



Akademie věd České republiky

Teze dizertace

k získání vědeckého titulu “doktor věd”, DSc.
ve skupině věd

Biologicko-ekologické vědy

**Struktura chromatinu a epigenetické procesy v kontextu
buněčné diferenciaci a při opravách DNA**

Komise pro obhajoby doktorských dizertačních prací v oboru:

Botanika, experimentální a ekologická biologie

Jméno uchazeče: doc. RNDr. Eva Bártová, Ph.D.

Pracoviště uchazeče: Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky,

Oddělení molekulární cytologie a cytometrie.

Místo a datum: Brno, 20. 7. 2018

Obsah	strana
1. Shrnutí významu práce	4
1.1. Úvod - Základní poznatky o struktuřegenomu	4
2. Vybrané statě z dizertace určené pro autoreferát	5
2.1. Epigenetické charakteristiky genomu	5
2.2. Post-translační modifikace histonů a jejich funkce při opravách DNA	9
2.3. Změny ve struktuře chromatinu a jejich korelace s epigenetickými změnami při opravě DNA	12
2.4. 53BP1 protein a jeho funkční význam při opravném procesu NHEJ	15
2.5. Základní funkce proteinu 53BP1 při poškození euchromatinu nebo heterochromatinu a prostorová organizace 53BP1 pozitivních lézí DNA	16
3. Závěr	19
4. Vybrané články, které jsou předloženy k obhajobě dizertační práce	20
5. Seznam použité literatury	24

1. Shrnutí významu práce

Specifická jaderná architektura je charakteristická pro řadu procesů, které probíhají v buněčných jádrech. V této práci diskutujeme řadu funkčních aspektů jaderné architektury. Zaměřili jsme se převážně na jadernou architekturu související s regulací exprese genů a opravou DNA, včetně tvorby spontánně se vyskytujících ohnisek, které jsou charakteristické pro opravu DNA. Zabýváme se zde strukturálními a funkčními aspekty 53BP1 pozitivních a BRCA1 pozitivních ohnisek oprav DNA. 53BP1 a BRCA1 jsou dobře popsány proteiny patřící k proteinovým komplexům, které hrají úlohu při opravě dvouřetězcových zlomů. Protein 53BP1 pravděpodobně představuje "pomocný faktor", který se uplatňuje v kanonické opravné dráze NHEJ. Naopak homologní rekombinace je zprostředkována signální dráhou závislou na proteinu BRCA1. Funkční úloha proteinu 53BP1 je spojena se specifickými post-translačními modifikacemi histonů, které se objevují v oblastech lézí v DNA, a to bezprostředně po poškození DNA. Toto epigenetické prostředí se především skládá z fosforylovaného histonu H2AX (γ H2AX) a dimethylovaného histonu H4 na lysinu 20 (H4K20me2). Naopak funkce, týkající se BRCA1, související s fosforylací H2AX, se pravděpodobně objevuje v pozdějších fázích opravy DNA, protože jako iniciační krok se před BRCA1 proteinem aktivuje komplex Rad50/Mre11/Nbs1 v místech vzniklé jednořetězcové DNA. V práci je také pojednáno o epigenetických mechanismech, které jsou důležité z hlediska regulace exprese genů. Především se zabýváme epigenetickými mechanismy oprav DNA, které se uplatňují při NHEJ a HRR procesech.

1.1. Úvod: základní poznatky o struktuře genomu

Primární struktura genomu mnoha organismů byla již z velké části zmapována a i přesto je jen málo známo o prostorovém uspořádání chromatinu v kontextu jaderných procesů, jako je replikace, transkripce, sestřih a DNA opravy. Velice důležitým poznatkem v biologii chromatinu je objev jaderného uspořádání chromosomálních teritorií v interfázních buněčných jádrech (Cremer a Cremer, 2001; Lanctôt a kol., 2007). Bylo zjištěno, že interfázní chromosomy tvoří vzájemně se nepřekrývající teritoria (CTs), mezi kterými se nachází takzvaný interchromatinový kompartment (IC), jehož funkce je důležitá z hlediska transportu regulačních proteinů k cílovým místům DNA (Cremer a Cremer 2001; Lanctôt a kol., 2007). V roce 2006 byl popsán model jaderného uspořádání, který připouští vzájemný překryv teritorií chromosomů (Branco a Pombo, 2006). Tento model byl později podpořen technikami souhrnně nazývanými “Chromosome conformation capture techniques” (3C-; 4C- nebo Hi-C technologie) (Dekker a kol., 2002; Hakim a Misteli, 2012). Tyto metody umožňují studovat celogenomové interakce chromosomů v 3D prostoru a statisticky kvantifikovat četnost interakcí genových lokusů. Jsou to nejnovější technologie, které jsou založeny na vysoce výkonných screeningových metodách sekvenování. Pomocí těchto technik je možné kvantifikovat genetické i epigenetické stavy v buněčných jádrech. Dalším velice užitečným kritériem hodnocení uspořádání chromosomů je jejich radiální poloha v rámci interfázních jader. Významným přínosem v této oblasti výzkumu je práce portugalského týmu vědců, kteří jako první publikovali výsledky o specifickém radiálním uspořádání genů v buněčných jádrech (Parreira a kol., 1997; Neves a kol., 1999). Později se ukázalo, že radiální uspořádání chromosomů souvisí s četností genů na daném chromosomu (Boyle a kol., 2001). Byly hledány korelace mezi radiální distribucí genů a jejich expresí (Croft a kol., 1999; Kozubek a kol., 2002). Jako velice zajímavé se rovněž jeví změny v uspořádání chromosomálních domén během buněčné diferenciaci. Z tohoto důvodu jsme se v rámci našich experimentů začali zabývat aspekty týkající se diferenciačně závislých změn na úrovni chromatinu (Bártová a kol., 2000a, 2000b, 2002; Galiová a kol., 2004, Harničarová a kol., 2006 and Bártová a kol., 2008a). Dalším velice významným fenoménem struktury chromatinu je objev transkripčně aktivních genů lokalizovaných na chromatinových smyčkách, které vybíhají mimo vlastní kompaktní chromosomální teritorium (Volpi a kol., 2000; Mahy a kol., 2002; Williams a kol., 2002). Zmíněný jev byl pozorován převážně u genů zodpovědných za pluripotenci embryonálních kmenových buněk anebo u vývojově významných lokusů. K těmto lokusům patří například gen Oct3/4 nebo skupina genů Hox (Chambeyron a kol., 2004; Wiblin a kol., 2005; Bártová a kol., 2008a). Na základě popsáných výsledků však není úplně jasné, zda dekonverzace chromosomálních teritorií u nediferencovaných buněk je příčinou nebo až následkem transkripčních procesů (Chubb a kol., 2003). Určité snahy o objasnění podstaty vztahu mezi strukturou chromatinu a genovou expresí byly naznačeny v práci Kurz a kol. (1996). Zde bylo zjištěno, že transkripčně aktivní kódující sekvence se preferenčně vyskytují na periférii příslušného chromosomálního teritoria, zatímco nekódující DNA fragmenty byly umístěny náhodně v rámci daného chromosomu. Stejně tak bylo zjištěno, že transkripčně aktivní geny, jako například ANT2 (Xq24-q25) a ANT3 (Xp22.3), byly umístěny na periférii odpovídajícího chromosomálního teritoria, v porovnání se stejnými, ale transkripčně neaktivními lokusy (Dietzel a kol., 1999). Dále bylo pozorováno, že oblasti se zvýšeným obsahem GC párů bazí mají větší variabilitu v rámci chromosomálního teritoria než AT bohatá místa (Tajbakhsh a kol., 2000). Periferní lokalizace transkripčně aktivního genu c-myc na daném chromosomálním teritoriu byla studována i v našich experimentech (Harničarová a kol., 2006). Zjistili jsme, že radiální distribuce transkripčních míst c-myc

genu není ovlivněná diferenciačními procesy a dále, že transkripce a posttranskripční úpravy probíhají v centrálních částech interfázních jader (Harničarová a kol., 2006). V případě vývojově důležitých genů, jako je β -globinový klastr nebo gen Oct3/4, jsme pozorovali umístění těchto lokusů na chromatinových smyčkách, které opět vybíhaly mimo kompaktní teritorium daného chromosomu (Galiová a kol., 2004; Bártová a kol., 2008a). Na druhou stranu však existují práce, které ukazují na možnost transportu transkripčních faktorů do vnitřních částí chromozomálního teritoria, což ukazuje na jev takzvané “invaginace” interchromatinových kanálů do centrálních částí chromosomálních teritorií (Mahy a kol., 2002). Pohled na vzájemné korelace mezi expresí genů a jejich jaderným uspořádáním ovlivnila i práce Schübeler a kol. (2001). Tito autoři zjistili, že umlčení genové exprese může být zprostředkováno přiblížením lokusů k vysoce kondenzovaným oblastem heterochromatinu, jako jsou například centromery. Tento typ umlčení genové exprese, připomínající poziční efekt PEV (“Position Effect Variegation”) u octomilky (*Drosophila melanogaster*), je pravděpodobně spojený s deacetylací histonů v daném lokusu. Vliv centromerického heterochromatinu na transkripční aktivitu genů byl rovněž ověřen v naší práci Bártová a kol., (2002), kde jsme se zabývali hledáním zákonitostí mezi strukturou a funkcí genomu u leukemických buněk diferencovaných myeloidním směrem. V tomto případě bylo zjištěno, že centromerický heterochromatin a inaktivní X chromosom významně ovlivňují heterochromatinizaci a transkripční inaktivaci vybraných lokusů. Z hlediska regulace transkripční aktivity genů a formování euchromatinu a heterochromatinu se do popředí zájmu začaly od roku 2000 dostávat studie řešící problematiku epigenetických modifikací nejen DNA, ale i na histonech (Rice a Allis 2001; Lachner a Jenuwein, 2002; Lachner a kol., 2003; Martin a Zhang, 2005; Jenuwein, 2006; Kouzarides, 2007). Na základě principů modelů kompartmentalizace interfázních jader bylo cílem několika studií pochopení jaderného uspořádání specificky modifikovaných histonů (Cremer a kol., 2004; Zinner a kol., 2006; 2007; Skalníková a kol., 2007). Bylo zjištěno, že histonový kód významně ovlivňuje kompartmentalizaci genomu do odlišných euchromatinových a heterochromatinových domén. Základní principy kompartmentalizace je možné pozorovat i v případě lokalizace epigenetických modifikací chromatinu (Obr. 2). Bylo například zjištěno, že H3K9 dimetylace (me₂) představuje významný epigenetický znak centromerického heterochromatinu, který se u terminálně diferencovaných buněk vyskytuje na okraji jaderné periferie (Lachner et al., 2003), stejně jako H3K27 trimetylace (me₃), která představuje významný epigenetický znak inaktivního chromosomu X (Kohlmaier a kol., 2004). Významné změny v epigenomu byly také pozorovány po působení inhibitorů histon deacetyláz (HDACi) (Taddei a kol., 2001; Gilchrist a kol., 2004; Bártová a kol., 2005a; 2007). U buněk ovlivněných HDACi se zjistilo, že histony umístěné na jaderné periférii podléhají větším změnám v epigenetických znacích než histony nacházející se ve vnitřní části interfázních jader (Taddei a kol., 2001; Bártová a kol., 2005a). Zásah do epigenomu pomocí HDACi rovněž ovlivňuje jaderné uspořádání klastrů centromer a jejich interakci s důležitým proteinem heterochromatinu (HP1) (Taddei a kol., 2001; Bártová a kol., 2005a; 2007).

2. Vybrané statě z dizertace určené pro autoreferát

2.1. Epigenetické charakteristiky genomu

Epigenetika je obor, který se zabývá vývojově specifickými procesy v chromatinu, resp. genomu, ke kterým dochází nezávisle na změnách v sekvencích DNA. K epigenetickým změnám dochází nejenom během vývoje a v závislosti na diferenciačních procesech, ale také působením vnějších faktorů prostředí nebo vlivem takzvané epi-diety. Epigenetické modifikace DNA, RNA a histonů hrají důležitou úlohu v regulaci jaderných funkcí. V

konečném důsledku jsou však epigenetické změny reverzibilní. Epigenetika má několik svých podoborů, jako je epigenomika, živočišná epigenetika, nádorová epigenetika, vývojová epigenetika, klinická epigenetika využívající účinků tak zvaných “epi-drugs” a dále regulační epigenetika. Za významné epigenetické znaky chromatinu jsou považovány metylace DNA, RNA, posttranslační modifikace histonů a nekódující RNA.

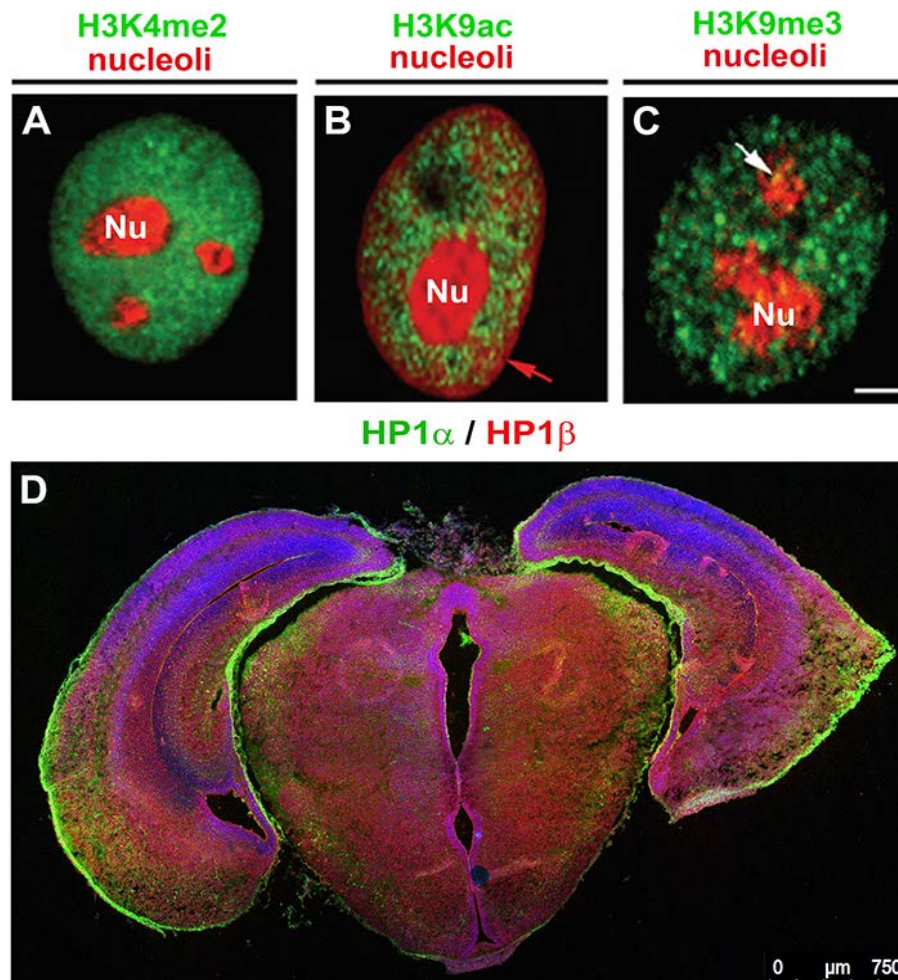
Metylace DNA a RNA je modifikace nukleových bází cytosinu nebo adeninu kovalentním připojením methylové skupiny. U adeninu je methyl připojen na šestý dusík, u cytosinu na čtvrtý dusík nebo pátý uhlík (5-methyl cytosin). Přítomnost 5-methyl cytosinu vede k umlčení exprese genů a procesům heterochromatinizace, ke kterým dochází většinou v průběhu buněčné diferenciaci. Metylace DNA se u somatických buněk vyskytuje v takzvaných CpG ostrůvcích. Je zajímavé, že tato modifikace DNA reguluje replikaci, rekombinaci i opravu DNA. Za navození metylačního stavu v DNA jsou zodpovědné DNA metyltransferázy (DNMTs) (například Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b). Obecně DNMTs využívají S-adenosyl methionin jako donor metylové skupiny (Kim a kol., 2009; Hashimoto a kol., 2009). Další významnou epigenetickou modifikací je RNA methylace, která je rovněž reversibilní posttranslační modifikací ovlivňující řadu buněčných procesů, včetně oprav DNA (Xiang a kol., 2017). Metylace se může vyskytnout na různých RNA, včetně tRNA, rRNA, mRNA, tmRNA, snRNA, snoRNA nebo miRNA. Za metylaci RNA je zodpovědná celá řada RNA methyltransferáz.

V naší laboratoři se přednostně zabýváme posttranslačními modifikacemi histonů, jako je metylace, acetylace, fosforylace nebo ubiquitinace. Za specifický znak transkripčně aktivního chromatinu jsou například považovány metylace histonu H3 v pozici lysinu 4 (H3K4), H3K36 a H3K79, které jsou zodpovědné za dekonenzaci chromatinu a formování chromatinových smyček (Chambeyron a Bickmore, 2004). Euchromatin je dále charakteristický přítomností acetylace histonů, která je zprostředkována enzymy histon acetyltransferázami (HATs). Zdrojem funkční acetyl skupiny je acetylkoenzym A (Kuo a Allis, 1998). Za odstranění acetylové skupiny jsou zodpovědné histon deacetylázy (HDACs). Deacetylační procesy vedou často k heterochromatinizaci, jejíž projevem je vysoká kondenzace chromatinu a aktivace histon methyltransferáz (HMTs), zodpovědných například za metylaci H3K9, H3K27 a H4K20. Tyto posttranslační modifikace, vedle metylace DNA, představují hlavní epigenetické znaky heterochromatinu (Kouzarides, 2007). Metylace H3K9 (například H3K9me3) je jednou z nejprostudovanějších epigenetických modifikací histonů, za jejíž přítomnost je v lidském genomu zodpovědná SUV39H1 histon methyltransferáza. Metylace H3K9 se může vyskytovat ve třech podobách: mono- (me1), di- (me2) a tri-metylace (me3). Počet metylových skupin významně determinuje, jaký typ chromatinu bude vytvořen, a jakou funkci H3K9 metylace bude mít. To znamená, že zmíněné epigenetické znaky významně rozhodují o formování euchromatinu a fakultativního nebo konstitutivního heterochromatinu. H3K9 metylace navíc představuje vazebné místo pro hlavní protein heterochromatinu HP1, jehož varianty ve většině případů zodpovídají za utlumením exprese genů a stabilizaci heterochromatinu.

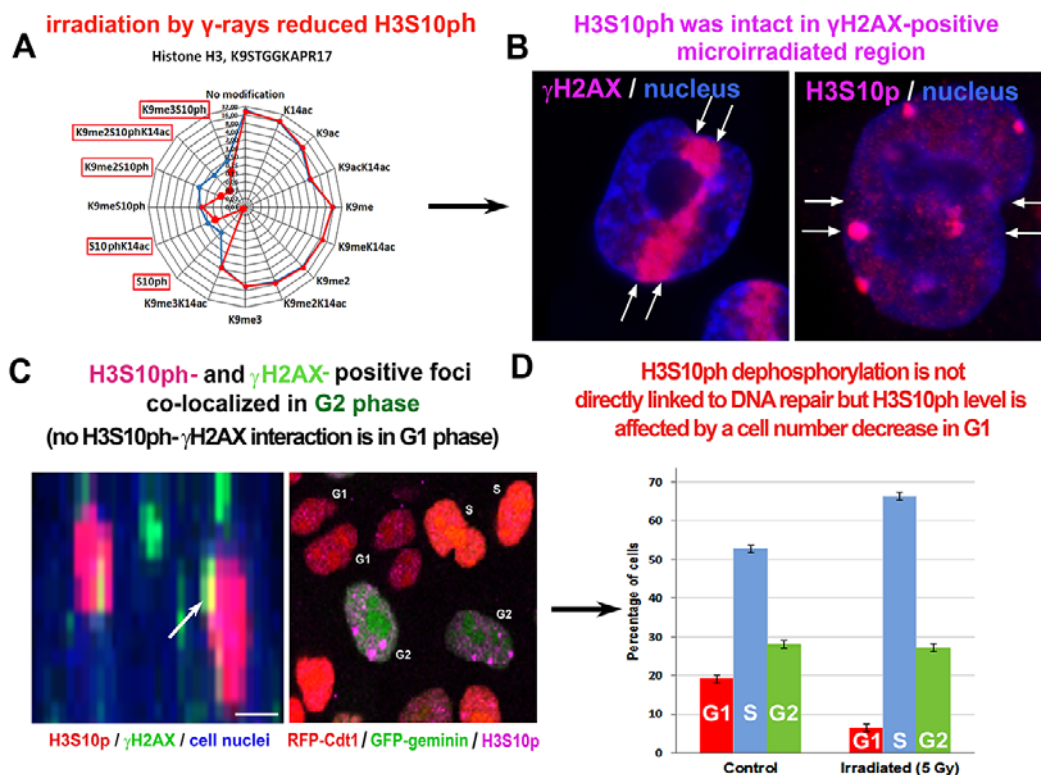
Metylace histonů byla objevena před více než 45 lety, ale dlouhou dobu se čekalo na objev enzymů, které jsou zodpovědné za demethylaci histonů. Předpokládalo se, že přítomnost této epigenetické modifikace je regulována acetylačními procesy. V roce 2004 byla objevena první histon demetyláza, nazvaná lyzin-specifická demetyláza (LSD1) (Shi a kol., 2004). Tento enzym je zodpovědný za demethylaci histonů H3K4, což vede k inaktivaci transkripce v daném lokusu. V případě, že LSD1 vytvoří komplex s receptorem pro androgeny, pak tento komplex zodpovídá za demethylaci H3K9, tedy aktivaci transkripce (Metzger a kol., 2005). V dalších letech bylo objeveno ještě mnoho jiných demetyláz, například třída Jumonji (Klose a kol., 2006; Klose a Zhang, 2007; Kouzarides 2007). Například JHDM2A je enzym zodpovědný za H3K9 demethylaci, zatímco JHDM1 má

schopnost měnit H3K36 dimetylaci na nemodifikovaný stav (Jenuwein, 2006).

Velký význam z hlediska regulace transkripčně aktivního/neaktivního heterochromatinu mají fosforylace a ubiquitinace histonů. Bylo zjištěno, že fosforylace H3 na serinu 10 (H3S10) reguluje transkripční aktivitu a je zodpovědná za dekonkondenzaci chromatinu (Grant, 2001; Johansen a Johansen, 2006). V naší laboratoři jsme zjistili, že změny v H3S10 fosforylaci hrají důležitou úlohu pro opravách DNA (Obr. 2).



Obrázek 1. Příklad kompartmentalizace post-translační modifikace histonů (A) H3K4me2, (B) H3K9ac nebo (C) H3K9me3 v interfázních jádrech (Skalníková a kol., 2007). (D) Kompartmentalizace HP1α a HP1β proteinů v řezu mozku dospělé myši (převzato z Franek a kol., MAM, 2016). Obrázky ukazují na jadernou distribuci (A) H3K4me2, (B) H3K9 acetylace a (C) H3K9me2 (vše zeleně) v porovnání s jadérky (červeně). (D) Pro analýzu proteinů v tkáni jsme použili metodu takzvaného dlaždicového snímání. Analýza byla provedena mikroskopem Leica SP5 X, což je pokročilý konfokální mikroskop. Pro snímání obrazu byl použit LAS AF software, objektiv 63× (panely A-C) a 10 × 0.25 (N PLAN 1; numerická apertura (NA) = 0.25; rozlišení: xy: 781nm a v ose z: 6916 nm (Leica Microsystems, Germany).



Obrázek 2. (A) Ozařování γ -zářením snížilo hladinu H3S10ph (červené signály). Nicméně (B) H3S10 fosforylace byla intaktní v genomové oblasti, vystavené mikroozařování. Tato místa v genomu byla pozitivní na fosforylaci histonu H2AX. (C) H3S10ph- a γ H2AX- pozitivní ohniska kolokalizovala v G2 fázi buněčného cyklu, (D) defosforylace H3S10 nebyla přímo spojena s opravou DNA, ale snížení bylo pravděpodobně způsobeno poklesem počtu buněk v G1-fázi buněčného cyklu. Buňky v G1 fázi jsou charakteristé sníženou hladinou S10ph.

Z důvodu velkého funkčního významu epigenetických modifikací histonů, byla provedena řada studií, které řešily interfázni i metafázni profily jednotlivých epigenetických znaků. Bylo zjištěno, že stejně jako kompartmentalizace jaderných struktur, včetně chromatinu, logicky i histony a jejich specifické modifikace, jsou začleněny do určitých kompartmentů. Například autoři Cremer a kol. (2004) zjistili, že jimi vybrané epigenetické modifikace histonů jsou významně klastrovány v interfázních jádrech. Tento jev může být například odrazem akumulace transkripčně aktivního chromatinu ve vnitřních částech buněčného jádra, zatímco heterochromatin je umístěn spíše na jaderné periférii a na okrajích jadérek (Croft a kol., 1999; Sadoni a kol., 1999). Ziner a kol. (2006) a Sklaníková a kol. (2007) dále zjistili, že existují určité vzájemně se nepřekrývající epigenetické vrstvy v rámci interfázni jáder, které ukazují na to, že interfázni chromatin a jeho epigenetické markery jsou významně kompartmentalizovány (Cremer a Cremer, 2001; Lanctôt a kol., 2007). Tyto modifikace a jejich vazebné proteiny jsou kompartmentalizovány nejenom v interfázni jádrech, ale také v rámci větších tkáňových celků. Kompartmentalizaci proteinů HP1 α a HP1 β , které mají schopnost se vázat na H3K9 metylaci, jsme například prokázali i v mozku dospělých myší. Výskyt H3K9 metylace v centromerických a telomerických oblastech chromosomů může rovněž ovlivnit jadernou topografii histonových modifikací (Lachner a

kol., 2003; Garcia-Cao a kol., 2004). Bylo například zjištěno, že u myších buněk s vyblokovanou funkcí Suv39h1 HMT se vyskytuje v telomerickém chromatinu pouze H3K9me1, což bylo spojeno s abnormálně se zkracujícími telomery, zatímco normální telomery jsou H3K9 mono-, di- a tri-methylovány (Garcia-Cao a kol., 2004). Z tohoto faktu vyplývá, že distribuce metylace H3K9 determinuje funkci telomer, které jsou charakteristické svojí specifickou jadernou topografií. Změny v radiálních distribucích telomer byly rovněž popsány v práci Amrichová a kol. (2003). Tito autoři zjistili, že telomery se obecně vyskytují blíže jaderného středu v porovnání s centromerickými sekvencemi. Déle zjistili, že telomery chromosomů 8, 9 a 19 nevykazují žádné vzájemné interakce, zatímco oba páry homologních telomer chromosomů 19 spolu velmi často asociovaly.

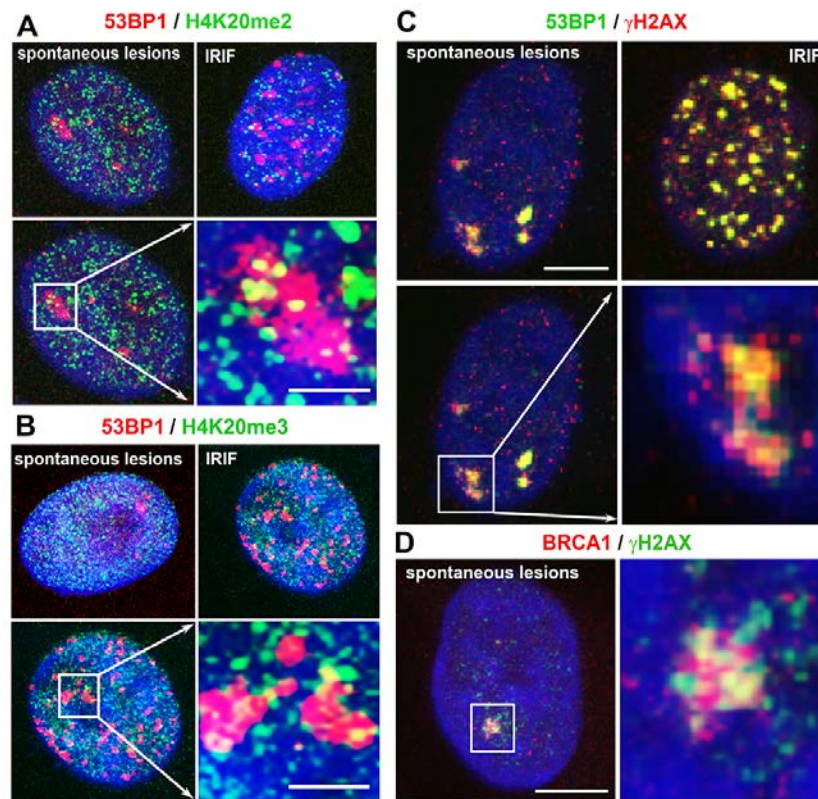
Změny v jaderném uspořádání genů, centromer, telomer nebo i celých chromosomů a jejich epigenetických modifikací mohou být navozeny působením inhibitorů nebo aktivátorů epigeneticky významných enzymů, zodpovědných za regulaci epigenetických procesů. Takto například HDAC inhibitory, jako trichostatin A (TSA), valproát, SAHA (Vorinostat) nebo butyrát sodný (NaBt) ovlivňují acetylaci histonů. Současně tyto inhibitory způsobují redistribuci a reorganizaci chromocenter, což jsme například prokázali u embryonálních nádorových buněk (Bártová a kol., 2007). Změnou jaderného uspořádání se projevuje i hyperacetylace histonů navozená HDACi. Tento fakt jsme potvrdili v případě variant proteinu HP1 (HP1 α , HP1 β , HP1 γ). Zjistili jsme, že jak TSA, tak NaBt významně mění distribuci všech variant proteinu HP1. V případech ovlivnění buněk zmíněnými HDACi byl tento jev doprovázen i změnami v hladinách studovaných proteinů (Bártová a kol., 2005a; Bártová a kol., 2007).

Epigenetické modifikace histonů a DNA metylace jsou rozhodující i z hlediska inaktivace chromosomu X v samičích buňkách genomu savců. Dávková kompenzace exprese genů na jednom ze samičích X chromosomů je velmi intenzivně studovaným tématem buněčné biologie (Heard a kol., 1997; 2001; Park a Kuroda, 2001). Inaktivní chromosom X může být rozpoznán od jeho transkripčně aktivního homologu tím, že jsou zde exprimovány pouze geny kódující X-inaktivní specifické transkripty (*Xist*), které vznikají v takzvaném X inaktivačním centru (*Xic*). Nekódující *Xist* RNA obklopují celý chromosom X, což způsobuje jeho transkripční umlčení. Tento proces je doprovázen mnoha změnami na úrovni chromatinu, jako je přítomnost varianty histonu H2A, takzvané macroH2A, či zvýšená H3K27me3 na inaktivním chromosomu X (Hall a Lawrence, 2003). H4K20me1 a H3K27me3 jsou významně asociovány s *Xist* expresí, tudíž představují hlavní znak iniciace inaktivace chromosomu X (Kohlmaier a kol., 2004). Typickými vlastnostmi inaktivního X chromozomu je navíc pozdní replikace, CpG metylace a H4 deacetylace (Czankovszki a kol., 2001). Bylo také zjištěno, že H3K27 trimetylace a ubiquitinace H2A jsou asociovány s přechodnou aktivací *Polycomb group* proteinových komplexů (PcG), což představuje první iniciační krok v inaktivaci chromosomu X (Martin a Zhang, 2005).

2.2. Posttranslační modifikace histonů a jejich funkce při opravách

DNA Jak již bylo uvedeno, specifické posttranslační modifikace histonů regulují vazbu proteinů 53BP1 a BRCA1 do oblasti poškozené DNA. Obecně platí, že modifikace histonů mají obrovský význam v signálních drahách, které regulují opravy DNA. V těchto ohledech hraje velmi důležitou úlohu ubiquitinace histonů. Například 53BP1 protein rozpoznává mono-ubiquitylaci histonu H2A v poloze lysinu 15 (H2AK15ub) zprostředkovanou ubiquitin ligázou RNF168. Tato posttranslační modifikace je obklopena dimetylovaným histonem H4 v pozici lysinu 20 (H4K20me2). H4K20me2 se vyskytuje v těsné blízkosti 53BP1-pozitivních „reparačních“ ohnisek, které dále kolokalizují s akumulovaným proteinem MDC1 (Botuyan a kol., 2006). V naší práci Suchánková a kol. (2017) jsme dále ukázali, že robustní MDC1-pozitivní radiačně-indikované ohniska (IRIF) obsahující menší

ohniska, pozitivní na fosforylaci H2AX. Tato ohniska se nacházela ve vnitřních částech akumulovaných lézí v DNA. Pro ilustraci uvádíme v Obr. 3, jak jsou proteiny, včetně vybraných posttranslačních modifikací histonů, kompartmentalizovány v ohniscích oprav DNA.

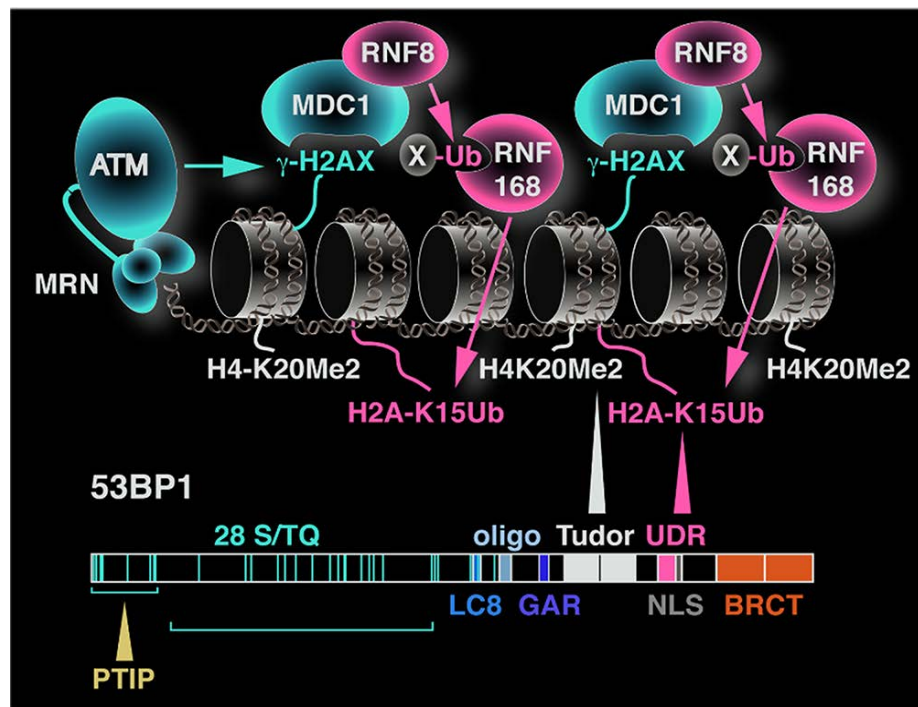


Obrázek 3. Kompartmentalizace jaderných ohnisek, ve kterých probíhají opravy DNA. (A) H4K20me2 (zelená, Alexa-Fluor-488) a (B) H4K20me3 (zelená, Alexa-fluor 488) byly homogenně rozmístěny v 53BP1-pozitivních ohniscích, kde probíhají opravy DNA (červená, Alexa-Fluor-594). Příklady spontánních lézí DNA a IRIF jsou dokumentovány v obou panelech A a B. Šipky v panelu (A) ukazují zvětšení 53BP1-pozitivní spontánní léze DNA. V panelu (B) vymezují šipky IRIF v buňkách HeLa. Stupnice měřítka v panelu (A) je 0,5 μm a měřítka v panelu (B) ukazuje 1 μm . Jaderné uspořádání proteinů (C) 53BP1 (zeleně) a γH2AX (červeně) ve spontánně se vyskytujících lézích DNA a IRIF v buňkách HeLa. (D) Schéma jaderné distribuce proteinů BRCA1 (červeně) a γH2AX (zeleně).

H4K20me2/me3 je v Obr. 2 homogenně distribuována v 53BP1 pozitivních ložiscích. Fosforylace H2AX je soustředěna v centrálních částech 53BP1-pozitivních DNA lézí a malá ložiska γH2AX se také objevují kolem koncentrovaných lézí v DNA. Ve srovnání s BRCA1 je fosforylace H2AX více rozptýlena v „reparačních“ ohniscích. DNA léze kromě popsaných znaků charakterizují ještě další epigenetické rysy. Bylo například zjištěno, že

protein 53BP1 se váže na konstitutivní histonovou modifikaci H3K79me3 a následně se tento opravný protein váže na chromatin, který je mono- nebo dimetylován na histonu H4K20 (Huyen a kol., 2004; Oda a kol., 2010). Je evidentní, že metylace H4K20 je zásadní pro funkci proteinu 53BP1 při opravách poškozené DNA, kdy funkce 53BP1 není primárně

regulována p53-dependentní signální dráhou. Mechanismus opravy DNA zprostředkovaný 53BP1 proteinem funguje paralelně s H4K20me2, kdy za tuto interakci proteinů je zodpovědná Tudor doména proteinu 53BP1 (Obrázek 4).



Obrázek 4. Ilustrace ukazuje doménu proteinu 53BP1 a mechanismus, kterým 53BP1 rozpoznává chromatin s dvouřetězcovými zlomy. Vazba proteinu 53BP1 vyžaduje dvě specifické modifikace histonů a to konstitutivní H4K20me2, která je rozpoznána doménou Tudor a „reparačně“ specifickou, která rozpoznává H2A(X)K15 ubiquitinaci. Jde o doménu UDR proteinu 53BP1. Vazba 53BP1 na poškozený chromatin je také podporována oligomerizační doménou (Oligo) a N-terminální ST / Q místem rozpoznávajícím fosforylované histony, což je důležité pro interakci proteinu 53BP1 s PTIP a Rif1 proteiny. Obrázek byl převzat z Zimmermann a de Lange (2014).

Autoři Yan a kol. (2009) a Oda a kol. (2010) dále ukázali, že H4 metyltransferáza PR-Set7/Set8, zodpovědná za H4K20 metylaci, rovněž rozpoznává léze v DNA. Pro tvorbu IRIF s pozitivitou γ H2AX/53BP1/MDC1/BRCA1 je dále významná i acetylace H4K16 zprostředkovaná faktorem MOF (Li a kol., 2010; Sharma a kol., 2010).

Několik studií také odhalilo funkci ubiquitinylace histonů H2A, H2B a H2AX v

reakci na poškození DNA. Za tento typ posttranslační modifikace je zodpovědná ubiquitin E3 ligáza RNF8. Je zajímavé, že H2AX ubiquitinylace, která je zprostředkována komplexem proteinu PRC1, přispívá k akumulaci 53BP1 a BRCA1 proteinů do oblasti dvouřetězcových zlomů (Ismail a kol., 2010). Kromě toho sumoylace 53BP1 a BRCA1 za pomoci ligandů PIAS1 a PIAS4 SUMO E3 zvyšuje dobu, kdy se začínají objevovat proteiny 53BP1 a BRCA1 v místech poškozené DNA (Polo a kol., 2011). Hu a kol. (2017) dále odhalili mechanismy rozpoznávání ubiquitinu v nukleosomu. Autoři ukazují, jak RNF168, RNF169 a RAD18 regulují funkci proteinu 53BP1. Wilson a kol. (2016) také dokumentovali, jak ubiquitinylace histonů zprostředkuje opravu DNA. RNF168 ubiquitínuje histon H2A na lysinu 13 a lysinu 15 (H2AK13ub a H2AK15ub) (Gatti a kol., 2012; Mattioli a kol., 2012).

Tento epigenetický proces ovlivňuje vazbu proteinu 53BP1 do oblastí buněčného jádra s poškozeným chromatinem. Vazba 53BP1 na ubiquitinaci H2AK15 je zprostředkována ubiquitinylační (UDR) doménou proteinu 53BP1. Tento proces probíhá souběžně s H4K20me₂, která se přes funkční Tudor doménu váže k proteinu 53BP1 (Zimmermann a de Lange, 2014). Dále je potvrzeno, že poškození DNA stimuluje ATM kinázu, která fosforyluje protein 53BP1. Výsledkem je nárůst hladiny faktoru 1 (RIF1), který interaguje s proteinem RAP1 v oblastí lézí v DNA a dochází k disociaci komplexu 53BP1-TIRR v buněčném jádře. V tomto případě může dysfunkce TIRR způsobovat nestabilitu 53BP1-pozitivních „reparačních“ ohnisek, a tím aktivovat nevhodnou dráhu opravy DNA (Drane a kol., 2017).

Velmi důležitou úlohu v reakci na poškození DNA hraje rovněž poly (ADP-ribóza) polymeráza 1 (PARP1). Autoři Chou a kol. (PNAS, 2010) zjistili, že inhibice PARP1 zabraňuje akumulaci PcG proteinů BMI a Mel18 do oblastí mikroozářeného genomu v živých buňkách. Yang a kol. (2017) ukázali, že „down-regulace“ 53BP1 významně snižuje schopnost PARP inhibitorů potlačit růst nádorových buněk *in vivo*. Toto pozorování má velký klinický význam, protože inhibitory PARP mohou být využity při léčbě některých nádorů. Například asi deset procent karcinomů prsu a vaječníků, charakterizovaných deplecí BRCA1 proteinu, má rovněž sníženou hladinu proteinu 53BP1. Monitorování onkologických markerů, včetně 53BP1 a BRCA1, může přispět ke zlepšení terapeutické strategie, zejména při kombinované radioterapii s cytostatickou léčbou. Tyto údaje ukazují, že inhibice PARP1 představuje velmi slibné terapeutické nástroje, zejména u nádorů s poškozenou funkcí BRCA1-závislé opravné dráhy DNA.

Autoři Ayrapetov a kol. (2014) dále poukázali na to, že oprava dvouřetězcových zlomů zprostředkováná ATM kinázou vyžaduje metylaci histonu H3 v poloze lysinu 9 (H3K9me₃). Nicméně stále zde zůstává otázka, jak přesně H3K9me₂/me₃, jako vazebný partner proteinů rodiny HP1, reguluje odpověď genomu na poškození DNA. Jako první ukázali autoři Luijsterburg a kol. (2009), že akumulace isoformy proteinu HP1 do lokálně indukovaných lézí v DNA je nezávislá na H3K9me₃. Ayrapetov a kol. (2014) dále uvádí, že proteinový komplex obsahující Suv39h1 methyltransferázu rozpoznává dvouřetězcové zlomy, ve kterých zprostředkovává metylaci H3K9 v těsné blízkosti DSBs. Tento proces, který zahrnuje dynamické změny v metylaci H3K9 v euchromatinu, se zdá být nezbytný pro celkovou remodelaci poškozeného chromatinu. H3K9me₃ také iniciuje aktivaci acetyltransferázy Tip60, která acetyluje jak ATM kinázu, tak histon H4. Tento proces pravděpodobně vede k vytvoření dekonzenzovaného stavu chromatinu, což je stav navozený především UV zářením (Kruhlak a kol., 2006). Nedávno jsme však pozorovali, že v oblastech mikroozářeného chromatinu dochází k deacetylaci H3K9 a k nárůstu hladiny histon deacetylázy 1 (HDAC1) (Bártová a kol., 2011). Zdá se tedy, že se histon deacetyláza a také sirtuin 7 (SIRT7) účastní procesu opravy DNA. Paredes a Chua, 2016) prokázali, že SIRT7 se naváže za účasti PARP1 do oblastí genomu s dvouřetězcovými zlomy, což vede k deacetylaci H3K18 v místech poškozeného chromatinu. Tento epigenetický stav umožňuje akumulaci 53BP1 proteinu do oblastí s H3K18 deacetylovaným chromatinem s dvouřetězcovými zlomy, které jsou rozpoznány mechanismem NHEJ (Vazquez a kol., 2016). Zajímavé je, že mobilizace SIRT7, závislá na poškození DNA, způsobuje snížení hladiny SIRT7 v kompartmentu jadérek, které jsou obecně vysoce pozitivní na tento typ sirtuinu (Vazquez a kol., 2016). Chen a Zhu (2016) dodatečně shrnuli, že lokální H3K9me₃, vyskytující se v blízkosti dvouřetězcových zlomů, se objevuje spíše v euchromatinu. Na druhou stranu v neozářených buňkách se H3K9me₃ primárně vyskytuje v klastrech heterochromatinu, tudíž v oblastech genomu méně citlivých na poškození DNA. Je zajímavé, že komplex obsahující proteiny Kap-1, HP1 a H3K9-methyltransferázu SUV39H1 se reorganizuje do oblastí chromatinu, který se nachází v blízkosti DSBs. Tento děj je

spojován s výskytem H3K9 metylace v místech poškozeného genomu a je závislý na funkci PARP1 proteinu. Zvýšení H3K9me2 bylo zjištěno také u DSBs indukovaných I-SceI endonukleázou (Fnu a kol., 2011). Na druhou stranu, snížení metylace H3K9 by mohlo navodit rozvolnění chromatinu, které se objevuje zejména po místním mikroozáření buněčných jader pomocí UVA-laseru. Lokálně indukované léze v DNA jsou také často charakteristické přítomností epigenetického markeru heterochromatinu, a tím je H3K27me3. Na tuto posttranslační modifikaci v chromatinu s poškozenou DNA se váží proteiny PcG, jako je BMI1 a Mel18 (Chou a kol., 2010; Šustáčková a kol., 2012). Dále bylo zjištěno, že zvýšená aktivita EZH2 histon metyltransferázy (z Polycomb represivního komplexu 2, PRC2), která zodpovídá za H3K27me3 na promotorech vývojově důležitých genů, byla pozorována po oxidačním poškození genomu (O'Hagan, 2011). Tito autoři dále ukázali, že epigenetické procesy, související s poškozením DNA, zahrnují snížení hladiny H3K4me3 a H4K16ac, ke kterému dochází po ozáření buněk.

2.3. Změny ve struktuře chromatinu a jejich korelace s epigenetickými změnami při opravě DNA

Epigenetické procesy nejsou spojeny se změnami v sekvencích DNA (Lahtz a Pfeifer, J. Mol., Cell Biol., 2011). Pro potenciálních terapeutické aplikace je významným poznatkem, že epigenetické změny, charakteristické pro různá onemocnění, jsou na rozdíl od cytogenetických poruch reverzibilní. Například klinicky používané inhibitory nebo aktivátory epigeneticky významných enzymů, včetně inhibitorů HDACs nebo DNA methyltransferáz (Dnmts), mají významnou úlohu zejména při léčbě nádorů a to z důvodu schopnosti měnit epigenom. Regulační úloha acetylace histonů a metylace DNA je primárně rozhodující v promotorových oblastech. Z tohoto důvodu je nezbytná optimální funkce histon acetyltransferáz (HATs), HDACs nebo Dnmts (Belikoff a kol., 1980; Martinet a Bertrand, 2011; Brownell a kol., 1996). Velmi důležitá regulační úloha je také připisována di-/tri-methylaci histonu H3 v pozici lysinu 9 (H3K9me2/me3). Tyto histonové znaky jsou zodpovědné za utlumení exprese genů a procesy heterochromatinizace. H3K9me3-pozitivní heterochromatin představuje rovněž vazebné místo pro izoformy heterochromatinového proteinu HP1 (HP1 α , HP1 β a HP1 γ) a z pohledu heterochromatinové stabilizace je nutná také optimální funkce H3K9 histon metyltransferáz (HMTs) (Baldeyron C. a kol., 2011). Isoformy HP1 hrají také důležitou roli v odezvě na poškození DNA (DDR) (Ayoub a kol., 2008). HP1 má schopnost rozpoznat především chromatin poškozený UV zářením (Dinant a Luijsterburg, 2009, Luijsterburg a kol., 2009, Zarebski a kol., 2009).

Dvouřetězcové zlomy v DNA, pokud nejsou opraveny, jsou hlavní hrozbou neporušené a smysluplné genetické informace buňky. Chyby v mechanismech opravy DNA tak mohou vést k chromosomálním aberacím, včetně translokací chromosomů, které jsou spojovány s patologickými procesy v buňkách a následně i v tkáních. O mechanismu, který je zodpovědný za vznik translokací chromosomů v savčích buňkách, se vedly a vedou spory. Jedním z předpokladů je fakt, že k translokaci může dojít jen mezi sousedními chromosomálními teritorii (Kruhlik a kol., 2006). Dále bylo zjištěno, že indukce DSBs je lokálně omezená do oblasti takzvaných "reparačních ohnisek" (Soutoglou a kol., 2007). Vznik chromosomálních zlomů vede ke zvýšenému pohybu poškozeného úseku DNA a tento pohyb se odehrává v dobře definovatelných, vymezených kompartmentech buněčného jádra (Soutoglou a kol., 2007). Dvouřetězcové zlomy tedy pravděpodobně nemohou migrovat do oblastí "reparačních ohnisek", ale kolem každého dvouřetězcového zlomu se budou formovat vlastní ohniska proteinů, které se aktivně zapojují do specifických opravných mechanismů (Soutoglou a kol., 2007). Velice vhodným epigenetickým znakem pro rozpoznání dvouřetězcových zlomů je fosforylovaný histon H2AX (γ H2AX). Tato posttranslační modifikace histonů je důležitá pro aktivaci dalších proteinů, které se účastní

opravy těchto zlomů v DNA (Celeste a kol., 2003). Při aplikaci genotoxických činidel nebo při ozáření buněk došlo například po 5 minutách u více než 75 % pozorovaných buněk k fosforylaci histonu H2AX v poškozené oblasti genomu (Soutoglou a kol., 2007). Během dalších pěti minut po ozáření se v oblasti DNA lézí akumulovaly další faktory opravy DNA. Byl to například protein MDC1, který je nezbytným faktorem mechanismu opravy DNA pomocí homologní rekombinace (HR). Na druhou stranu, akumulace 53BP1 proteinu v místech poškozeného chromatinu se objevovala přibližně 15 min po poškození genomu (Soutoglou a kol., 2007). Je však známo, že 53BP1 se účastní jiné opravné dráhy zvané nehomologní spojování konců (NHEJ), což by vysvětlovalo rozdíly v kinetice uvedených proteinů. Tento rozdíl může být ovlivněn i skutečností, že NHEJ mechanismus probíhá z velké části v G1 fázi buněčného cyklu, zatímco HR opravná dráha je aktivována v S/G2 fázích. Na základě výsledků těchto experimentů je možné konstatovat, že úseky DSBs, které se vyskytují na různých chromosomech, patrně nejsou schopny volně migrovat jádrem savčích buněk, kdy přinejmenším faktor Ku80 se podílí na omezení pohybu konců porušených chromosomů (Soutoglou a kol., 2007). K chybnému spojení neopravených zlomů tedy nejspíš dochází v rámci přesně lokalizovaného výskytu poškozených chromosomálních teritorií. Z tohoto důvodu je četnost chromosomálních translokací závislá na stupni vzájemné interakce mezi sousedními chromosomy tak, jak to bylo popsáno v práci Kozubek a kol. (1997) a Branco a Pombo (2006). Díky omezené mobilitě dvouřetězcových zlomů v rámci interfázních jader jsou translokace chromosomů relativně vzácné děje, protože opravné mechanismy probíhají velmi rychle, dříve než může dojít k vzájemnému propojení poškozených oblastí nehomologních chromosomů. Omezení pohybu DSBs v savčích buňkách představuje pravděpodobně ochranný mechanismus, který brání nestabilitě genomu (Soutoglou a kol., 2007).

V naší práci se zabýváme především epigenetickými ději, které jsou zodpovědné za opravy dvouřetězcových zlomů. Poškození DNA vede nejenom k epigenetickým změnám, ale rovněž k reorganizaci buněčného jádra, včetně lokálních změn v jaderné struktuře některých kompartmentů buněčného jádra, jako jsou PML tělíska, Cajalova tělíska nebo celé oblasti chromozomů (Kinner a kol., 2008, Bártoová a kol., 2000a, Legartová a kol., 2014; Bártoová a kol., 2014). Specifické posttranslační modifikace histonů regulují opravy DNA, kdy například velice důležitá je již zmíněná fosforylace H2AX, která je zprostředkována ATM (Ataxia telangiectasia mutated) kinázou. Dále jak již bylo zmíněno, v oblasti dvouřetězcových zlomů se vyskytuje dimethylace (me₂) histonu H4 v pozici lysinu 20, která důležitá pro opravný mechanismus NHEJ (Botuyan a kol., 2006). Za zmínku stojí i to, že metyltransferáza MMSET/HSC1 může lokálně zvyšovat H4K20me₂, a tím i vazbu mezi touto posttranslační modifikací a proteinem 53BP1 (Pei a kol., 2011; Hajdu a kol., 2011).

Při reakci na poškození DNA hrají významnou úlohu isoformy heterochromatinového proteinu HP1 (HP1 α , HP1 β , HP1 γ) (Ayoub a kol., 2008, Luijsterburg a kol., 2009). V tomto směru je známo, že HP1 isoformy se váží na metylaci H3K9 prostřednictvím N-koncové chromodomény HP1 (Jacobs a Khorasanizadeh, 2002). Na druhou stranu, HP1 interakce s jinými proteiny je zprostředkována C-terminální takzvanou "chromoshadow" doménou (CSD) (Nielsen a kol., 2002; Fuks a kol., 2003, Eskeland a kol., 2007). Funkce HP1 při opravách DNA rovněž závisí na fosforylaci tohoto proteinu, což pravděpodobně vede k zahájení odpovědi buňky na poškození genomu (Dinant a Luijsterburg, Mol Cell Biol., 2009). Naše nedávné experimenty ukázaly, že HP1 β má schopnost rozpoznávat léze v DNA navozené UVA zářením. Tyto léze obsahují cyklobutan-pyrimidinové dimery (CPDs), a z tohoto důvodu se domníváme, že HP1 protein by mohl hrát významnou úlohu při mechanismech nukleotidové excizní opravy (NER) (Stixová a kol., 2014). Na druhou stranu, autoři Zarebski a kol. (2009) poukázali na to, že HP1 se během několika minut po poškození

DNA akumuluje do poškozených oblastí jak v euchromatinu, tak v heterochromatinu. Autoři této práce tvrdí, že se HP1 protein účastní básových excizních oprav (BER mechanismus).

Velice významnou modifikací histonů z pohledu opravy DNA je zmíněná trimetylace H3K9 zprostředkovaná histon methyltransferázami (HMTs) Suv39h1/h2 (Bannister a Kouzarides, 2005). Methylace H3K9 má kromě Suv39h1/h2-dependentní interakce s HP1 proteinem mnoho dalších funkcí. Ayrapetov a kol. (2014) ukázali, že hladina H3K9me3 reguluje aktivaci ATM kinázy, ale přesná úloha methylace H3K9 při opravách DNA není zatím stále objasněna. Zmínění autoři prokázali, že Suv39h1 HMT velmi rychle rozpoznává léze v DNA, kde reguluje metylaci H3K9 v blízkosti dvouřetězcových zlomů. Navíc ztráta H3K9me3 v místech poškozeného genomu je spojena s nefyziologickou opravou DNA. Je zajímavé, že přechodné uvolňování komplexu Kap-1/HP1/Suv39h1 z chromatinu se objevuje v okamžiku, kdy dojde k fosforylaci Kap-1 pomocí ATM (Ayrapetov a kol., 2014). Sun a kol., (2009) pozorovali, že komplex proteinů Mre11-Rad50-Nbsl, Tip60 a H3K9 trimetylase se účastní opravy poškozené DNA pomocí homologní rekombinace (HR). Z uvedených výsledků plyne, že epigenetické děje hrají důležitou úlohu zejména během regulace exprese genů, ale opravy DNA jsou také zprostředkovány specifickým histonovým kódem. Je ovšem zajímavé, že například demethylace H3K9, H3K27 nebo H3K36 nezmění počet γ H2AX-pozitivních ohnisek, ve kterých probíhá oprava DNA (Sun a kol., 2009).

Sun a kol. (2009) potvrdili interakci mezi H3K9me3 a nádorovým supresorem Tip60. Tato interakce proteinů se vztahovala k opravě DNA. Autoři objevili, že pokud dojde ke snížení hladiny H3K9me3, je potlačena aktivita acetyltransferázy Tip60, což vede k poruchám ve funkci ATM kinasy (Sun a kol., 2009). V tomto případě může proto dojít k chybné opravě DSBs v buňkách s poruchou v metylaci H3K9. Ayrapetov kol. (2014) ukázali, že Suv39h1 HMT se objevuje ve dvouřetězcových zlomech, stabilizuje poškozený chromatin a aktivuje ATM. Tento mechanismus je nezbytný pro remodelaci chromatinu, který je fosforylován na histonu H2AX. Fosforylace H2AX je nutná pro stabilizaci "reparačních" ohnisek (IRIF) indukovaných ionizujícím zářením (Nakamura a kol., 2010). Je zajímavé, že i "reparační ohniska" vykazují určitou míru kompartmentalizace proteinů (Obr. 2). Například protein 53BP1 a NBS1 jsou uspořádány v centrálních částech IRIF, zatímco BRCA1 a drobná ohniska γ H2AX se vyskytují na periferii radiačně-indukovaných lézí v DNA (IRIF).

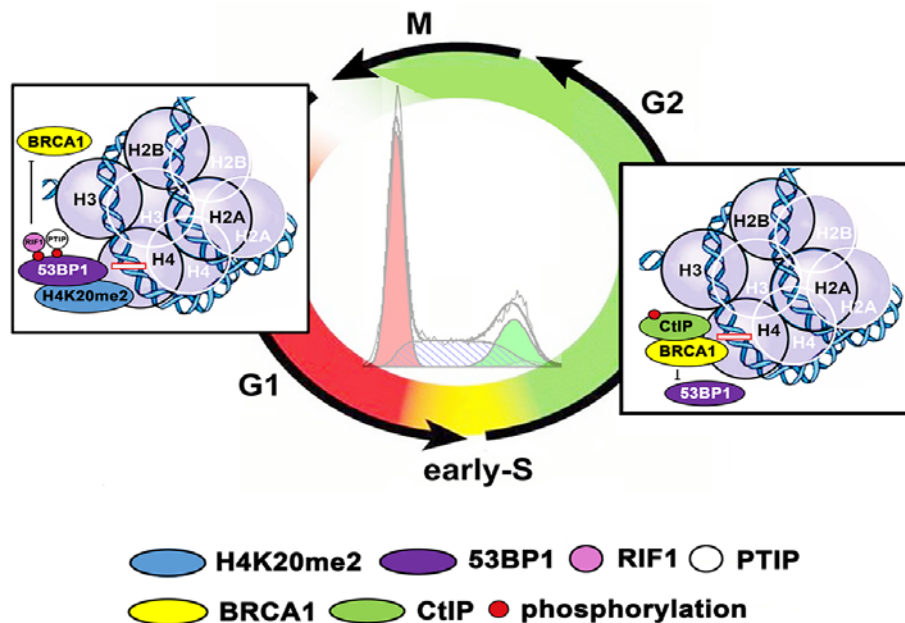
Při studiu tvorby γ H2AX-pozitivních ohnisek Ayrapetov a kol. (2014) zjistili, že v G2-M fázích buněčného cyklu chyběl v těchto ohniscích protein 53BP1. Dále je zajímavé, že protein 53BP1 netvoří ohniska v M-fázi buněčného cyklu, zatímco protein MDC1 je lokalizován do "reparačních" ohnisek i v mitóze.

V lézích DNA byla pozorována kromě fosforylace H2AX také velmi dynamická acetylace histonů. Prokázali jsme, že UVA indukované DNA léze neobsahují acetylaci H3K9, což bylo doprovázeno nárůstem hladiny HDAC1 v lokálně ozařovaném chromatinu (Bártová a kol., 2011). Guo a kol. (2010) dále ukázali, že UV-záření ovlivňuje acetylaci H3K9 a H4K16, a že řada změn v acetylaci histonu se objevila paralelně se vznikem CPDs (Brand a kol., 2001). Z tohoto pohledu se zdá, že funkce HATs a HDACs je nezbytná pro bezchybnou opravu poškozeného genomu především NER mechanismem. V buňkách vystavených záření se také objevuje i acetylace histonu H2AX na lyzinu 5, což zprostředkovává histon acetyltransferáza Tip60.

2.4. 53BP1 protein a jeho funkční význam při opravném procesu NHEJ

Je evidentní, že různé typy lézí v DNA aktivují odlišnou kaskádu opravných mechanismů. Obecně platí, že chyby při opravě DNA navozují mutagenesi vedoucí ke genomové nestabilitě. K zabránění vzniku mutagenních procesů slouží dvě kanonické dráhy opravy DNA, nehomologní spojování konců (NHEJ) a dále oprava dvouřetězcových zlomů v DNA

pomocí homologní rekombinace (HR). Z tohoto pohledu proteiny 53BP1 a BRCA1 představují klíčové hráče. Funkce 53BP1 při opravách DNA je zprostředkována proteinem RIF1 (tzv. RAP1-interagujícím faktorem 1). (Obr. 4)



Obrázek 5. Hlavní opravné dráhy dvouřetězcových zlomů v DNA. 53BP1 protein se uplatňuje v NHEJ opravném mechanismu a BRCA1 protein v opravě DNA pomocí homologní rekombinace.

Tento protein chrání konce chromosomů, reguluje jadernou architekturu a slouží jako efektor funkce 53BP1. Během opravného mechanismu NHEJ je aktivní RIF1 společně s 53BP1 především v G1 fázi buněčného cyklu. Akumulace 53BP1 do oblastí DNA lézí dále závisí na funkci BRCT domén MDC1 proteinu (Zimmerman a de Lange, 2014). Pro optimální opravu DNA pomocí NHEJ je také nezbytná fosforylace proteinu 53BP1. Tato posttranslační modifikace je zprostředkována ATM kinázou, která aktivuje RIF1 faktor. Tento molekulární mechanismus, související s NHEJ mechanismem, navíc zabraňuje vazbě proteinu BRCA1 do oblastí poškozené DNA. Ve fázích S a G2 buněčného cyklu, kdy je zapojena do opravných mechanismů homologní rekombinace a jsou k dispozici sesterské chromatidy, začíná být protein 53BP1 a jeho kofaktory neaktivní a naopak aktivuje se BRCA1 protein společně s CtIP faktorem. Je tudíž potlačena opravná dráha závislá na funkci proteinu 53BP1 (Cuella-Martin a kol., Mol Cell, 2016). Tento proces vede k opravě potenciálně nebezpečných lézí v DNA. Řada studií však dokumentuje, že první volbou opravy dvouřetězcových zlomů v S/G2 fázích buněčného cyklu není HRR, ale kanonický NHEJ mechanismus (Shibata a kol., 2011). Mechanismy, kterými 53BP1, RIF1 a také faktor PTIP (protein interagující s transakční doménou Pax) podporují NHEJ, nebyly dosud zcela objasněny. Nicméně z pohledu HR je zřejmé, že BRCA1 antagonizuje funkci 53BP1 (Feng a kol., 2015). Je také zřejmé, že u některých nádorových buněk dochází k depleci proteinu BRCA1, který ovlivňuje procesy opravy DNA, což vede k výrazné akumulaci 53BP1 na místech s poškozenou DNA (Escribano-Diaz a kol., 2013). Na druhé straně BRCA1

fyziologicky inhibuje ATM-dependentní fosforylaci proteinu 53BP1 a zabraňuje akumulaci interakčních partnerů 53BP1, RIF1 a PTIP v dvouřetězcových zlomech, které se objevují v S/G2 fázích buněčného cyklu. Z těchto důvodů se jednoznačně jeví dráha HR také v určitém rozsahu závislá na proteinu 53BP1, který se však preferenčně uplatňuje při opravách DNA v G1 fázi buněčného cyklu, tudíž při NHEJ mechanismech. Z hlediska efektů vlivu záření na buněčnou populaci je zajímavé, že γ -záření u řady buněčných typů zastavuje buňky v G2-M fázích buněčného cyklu. Z těchto důvodů vyplývá, že γ -záření by mohlo přednostně indukovat BRCA1-dependentní „reparační“ dráhu. Avšak hladina 53BP1 proteinu, i když velmi nízká, se v DNA lézích vyskytuje i ve fázích S nebo G2, ne však dále v mitóze (Giunta a kol., 2010; Nelson a kol., 2009). Isono a kol., (2017) ukázali, že protein BRCA1 podporuje resekci konců DNA přerušením bariéry závislé na proteinu 53BP1. Tito autoři naznačili, že BRCA1 podporuje defosforylaci proteinu 53BP1 a uvolňování RIF1 z proteinového komplexu, který se vyskytuje v oblastech dvouřetězcových zlomů. Tento jaderný proces reguluje přechod z NHEJ mechanismu do dráhy oprav DNA pomocí homologní rekombinace. Prostřednictvím těchto vysoce sofistikovaných buněčných mechanismů buňka "rozhoduje", zda bude aktivována NHEJ nebo HR „reparační“ dráha (Kimar a kol., 2014). Funkční a strukturální vazby mezi těmito dvěma hlavními mechanismy opravy dvouřetězcových zlomů jsou uvedeny v dalších částech této práce.

2.5. Základní funkce proteinu 53BP1 při poškození euchromatinu nebo heterochromatinu a prostorová organizace 53BP1 pozitivních lézí v DNA

Imunofluorescenční analýza odhalila existenci tří forem proteinu 53BP1. Jsou to cytoplazmatické frakce proteinů, homogenně disperzní nukleární frakce a jaderná tělíska, která také nazýváme ložiska opravy DNA (Iwabuchi a kol., 1998). Vznik dvouřetězcových zlomů způsobuje změny v jaderné distribuci proteinu 53BP1. Vlivem záření nebo činidel poškozujících DNA dochází ke změně difúzní nukleární frakce 53BP1 na jaderná ohniska, která kolokalizují s fosforylovaným histonem H2AX nebo BRCA1 proteinem (Schultz a kol., 2000; Wang a kol., 2002; Ward a kol., 2003). Iwabuchi a kol., (1994) ukázali schopnost 53BP1 proteinu se vázat na protein p53, kdy mutace v lokusu TP53 ovlivňují tuto vazbu. Zmíněný proces je zprostředkován DNA-vazebnou doménou proteinu p53, která je zodpovědná za umlčování exprese genů (Iwabuchi a kol., 1998). Nedávno jsme i my v naší laboratoři řešili otázku, zda mutace v genu TP53 mohou změnit akumulaci proteinu 53BP1 v chromatinu lokálně ozářeném UVA zářením (Suchánková a kol., 2017). Zjistili jsme, že odlišné mutace v genu TP53 různým způsobem ovlivňují interakci 53BP1 s proteinem p53. Dále naše data ukázala, že hladina proteinu p53, která se často mění vlivem mutace v genu TP53, ovlivňuje akumulaci proteinu 53BP1 v DNA lézích. Zimmerman a de Lange (2014) ve své práci shrnuli mechanismus aktivace proteinu 53BP1, který je obecně odlišný během regulace oprav dvouřetězcových zlomů v porovnání s regulací transkripce závislé na proteinu p53. Jak již bylo výše uvedeno, mechanismus opravy dvouřetězcové DNA je regulován interakcí 53BP1 s proteiny jako je RIF1 a PTIP, což se významně liší od 53BP1-závislé regulace transkripce, kterou zprostředkovává proteinový komplex p53-53BP1 (Cuella-Martin a kol., 2016). Funkce 53BP1 při opravě poškozené DNA má rovněž své strukturální specifika. Akumulace 53BP1 ve spontánně vznikajících ohniscích nebo ložiscích vyvolaných ozářením (IRIF) je hlavním rysem oprav DNA. Pomocí technik pokročilé konfokální mikroskopie lze studovat například lokalizovaný pohyb lézí DNA nebo difúzi proteinů v „reparačních“ ohniscích. Pro tyto účely se používají metodiky „single particle tracking“ analýzy nebo FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching); (a kol., 2013a). S využitím těchto technik jsme zjistili, že mCherry-značený protein 53BP1 se akumuluje daleko rychleji v UV-indukovaných lézích DNA, v porovnání se spontánními lézemi s poškozenou DNA (Foltánková a kol., 2013b). Hable a kol. (2012) ukázali pro jiné „reparační“ proteiny, že například mobilita proteinu RAD52 je pomalejší než mobilita

proteinu MDC1. Tyto práce jasně ukazují, že rozsah poškození DNA a typ záření má velký vliv na opravné procesy a při vzájemném porovnávání různých experimentálních studií by měl být zvážen rozsah poškození genomu. Při vyhodnocování kinetiky oprav DNA je třeba brát na zřetel, jaké typy lézí DNA daný zdroj poškození indukuje. Důležité je si rovněž ověřit, zda exogenní akumulace proteinu do oblastí DNA lézí studovaných u živých buněk odpovídá i fyziologickému stavu proteinu na endogenní úrovni. K těmto analýzám lze využít specifických protilátek proti studovanému proteinu (Suchánková a kol., 2017). Využívání širokého spektra biofyzikálních analýz v tomto směru rozšiřuje poznatky o procesech probíhajících v buněčném jádře, o dynamickém chování proteinů při opravách DNA (Essers a kol., 2006; Mortusewicz a kol., 2008). Tyto experimentální přístupy, především aplikované při studiu živých buněk, jsou důležité pro pochopení hierarchického uspořádání proteinů v místech poškozené DNA.

Prostorovou distribuci jaderných struktur souvisejících s opravou DNA lze analyzovat na individuální buněčné úrovni buď běžnou konfokální mikroskopií, nebo pokročilými optickými technikami, jako jsou nanoskopie se super-rozlišovací schopností (STED) nebo strukturovaná iluminační mikroskopie (SIM). Je známo, že ohniska související s opravou DNA jsou tvořena akumulovanými proteiny. Tato ložiska opravy DNA, pokud se v nich vyskytnou dvouřetězcové zlomy, jsou většinou pozitivní na fosforylace histonu H2AX nebo přítomnost proteinů 53BP1 nebo BRCA1 (Daley a kol., 2014). Proteiny účastníci se oprav DNA jsou charakterizovány specifickým jaderným uspořádáním. Například autoři Reindl a kol., (2017) ukázali, že 53BP1 protein je lokalizován hlavně v perichromatinové oblasti. Naproti tomu Rad51, důležitý protein homologní rekombinace, tvoří specifickou nanostrukturu a RAD51-pozitivní ložiska jsou obklopena proteinem 53BP1. Dále je zajímavé, že kinázy Chk1 a Chk2, které jsou okamžitě fosforylovány na místech poškozené DNA, rychle disociují a difundují v celém buněčném jádře (Lukas a kol., 2003; Smits a kol., *Current Biol.*, 2006). Podle údajů těchto autorů je zřejmé, že některé proteiny, které se účastní opravy DNA a okamžitě rozpoznávají poškozenou DNA, následně rychle disociují s DNA lézemi nebo dochází k jejich přemístění na periferii „reparačních“ ohnisek (Polo a Jackson, *Genes Dev.*, 2011). Prostorová distribuce proteinů účastnících se opravy DNA může být ovlivněna i nestabilitou genomu. Na úrovni mutací genu TP53 jsme například prokázali podstatné ovlivnění akumulace protein 53BP1 do lokálně mikro-ozařovaného chromatinu (Suchánková a kol., 2017).

Z hlediska jaderné architektury jsme nedávno ukázali, že přítomnost proteinu 53BP1 je velmi výrazná v tzv. zónách interchromatinových granulí (Interchromatin Granule Associated Zones; IGAZ) a 53BP1-pozitivní spontánní léze v DNA byly lokalizovány v těsné blízkosti SC-35 pozitivních jaderných skvrn, v takzvaných jaderných skvrnách (nuclear speckles), kde probíhá sestřih pre-mRNA (Legartová a kol., 2017). Výskyt proteinů účastnících se oprav v DNA v oblastech jaderných skvrn publikoval také Campalans a kol. (2007). V této práci byl tento děj navozen oxidačním stresem buněk, což poukázalo na to, že „nuclear speckles“ se do určité míry podílejí na odpovědi buňky v případě poškození DNA.

Autoři Yamauchi a kol. (*Sci. Rep.*, 2017) dokumentovali další poziční aspekt jaderných ohnisek, ve kterých probíhá oprava DNA. Tito autoři pozorovali shlukování DNA lézí a zvýšení jejich počtu v případě, kdy došlo k redukci faktorů jako je Ku80 nebo k omezení funkce ATM kinázy. Na druhou stranu, deplece proteinu 53BP1 snížila počet

„reparačních ohnisek“. Je zajímavé, že tato ohniska byla lokalizována nejčastěji v blízkosti heterochromatinových oblastí buněčného jádra. Toto pozorování ukazuje, že stupeň kondenzace chromatinu by mohl ovlivnit tvorbu jaderných ohnisek důležitých pro opravu DNA. Autoři Falk a kol., (2014) dále ukázali, že γ H2AX-pozitivní ohniska se vyskytují spíše

v oblastech s nízkou hustotou chromatinu. Ovšem v tomto experimentálním modelu protein 53BP1 pronikal do vnitřních částí domén heterochromatinu. V tomto případě heterochromatin u ozářených buněk podléhal dekonduzaci. Goodarzi a Jeggo (2012) publikovali, že struktura chromatinu v oblasti dvouřetězcových zlomů významně ovlivňuje účinnost opravy DNA. Z uvedených poznatků lze shrnout, že typ chromatinu v těsné blízkosti DNA lézí podstatně ovlivňuje účinnost opravných mechanismů. Goodarzi a Jeggo (2012) rovněž zjistili, že heterochromatinizace omezuje jadernou signalizaci, která se účastní oprav DNA. Tyto experimenty ukázaly, že dvouřetězcové zlomy heterochromatinu se rychle přeskupují a přesouvají na rozhraní mezi oblastmi heterochromatinu a euchromatinu. Je zajímavé, že pro opravu dvouřetězcových zlomů, která je spojena s heterochromatinem, je vyžadována aktivita ATM kinázy. Avšak funkce tohoto enzymu není nezbytná pro přeuspořádání heterochromatických lézí DNA. ATM spíše zodpovídá za uvolnění heterochromatinu v těsné blízkosti DSBs (Goodarzi a Jeggo, 2012). Je dále zajímavé, že poškozený chromatin uvnitř klastrů heterochromatinu je charakteristický fosforylací histonu H2AX. V pozdější fázi opravných mechanismů dochází k přesunu fosforylace H2AX na okraj klastrů centromerického heterochromatinu, takzvaných chromocenter. Tyto výsledky jasně dokumentují výraznou lokalizovanou kinetiku γ H2A-pozitivních DNA lézí. Naše studie nedávno ukázala, že UVA záření omezuje trajektorii 53BP1-pozitivních ohnisek, které kolokalizovali s PML tělísky (Foltánková a kol., 2013a). Omezený pohyb v interfázním jádře jsme pozorovali také u Cajalových tělísek v buňkách ozářených ionizujícím zářením (Bártová a kol., 2014). Velmi zajímavé pozorování, které souviselo s morfologií DNA „reparačních“ ohnisek, bylo publikováno autory Croco a kol., (2016). Tito autoři zjistili, že buňky déle žijících živočišných druhů jsou charakteristické vyšším počtem 53BP1 pozitivních ložisek, ve srovnání s buňkami živočichů s krátkým životním cyklem. Toto zvýšení počtu ohnisek 53BP1 bylo spojeno se sníženou fragmentací DNA a nižším počtem buněk s mikrojádry. Z tohoto pozorování vyplývá, že druhy s delší periodou života mají pravděpodobně posíleny obranné mechanismy, které účinně opravují poškozenou DNA. To podporuje tvrzení, že existuje vztah mezi procesy stárnutí a úspěšnou opravou DNA (Noda a kol., 2015). Cann a Delleire (2011) poukázali na to, že vysoce kondenzovaný heterochromatin je pravděpodobně určen k ochraně genomu před poškozením. Naproti tomu kondenzace chromatinu může představovat překážku pro proteiny, které musí rozpoznat poškozená místa v DNA. Zdá se tedy, že chromatin v blízkosti lézí v DNA musí být velmi dekonduzovaný. V tomto ohledu by fungování HATs nebo inhibitorů histondeacetyláz (HDACi) mohlo navodit vhodnou míru dekonduzace chromatinu. Například inhibice HDACs zvyšuje rozvolnění chromatinu, čili děj, který pravděpodobně zvyšuje účinnost opravy DNA. Na druhou stranu je zajímavé, že několik proteinů, které stabilizují heterochromatin, včetně Polycomb Group (PcG) proteinů BMI1 a Mel18 nebo proteinů heterochromatinu (HP1 α , HP1 β , HP γ) mají schopnost rozpoznat poškozenou DNA (Ayoub a kol., 2008; Chou a kol., 2010; Luijsterburg a kol., 2009; Šustáčková a kol., 2012). Pokud však v těchto případech byly buňky ovlivněny inhibitory HDACs, proteiny HP1 β nebo BMI1 ztratily schopnost akumulace do oblastí chromatinu ozářeného UVA laserem (Šustáčková a kol., 2012). Na základě tohoto zjištění se zdá být zřejmé, že stupeň heterochromatinizace a proteiny, které se váží na heterochromatin, ovlivňují účinnost odpovědi buněk na poškození genomu. Autoři Han a kol., (2016) ukázali, že hierarchická kondenzace chromatinu je velmi důležitá pro ochranu chromosomů před jejich poškozením. Tento víceúrovňový proces je specifický pro rozpoznávání a opravu dvouřetězcových zlomů (mechanismu NHEJ nebo HRR) nebo v případě výskytu cyklobutan pyrimidinových dimerů (CPDs), které jsou rozpoznány mechanismem nukleotidové excizní opravy (NER). Autoři ve své studii zjistili pomalejší opravu CPDs v heterochromatinu ve srovnání s euchromatickými oblastmi. Výsledky potvrdily velmi komplikovanou kinetiku faktorů zapojených do mechanismů opravy DNA. Toto tvrzení je podpořeno experimentálními studiemi, kde se oprava dvouřetězcových zlomů, zprostředkovaná mechanismem závislým na proteinu 53BP1, odehrává převážně v oblastech heterochromatinu. Tento chromatin je

charakteristický specifickými epigenetickými modifikacemi, jako je posttranslační modifikace histonů H3K9me3 nebo H4K20me2/me3 (Kakarougkas a kol., 2013).

Všechna výše uvedená pozorování ukazují, že stupeň kondenzace chromatinu může ovlivnit procesy opravy DNA (Kruhlak a kol., 2006). Velmi dobrý příklad dekonkondenzace chromatinu představují embryonální kmenové buňky (ESCs). Obecně je přijímáno, že jádra ES buněk mají takzvanou otevřenou strukturu chromatinu, která může být experimentálně změněna navozením specifické diferenciací dráhy (Bártová a kol., 2008a; Venkatesh a kol., 2016). Autoři Venkatesh a kol. (2016) pozorovali, že stejná dávka ionizujícího záření způsobila zvýšení počtu 53BP1-pozitivní IRIF (radiačně-indukovaných lézí) u lidských ESCs v porovnání s normálními lidskými fibroblasty. Dalším důležitým pozorováním u embryonálních kmenových buněk je, že protein OCT 4, který je zodpovědný za zachování pluripotence ES buněk, může hrát důležitou úlohu i při opravě DNA. Prokázali jsme, že OCT4 protein má schopnost rozpoznávat DNA léze indukované UVA zářením u myších ES buněk. Tento proces byl doprovázen deacetylací H3K9 a zvýšeným výskytem HDAC1 v lokálně mikro-ozářeném chromatinu (Bártová a kol., 2011). Kromě OCT4 proteinu má v opravách DNA u ES buněk klíčovou úlohu i protein 53BP1. Je zajímavé, že ztráta 53BP1 snižuje počet spontánní lézí v DNA a kontrolní bod v buněčném cyklu, G2/M, je aktivován současně s deplecí proteinu BRCA1 (Bunting a kol., 2010). Tito autoři prokázali, že u BRCA1 mutantních buněk deplece proteinu 53BP1 obnovuje tvorbu RAD51-pozitivních DNA „reparačních“ ohnisek, které se objevují po ozáření buněk ionizujícím zářením. Tento popsaný proces se spjatý s aktivací opravných mechanismů pomocí homologních rekombinace (HR).

3. Závěr

Jak vyplývá z této práce, výsledky našeho výzkumného týmu významně přispěly k poznání zákonitostí mezi strukturou a funkcí chromatinu. Naše analýzy pomocí sofistikovaných technik pokročilé konfokální mikroskopie prohloubily znalosti o struktuře lidského a myšího genomu. Naš výzkum je významný v teoretické i v praktické rovině. Obecně nyní platí, že vztahy mezi strukturou a funkcemi chromatinu jsou vzájemně propojené a že velký funkční význam má rovněž uspořádání struktur buněčného jádra. I naše poznatky ukazují, že biochemické regulační mechanismy řídí například expresi genů, nebo že mechanismy oprav DNA jsou důležité z hlediska fyziologického průběhu buněčných procesů, jako je proliferace, diferenciaci a apoptóza. V tomto ohledu hraje struktura genomu zásadní funkci a jeho studium bude i nadále velkou výzvou v biologii chromatinu. Jako velmi důležité se jeví experimenty odkrývající lokalizovanou kinetiku struktury chromatinu a asociovaných proteinů. Je evidentní, že spojení genetických, biochemických a molekulárně-biologických přístupů by mohlo vést k poznání významu kompartmentalizace interfázních jader v genové expresi nebo opravách DNA. Navíc fakt, že jaderná organizace je evolučně konzervativní, ukazuje na to, že struktura chromatinu je opravdu zásadní z hlediska regulace všech buněčných procesů. Praktický význam zkoumání vztahu struktury a funkce genomu má například pro nádorovou biologii, kdy především jaderná struktura různých chromozomálních přestaveb nebo amplifikace genů reguluje expresi genů. Velká pozornost je v současnosti věnována mechanismům oprav DNA, což má velký klinický potenciál z hlediska poznání buněčných dějů u tkáň vystavené radioterapii.

Velký pokrok v biologii chromatinu představují různé super-rozlišovací mikroskopické metody a analýzy obrazu. Byla například vyvinuta řada metod, které umožňují kvantitativní i kvalitativní analýzu dat. Automatizované snímání obrazu pomocí konfokálních mikroskopů a automatizovaná analýza obrazu přispěly k poznání jaderné kompartmentalizace

chromozomálních teritorií a prostorové distribuce vývojově důležitých genů u různých buněčných typů a organismů. V poslední době patří k převratným technologiím nanoskopie, jako jsou techniky SIM a STED. Uplatnění statistických metod významně přispělo k poznání zákonitostí ve struktuře chromatinu. V současné době je kladen velký důraz na pozorování živých buněk. Technologie fluorescenčních proteinů a FRAP technika přispěly k odhalení dynamiky proteinů v různých buněčných systémech. Hlavním úkolem našeho vědeckého týmu je přispět k objasnění podstaty biologie chromatinu a epigenetických procesů během buněčné diferenciace a při opravách DNA.

4. Vybrané články autorky, které jsou předloženy v obhajobě dizertační práce

1) Bártová E, Galiová G, Krejčí J, Harničarová A, Strašák L, Kozubek S. Epigenome and chromatin structure in human embryonic stem cells undergoing differentiation. Dev Dyn. 2008, 237(12):3690-702.

Epigenetické modifikace histonu (H3) a jaderné radiální uspořádání vybraných cytogenetických struktur byly porovnány v lidských embryonálních kmenových buňkách (hESCs) před a po diferenciaci. Na jaderné periférii diferencovaných hES buněk byla zjištěna snížená acetylace H3K9, trimetylace H3K9 a mono-metylace H3K79. Rovněž došlo k redistribuci centromer, o čemž svědčí perinukleolární akumulace centromerických markerů CENP-A a posttranslační modifikace H3K9me3. Diferenční proces byl doprovázen přemístěním centromer chromosomů 1, 5, 19 do vnitřních částí buněčného jádra. Dále jsme se zaměřili na radiální distribuci genů PML, RAR α a celých teritorií lidských chromosomů 10, 12, 15, 17 a 19. Pozice chromosomálních teritorií zůstala relativně stabilní v rámci interfázních jader ES buněk stimulovaných do endodermální diferenciace. Dále jsme zjistili, že inaktivní X chromosom, který je trimetylovaný na H3K27 byl u diferencovaných ES buněk lokalizován na jaderné periférii. Z těchto zjištění plyne, že pluripotentní a diferencované hES buňky jsou charakteristické odlišnou jadernou architekturou heterochromatických struktur, jako jsou centromery a inaktivní chromosom X. Během buněčné diferenciace byly změněny epigenetické markery, jako je H3K9me3 a H3K27me3, zatímco relativně stabilní byla radiální distribuce chromosomálních teritorií a vybraných genů, které byly studovány klasickou DNA-FISH technikou u lidských ES buněk.

2) Stixová L, Sehnalová P, Legartová S, Suchánková J, Hrušková T, Kozubek S, Sorokin DV, Matula P, Raška I, Kovařík A, Fulneček J, Bártová E. HP1 β -dependent recruitment of UBF1 to irradiated chromatin occurs simultaneously with CPDs. Epigenetics and Chromatin, 2014, 7(1):39.

Oprava spontánních a indukovaných lézí v DNA je vícestupňový proces. V závislosti na druhu poškození je DNA rozpoznávána mnoha proteiny, které se specificky podílejí na odlišných mechanismech opravy DNA. Analyzovali jsme odpověď na poškození DNA po ozáření buněk ultrafialovým zářením (UVA). U ozářovaných myších embryonálních fibroblastů jsme se zaměřili na studium tak zvaného „up stream“ vazebného faktoru 1 (UBF1), který je klíčovým proteinem při regulaci transkripce ribosomálního genu. Zjistili jsme, že UBF1 protein se akumuluje do oblastí lokálně indukovaných lézí v DNA, což nebylo pozorováno pro jiné proteiny jadérek, jako je podjednotka RNA polymerázy I, RPA194, nebo proteiny TCOF a fibrillarin. UBF1 rozpoznával ozářený chromatin, který byl současně pozitivní na přítomnost proteinu HP1 β . Metoda Förster Resonance Energy Transfer (FRET) potvrdila interakci mezi proteiny UBF1 a HP1 β . Tato interakce byla závislá na funkci takzvané „chromoshadow“ domény HP1 β . Nadměrná exprese HP1 β s deletovanou „chromo“ doménou měla dominantně negativní účinek na akumulaci

proteinu UBF1 do míst genomu s poškozeným chromatinem pomocí UVA ozáření. Transkripční faktor UBF1 také přímo interagoval s DNA uvnitř buněčného jádra. Nebyla ovšem potvrzena interakce UBF1 a DNA mimo jádro, kde se akumulace UBF1 do lézí v DNA léze objevila současně s cyklobutan pyrimidinovými dimery (CPDs). Naše experimenty ukázaly, že interakce a funkce UBF1 a HP1 β v lézích DNA souvisí s přítomností CPDs, tudíž s mechanismem nukleotidové excizní opravy.

3) Galiová G, Bártová E, Raska I, Krejčí J, Kozubek S. Chromatin changes induced by lamin A/C deficiency and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. Eur. J. Cell Biol., 2008, 87(5):291-303.

Nedávné studie ukázaly, že histonový kód určuje typ a strukturu chromatinu. Vzhledem k významu laminů typu A pro uspořádání chromatinu jsme se rozhodli studovat vliv hyperacetylace histonu indukovanou trichostatinem A (TSA). Pro naše experimenty jsme vybrali myší embryonální fibroblasty s deficiencí laminů A/C (LMNA dn). Deplece laminů A/C způsobila kondenzaci chromosomálních teritorií a jadernou reorganizaci centromerického heterochromatinu, což bylo doprovázeno změnou v morfologii ohnisek HP1 β proteinu. Na druhé straně, inhibice histon HDACs způsobila dekonkondenzaci studovaných chromosomálních teritorií, což kompenzovalo účinek deplece laminů typu A. Vrstva heterochromatinu v oblasti spojené s jadernou membránou byla signifikantně snížena v *lmna* deficičních (dn) buňkách, ve srovnání s normálními fibroblasty. Účinek TSA měl vliv na snížení hustoty heterochromatinu na jaderné periférii, podobně jak tomu bylo u buněk *lmna* dn. Zajímavé bylo, že jak u *lmna* dn buněk, tak u buněk s normální funkcí laminů typu A, byly větší chromosomy (v Mbp) umístěny více periferně v rámci interfázního jádra a to ve srovnání s menšími chromosomálními teritoriemi. Naše pozorování naznačují, že deplece laminů typu A způsobuje nejen reorganizaci chromatinu na jaderné periférii, ale má také vliv na kondenzaci chromosomálních teritorií. Vzhledem k tomu, že inhibice HDACs by mohla kompenzovat změny v laminech a organizaci chromatinu vyššího řádu, mohou tyto procesy ovlivnit transkripční aktivitu genů.

4) Harikumar A, Edupuganti RR, Sorek M, Azad GK, Markoulaki S, Sehnalová P, Legartová S, Bártová E, Farkash-Amar S, Jaenisch R, Alon U, Meshorer E. An Endogenously Tagged Fluorescent Fusion Protein Library in Mouse Embryonic Stem Cells. Stem Cell Reports, 2017, 9(4):1304-1314.

Ke studiu epigenetické regulace se běžně využívají embryonální kmenové buňky (ESCs), které mají schopnost sebeobnovy a diferenciace. Použitím retrovirové integrace exonu YFP nebo mCherry do myších ES buněk kolegové z University v Jerusálemu vytvořili knihovnu s více než 200 endogenně značenými fluorescenčními fúzními proteiny. Společně s nimi jsme v tomto článku představili několik možných aplikací pro využití této knihovny a tím jsme ukázali využitelnost našich molekulárně-biologických přístupů pro sledování proteinů v živých buňkách. Dokážeme například studovat dynamiku endogenně značených proteinů; proteinové dráhy, které jsou zapojeny do mechanismů oprav DNA. Tato knihovna může být využita technikami založenými na zobrazování nebo je možné provádět analýzy, které využívají fluorescenční fúzní protein pro biochemické testy pomocí imunoprecipitace, koimunoprecipitace nebo chromatinové precipitace. Knihovna fluorescenčních proteinů má velký aplikační potenciál pro řadu biologických experimentů.

5) Horáková AH, Bártová E, Galiová G, Uhlířová R, Matula P, Kozubek S. SUV39h-independent association of HP1 beta with fibrillar-in-positive nucleolar regions. *Chromosoma*, 2010, 119(3):227-41.

Heterochromatinový protein 1 (HP1), který se váže na místa methylovaného histonu H3 v pozici lysinu 9 (H3K9), je primárně zodpovědný za tlumení exprese genů a tvorbu heterochromatinu. Zjistili jsme, že protein HP1 β je lokalizován jak v chromocentrech, tak ve fibrillar-in-pozitivních kompartmentech jádérka. Isoformy HP1 α a HP1 γ kolokalizovaly s fibrillar-in-pozitivními místy jáderek v menším rozsahu než HP1 β . Deplece histon-methyltransferáz SUV39h1/h2 a nebo inhibice histon deacetyláz (HDACsi) redukovaly hladinu HP1 β a H3K9me3 v chromocentrech, ale ne v oblastech pozitivních na fibrillar-in. Místa s přítomností fibrillarinu kolokalizovala společně s RNA polymerázou I, tudíž s transkripčně aktivními rDNA geny. Předpokládáme, že přítomnost HP1 β v jádřících je pravděpodobně spojena s transkripcí ribozomálních genů a s úlohou fibrillarinu v procesech regulace funkce rDNA.

6) Krejčí J, Uhlířová R, Galiová G, Kozubek S, Šmigová J, Bártová E. Genome-wide reduction in H3K9 acetylation during human embryonic stem cell differentiation. *J. Cell Physiol.*, 2009, 219(3):677-87.

Epigenetické markery jsou důležitými faktory, které regulují pluripotenci a diferenciaci lidských embryonálních kmenových buněk (hESCs). V této studii jsme diferencovali hES buňky do endodermu a následně analyzovali acetylaci H3K9; epigenetickou modifikaci spojenou s transkripčně aktivním chromatinem. Chip-on-chip analýza odhalila, že diferenciace vede k celkové deacetylaci H3K9 v promotorech genů. Z analyzovaných 24 659 promotorů bylo pouze 117 zodpovědných za expresi genů, které zodpovídají za pluripotentní stav ES buněk, zatímco 25 acetylovaných promotorů bylo pravděpodobně zodpovědných za diferenciaci do endodermu. U pluripotentních hES buněk jsme zjistili, že mezi chromosomy s nejvyššími absolutními hladinami acetylce H3K9 patří chromosomy 1, 6, 2, 17, 11 a 12. Chromosomy 17, 19, 11, 20, 22 a 12 byly nejvíce náchylné k deacetylačním změnám, které souvisely s diferenciací. Hustota genů a velikost jednotlivých chromosomů silně korelovaly s hladinami acetylce H3K9. Naše analýzy ukázaly, že chromosomy 11, 12, 17 a 19 jsou zásadní pro pluripotenci a diferenciaci ES buněk.

7) Bártová E, Šustáčková G, Stixová L, Kozubek S, Legartová S, Foltánková V. Recruitment of Oct4 protein to UV-damaged chromatin in embryonic stem cells. *PLoS One.*, 2011, 6(12):e27281.

Oct4 protein je specifickým markerem pluripotence embryonálních kmenových buněk (ESCs). Není dosud mnoho informací o tom, jakým procesem OCT4 reaguje na poškození DNA. V této práci jsme zjišťovali, zda OCT4 protein rozpozná poškozený chromatin v myších ES buňkách, stabilně exprimujících GFP-značený protein OCT4. Tyto experimenty měly přispět k poznání toho, jak OCT4 přispívá k zachování genové integrity u ES buněk po jejich poškození, což je klíčové pro potenciální aplikaci lidských ES buněk v regenerativní medicíně. Pro tyto experimenty jsme využili konfokální mikroskopii s časosběrným módem a mikro-ozáření pomocí UVA laseru (o vlnové délce 355 nm). Zjistili jsme, že protein OCT4 má schopnost akumulace v oblastech poškozených UVA zářením okamžitě po mikro-iradiaci. Zajímavé je, že tento děj nebyl doprovázen akumulací Nanog a c-MYC proteinů do oblastí poškozených UVA zářením. Akumulace OCT4 v poškozeném chromatinu se objevila současně s deacetylací H3K9 a fosforylací H2AX (γ H2AX). Inhibice histon deacetyláz většinou zabránila výrazné akumulaci OCT4 do ozářeného místa v genomu. Později se nám podařilo prokázat, že současně s OCT4

proteinem se v místě ozářeného chromatinu vyskytuje i XPC protein, čili marker klasické nukleotidové excizní opravy (NER) (pozorování dr. Lenky Stixové pracující v laboratoři Evy Bártové). Naše analýzy odhalily opravné mechanismy specifické pro pluripotentní buňky, ve kterých OCT4 pravděpodobně hraje klíčovou úlohu.

8) Suchánková J, Legartová S, Ručková E, Vojtěšek B, Kozubek S, Bártová E. Mutations in the TP53 gene affected recruitment of 53BP1 protein to DNA lesions, but level of 53BP1 was stable after γ -irradiation that depleted MDC1 protein in specific TP53 mutants. *Histochem. Cell. Biol.*, 2017, 148(3):239-255.

53BP1 je znám jako protein, který se akumuluje do oblastí lézí v DNA. Fokální akumulace 53BP1 proteinu, který se váže při regulaci transkripce na protein p53, je hlavním rysem opravy spontánních lézí v DNA nebo DNA v „reparačních“ místech genomu, který byl poškozen ionizujícím zářením (tak zvaná ohniska IRIF). Zabývali jsme se tedy otázkou, zda mutace v genu TP53, které často ovlivňují hladinu proteinu p53, mohou mít vliv na akumulaci proteinu 53BP1 v ozářeném chromatinu. Testovali jsme různé mutace v genu TP53 a pozorovali jsme zřetelnou akumulaci proteinu 53BP1 v poškozené DNA. Následující jevy navozené zářením UVA se u jednotlivých typů mutantů lišily: u mutantů R273C se 53BP1 objevil přechodně v lézích DNA během 10-30 minut po ozařování; mutace R282W byla odpovědná za akumulaci 53BP1 bezprostředně po poškození genomu a u mutantů L194F se první výskyt proteinu 53BP1 v lézích DNA objevil během 60-70 minut. Tyto výsledky ukázaly, že specifické mutace v genu TP53 navozují nejen různé hladiny proteinu p53, ale také ovlivňují lokalizovanou kinetiku proteinu 53BP1 v chromatinu, který je poškozený UVA zářením. Je zajímavé, že po ozařování byla pouze mutace G245S v genu TP53 spojena s výrazně sníženou hladinou proteinu 53BP1. V jiných mutovaných buněčných liniích nebyla hladina 53BP1 ovlivněna γ -zářením. Dále jsme zjistili, že mutace R280K, G245S, L194F nebo delece TP53 měly vliv na snížení hladiny proteinu MDC1, která byla překvapivě navozena ozařováním. V mutantních buňkách byla navíc, ve srovnání s buňkami s normální funkcí genu TP53, oslabena interakce mezi proteiny MDC1 a 53BP1. Jednoznačně jsme ukázali, že existuje funkční vztah mezi proteinem MDC1 a genem TP53, jehož specifické mutace způsobily radiačně indukovanou depleci MDC1 proteinu. Tato zjištění jsou významná zejména pro posuzování vhodnosti radioterapie u nádorů s poškozenou funkcí genu TP53.

9) Sustáčková G, Kozubek S, Stixová L, Legartová S, Matula P, Orlova D, Bártová E. Acetylation-dependent nuclear arrangement and recruitment of BMI1 protein to UV-damaged chromatin. *J. Cell Physiol.*, 2012, 227(5):1838-50.

Proteiny skupiny Polycomb (PcG), akumulované v tak zvaných Polycomb-group jaderných tělískách (PcG „bodies“), jsou důležitými regulačními složkami epigenetických procesů účastnících se vývojově specifického umlčování genů. V naší práci jsme řešili, zda změna v acetylacích histonů může ovlivnit jaderné uspořádání a funkci PcG tělísek, respektive proteinu BMI1, který je složkou PcG komplexu, PRC1. Pro studium dynamiky a funkce proteinu BMI1 jsme použili časosběrnou konfokální mikroskopii, mikro-ozáření pomocí UV laseru (355 nm) a technologii GFP. Zjistili jsme, že BMI1 protein měl schopnost aktivně rozpoznat UVA-poškozený chromatin. Současně byl tento jev doprovázen sníženou acetylací všech lysinů a následnou akumulací HP1 β proteinu do oblastí lézí v DNA. Výrazná akumulace proteinu BMI1 v poškozeném chromatinu byla velmi rychlá, s poločasem $t = 15$ sec po mikro-ozáření. Z tohoto důvodu se BMI1 protein jeví jako iniciátor „reparačních“ dějů,

ke kterým dochází po poškození genomu. Bylo však zajímavé, že hyperacetylace histonů stimulovaná HDACs inhibitory TSA, potlačení transkripce působením aktinomycinu D a deplece ATP zabránily zvýšené akumulaci BMI1, což však neovlivnilo fosforylaci H2AX v ozařovaném chromatinu. Navíc BMI1 protein velmi omezeně rozpoznával spontánně se vyskytující léze v DNA, ke kterým dochází v důsledku replikačních kolizí nebo dysfunkcí telomer u kultivovaných buněk *in vitro*. Naše analýzy naznačily, že dynamika rozpoznání poškozeného chromatinu proteinem BMI1 a jaderné uspořádání tohoto proteinu jsou ovlivněny především acetylačními stavy v genomu.

10) Večeřa J, Bártová E, Krejčí J, Legartová S, Komůrková D, Rudá-Kučerová J, Štark T, Dražanová E, Kašpárek T, Šulcová A, Dekker FJ, Szymanski W, Seiser C, Weitzer G, Mechoulam R, Micale V, Kozubek S. HDAC1 and HDAC3 underlie dynamic H3K9 acetylation during embryonic neurogenesis and in schizophrenia-like animals. J. Cell Physiol., 2018, 233(1):530-548.

Přestože acetylace histonů je jednou z nejvíce studovaných epigenetických modifikací, stále chybí informace o tom, jak je acetylom regulován během vývoje mozku a během jeho patofyziologických procesů. V této práci ukazujeme, že embryonální mozek (ve stádiu e15.5) je charakterizován zvýšenou acetylací H3K9 stejně jako poklesem hladin histon deacetyláz HDAC1 a HDAC3. Experimentální navození hyperacetylace H3K9 vedlo k nadměrné expresi proteinu NCAM v embryonálním kortexu a následně došlo k depleci proteinu Sox2 v subventrikulárním ependymě, což napodobovalo diferenciační procesy. Indukce diferenciace u myších ES buněk s deplecí HDAC1 vedla k deacetylaci H3K9, „down regulací“ Sox2 a zvýšené astrogliogenezi, zatímco neurodiferenciace byla u těchto buněk téměř potlačena. Neurodiferenciace ES buněk byla naopak charakterizována hyperacetylací H3K9, která byla spojena s deplecí HDAC1 a HDAC3. V těchto experimentech jsme dále studovali acetylom u potkanů s experimentálně navozenou schizofrenií. Oblast hipokampu schizofrenních zvířat vykazovala deacetylaci H3K9, která byla regulována zvýšením hladiny jak HDAC1, tak HDAC3. Hipokampy mozku zvířat s experimentálně navozenou schizofrenií, léčenými antagonistou kanabinoidního receptoru-1, látkou AM251, byly charakteristické H3K9 acetylací na hladině pozorované v normálních mozcích, čili tato terapie zvrátila epigenetický stav spojený se schizofrenií. Naše výsledky naznačily, že koregulace H3K9ac pomocí HDAC1 a HDAC3 je důležitá nejen pro vývoj embryonálního mozku, tudíž pro neurogenezi, ale také rozhoduje o patofyziologických stavech připomínajících schizofrenii.

5. Seznam použité literatury

1. Amrichová J, Lukášová E, Kozubek S and Kozubek M. Nuclear and territorial topography of chromosome telomeres in human lymphocytes. *Exp Cell Res.* 2003, 289: 11-26.
2. Ayoub N, Jeyasekharan AD, Bernal JA, Venkitaraman AR. HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature.* 2008, 453:682-686.
3. Ayrapetov MK, Gursoy-Yuzugullu O, Xu C, Xu Y, B.D. Price BD. DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014, 111:9169-9174.
4. Baldeyron C, Soria G, Roche D, Cook AJ, Almouzni G. HP1alpha recruitment to DNA damage by p150CAF-1 promotes homologous recombination repair. *J Cell Biol.* 2011, 193(1):81-95.
5. Bannister AJ, Kouzarides T. Reversing histone methylation. *Nature.* 2005, 436(7054):1103-6.
6. Bártová E, Kozubek S, Kozubek M, Jirsová P, Lukášová E, Skalníková M, Buchníčková K. The influence of the cell cycle, differentiation and irradiation on the nuclear location of the *abl*, *bcr* and *c-myc* genes in human leukemic cells. *Leuk Res.* 2000a, 24: 233-241.
7. Bártová E, Kozubek S, Kozubek M, Jirsová P, Lukášová E, Skalníková M, Cafourková A, Koutná I. Nuclear topography of the *c-myc* gene in human leukemic cells. *Gene.* 2000b, 244:1-11.
8. Bártová E, Kozubek S, Jirsová P, Kozubek M, Lukášová E, Skalníková M, Cafourková A, Koutná I, Paseková

- R. Higher-order chromatin structure of human granulocytes. *Chromosoma*. 2001, 110:360-370.
9. Bártoová E, Kozubek S, Jirsová P, Kozubek M, Gajová H, Lukášová E, Skalníková M, Gaňová A, Koutná I, Hausmann M. Nuclear structure and gene activity in human differentiated cells. *J. Struct Biol*. 2002, 139:76-89.
 10. Bártoová E, Pacherník J, Harničarová A, Kovařík A, Kovaříková M, Hofmanová J, Skalníková M, Kozubek M, Kozubek S. Nuclear levels and patterns of histone H3 modification and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J. Cell Sci*. 2005;118:5035-5046.
 11. Bártoová E, Pacherník J, Kozubík A, Kozubek S. Differentiation-specific association of HP1alpha and HP1beta with chromocentres is correlated with clustering of TIF1beta at these sites. *Histochem. Cell Biol*. 2007;127:375-388.
 12. Bártoová E, Krejčí J, Harničarová A, Kozubek S. Differentiation of human embryonic stem cells induces condensation of chromosome territories and formation of heterochromatin protein 1 foci. *Differentiation*. 2008a, 76:24-32.
 13. Bártoová E, Šustáčková G, Stixová L, Kozubek S, Legartová S, Foltánková V. Recruitment of Oct4 protein to UV-damaged chromatin in embryonic stem cells. *PLoS One*. 2011;6(12):e27281.
 14. Bártoová E, Foltánková V, Legartová S, Sehnalová P, Sorokin DV, Suchánková J, Kozubek S. Coilin is rapidly recruited to UVA-induced DNA lesions and γ -radiation affects localized movement of Cajal bodies. *Nucleus*. 2014, 5(3):460-8.
 15. Belikoff E, Wong LJ, Alberts BM. Extensive purification of histone acetylase A, the major histone N-acetyltransferase activity detected in mammalian cell nuclei. *J Biol Chem*. 1980, 255(23):11448-53.
 16. Botuyan MV, Lee J, Ward IM, Kim JE, Thompson JR, Chen J, Mer G. Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell*. 2006, 127:1361-1373.
 17. Boyle S, Gilchrist S, Bridger JM, Mahy NL, Ellis JA, Bickmore WA. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet*. 2001,10:211-219.
 18. Branco MR, Pombo A. Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol*. 2006, 4:e138.
 19. Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*. 1996, 84(6):843-51.
 20. Bunting SF, Callen E, Wong N, Chen HT, Polato F, Gunn A, Bothmer A, Feldhahn N, Fernandez-Capetillo O, Cao L, Xu X, Deng CX, Finkel T, Nussenzweig M, Stark JM, Nussenzweig A. 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*. 2010, 141:243-254.
 21. Campalans A, Amouroux R, Bravard A, Epe B, Radicella JP. UVA irradiation induces relocalisation of the DNA repair protein hOGG1 to nuclear speckles. *J Cell Sci*. 2007, 120(Pt 1):23-32.
 22. Cann KL, Dellaire G. Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochem Cell Biol*. 2011, 89:45-60.
 23. Cremer M, Zinner R, Stein S, Albiez H, Wagler B, Cremer C, Cremer T. Three dimensional analysis of histone methylation patterns in normal and tumor cell nuclei. *Eur J Histochem*. 2004, 48:15-28.
 24. Cremer T, Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*. 2001, 2:292-301.
 25. Croco E, Marchionni S, Lorenzini A. Genetic instability and aging under the scrutiny of comparative biology: a meta-analysis of spontaneous micronuclei frequency. *Mech Ageing Dev*. 2016, 156:34-41.
 26. Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus *J Cell Biol*. 1999, 145:1119-1131.
 27. Csankovszki G, Nagy A, Jaenisch R. Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol*. 2001, 153:773-784.
 28. Cuella-Martin R, Oliveira C, Lockstone HE, Snellenberg S, Grolmusova N, Chapman JR. 53BP1 Integrates DNA Repair and p53-Dependent Cell Fate Decisions via Distinct Mechanisms. *Mol Cell*. 2016, 64:51-64.
 29. Daley JM, Sung P. 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*. 2014, 34:1380-1388
 30. Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N. Capturing chromosome conformation. *Science*. 2002, 295(5558):1306-11.
 31. Dietzel S, Schiebel K, Little G, Edelmann P, Rappold GA, Eils R, Cremer C, Cremer T. The 3D positioning of ANT2 and ANT3 genes within female X chromosome territories correlates with gene activity. *Exp Cell Res*. 1999, 252:363-375.
 32. Dinant C, Luijsterburg MS. The emerging role of HP1 in the DNA damage response. *Mol Cell Biol*. 2009, 24:6335-40.
 33. Drane P, Brault ME, Cui G, Meghani K, Chaubey S, Detappe A, Parnandi N, He Y, Zheng XF, Botuyan MV, Kalousi A, Yewdell WT, Munch C, Harper JW, Chaudhuri J, Soutoglou E, Mer G, Chowdhury D. TIRR regulates 53BP1 by masking its histone methyl-lysine binding function. *Nature*. 2017, 543:211-216.
 34. Escribano-Diaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, Xing M, Young JT, Tkac J, Cook MA, Rosebrock AP, Munro M, Canny MD, Xu D, Durocher D. A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol Cell*. 2013, 49:872-883.
 35. Eskeland R, Eberharther A, Imhof A. HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary

- factors. *Mol Cell Biol.* 2007, 27(2):453-65.
- 36 Essers J, Houtsmuller AB, Kanaar R. Analysis of DNA recombination and repair proteins in living cells by photobleaching microscopy. *Methods Enzymol.* 2006, 408:463-485.
- 37 Falk M, Lukasova E, Stefancikova L, Baranova E, Falkova I, Jezkova L, Davidkova M, Bacikova A, Vachelova J, Michaelidesova A, Kozubek S. Heterochromatinization associated with cell differentiation as a model to study DNA double strand break induction and repair in the context of higher-order chromatin structure. *Appl Radiat Isot.* 2014, 83 Pt B:177-185.
- 38 Feng L, Li N, Li Y, Wang J, Gao M, Wang W, Chen J. Cell cycle-dependent inhibition of 53BP1 signaling by BRCA1. *Cell Discov.* 2015, 1:15019.
- 39 Fnu S, Williamson EA, De Haro LP, Brenneman M, Wray J, Shaheen M, Radhakrishnan K, Lee SH, Nickoloff JA, Hromas R. Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011, 108:540-545.
- 40 Foltánková V, Matula P, Sorokin D, Kozubek S, Bártoová E. Hybrid detectors improved time-lapse confocal microscopy of PML and 53BP1 nuclear body colocalization in DNA lesions. *Microsc Microanal.* 2013a, 19(2):360-9.
- 41 Foltánková V, Legartová S, Kozubek S, Hofer M, Bártoová E. DNA-damage response in chromatin of ribosomal genes and the surrounding genome. *Gene.* 2013b, 15:522(2):156-67.
- 42 Galiová G, Bártoová E, Raška I, Krejčí J, Kozubek S. Chromatin changes induced by lamin A/C deficiency and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A *Eur J. Cell. Biol.*, 2008; 87:291-303.
- 43 Galiová G, Bártoová E. Kozubek S. Nuclear topography of beta-like globin gene cluster in IL-3-stimulated human leukemic K-562 cells. *Blood Cells Mol. Dis.* 2004, 33:4-14.
- 44 García-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, Jenuwein T, Blasco MA. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the SUV39H1 and SUV39H2 histone methyltransferases. *Nat Genet.* 2004, 36:94-99.
- 45 Gatti M, Pinato S, Maspero E, Soffientini P, Polo S, Penengo L. A novel ubiquitin mark at the N-terminal tail of histone H2As targeted by RNF168 ubiquitin ligase. *Cell Cycle.* 2012, 11:2538-2544.
- 46 Gilchrist S, Gilbert N, Perry S, Bickmore WA. Nuclear organization of centromeric domains is not perturbed by inhibition of histone deacetylases. *Chromosome Res.* 2004, 12:505-516.
- 47 Giunta S, Belotserkovskaya R, Jackson SP. DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J Cell Biol.* 2010, 190(2):197-207.
- 48 Goodarzi AA, PJeppo PA. The heterochromatic barrier to DNA double strand break repair: how to get the entry visa. *Int J Mol Sci.* 2012, 13:11844-11860.
- 49 Grant PA. A tale of histone modifications. *Genome Biology.* 2001, 2(003):1-0003.6. Review.
- 50 Hajdu I, Ciccia A, Lewis SM, Elledge SJ. Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 is involved in the cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011, 108(32):13130-4.
- 51 Hakim O, Misteli T. SnapShot: Chromosome confirmation capture. *Cell.* 2012, 148(5):1068.e1-2.
- 52 Hall LL, Lawrence JB. The cell biology of a novel chromosomal RNA: chromosome painting by XIST/Xist RNA initiates a remodeling cascade. *Semin Cell Dev. Biol.* 2003, 14:369-378.
- 53 Han C, Srivastava AK, Cui T, Wang QE, Wani AA. Differential DNA lesion formation and repair in heterochromatin and euchromatin. *Carcinogenesis.* 2016, 37:129-138.
- 54 Harničarová A, Kozubek S, Pacherník J, Krejčí J, Bártoová E. Distinct nuclear arrangement of active and inactive c-myc genes in control and differentiated colon carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2006, 312:4019-4035.
- 55 Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics.* 2010, 2(5):657-69.
- 56 Heard E, Clerc P, Avner P. X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet.* 1997, 31:571-610.
- 57 Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA, Jr., Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD. Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature.* 2004, 432: 406-411.
- 58 Chambeyron S, Bickmore WA. Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. *Genes Dev.* 2004, 18:1119-1130.
- 59 Chen Y, Zhu WG. Biological function and regulation of histone and non-histone lysine methylation in response to DNA damage. *Acta Biochim Biophys Sin Shanghai.* 2016, 48:603-616.
- 60 Chou DM, Adamson B, Dephoure NE, Tan X, Nottke AC, Hurov KE, Gygi SP, Colaiacovo MP, Elledge SJ. A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107:18475-18480.
- 61 Chubb JR, Bickmore WA. Considering nuclear compartmentalization in the light of nuclear dynamics. *Cell.* 2003, 112:403-406.
- 62 Isono M, Niimi A, Oike T, Hagiwara Y, Sato H, Sekine R, Yoshida Y, Isobe SY, Obuse C, Nishi R, Petricci E, Nakada S, Nakano T, Shibata A. BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell Rep.* 2017; 18:520-532.
- 63 Ismail IH, Andrin C, McDonald D, Hendzel MJ. BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair. *J Cell Biol.* 2010, 191(1):45-60.
- 64 Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R, Fields S. Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994, 91(13):6098-102.
- 65 Iwabuchi K, Li B, Massa HF, Trask BJ, Date T, Fields S. Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2. *J Biol Chem.* 1998, 273(40):26061-8.
- 66 Jacobs SA, Khorasanizadeh S. Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science.* 2002, 295(5562):2080-3.
- 67 Jenuwein T. The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J.* 2006, 273:3121-3135.
- 68 Johansen KM, Johansen J. Regulation of chromatin structure by histone H3 phosphorylation. *Chromosome Res.* 2006, 14:393-404.

69. Kakarougkas A, Ismail A, Klement K, Goodarzi AA, Conrad S, Freire R, Shibata A, Lobrich M, Jeggo PA. Opposing roles for 53BP1 during homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* 2013, 41:9719-9731.
70. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36(17):5678-94.
71. Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci.* 2009, 66(4):596-612.
72. Klose RJ, Yamane K, Bae Y, Zhang D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y. The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature.* 2006, 442:312-316.
73. Kohlmaier A, Savarese F, Lachner M, Martens J, Jenuwein T, Wutz A. A chromosomal memory triggered by Xist regulates histone methylation in X inactivation. *PLoS Biol.* 2004, 2:E171.
74. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007, 128:693-705.
75. Kozubek S, Lukášová E, Rýznar L, Kozubek M, Lišková A, Govorun RD, Krasavin EA, Horneck G. Distribution of ABL and BCR genes in cell nuclei of normal and irradiated lymphocytes. *Blood.* 1997, 89:4537-4545.
76. Kozubek M, Kozubek S, Lukášová E, Marečková A, Bártoová E, Skalníková M, Jergová A. High-resolution cytometry of FISH dots in interphase cell nuclei. *Cytometry.* 1999, 36:279-293.
77. Kruhlak MJ, Celeste A, Dellaire G, Fernandez-Capetillo O, Müller WG, McNally JG, Bazett-Jones DP, Nussenzweig A. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol.* 2006, 172:823-834.
78. Kruhlak M, Crouch EE, Orlov M, Montano C, Gorski SA, Nussenzweig A, Misteli T, Phair RD, Casellas R. The ATM repair pathway inhibits RNA polymerase I transcription in response to chromosome breaks. *Nature.* 2007, 447:730-734.
79. Kurz A, Lampel S, Nickolenko JE, Bradl J, Benner A, Zirbel RM, Cremer T, Lichter P. Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J Cell Biol.* 1996, 135:1195-1205.
80. Kohlmaier A¹, Savarese F, Lachner M, Martens J, Jenuwein T, Wutz A. A chromosomal memory triggered by Xist regulates histone methylation in X inactivation. *PLoS Biol.* 2004 Jul;2(7):E171. Epub 2004 Jul 13.
81. Lahtz C, Pfeifer GP. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *J Mol Cell Biol.* 2011, 3(1):51-8.
82. Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol.* 2002, 14:286-298.
83. Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci.* 2003, 116:2117-2124.
84. Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet.* 2007, 8:104-115.
85. Legartová S, Kozubek S, Franek M, Zdráhal Z, Lochmanová G, Martinet N, Bártoová E. Cell differentiation along multiple pathways accompanied by changes in histone acetylation status. *Biochem Cell Biol.* 2014, 92(2):85-93.
86. Legartová S, Suchánková J, Krejčí J, Kovaříková A, Bártoová E. Advanced Confocal Microscopy Techniques to Study Protein-protein Interactions and Kinetics at DNA Lesions. *J Vis Exp.* 2017, 12(129).
87. Li X, Corsa CA, Pan PW, Wu L, Ferguson D, Yu X, Min J, Dou Y. MOF and H4 K16 acetylation play important roles in DNA damage repair by modulating recruitment of DNA damage repair protein Mdc1. *Mol Cell Biol.* 2010, 30(22):5335-47.
88. Luijsterburg MS, Dinant C, Lans H, Stap J, Wiernasz E, Lagerwerf S, Warmerdam DO, Lindh M, Brink MC, Dobrucki JW, Aten JA, Fousteri MI, Jansen G, Dantuma NP, Vermeulen W, Mullenders LH, Houtsmuller AB, Verschure PJ, van Driel R. Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. *J Cell Biol.* 2009, 185:577-586.
89. Mahy NL, Perry PE, Bickmore WA. Gene density and transcription influence on the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH. *J. Cell Biol.* 2002, 159:753-763.
90. Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005, 6:838-849.
91. Martinet N, Bertrand P. Interpreting clinical assays for histone deacetylase inhibitors. *Cancer Manag Res.* 2011, 3:117-41.
92. Mattioli F, Vissers JH, van Dijk WJ, Ikpa P, Citterio E, Vermeulen W, Marteiijn JA, Sixma TK. RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell.* 2012, 150:1182-1195.
93. Metzger E, Wissmann M, Yin N, Müller JM, Schneider R, Peters AH, Günther T, Buettner R, Schüle R. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature.* 2005, 437:436-439.
94. Mortusewicz O, Leonhardt H, Cardoso MC. Spatiotemporal dynamics of regulatory protein recruitment at DNA damage sites. *J Cell Biochem.* 2008, 104:1562-1569.
95. Nelson G, Buhmann M, von Zglinicki T. DNA damage foci in mitosis are devoid of 53BP1. *Cell Cycle.* 2009, 8(20):3379-83.
96. Neves H, Ramos C, da Silva MG, Parreira A and Parreira L. The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood.* 1999, 93:1197-1207.
97. Nielsen AL, Sanchez C, Ichinose H, Cerviño M, Lerouge T, Chambon P, Losson R. Selective interaction between the chromatin-remodeling factor BRG1 and the heterochromatin-associated protein HP1alpha. *EMBO J.* 2002, 21(21):5797-806.
98. Noda A, Mishima S, Hirai Y, Hamasaki K, Landes RD, Mitani H, Haga K, Kiyono T, Nakamura N, Kodama

99. Y. Progerin, the protein responsible for the Hutchinson-Gilford progeria syndrome, increases the unrepaired DNA damages following exposure to ionizing radiation. *Genes Environ.* 2015, 37:13.
100. Oda H, Hubner MR, Beck DB, Vermeulen M, Hurwitz J, Spector DL, Reinberg D. Regulation of the histone H4 monomethylase PR-Set7 by CRL4(Cdt2)-mediated PCNA-dependent degradation during DNA damage. *Mol Cell.* 2010, 40:364-376.
101. Park Y, Kuroda MI. Epigenetic aspects of X-chromosome dosage compensation. *Science.* 2001, 293:1083-1085.
102. Parreira L, Telhada M, Ramos C, Hernandez R, Neves H, Carmo-Fonseca M. The spatial distribution of human immunoglobulin genes within the nucleus: evidence for gene topography independent of cell type and transcriptional activity. *Hum Genet.* 1997, 100:588-594.
103. Pei H, Zhang L, Luo K, Qin Y, Chesi M, Fei F, Bergsagel PL, Wang L, You Z, Lou Z. MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature.* 2011, 470(7332):124-8.
104. Polo SE, Jackson SP. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev.* 201, 25:409-433.
105. Reindl J, Girst S, Walsh DW, Greubel C, Schwarz B, Siebenwirth C, Drexler GA, Friedl AA, Dollinger G. Chromatin organization revealed by nanostructure of irradiation induced gammaH2AX, 53BP1 and Rad51 foci. *Sci Rep.* 2017, 7:40616.
106. Rice JC, Allis CD. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2001, 13:263-273.
107. Sadoni N, Langer S, Fauth C, Bernardi G, Cremer T, Turner BM, Zink D. Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol.* 1999, 146:1211-1226.
108. Sharma GG, So S., Gupta A., Kumar R., Cayrou C., Avvakumov N., Bhadra U., Pandita RK, Porteus MH, Chen DJ, Cote J, Pandita TK. MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 2010, 30: 3582-3595.
109. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* 2004, 119:941-953.
110. Shibata A, Conrad S, Birraux J, Geuting V, Barton O, Ismail A, Kakarougkas A, Meek K, Taucher-Scholz G, Lobrich M, Jeggo PA. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* 2011, 30:1079-1092.
111. Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol.* 2000, 151:1381-1390.
112. Schübeler D, Groudine M, Bender MA. The murine beta-globin locus control region regulates the rate of transcription but not the hyperacetylation of histones at the active genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001, 98:11432-11437.
113. Skalníková M, Kozubek S, Lukášová E, Bártová E, Jirsová P, Cafourková A, Koutná I, Kozubek M. Spatial arrangement of genes, centromeres and chromosomes in human blood cell nuclei and its changes during the cell cycle, differentiation and after irradiation. *Chromosome Res.* 2000, 8:487-499.
114. Skalníková M, Bártová E, Ulman V, Matula P, Svoboda D, Harničarová A, Kozubek M, Kozubek S. Distinct patterns of histone methylation and acetylation in human interphase nuclei. *Physiol. Res.* 2007, 56:797-806.
115. Soutoglou E, Dorn JF, Sengupta K, Jasin M, Nussenzweig A, Ried T, Danuser G, Misteli T. Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 2007, 9:675-682.
116. Stixová L, Bártová E, Matula P, Daněk O, Legartová S, Kozubek S. Heterogeneity in the kinetics of nuclear proteins and trajectories of substructures associated with heterochromatin. *Epigenetics Chromatin.* 2011, 18:4:5.
117. Stixová L, Sehnalová P, Legartová S, Suchánková J, Hrušková T, Kozubek S, Sorokin DV, Matula P, Raška I, Kovářik A, Fulneček J, Bártová E. HP1 β -dependent recruitment of UBF1 to irradiated chromatin occurs simultaneously with CPDs. *Epigenetics Chromatin.* 2014, 7(1):39.
118. Suchánková J, Legartová S, Ručková E, Vojtěšek B, Kozubek S, Bártová E. Mutations in the TP53 gene affected recruitment of 53BP1 protein to DNA lesions, but level of 53BP1 was stable after γ -irradiation that depleted MDC1 protein in specific TP53 mutants. *Histochem Cell Biol.* 2017, 148(3):239-255.
119. Sun Y, Jiang X, Xu Y, Ayrapetov MK, Moreau LA, Whetstone JR, Price BD. Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat Cell Biol.* 2009, 11(11):1376-82.
120. Šustáčková G, Legartová S, Kozubek S, Stixová L, Pacherník J, Bártová E. Differentiation-independent fluctuation of pluripotency-related transcription factors and other epigenetic markers in embryonic stem cell colonies. *Stem Cells Dev.* 2012, 21(5):710-20.
121. Taddei A, Maison C, Roche D, Almouzni G. Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol.* 2001, 3:114-120.
122. Tajbakhsh J, Luz H, Borneth H, Lampel S, Cremer C, Lichter P. Spatial distribution of GC- and AT-rich DNA sequences within human chromosome territories. *Exp Cell Res.* 2000, 255:229-237.
123. Venkatesh P, Panyutin IV, Remeeva E, Neumann RD, Panyutin IG. Effect of Chromatin Structure on the Extent and Distribution of DNA Double Strand Breaks Produced by Ionizing Radiation; Comparative Study of hESC and Differentiated Cells Lines. *Int J Mol Sci.* 2016, 17(1).
124. Vazquez BN, Thackray JK, Simonet NG, Kane-Goldsmith N, Martinez-Redondo P, Nguyen T, Bunting S, Vaquero A, Tischfield JA, Serrano L. SIRT7 promotes genome integrity and modulates non-homologous end joining DNA repair. *EMBO J.* 2016, 35:1488-1503.
125. Volpi EV, Chevret E, Jones T, Vatcheva R, Williamson J, Beck S, Campbell RD, Goldsworthy M, Powis SH, Ragoussis J, Trowsdale J, Sheer D. Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility

- complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J Cell Sci.* 2000, 113:1565-1576.
- 126 Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science.* 2002, 298:1435-1438.
- 127 Ward IM, Minn K, Jorda KG, Chen J. Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J Biol Chem.* 2003, 278:19579-19582.
- 128 Wiblin AE, Cui W, Clark AJ, Bickmore WA. Distinctive nuclear organisation of centromeres and regions involved in pluripotency in human embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2005, 118:3861-3868.
- 129 Williams RR, Broad S, Sheer D, Ragoussis J. Subchromosomal positioning of the epidermal differentiation complex (EDC) in keratinocyte and lymphoblast interphase nuclei. *Exp Cell Res.* 2002, 272:163-175.
- 130 Wilson MD, Benlekbir S, Fradet-Turcotte A., Sherker A., Julien JP, McEwan A, Noordermeer SM, Sicheri F, Rubinstein JL, Durocher D. The structural basis of modified nucleosome recognition by 53BP1. *Nature.* 2016, 536:100-103.
- 131 Xiang Y, Laurent B, Hsu CH, Nachtergaele S, Lu Z, Sheng W, Xu C, Chen H, Ouyang J, Wang S, Ling D, Hsu PH, Zou L, Jambhekar A, He C, Shi Y. RNA m6A methylation regulates the ultraviolet-induced DNA damage response. *Nature.* 2017, 543(7646):573-576.
- 132 Yamauchi M, Shibata A, Suzuki K, Suzuki M, Niimi A, Kondo H, Miura M, Hirakawa M, Tsujita K, Yamashita S, Matsuda N. Regulation of pairing between broken DNA-containing chromatin regions by KU80, DNA-PKcs, ATM, and 53BP1. *Sci Rep.* 2017, 7: 41812.
- 133 Yan Q., Dutt S, Xu R., Graves K., Juszczynski P., Manis JP, Shipp MA. BBAP monoubiquitylates histone H4 at lysine 91 and selectively modulates the DNA damage response. *Mol Cell.* 2009, 36:110-120.
- 134 Yang ZM, Liao XM, Chen Y, Shen YY, Yang XY, Su Y, Sun YM, Gao YL, Ding J, Zhang A, He JX, Miao ZH. Combining 53BP1 with BRCA1 as a biomarker to predict the sensitivity of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Acta Pharmacol Sin.* 2017, 38: 1038-1047.
- 135 Zarebski M, Wiernasz E, Dobrucki JW. Recruitment of heterochromatin protein 1 to DNA repair sites. *Cytometry A.* 2009, 75(7):619-25.
- 136 Zimmermann M, de Lange T. 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends Cell Biol.* 2014, 24(2):108-17.
- 137 Zinner R, Albiez H, Walter J, Peters AH, Cremer T, Cremer M. Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones. *Histochem. Cell Biol.* 2006, 125:3-19.
- 138 Zinner R, Teller K, Versteeg R, Cremer T, Cremer M. Biochemistry meets nuclear architecture: Multicolor immuno-FISH for co-localization analysis of chromosome segments and differentially expressed gene loci with various histone methylations. *Adv Enzyme Regul.* 2007, 47:223-241.