's sarcoma associated herpesvirus tegument protein ORF75 is essential for viral lytic replication and plays a critical role in the antagonization of ND10-instituted intrinsic immunity*. PLoS Pathogens, 2014. **10**(1): p. e1003863.
175. Zhao, L.Y., Colosimo, A. L., Liu, Y., Wan, Y., Liao, D., *Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein binds to Daxx and eliminates enhancement of p53-dependent transcription by Daxx*. Journal of Virology, 2003. **77**(21): p. 11809-21.
176. Ullman, A.J., Hearing, P., *Cellular proteins PML and Daxx mediate an innate antiviral defense antagonized by the adenovirus E4 ORF3 protein*. Journal of Virology, 2008. **82**(15): p. 7325-35.
177. Schreiner, S., Wimmer, P., Sirma, H., Everett, R. D., Blanchette, P., Groitl, P., Dobner, T., *Proteasome-dependent degradation of Daxx by the viral E1B-55K protein in human adenovirus-infected cells*. Journal of Virology, 2010. **84**(14): p. 7029-38.
178. Schreiner, S., Wimmer, P., Groitl, P., Chen, S. Y., Blanchette, P., Branton, P. E., Dobner, T., *Adenovirus type 5 early region 1B 55K oncoprotein-dependent degradation of cellular factor Daxx is required for efficient transformation of primary rodent cells*. Journal of Virology, 2011. **85**(17): p. 8752-65.
179. Schreiner, S., Burck, C., Glass, M., Groitl, P., Wimmer, P., Kinkley, S., Mund, A., Everett, R. D., Dobner, T., *Control of human adenovirus type 5 gene expression by cellular Daxx/ATRAX chromatin-associated complexes*. Nucleic Acids Research, 2013. **41**(6): p. 3532-50.
180. Wimmer, P., Blanchette, P., Schreiner, S., Ching, W., Groitl, P., Berscheminski, J., Branton, P. E., Will, H., Dobner, T., *Cross-talk between phosphorylation and SUMOylation regulates transforming activities of an adenoviral oncoprotein*. Oncogene, 2013. **32**(13): p. 1626-37.
181. Schreiner, S., Martinez, R., Groitl, P., Rayne, F., Vaillant, R., Wimmer, P., Bossis, G., Sternsdorf, T., Marcinowski, L., Ruzsics, Z., Dobner, T., Wodrich, H., *Transcriptional activation of the adenoviral genome is mediated by capsid protein VI*. PLoS Pathogens, 2012. **8**(2): p. e1002549.
182. Huang, L., Xu, G. L., Zhang, J. Q., Tian, L., Xue, J. L., Chen, J. Z., Jia, W., *Daxx interacts with HIV-1 integrase and inhibits lentiviral gene expression*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **373**(2): p. 241-5.
183. Greger, J.G., Katz, R. A., Ishov, A. M., Maul, G. G., Skalka, A. M., *The cellular protein daxx interacts with avian sarcoma virus integrase and viral DNA to repress viral transcription*. Journal of Virology, 2005. **79**(8): p. 4610-8.
184. Shalginskikh, N., Poleshko, A., Skalka, A. M., Katz, R. A., *Retroviral DNA methylation and epigenetic repression are mediated by the antiviral host protein Daxx*. Journal Virology, 2013. **87**(4): p. 2137-50.
185. Poleshko, A., Palagin, I., Zhang, R., Boimel, P., Castagna, C., Adams, P. D., Skalka, A. M., Katz, R. A., *Identification of cellular proteins that maintain retroviral epigenetic silencing: evidence for an antiviral response*. Journal of Virology, 2008. **82**(5): p. 2313-23.

186. Elsässer, S.J., Noh, K. M., Diaz, N., Allis, C. D., Banaszynski, L. A., *Histone H3.3 is required for endogenous retroviral element silencing in embryonic stem cells*. *Nature*, 2015. **522**(7555): p. 240-4.
187. Haugh, K.A., Shalginskikh, N., Nogusa, S., Skalka, A. M., Katz, R. A., Balachandran, S., *The interferon-inducible antiviral protein Daxx is not essential for interferon-mediated protection against avian sarcoma virus*. *Virology Journal*, 2014. **11**: p. 100.
188. Gurer, C., Berthoux, L., Luban, J., *Covalent modification of human immunodeficiency virus type 1 p6 by SUMO-1*. *Journal of Virology*, 2005. **79**(2): p. 910-7.
189. Dutrieux, J., Maarifi, G., Portilho, D. M., Arhel, N. J., Chelbi-Alix, M. K., Nisole, S., *PML/TRIM19-Dependent Inhibition of Retroviral Reverse-Transcription by Daxx*. *PLoS Pathogens*, 2015. **11**(11): p. e1005280.
190. Florin, L., Schäfer, F., Sotlar, K., Streeck, R. E., Sapp, M., *Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein l2*. *Virology*, 2002. **295**(1): p. 97-107.
191. Becker, K.A., Florin, L., Sapp, C., Sapp, M., *Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization*. *Virology*, 2003. **314**(1): p. 161-7.
192. Kivipöld, P., Vösa, L., Ustav, M., Kurg, R., *DAXX modulates human papillomavirus early gene expression and genome replication in U2OS cells*. *Virology Journal*, 2015. **12**: p. 104.
193. Li, X.D., Mäkelä, T. P., Guo, D., Soliymani, R., Koistinen, V., Vapalahti, O., Vaheri, A., Lankinen, H., *Hantavirus nucleocapsid protein interacts with the Fas-mediated apoptosis enhancer Daxx*. *Journal of General Virology*, 2002. **83**(Pt 4): p. 759-66.
194. Limjindaporn, T., Netsawang, J., Noisakran, S., Thiemmecca, S., Wongwiwat, W., Sudsaward, S., Avirutnan, P., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Sriburi, R., Sittisombut, N., Yenchitsomanus, P. T., Malasit, P., *Sensitization to Fas-mediated apoptosis by dengue virus capsid protein*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007. **362**(2): p. 334-9.
195. Netsawang, J., Noisakran, S., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Wongwiwat, W., Malasit, P., Yenchitsomanus, P. T., Limjindaporn, T., *Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis*. *Virus Research*, 2010. **147**(2): p. 275-83.
196. Nagila, A., Netsawang, J., Srisawat, C., Noisakran, S., Morchang, A., Yasamut, U., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Malasit, P., Yenchitsomanus, P. T., Limjindaporn, T., *Role of CD137 signaling in dengue virus-mediated apoptosis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011. **410**(3): p. 428-33.
197. Khunchai, S., Junking, M., Suttitheptumrong, A., Yasamut, U., Sawasdee, N., Netsawang, J., Morchang, A., Chaowalit, P., Noisakran, S., Yenchitsomanus, P. T., Limjindaporn, T., *Interaction of dengue virus nonstructural protein 5 with Daxx modulates RANTES production*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012. **423**(2): p. 398-403.
198. Netsawang, J., Panaampon, J., Khunchai, S., Kooptiwut, S., Nagila, A., Puttikhunt, C., Yenchitsomanus, P. T., Limjindaporn, T., *Dengue virus disrupts*

- Daxx and NF- κ B interaction to induce CD137-mediated apoptosis.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014. **450**(4): p. 1485-91.
199. Piñeiro, D., Ramajo, J., Bradrick, S. S., Martínez-Salas, E., *Gemin5 proteolysis reveals a novel motif to identify L protease targets.* Nucleic Acids Research, 2012. **40**(11): p. 4942-53.
200. Dionne, K.R., Zhuang, Y., Leser, J. S., Tyler, K. L., Clarke, P., *Daxx upregulation within the cytoplasm of reovirus-infected cells is mediated by interferon and contributes to apoptosis.* Journal of Virology, 2013. **87**(6): p. 3447-60.
201. Halder, U.C., Bhowmick, R., Roy Mukherjee, T., Nayak, M. K., Chawla-Sarkar, M., *Phosphorylation drives an apoptotic protein to activate antiapoptotic genes: paradigm of influenza A matrix 1 protein function.* Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(20): p. 14554-68.
202. Maeshima, K., Imai, R., Tamura, S., Nozaki, T., *Chromatin as dynamic 10-nm fibers.* Chromosoma, 2014. **123**(3): p. 225-37.
203. Richards, E.J., Elgin, S. C. R., *Epigenetic Codes for Heterochromatin Formation and Silencing: Rounding up the Usual Suspects.* Cell, 2002. **108**(4): p. 489-500.
204. Siggins, L., Ekwall, K., *Epigenetics, chromatin and genome organization: recent advances from the ENCODE project.* Journal of Internal Medicine, 2014. **276**(3): p. 201-14.
205. Hargreaves, D.C., Crabtree, G. R., *ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms.* Cell Research, 2011. **21**(3): p. 396-420.
206. Studitsky, V.M., Walter, W., Kireeva, M., Kashlev, M., Felsenfeld, G., *Chromatin remodeling by RNA polymerases.* TRENDS in Biochemical Sciences, 2004. **29**(3): p. 127-35.
207. Xue, Y., Gibbons, R., Yan, Z., Yang, D., McDowell, T. L., Sechi, S., Qin, J., Zhou, S., Higgs, D., Wang, W., *The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(19): p. 10635-40.
208. Santoro, S.W., Dulac, C., *Histone variants and cellular plasticity.* Trends in Genetics, 2015. **31**(9): p. 516-27.
209. Avvakumov, N., Nourani, A., Côté, J., *Histone chaperones: modulators of chromatin marks.* Molecular Cell, 2011. **41**(5): p. 502-14.
210. Venkatesh, S., Workman, J. L., *Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription.* Nature Reviews / Molecular and Cellular Biology, 2015. **16**(3): p. 178-89.
211. Meng, H., Cao, Y., Qin, J., Song, X., Zhang, Q., Shi, Y., Cao, L., *DNA methylation, its mediators and genome integrity.* International Journal of Biological Sciences, 2015. **11**(5): p. 604-17.
212. Hahn, S., *Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery.* Nature Structural & Molecular Biology, 2004. **11**(5): p. 394-403.
213. Kadonaga, J.T., *Regulation of RNA Polymerase II Transcription by Sequence-Specific DNA Binding Factors.* Cell, 2004. **116**(2): p. 247-57.

214. McKenna, N.J., O'Malley, B. W., *Combinatorial Control of Gene Expression by Nuclear Receptors and Coregulators*. Cell, 2002. **108**(4): p. 465-74.
215. Kumar, R., Wang, R.-A., Barnes, C. J., *Coregulators and Chromatin Remodeling in Transcriptional Control*. Molecular Carcinogenesis, 2004. **41**(4): p. 221-30.
216. Lewis, B.A., Reinberg, D., *The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation*. Journal of Cell Science, 2003. **116**(Pt 18): p. 3667-75.
217. Holmqvist, P.H., Mannervik, M., *Genomic occupancy of the transcriptional co-activators p300 and CBP*. Transcription, 2013. **4**(1): p. 18-23.
218. Hollenbach, A.D., Sublett, J. E., McPherson, C. J., Grosveld, G., *The Pax3-FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax3-associated repressor hDaxx*. EMBO Journal, 1999. **18**(13): p. 3702-11.
219. Li, R., Pei, H., Watson, D. K., Papas T. S., *EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes*. Oncogene, 2000. **19**(6): p. 745-53.
220. Lehembre, F., Muller, S., Pandolfi, P. P., Dejean, A., *Regulation of Pax3 transcriptional activity by SUMO-1-modified PML*. Oncogene, 2001. **20**(1): p. 1-9.
221. Emelyanov, A.V., Kovac, C. R., Sepulveda, M. A., Birshtein, B. K., *The Interaction of Pax5 (BSAP) with Daxx Can Result in Transcriptional Activation in B Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(13): p. 11156-64.
222. Lin, D.-Y., Lai, M.-Z., Ann, D. K., Shih, H.-M., *Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Functions as a Glucocorticoid Receptor Co-activator by Sequestering Daxx to the PML Oncogenic Domains (PODs) to Enhance Its Transactivation Potential*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(18): p. 15958-65.
223. Mizuta, H., Kuroda, Y., *Cloning and functional characterization of a rat Daxx that functions as a corepressor for the androgen receptor*. Cell Biology International, 2004. **28**(8-9): p. 609-14.
224. Lin, D.-Y., Fang, H.-I., Ma, A.-H., Huang, Y.-S., Pu, Y.-S., Jenster, G., Kung, H.-J., Shih, H.-M., *Negative Modulation of Androgen Receptor Transcriptional Activity by Daxx*. Molecular and Cellular Biology, 2004. **24**(24): p. 10529-41.
225. Boellmann, F., Guettouche, T., Guo, Y., Fenna, M., Mnayer, L., Voellmy, R., *DAXX interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(12): p. 4100-5.
226. La, M., Kim, K., Park, J., Won, J., Lee, J.-H., Fu, Y.-M., Meadows, G. G., Joe, C. O., *Daxx-mediated transcriptional repression of MMP1 gene is reversed by SPOP*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. **320**(3): p. 760-5.
227. Muromoto, R., Nakao, K., Watanabe, T., Sato, N., Sekine, Y., Sugiyama, K., Oritani, K., Shimoda, K., Matsuda, T., *Physical and functional interactions between Daxx and STAT3*. Oncogene, 2006. **25**(14): p. 2131-6.
228. Tzeng, S.L., Cheng, Y. W., Li, C. H., Lin, Y. S., Hsu, H. C., Kang, J. J., *Physiological and functional interactions between Tcf4 and Daxx in colon cancer cells*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(22): p. 15405-11.

229. Croxton, R., Puto, L. A., de Belle, I., Thomas, M., Torii, S., Hanai, F., Cuddy, M., Reed, J.C., *Daxx represses expression of a subset of antiapoptotic genes regulated by nuclear factor-kappaB*. *Cancer Research*, 2006. **66**(18): p. 9026-35.
230. Shih, H.M., Chang, C. C., Kuo, H. Y., Lin, D. Y., *Daxx mediates SUMO-dependent transcriptional control and subnuclear compartmentalization*. *Biochemical Society Transactions*, 2007. **35**(Pt 6): p. 1397-400.
231. Puto, L.A., Reed, J. C., *Daxx represses RelB target promoters via DNA methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation*. *Genes & Development*, 2008. **22**(8): p. 998-1010.
232. Gupta, A., Hou, R., Liu, L., Hiroyasu, S., Hadix, J. A., Huggins, G. S., Sibinga, N. E., *Daxx inhibits muscle differentiation by repressing E2A-mediated transcription*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2009. **107**(3): p. 438-47.
233. Huang, Y.S., Shih, H. M., *Daxx positively modulates beta-catenin/TCF4-mediated transcriptional potential*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009. **386**(4): p. 762-8.
234. Wethkamp, N., Klempnauer, K. H., *Daxx is a transcriptional repressor of CCAAT/enhancer-binding protein beta*. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. **284**(42): p. 28783-94.
235. Meloni, A., Fiorillo, E., Corda, D., Incani, F., Serra, M. L., Contini, A., Cao, A., Rosatelli, M. C., *DAXX is a new AIRE-interacting protein*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(17): p. 13012-21.
236. Huang, Y.S., Chang, C. C., Huang, T. C., Hsieh, Y. L., Shih, H. M., *Daxx interacts with and modulates the activity of CREB*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(1): p. 99-108.
237. Holmstrom, S.R., Chupreta, S., So, A. Y., Iñiguez-Lluhí, J. A., *SUMO-mediated inhibition of glucocorticoid receptor synergistic activity depends on stable assembly at the promoter but not on DAXX*. *Molecular Endocrinology*, 2008. **22**(9): p. 2061-75.
238. Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E.-J., Chen, J. D., *Sequestration and Inhibition of Daxx-Mediated Transcriptional Repression by PML*. *Molecular and Cellular Biology*, 2000. **20**(5): p. 1784-96.
239. Kwon, J.E., La, M., Oh, K. H., Oh, Y. M., Kim, G. R., Seol, J. H., Baek, S. H., Chiba, T., Tanaka, K., Bang, O. S., Joe, C. O., Chung, C. H., *BTB domain-containing speckle-type POZ protein (SPOP) serves as an adaptor of Daxx for ubiquitination by Cul3-based ubiquitin ligase*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(18): p. 12664-72.
240. Morozov, V.M., Massoll, N. A., Vladimirova, O. V., Maul, G. G., Ishov, A. M., *Regulation of c-met expression by transcription repressor Daxx*. *Oncogene*, 2008. **27**(15): p. 2177-86.
241. Yao, Z., Zhang, Q., Li, X., Zhao, D., Liu, Y., Zhao, K., Liu, Y., Wang, C., Jiang, M., Li, N., Cao, X., *Death domain-associated protein 6 (Daxx) selectively represses IL-6 transcription through histone deacetylase 1 (HDAC1)-mediated histone deacetylation in macrophages*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014. **289**(13): p. 9372-9.

242. Puto, L.A., Brognard, J., Hunter, T., *Transcriptional Repressor DAXX Promotes Prostate Cancer Tumorigenicity via Suppression of Autophagy*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(25): p. 15406-20.
243. Puto, L.A., Benner, C., Hunter, T., *The DAXX co-repressor is directly recruited to active regulatory elements genome-wide to regulate autophagy programs in a model of human prostate cancer*. Oncoscience, 2015. **2**(4): p. 362-72.
244. Lin, G.J., Huang, Y. S., Lin, C. K., Huang, S. H., Shih, H. M., Sytwu, H. K., Chen, Y. W., *Daxx and TCF4 interaction links to oral squamous cell carcinoma growth by promoting cell cycle progression via induction of cyclin D1 expression*. Clinical Oral Investigations 2015(přijato k tisku 24. 7. 2015).
245. Vihervaara, A., Sistonen, L., *HSF1 at a glance*. Journal of Cell Science, 2014. **127**(Pt 2): p. 261-6.
246. Hollenbach, A.D., McPherson, C. J., Mientjes, E. J., Iyengar, R., Grosveld, G., *Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek*. Journal of Cell Science, 2002. **115**(Pt 16): p. 3319-30.
247. Muromoto, R., Sugiyama, K., Takachi, A., Imoto, S., Sato, N., Yamamoto, T., Oritani, K., Shimoda, K., Matsuda, T., *Physical and Functional Interactions between Daxx and DNA Methyltransferase 1-Associated Protein, DMAP1*. Journal of Immunology, 2004. **172**(5): p. 2985-93.
248. Kuo, H.Y., Chang, C. C., Jeng, J. C., Hu, H. M., Lin, D. Y., Maul, G. G., Kwok, R. P., Shih, H. M., *SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(47): p. 16973-8.
249. Gibbons, R.J., Suthers, G. K., Wilkie, A. O., Buckle, V. J., Higgs, D. R., *X-linked alpha-thalassemia/mental retardation (ATR-X) syndrome: localization to Xq12-q21.31 by X inactivation and linkage analysis*. American Journal of Human Genetics, 1992. **51**(5): p. 1136-49.
250. Gibbons, R.J., McDowell, T. L., Raman, S., O'Rourke, D. M., Garrick, D., Ayyub, H., Higgs, D. R., *Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation*. Nature Genetics, 2000. **24**(4): p. 368-71.
251. Luciani, J.J., Depetris, D., Usson, Y., Metzler-Guillemain, C., Mignon-Ravix, C., Mitchell, M. J., Megarbane, A., Sarda, P., Sirma, H., Moncla, A., Feunteun, J., Mattei, M. G., *PML nuclear bodies are highly organised DNA-protein structures with a function in heterochromatin remodelling at the G2 phase*. Journal of Cell Science, 2006. **119**(Pt 12): p. 2518-31.
252. Tang, J., Wu, S., Liu, H., Stratton, R., Barak, O. G., Shiekhhattar, R., Picketts, D. J., Yang, X., *A novel transcription regulatory complex containing death domain-associated protein and the ATR-X syndrome protein*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(1920369-77).
253. Dhayalan, A., Tamas, R., Bock, I., Tattermusch, A., Dimitrova, E., Kudithipudi, S., Ragozin, S., Jeltsch, A., *The ATRX-ADD domain binds to H3 tail peptides and reads the combined methylation state of K4 and K9*. Human Molecular Genetics, 2011. **20**(11): p. 2195-203.

254. Eustermann, S., Yang, J. C., Law, M. J., Amos, R., Chapman, L. M., Jelinska, C., Garrick, D., Clynes, D., Gibbons, R. J., Rhodes, D., Higgs, D. R., Neuhaus, D., *Combinatorial readout of histone H3 modifications specifies localization of ATRX to heterochromatin*. Nature Structural & Molecular Biology, 2011. **18**(7): p. 777-82.
255. Iwase, S., Xiang, B., Ghosh, S., Ren, T., Lewis, P. W., Cochrane, J. C., Allis, C. D., Picketts, D. J., Patel, D. J., Li, H., Shi, Y., *ATRX ADD domain links an atypical histone methylation recognition mechanism to human mental-retardation syndrome*. Nature Structural & Molecular Biology, 2011. **18**(7): p. 769-76.
256. Saade, E., Mechold, U., Kulyyassov, A., Vertut, D., Lipinski, M., Ogryzko, V., *Analysis of interaction partners of H4 histone by a new proteomics approach*. Proteomics, 2009. **9**(21): p. 4934-43.
257. Goldberg, A.D., Banaszynski, L. A., Noh, K. M., Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., Wen, D., Chapgier, A., DeKolver, R. C., Miller, J. C., Lee, Y. L., Boydston, E. A., Holmes, M. C., Gregory, P. D., Grealley, J. M., Rafii, S., Yang, C., Scambler, P. J., Garrick, D., Gibbons, R. J., Higgs, D. R., Cristea, I. M., Urnov, F. D., Zheng, D., Allis, C. D., *Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions*. Cell, 2010. **140**(5): p. 678-91.
258. Drané, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., Hamiche, A., *The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3*. Genes & Development, 2010. **24**(12): p. 1253-65.
259. Lewis, P.W., Elsaesser, S. J., Noh, K. M., Stadler, S. C., Allis, C. D., *Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(32): p. 14075-80.
260. Elsaesser, S.J., Allis, C. D., *HIRA and Daxx constitute two independent histone H3.3-containing predeposition complexes*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2010. **75**: p. 27-34.
261. McDowell, T.L., Gibbons, R. J., Sutherland, H., O'Rourke, D. M., Bickmore, W. A., Pombo, A., Turley, H., Gatter, K., Picketts, D. J., Buckle, V. J., Chapman, L., Rhodes, D., Higgs, D. R., *Localization of a putative transcriptional regulator (ATRX) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(24): p. 13983-8.
262. Law, M.J., Lower, K. M., Voon, H. P., Hughes, J. R., Garrick, D., Viprakasit, V., Mitson, M., De Gobbi, M., Marra, M., Morris, A., Abbott, A., Wilder, S. P., Taylor, S., Santos, G. M., Cross, J., Ayyub, H., Jones, S., Ragoussis, J., Rhodes, D., Dunham, I., Higgs, D. R., Gibbons, R. J., *ATR-X syndrome protein targets tandem repeats and influences allele-specific expression in a size-dependent manner*. Cell, 2010. **143**(3): p. 367-78.
263. Rapkin, L.M., Ahmed, K., Dulev, S., Li, R., Kimura, H., Ishov, A. M., Bazett-Jones, D. P., *The histone chaperone DAXX maintains the structural organization of heterochromatin domains*. Epigenetics & Chromatin, 2015. **8**: p. 44.

264. Wong, L.H., McGhie, J. D., Sim, M., Anderson, M. A., Ahn, S., Hannan, R. D., George, A. J., Morgan, K. A., Mann, J. R., Choo, K. H., *ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells*. Genome Research, 2010. **20**(3): p. 351-60.
265. Watson, L.A., Solomon, L. A., Li, J. R., Jiang, Y., Edwards, M., Shin-ya, K., Beier, F., Bérubé, N. G., *Atrx deficiency induces telomere dysfunction, endocrine defects, and reduced life span*. Journal of Clinical Investigation, 2013. **123**(5): p. 2049-63.
266. Chang, F.T., McGhie, J. D., Chan, F. L., Tang, M. C., Anderson, M. A., Mann, J. R., Andy Choo, K. H., Wong, L. H., *PML bodies provide an important platform for the maintenance of telomeric chromatin integrity in embryonic stem cells*. Nucleic Acids Research, 2013. **41**(8): p. 4447-58.
267. Baumann, C., Viveiros, M. M., De La Fuente, R., *Loss of maternal ATRX results in centromere instability and aneuploidy in the mammalian oocyte and pre-implantation embryo*. PLoS Genetics, 2010. **6**(9): p. e1001137.
268. De La Fuente, R., Baumann, C., Viveiros, M. M., *ATRX contributes to epigenetic asymmetry and silencing of major satellite transcripts in the maternal genome of the mouse embryo*. Development, 2015. **142**(10): p. 1806-17.
269. He, Q., Kim, H., Huang, R., Lu, W., Tang, M., Shi, F., Yang, D., Zhang, X., Huang, J., Liu, D., Songyang, Z., *The Daxx/Atrx Complex Protects Tandem Repetitive Elements during DNA Hypomethylation by Promoting H3K9 Trimethylation*. Cell Stem Cell, 2015. **17**(3): p. 273-86.
270. Sadic, D., Schmidt, K., Groh, S., Kondofersky, I., Ellwart, J., Fuchs, C., Theis, F. J., Schotta, G., *Atrx promotes heterochromatin formation at retrotransposons*. EMBO Reports, 2015. **16**(7): p. 836-50.
271. Voon, H.P., Hughes, J. R., Rode, C., De La Rosa-Velázquez, I. A., Jenuwein, T., Feil, R., Higgs, D. R., Gibbons, R. J., *ATRX Plays a Key Role in Maintaining Silencing at Interstitial Heterochromatic Loci and Imprinted Genes*. Cell Reports, 2015. **11**(3): p. 405-18.
272. Clynes, D., Jelinska, C., Xella, B., Ayyub, H., Taylor, S., Mitson, M., Bachrati, C. Z., Higgs, D. R., Gibbons, R. J., *ATRX dysfunction induces replication defects in primary mouse cells*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e92915.
273. Delbarre, E., Ivanauskiene, K., Kuntziger, T., Collas, P., *DAXX-dependent supply of soluble (H3.3-H4) dimers to PML bodies pending deposition into chromatin*. Genome Research, 2013. **23**(3): p. 440-51.
274. Corpet, A., Olbrich, T., Gwerder, M., Fink, D., Stucki, M., *Dynamics of histone H3.3 deposition in proliferating and senescent cells reveals a DAXX-dependent targeting to PML-NBs important for pericentromeric heterochromatin organization*. Cell Cycle, 2013. **13**(2).
275. Ivanauskiene, K., Delbarre, E., McGhie, J. D., Kuntziger, T., Wong, L. H., Collas, P., *The PML-associated protein DEK regulates the balance of H3.3 loading on chromatin and is important for telomere integrity*. Genome Research, 2014. **24**(10): p. 1584-94.
276. Jiao, Y., Shi, C., Edil, B. H., de Wilde, R. F., Klimstra, D. S., Maitra, A., Schlick, R. D., Tang, L. H., Wolfgang, C. L., Choti, M. A., Velculescu, V. E., Diaz, L. A. Jr., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., Hruban, R. H., Papadopoulos, N.,

- DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors.* Science, 2011. **331**(6021): p. 1199-203.
277. Yachida, S., Vakiani, E., White, C. M., Zhong, Y., Saunders, T., Morgan, R., de Wilde, R. F., Maitra, A., Hicks, J., Demarzo, A. M., Shi, C., Sharma, R., Laheru, D., Edil, B. H., Wolfgang, C. L., Schlick, R. D., Hruban, R. H., Tang, L. H., Klimstra, D. S., Iacobuzio-Donahue, C. A., *Small cell and large cell neuroendocrine carcinomas of the pancreas are genetically similar and distinct from well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors.* American Journal of Surgical Pathology, 2012. **36**(2): p. 173-84.
278. de Wilde, R.F., Heaphy, C. M., Maitra, A., Meeker, A. K., Edil, B. H., Wolfgang, C. L., Ellison, T. A., Schlick, R. D., Molenaar, I. Q., Valk, G. D., Vriens, M. R., Borel Rinkes, I. H., Offerhaus, G. J., Hruban, R. H., Matsukuma, K. E., *Loss of ATRX or DAXX expression and concomitant acquisition of the alternative lengthening of telomeres phenotype are late events in a small subset of MEN-1 syndrome pancreatic neuroendocrine tumors.* Modern Pathology, 2012. **25**(7): p. 1033-9.
279. Chen, S.F., Kasajima, A., Yazdani, S., Chan, M. S., Wang, L., He, Y. Y., Gao, H. W., Sasano, H., *Clinicopathologic significance of immunostaining of α -thalassemia/mental retardation syndrome X-linked protein and death domain-associated protein in neuroendocrine tumors.* Human Pathology, 2013. **44**(10): p. 2199-203.
280. Schwartzenuber, J., Korshunov, A., Liu, X. Y., Jones, D. T., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A. M., Quang, D. A., Tonjes, M., Hovestadt, V., Albrecht, S., Kool, M., Nantel, A., Konermann, C., Lindroth, A., Jager, N., Rausch, T., Ryzhova, M., Korbel, J. O., Hielscher, T., Hauser, P., Garami, M., Klekner, A., Bogner, L., Ebinger, M., Schuhmann, M. U., Scheurlen, W., Pekrun, A., Fruhwald, M. C., Roggendorf, W., Kramm, C., Durken, M., Atkinson, J., Lepage, P., Montpetit, A., Zakrzewska, M., Zakrzewski, K., Liberski, P. P., Dong, Z., Siegel, P., Kulozik, A. E., Zapatka, M., Guha, A., Malkin, D., Felsberg, J., Reifenberger, G., von Deimling, A., Ichimura, K., Collins, V. P., Witt, H., Milde, T., Witt, O., Zhang, C., Castelo-Branco, P., Lichter, P., Faury, D., Tabori, U., Plass, C., Majewski, J., Pfister, S. M., Jabado, N., *Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma.* Nature, 2012. **482**(7384): p. 226-31.
281. Kurihara, S., Hiyama, E., Onitake, Y., Yamaoka, E., Hiyama, K., *Clinical features of ATRX or DAXX mutated neuroblastoma.* Journal of Pediatric Surgery, 2014. **49**(12): p. 1835-8.
282. Lee, J.C., Jeng, Y. M., Liao, J. Y., Tsai, J. H., Hsu, H. H., Yang, C. Y., *Alternative lengthening of telomeres and loss of ATRX are frequent events in pleomorphic and dedifferentiated liposarcomas.* Modern Pathology, 2015. **28**(8): p. 1064-73.
283. Liao, J.Y., Tsai, J. H., Yang, C. Y., Lee, J. C., Liang, C. W., Hsu, H. H., Jeng, Y. M., *Alternative lengthening of telomeres phenotype in malignant vascular tumors is highly associated with loss of ATRX expression and is frequently observed in hepatic angiosarcomas.* Human Pathology, 2015. **46**(9): p. 1360-6.
284. Abedalthagafi, M., Phillips, J. J., Kim, G. E., Mueller, S., Haas-Kogen, D. A., Marshall, R. E., Croul, S. E., Santi, M. R., Cheng, J., Zhou, S., Sullivan, L. M.,

- Martinez-Lage, M., Judkins, A. R., Perry, A., *The alternative lengthening of telomere phenotype is significantly associated with loss of ATRX expression in high-grade pediatric and adult astrocytomas: a multi-institutional study of 214 astrocytomas*. *Modern Pathology*, 2013. **26**(11): p. 1425-32.
285. Nabetani, A., Ishikawa, F., *Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells*. *Journal of Biochemistry*, 2011. **149**(1): p. 5-14.
286. Heaphy, C.M., de Wilde, R. F., Jiao, Y., Klein, A. P., Edil, B. H., Shi, C., Bettegowda, C., Rodriguez, F. J., Eberhart, C. G., Hebbar, S., Offerhaus, G. J., McLendon, R., Rasheed, B. A., He, Y., Yan, H., Bigner, D. D., Oba-Shinjo, S. M., Marie, S. K., Riggins, G. J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Hruban, R. H., Maitra, A., Papadopoulos, N., Meeker, A. K., *Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations*. *Science*, 2011. **333**(6041): p. 425.
287. Marinoni, I., Kurrer, A. S., Vassella, E., Dettmer, M., Rudolph, T., Banz, V., Hunger, F., Pasquinelli, S., Speel, E. J., Perren, A., *Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(2): p. 453-60.
288. Yuan, F., Shi, M., Ji, J., Shi, H., Zhou, C., Yu, Y., Liu, B., Zhu, Z., Zhang, J., *KRAS and DAXX/ATRX gene mutations are correlated with the clinicopathological features, advanced diseases, and poor prognosis in Chinese patients with pancreatic neuroendocrine tumors*. *International Journal of Biological Sciences*, 2014. **10**(9): p. 957-65.
289. Lovejoy, C.A., Li, W., Reisenweber, S., Thongthip, S., Bruno, J., de Lange, T., De, S., Petrini, J. H., Sung, P. A., Jasin, M., Rosenbluh, J., Zwang, Y., Weir, B. A., Hatton, C., Ivanova, E., Macconail, L., Hanna, M., Hahn, W. C., Lue, N. F., Reddel, R. R., Jiao, Y., Kinzler, K., Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Meeker, A. K., A. L. T. Starr Cancer Consortium, *Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA damage response are hallmarks of the alternative lengthening of telomeres pathway*. *PLoS Genetics*, 2012. **8**(7): p. e1002772.
290. Episkopou, H., Draskovic, I., Van Beneden, A., Tilman, G., Mattiussi, M., Gobin, M., Arnoult, N., Londoño-Vallejo, A., Decottignies, A., *Alternative Lengthening of Telomeres is characterized by reduced compaction of telomeric chromatin*. *Nucleic Acids Research*, 2014. **42**(7): p. 4391-405.
291. Napier, C.E., Huschtscha, L. I., Harvey, A., Bower, K., Noble, J. R., Hendrickson, E. A., Reddel, R. R., *ATRX represses alternative lengthening of telomeres*. *Oncotarget*, 2015. **6**(18): p. 16543-58.
292. Clynes, D., Jelinska, C., Xella, B., Ayyub, H., Scott, C., Mitson, M., Taylor, S., Higgs, D. R., Gibbons, R. J., *Suppression of the alternative lengthening of telomere pathway by the chromatin remodelling factor ATRX*. *Nature Communications*, 2015. **6**: p. 7538.
293. Matson, D.R., Stukenberg, P. T., *Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways*. *Molecular Interventions*, 2011. **11**(2): p. 141-50.
294. Lindsay, C.R., Scholz, A., Morozov, V. M., Ishov, A. M., *Daxx shortens mitotic arrest caused by paclitaxel*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(10): p. 1200-4.

295. Giovinazzi, S., Lindsay, C. R., Morozov, V. M., Escobar-Cabrera, E., Summers, M. K., Han, H. S., McIntosh, L. P., Ishov, A. M., *Regulation of mitosis and taxane response by Daxx and Rassf1*. *Oncogene*, 2012. **31**(1): p. 13-26.
296. Giovinazzi, S., Morozov, V. M., Summers, M. K., Reinhold, W. C., Ishov, A. M., *USP7 and Daxx regulate mitosis progression and taxane sensitivity by affecting stability of Aurora-A kinase*. *Cell Death and Differentiation*, 2013. **20**(5): p. 721-31.
297. De La Fuente, R., Viveiros, M. M., Wigglesworth, K., Eppig, J. J., *ATRX, a member of the SNF2 family of helicase/ATPases, is required for chromosome alignment and meiotic spindle organization in metaphase II stage mouse oocytes*. *Developmental Biology*, 2004. **272**(1): p. 1-14.
298. Ritchie, K., Seah, C., Moulin, J., Isaac, C., Dick, F., Bérubé, N. G., *Loss of ATRX leads to chromosome cohesion and congression defects*. *Journal of Cell Biology*, 2008. **180**(2): p. 315-24.
299. McLean, J.R., Chaix, D., Ohi, M. D., Gould, K. L., *State of the APC/C: organization, function, and structure*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2011. **46**(2): p. 118-36.
300. Kwan, P.S., Lau, C. C., Chiu, Y. T., Man, C., Liu, J., Tang, K. D., Wong, Y. C., Ling, M. T., *Daxx regulates mitotic progression and prostate cancer predisposition*. *Carcinogenesis*, 2013. **34**(4): p. 750-9.
301. Milella, M., Falcone, I., Conciatori, F., Cesta Incani, U., Del Curatolo, A., Inzerilli, N., Nuzzo, C. M., Vaccaro, V., Vari, S., Cognetti, F., Ciuffreda, L., *PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors*. *Frontiers in Oncology*, 2015. **5**: p. 24.
302. Song, M.S., Salmena, L., Carracedo, A., Egia, A., Lo-Coco, F., Teruya-Feldstein, J., Pandolfi, P. P., *The deubiquitylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network*. *Nature*, 2008. **455**(7214): p. 813-7.
303. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Manniatis, F., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
304. Xiao, J.H., Davidson, I., Matthes, H., Garnier, J. M., Chambon, P., *Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1*. *Cell*, 1991. **17**(4): p. 551-68.
305. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J. P., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
306. Ni, Z., Karaskov, E., Yu, T., Callaghan, S. M., Der, S., Park, D. S., Xu, Z., Pattenden, S. G., Bremner, R., *Apical role for BRG1 in cytokine-induced promoter assembly*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(41): p. 14611-6.
307. Čermák, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J. A., Somia, N. V., Bogdanove, A. J., Voytas, D. F., *Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting*. *Nucleic Acids Research*, 2011. **39**(12).

308. Kervestin, S., Jacobson, A., *NMD: a multifaceted response to premature translational termination*. Nature Reviews: Molecular and Cellular Biology, 2012. **13**(11): p. 700-12.
309. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Struhl, K., *Current Protocols in Molecular Biology Online*. John Wiley & Sons, Inc., 2003.
310. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Research, 2001. **29**(9).
311. Huen, M.S., Sy, S. M., Chen, J., *BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity*. Nature Reviews / Molecular and Cellular Biology, 2010. **11**(2): p. 138-48.
312. Wang, B., Matsuoka, S., Ballif, B. A., Zhang, D., Smogorzewska, A., Gygi, S. P., Elledge, S. J., *Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1194-8.
313. Liu, Z., Wu, J., Yu, X., *CCDC98 targets BRCA1 to DNA damage sites*. Nature Structural & Molecular Biology, 2007. **14**(8): p. 716-20.
314. Kim, H., Huang, J., Chen, J., *CCDC98 is a BRCA1-BRCT domain-binding protein involved in the DNA damage response*. Nature Structural & Molecular Biology, 2007. **14**(8): p. 710-5.
315. Jensen, D.E., Proctor, M., Marquis, S. T., Gardner, H. P., Ha, S. I., Chodosh, L. A., Ishov, A. M., Tommerup, N., Vissing, H., Sekido, Y., Minna, J., Borodovsky, A., Schultz, D. C., Wilkinson, K. D., Maul, G. G., Barlev, N., Berger, S. L., Prendergast, G. C., Rauscher, F. J. 3rd., *BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression*. Oncogene, 1998. **16**(9): p. 1097-112.
316. Nishikawa, H., Wu, W., Koike, A., Kojima, R., Gomi, H., Fukuda, M., Ohta, T., *BRCA1-associated protein 1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity*. Cancer Research, 2009. **69**(1): p. 111-9.
317. Yu, H., Pak, H., Hammond-Martel, I., Ghram, M., Rodrigue, A., Daou, S., Barbour, H., Corbeil, L., Hébert, J., Drobetsky, E., Masson, J. Y., Di Noia, J. M., Affar, el B., *Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014. **111**(1): p. 285-90.
318. Misaghi, S., Ottosen, S., Izrael-Tomasevic, A., Arnott, D., Lamkanfi, M., Lee, J., Liu, J., O'Rourke, K., Dixit, V. M., Wilson, A. C., *Association of C-terminal ubiquitin hydrolase BRCA1-associated protein 1 with cell cycle regulator host cell factor 1*. Molecular and Cellular Biology, 2009. **29**(8): p. 2181-92.
319. Machida, Y.J., Machida, Y., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., Dutta, A., *The deubiquitinating enzyme BAP1 regulates cell growth via interaction with HCF-1*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(49): p. 34179-88.
320. Eletr, Z.M., Wilkinson, K. D., *An emerging model for BAP1's role in regulating cell cycle progression*. Cell Biochemistry and Biophysics, 2011. **60**(1-2): p. 3-11.
321. Huang, M., Qian, F., Hu, Y., Ang, C., Li, Z., Wen, Z., *Chromatin-remodelling factor BRG1 selectively activates a subset of interferon-alpha-inducible genes*. Nature Cell Biology, 2002. **4**(10): p. 774-81.

322. King, H.A., Trotter, K. W., Archer, T. K., *Chromatin remodeling during glucocorticoid receptor regulated transactivation*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012. **1819**(7): p. 716-26.
323. Barker, N., Hurlstone, A., Musisi, H., Miles, A., Bienz, M., Clevers, H., *The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation*. *EMBO Journal*, 2001. **20**(17): p. 4935-43.
324. Dunaief, J.L., Strober, B. E., Guha, S., Khavari, P. A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G. R., Goff, S. P., *The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest*. *Cell*, 1994. **79**(1): p. 119-30.
325. Lee, D., Kim, J. W., Seo, T., Hwang, S. G., Choi, E. J., Choe, J., *SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(25): p. 22330-7.
326. Kidder, B.L., Palmer, S., Knott, J. G., *SWI/SNF-Brg1 regulates self-renewal and occupies core pluripotency-related genes in embryonic stem cells*. *Stem Cells*, 2009. **27**(2): p. 317-28.
327. Bultman, S., Gebuhr, T., Yee, D., La Mantia, C., Nicholson, J., Gilliam, A., Randazzo, F., Metzger, D., Chambon, P., Crabtree, G., Magnuson, T., *A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes*. *Molecular Cell*, 2000. **6**(6): p. 1287-95.
328. Reisman, D., Glaros, S., Thompson, E. A., *The SWI/SNF complex and cancer*. *Oncogene*, 2009. **28**(14): p. 1653-68.
329. Fujita, T., Ikuta, J., Hamada, J., Okajima, T., Tatematsu, K., Tanizawa, K., Kuroda, S., *Identification of a tissue-non-specific homologue of axonal fasciculation and elongation protein zeta-1*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004. **313**(3): p. 738-44.
330. Spang, N., Feldmann, A., Huesmann, H., Bekbulat, F., Schmitt, V., Hiebel, C., Koziollek-Drechsler, I., Clement, A. M., Moosmann, B., Jung, J., Behrends, C., Dikic, I., Kern, A., Behl, C., *RAB3GAP1 and RAB3GAP2 modulate basal and rapamycin-induced autophagy*. *Autophagy*, 2014. **10**(12): p. 2297-309.
331. Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D., *Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex*. *Cell*, 1997. **89**(3): p. 357-64.
332. Zhang, Y., Sun, Z. W., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hampsey, M., Reinberg, D., *SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex*. *Molecular Cell*, 1998. **1**(7): p. 1021-31.
333. Laherty, C.D., Billin, A. N., Lavinsky, R. M., Yochum, G. S., Bush, A. C., Sun, J. M., Mullen, T. M., Davie, J. R., Rose, D. W., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., Ayer, D. E., Eisenman, R. N., *SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors*. *Molecular Cell*, 1998. **2**(1): p. 33-42.
334. Lai, A., Kennedy, B. K., Barbie, D. A., Bertos, N. R., Yang, X. J., Theberge, M. C., Tsai, S. C., Seto, E., Zhang, Y., Kuzmichev, A., Lane, W. S., Reinberg, D., Harlow, E., Branton, P. E., *RBPI recruits the mSIN3-histone deacetylase com-*

- plex to the pocket of retinoblastoma tumor suppressor family proteins found in limited discrete regions of the nucleus at growth arrest.* Molecular and Cellular Biology, 2001. **21**(8): p. 2918-32.
335. Huang, N.E., Lin, C. H., Lin, Y. S., Yu, W. C., *Modulation of YY1 activity by SAP30.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **306**(1): p. 267-75.
336. Viiri, K.M., Jänis, J., Siggers, T., Heinonen, T. Y., Valjakka, J., Bulyk, M. L., Mäki, M., Lohi, O., *DNA-binding and -bending activities of SAP30L and SAP30 are mediated by a zinc-dependent module and monophosphoinositides.* Molecular and Cellular Biology, 2009. **29**(2): p. 342-56.
337. Li, J.F., Liu, L. D., Ma, S. H., Che, Y. C., Wang, L. C., Dong, C. H., Zhao, H. L., Liao, Y., Li, Q. H., *HTRP--an immediate-early gene product induced by HSV1 infection in human embryo fibroblasts, is involved in cellular co-repressors.* Journal of Biochemistry, 2004. **136**(2): p. 169-76.
338. Sichtig, N., Körfer, N., Steger, G., *Papillomavirus binding factor binds to SAP30 and represses transcription via recruitment of the HDAC1 co-repressor complex.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007. **467**(1): p. 67-75.
339. Banumathy, G., Somaiah, N., Zhang, R., Tang, Y., Hoffmann, J., Andrade, M., Ceulemans, H., Schultz, D., Marmorstein, R., Adams, P. D., *Human UBN1 is an ortholog of yeast Hpc2p and has an essential role in the HIRA/ASF1a chromatin-remodeling pathway in senescent cells.* Molecular and Cellular Biology, 2009. **29**(3): p. 758-70.
340. Daniel Ricketts, M., Frederick, B., Hoff, H., Tang, Y., Schultz, D. C., Singh Rai, T., Grazia Vizioli, M., Adams, P. D., Marmorstein, R., *Ubinuclein-1 confers histone H3.3-specific-binding by the HIRA histone chaperone complex.* Nature Communications, 2015. **6**: p. 7711.
341. Schroer, A., Schneider, S., Ropers, H., Nothwang, H., *Cloning and characterization of UXT, a novel gene in human Xp11, which is widely and abundantly expressed in tumor tissue.* Genomics, 1999. **56**(3): p. 340-3.
342. Markus, S.M., Taneja, S. S., Logan, S. K., Li, W., Ha, S., Hittelman, A. B., Rogatsky, I., Garabedian, M. J., *Identification and characterization of ART-27, a novel coactivator for the androgen receptor N terminus.* Molecular Biology of the Cell, 2002. **13**(2): p. 670-82.
343. Sun, S., Tang, Y., Lou, X., Zhu, L., Yang, K., Zhang, B., Shi, H., Wang, C., *UXT is a novel and essential cofactor in the NF-kappaB transcriptional enhanceosome.* Journal of Cell Biology, 2007. **178**(2): p. 231-44.
344. Zhao, H., Wang, Q., Zhang, H., Liu, Q., Du, X., Richter, M., Greene, M. I., *UXT is a novel centrosomal protein essential for cell viability.* Molecular Biology of the Cell, 2005. **16**(12): p. 5857-65.
345. Huang, Y., Chen, L., Zhou, Y., Liu, H., Yang, J., Liu, Z., Wang, C., *UXT-V1 protects cells against TNF-induced apoptosis through modulating complex II formation.* Molecular Biology of the Cell, 2011. **22**(8): p. 1389-97.
346. Yamamichi-Nishina, M., Ito, T., Mizutani, T., Yamamichi, N., Watanabe, H., Iba, H., *SW13 cells can transition between two distinct subtypes by switching*

- expression of BRG1 and Brm genes at the post-transcriptional level.* Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(9): p. 7422-30.
347. Bražina, J., Švadlenka, J., Macůrek, L., Anděra, L., Hodný, Z., Bartek, J., Hanzlíková, H., *DNA damage-induced regulatory interplay between DAXX, p53, ATM kinase and Wip1 phosphatase.* Cell Cycle, 2015. **14**(3): p. 375-387.
348. Tang, J., Agrawal, T., Cheng, Q., Qu, L., Brewer, M. D., Chen, J., Yang, X., *Phosphorylation of Daxx by ATM contributes to DNA damage-induced p53 activation.* PloS One, 2013. **8**(2).
349. Horová, V., Hradilová, N., Jelínková, I., Koc, M., Švadlenka, J., Bražina, J., Klíma, M., Slavík, J., Hyršlová Vaculová, A., Anděra, L., *Inhibition of vacuolar ATPase attenuates the TRAIL-induced activation of caspase-8 and modulates the trafficking of TRAIL receptosomes.* FEBS Journal, 2013. **280**(14): p. 3436-50.
350. Klánová, M., Anděra, L., Bražina, J., Švadlenka, J., Benešová, S., Soukup, J., Průková, D., Vejmelková, D., Jakša, R., Helman, K., Vočková, P., Latečková, L., Molinský, J., Maswabi, B. C., Alam, M., Kodet, R., Pytlík, R., Trněný, M., Klener, P., *Targeting of BCL2 Family Proteins with ABT-199 and Homoharringtonine Reveals BCL2- and MCL1-Dependent Subgroups of Diffuse Large B-Cell Lymphoma.* Clinical Cancer Research, 2015(přijato k publikování).
351. Elsässer, S.J., Huang, H., Lewis, P. W., Chin, J. W., Allis, C. D., Patel, D. J., *DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition.* Nature, 2012. **491**(7425): p. 560-5.
352. Liu, C.P., Xiong, C., Wang, M., Yu, Z., Yang, N., Chen, P., Zhang, Z., Li, G., Xu, R. M., *Structure of the variant histone H3.3-H4 heterodimer in complex with its chaperone DAXX.* Nature Structural & Molecular Biology, 2012. **19**(12): p. 1287-92.
353. Trotter, K.W., Fan, H. Y., Ivey, M. L., Kingston, R. E., Archer, T. K., *The HSA domain of BRG1 mediates critical interactions required for glucocorticoid receptor-dependent transcriptional activation in vivo.* Molecular and Cellular Biology, 2008. **28**(4): p. 1413-26.
354. Park, J.H., Park, E. J., Lee, H. S., Kim, S. J., Hur, S. K., Imbalzano, A. N., Kwon, J., *Mammalian SWI/SNF complexes facilitate DNA double-strand break repair by promoting gamma-H2AX induction.* EMBO Journal, 2006. **25**(17): p. 3986-97.
355. Zhao, Q., Wang, Q. E., Ray, A., Wani, G., Han, C., Milum, K., Wani, A. A., *Modulation of nucleotide excision repair by mammalian SWI/SNF chromatin-remodeling complex.* Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(44): p. 30424-32.
356. Lee, H.S., Park, J. H., Kim, S. J., Kwon, S. J., Kwon, J., *A cooperative activation loop among SWI/SNF, gamma-H2AX and H3 acetylation for DNA double-strand break repair.* EMBO Journal, 2010. **29**(8): p. 1434-45.
357. Zhang, L., Chen, H., Gong, M., Gong, F., *The chromatin remodeling protein BRG1 modulates BRCA1 response to UV irradiation by regulating ATR/ATM activation.* Frontiers in Oncology, 2013. **3**(7).
358. Qi, W., Wang, R., Chen, H., Wang, X., Xiao, T., Boldogh, I., Ba, X., Han, L., Zeng, X., *BRG1 promotes the repair of DNA double-strand breaks by facilitat-*

- ing the replacement of RPA with RAD51*. Journal of Cell Science, 2015. **128**(2): p. 317-30.
359. Kwon, S.J., Park, J. H., Park, E. J., Lee, S. A., Lee, H. S., Kang, S. W., Kwon, J., *ATM-mediated phosphorylation of the chromatin remodeling enzyme BRG1 modulates DNA double-strand break repair*. Oncogene, 2015. **34**(3): p. 303-13.
360. Orian-Rousseau, V., Sleeman, J., *CD44 is a multidomain signaling platform that integrates extracellular matrix cues with growth factor and cytokine signals*. Advances in Cancer Research, 2014. **123**: p. 231-54.
361. Bonnans, C., Chou, J., Werb, Z., *Remodelling the extracellular matrix in development and disease*. Nature Reviews / Molecular and Cellular Biology, 2014. **15**(12): p. 786-801.