

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Bc. Andrea Hušková**

Studium regulace a funkce DNA-opravných enzymů UBE2T a FANCL  
Study of regulation and function of DNA repair enzymes UBE2T and FANCL

**Diplomová práce**

Vedoucí práce: RNDr. Jan Šilhán, PhD.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jana Šilhána, PhD. a veškeré použité zdroje jsem řádně ocitovala.

V Praze dne .....

.....

Andrea Hušková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Šilhánovi, PhD. za jeho cenné rady, trpělivost a snahu naučit mě novým dovednostem. Mé poděkování rovněž patří mé konzultantce prof. RNDr. Marii Stiborové DrSc. za podnětné rady a věcné připomínky při sepisování diplomové práce. Dále děkuji všem členům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu vždy poradit a pomoci. Na závěr také děkuji své rodině a přátelům za jejich nesmírnou trpělivost a podporu v době mého studia.

## Abstrakt

DNA podléhá denně až 70 000 různým poškozením, tudíž existence opravných mechanismů a enzymů je více než nezbytná. Již známe základní mechanismy několika specifických opravných drah, z nichž opravná dráha Fanconiho anémie (FA) je jedna z nejméně prozkoumaných. FA je vzácná autosomálně recesivní porucha charakterizovaná selháním kostní dřeně, vývojovými defekty, genomickou nestabilitou a predispozicí k akutní myeloidní leukémii a vzniku nádorů. Primární diagnóza FA je přecitlivělost na činidla způsobující meziřetězcové kovalentní spojení DNA v důsledku deaktivace jednoho z 21 genů, tzv. genů FANC (z angl. FA complementation group), z opravné dráhy FA. Molekulárním defektem ve FA je narušená oprava meziřetězcových kovalentních spojení DNA. Tato spojení jsou vysoce cytotoxická a inhibují proces replikace a transkripce DNA. Rozhodujícím krokem v opravné dráze FA, který iniciuje opravu meziřetězcových spojení DNA, je monoubiquitylace FANCD2. Ubiquitylovaný FANCD2 je základem pro svolání dalších proteinů participujících v opravné dráze FA. Ubiquitin je aktivován pomocí ubiquitin-aktivujícího enzymu UBA1 a přenesen prostřednictvím ubiquitin-konjugujícího enzymu UBE2T na FANCD2 multipodjednotkovou E3-ligasou (nukleární komplex FA). Existuje až 11 různých proteinů, které tvoří nukleární komplex FA, z nichž nejdůležitější jsou FANCB, FAAP100 a FANCL. Nicméně minimálním systémem pro správnou monoubiquitylacii FANCD2 *in vitro* je ubiquitin, UBA1, UBE2T, FANCL a DNA.

Tato práce se zabývá molekulární architekturou a faktory regulující ubiquitylacii a tím celou opravnou dráhu FA. Hlavním úkolem byla příprava a charakterizace konstruktů a mutantních variant UBE2T a FANCL a vlastní studium mechanismu přenosu ubiquitinu přes E3-ligasu na substrát, FANCD2. Byl vyroben kovalentní komplex UBE2T s ubiquitem. Pro zkoumání molekulárních mechanismů monoubiquitylace FANCD2 byly připraveny varianty konstruktů různých domén FANCL. Ty byly exprimovány, purifikovány a byla testována jejich enzymová aktivita a vazebné vlastnosti s proteinovým komplexem Ub-UBE2T. Dále byly připraveny různé mutantní varianty UBE2T a jejich aktivita byla testována přes monoubiquitylacii FANCD2 pro lepší pochopení strukturního přeskupení UBE2T v rámci dosažení jeho aktivity a pro budoucí strukturní analýzy.

Klíčová slova: Fanconiho anémie, opravná dráha Fanconiho anémie, UBE2T, FANCL, monoubiquitylovaný enzym UBE2T, monoubiquitylace FANCD2

## Abstract

Due to the action of endogenous and exogenous agents, DNA is subject up to 70,000 lesions per day, thus the existence of repair mechanisms and enzymes is more than necessary. We know basic mechanisms of several specific DNA repair pathways, of which the Fanconi anaemia (FA) repair pathway is one of the least explored. FA is a rare, autosomal recessive disorder characterized by early onset bone marrow failure, developmental defects, genomic instability and predisposition to acute myeloid leukaemia and solid tumours. The primary diagnosis of FA is a hypersensitivity to cross-linking agents of DNA due to inactivation of one of the 21 genes from the FA repair pathway, the so-called FANC genes (FA complementation group). The molecular defect in FA is an impaired repair of DNA interstrand cross-links (ICLs). The ICLs are cytotoxic lesions that inhibit the process of DNA replication and transcription. A crucial step in the FA pathway that initiates ICL repair is a monoubiquitination of FANCD2. FANCD2 monoubiquitination is a base for the recruitment of additional proteins that coordinate DNA repair. Ubiquitin is recruited *via* activating enzyme E1 (UBA1), ubiquitin-conjugating enzyme E2T (UBE2T) and transferred onto FANCD2 by multisubunit E3 ligase (FA core complex). There are up to 11 different proteins composing FA core complex, of which are the most important FANCB, FAAP100 and FANCL. However, a minimal system for proper monoubiquitination of FANCD2 is ubiquitin, UBE2T, FANCL, UBA1 and DNA.

This work deals with molecular architecture and factors regulating ubiquitination and thus the entire FA pathway. The main task was to prepare and characterize the construct and mutant variants of UBE2T and FANCL and to study the mechanism of transmission of ubiquitin *via* E3 ligase to the substrate, FANCD2. A covalent complex of UBE2T with ubiquitin was produced. Variants of constructs of different domains of FANCL were prepared in order to investigate the molecular mechanisms of FANCD2 monoubiquitination. These were expressed, purified and their enzymatic activity and binding properties were tested with the Ub-UBE2T protein complex. In addition, various mutant variants of UBE2T were prepared and their activity was tested through monoubiquitination of FANCD2 for better understanding of structural rearrangement of UBE2T to achieve its activity and for future structural analyzes.

Keywords: Fanconi anaemia, Fanconi anaemia repair pathway, UBE2T, FANCL, monoubiquitinated enzyme UBE2T, monoubiquitination of FANCD2 (In Czech)

# Obsah

1	Seznam zkratek .....	8
2	Úvod.....	10
2.1	Poškození DNA .....	10
2.2	Meziřetězcové kovalentní spojení DNA.....	10
2.3	Fanconiho anémie .....	11
2.4	Opravná dráha Fanconiho anémie .....	12
2.4.1	Aktivace opravné dráhy .....	12
2.4.2	Proteiny důležité pro aktivaci opravné dráhy .....	13
2.4.2.1	Ubiquitin .....	13
2.4.2.2	Ubiquitin-aktivující enzym UBA1.....	14
2.4.2.3	Ubiquitin-konjugující enzym UBE2T.....	15
2.4.2.4	FANCL („Fanconi anemia complementation group L“) .....	18
2.4.2.5	FANCD2 („Fanconi anemia complementation group D2“) .....	19
2.4.2.6	FANCI („Fanconi anemia complementation group I“) .....	20
3	Cíl práce .....	21
4	Materiál .....	22
4.1	Použité přístroje .....	22
4.2	Použité chemikálie .....	23
4.2.1	Roztoky, pufrы a média.....	24
4.2.2	Enzymy .....	26
4.2.3	Složení gelů pro SDS-PAGE .....	26
4.2.4	Použité sekvence primerů pro přípravu konstruktů .....	27
5	Metody .....	28
5.1	Příprava vektorů pro bakteriální expresi.....	28
5.1.1	Příprava konstruktů DNA .....	28
5.1.2	Cílená mutagenese konstruktů UBE2TΔC.....	29

5.1.3	Horizontální agarosová elektroforesa .....	30
5.1.4	Izolace produktu PCR.....	30
5.1.5	Gibsonovo klonování .....	30
5.1.6	Ligace mutantních variant UBE2 $\Delta$ C .....	31
5.1.7	Transformace kompetentních bakterií <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	31
5.1.8	Minipreparace plasmidové DNA .....	32
5.1.9	Sekvenování plasmidové DNA.....	32
5.2	Bakteriální exprese.....	32
5.2.1	Expese rekombinantního proteinu v buňkách .....	32
5.2.2	Izolace a purifikace proteinu.....	33
5.2.2.1	Zpracování bakteriální kultury.....	33
5.2.2.2	Afinitní chelatační chromatografie pomocí histidinové kotvy .....	33
5.2.2.3	Afinitní chromatografie pomocí glutathion-S-transferasy.....	33
5.2.2.4	Štěpení GST-značky 3C PreScission proteasou .....	34
5.2.2.5	Reversní afinitní chromatografie pro odstranění GST-značky .....	34
5.2.2.6	Diskontinuální elektroforesa v denaturačním prostředí dodecylsiranu sodného (SDS-PAGE) .....	34
5.2.2.7	Koncentrování proteinu .....	34
5.2.2.8	Chromatografie zkrácených variant FANCL na iontoměničích .....	35
5.2.2.9	Gelová permeační chromatografie proteinů.....	35
5.2.2.10	Štěpení fúzního proteinu HisSUMO SUMO-proteasou .....	35
5.3	Produkce komplexu Ub-UBE2 $\Delta$ C.....	35
5.3.1	Izolace komplexu Ub-UBE2 $\Delta$ C .....	36
5.3.1.1	Afinitní chelatační chromatografie komplexu Ub-UBE2 $\Delta$ C .....	36
5.3.1.2	Štěpení histidinové kotvy TEV-proteasou .....	36
5.3.1.3	Reversní afinitní chelatační chromatografie komplexu Ub-UBE2 $\Delta$ C .....	37
5.3.1.4	Gelová permeační chromatografie komplexu Ub-UBE2 $\Delta$ C .....	37
5.4	Interakční analýza FANCL.....	37
5.5	Monoubiquitinylační reakce FANCD2 a FANCI.....	38

6	Výsledky .....	39
6.1	Příprava vektorů pro bakteriální expresi zkrácených variant FANCL .....	39
6.2	Expres a purifikace zkrácených variant FANCL .....	40
6.3	Příprava vektoru pro bakteriální expresi mutantních forem UBE2TΔC.....	43
6.4	Expres a purifikace UBE2TΔC a jeho mutantních variant .....	43
6.5	Optimalizace produkce a izolace komplexu Ub-UBE2TΔC .....	45
6.6	Monoubiquitinylační reakce FANCD2 a FANCI.....	50
6.7	Ověření interakce FANCL <sup>DRWD-RING</sup> s Ub-UBE2TΔC.....	53
6.8	Monoubiquitinylační reakce FANCD2/FANCI s mutantními formami UBE2TΔC .....	54
7	Diskuze .....	55
8	Závěr .....	59
9	Seznam literatury .....	60
10	Přílohy.....	65

# 1 Seznam zkratek

AAD	aktivní adenylační doména
ATR	z angl. ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related
BL100	komplex FANCB:FANCL:FAAP100
DRWD	centrální doména FANCL (z angl. double RWD-like fold)
DSB	dvouřetězcové zlomy (z angl. double-strand breaks)
IAD	inaktivní adenylační doména
ICL	meziřetězcové kovalentní spojení DNA (z angl. interstrand cross-link)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELF	<i>N</i> -terminální doména FANCL (z angl. E2-like fold)
ESI	„elektrosprejová“ ionizace (z angl. electrospray ionization)
FA	Fanconiho anémie
FANC	komplementační skupina Fanconiho anémie (z angl. Fanconi anemia complementation group)
FAAP	asociovaný protein Fanconiho anemie (z angl. Fanconi anemia-associated protein)
LB	kultivační médium (z angl. lysogeny broth)
NTA	nitrilotrioctová kyselina (z angl. nitrilotriacetic acid)
PB	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffer)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PE	z angl. phosphate/ethanol
RING	C-terminální doména FANCL (z angl. really interesting new gene)
RPM	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SDS	dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecyl sulfát)
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza
TAE	Tris-acetátový pufr s EDTA
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin

TE	Tris/EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TEV	virus tabákové mozaiky (z angl. tobacco etch virus)
Ub	ubiquitin
UBA1	ubiquitin-aktivující enzym
UBE2T	ubiquitin-konjugující enzym E2T
UFD	z angl. ubiquitin-fold domain

## 2 Úvod

### 2.1 Poškození DNA

DNA jakožto makromolekula důležitá pro existenci života podléhá denně v buňkách až 70 000 různým poškozením [1]. Již před objevem struktury DNA bylo zjištěno, že působením exogenních činidel, ať se jedná o ultrafialové a rentgenové záření nebo další chemické látky, jimiž jsme vystaveni každý den, dochází ke genetickým změnám podněcujícím vznik rakoviny [2]. Až o několik let později byla k vlivům, které negativně působí na stabilitu DNA, zařazena i endogenní činidla z běžného buněčného metabolismu a spontánní jevy v buňce [3].

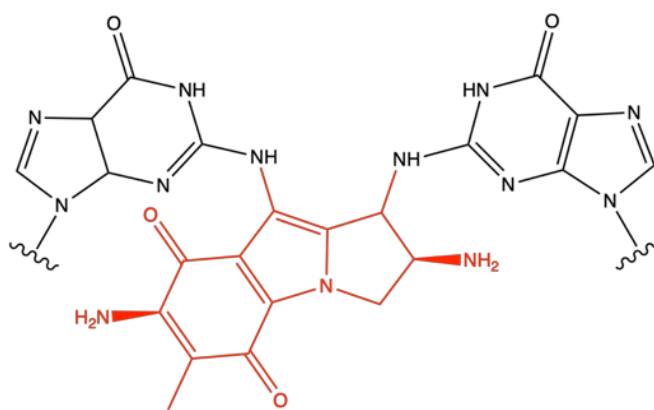
Mezi poškození, kterým DNA podléhá nejčastěji, patří jednořetězcové zlomy, které mohou být způsobeny oxidačním stresem nebo bazickou hydrolyzou. Mnohem nebezpečnější jsou však dvouřetězcové zlomy, zkráceně DSB (z angl. double-strand breaks) [1,2,4]. DNA také může podlehnout depurinaci, depyrimidinaci, deaminaci, inzerci či delecii nukleotidu, vložení analogu báze, vzniku thymidylových dimerů a dalším [5].

Jak již bylo uvedeno, DNA podléhá denně velkému množství poškození, tudíž existence opravných mechanismů a enzymů participujících na těchto opravách je více než nezbytná. V tomto odvětví mají velkou zásluhu Tomas Lindahl, Paul Modrich a Aziz Sancar, kteří za svůj výzkum získali Nobelovu cenu. Tomas Lindahl definoval základní mechanismus opravy bází [6]. Oprava DNA poškozené UV zářením za vzniku thymidylových dimerů či dalších aduktů a opravný mechanismus nesprávně párovaných bází jsou připisovány Paulu Modrichovi a Azizu Sancarovi [7,8]. Mezi další známé specifické opravné dráhy patří opravná dráha Fanconioho anémie (FA) a homologní rekombinace [9].

Nutno uvést, že poškození DNA a z toho vycházející mutace jsou nepostradatelným zdrojem genetické diverzity, ať už se jedná o diverzifikaci protilátek nebo přírodní výběr. Tyto jevy tak neodmyslitelně patří k evoluci všech organismů. Na druhé straně mutace a genetická nestabilita souvisí s rozvojem rakoviny a nemocí spojené se stářím [1].

### 2.2 Meziřetězcové kovalentní spojení DNA

Působením různých exogenních a endogenních činidel může docházet ke kovalentnímu spojení mezi nukleotidy dvou řetězců DNA, zkráceně ICL (z angl. interstrand cross-link) viz Obrázek 1 na následující straně.



Obrázek 1: Kovalentní spojení mezi nukleotidy dvou řetězců prostřednictvím mitomycinu C. Vytvořeno v programu ChemDraw.

ICL je vysoce cytotoxické a pokud není opraveno, dochází v důsledku jeho tvorby k blokaci replikace a transkripce z důvodu bránění separace řetězců DNA [10]. Mezi exogenní činnidla způsobující ICL patří například psoralen, cisplatina, mytomycin C a dusíkaté yperity, jež si našly využití jako protinádorová léčiva ale i jako válečné zbraně [11,12]. Z endogenního metabolismu lze do ICL-tvořících činnidel zařadit kyselinu dusitou, aldehydy (formaldehyd, acetaldehyd a další) a reaktivní formy kyslíku [11,13–15].

Ve všech buňkách může replikace DNA, která obsahuje ICL, indukovat tvorbu DSB. ICL jsou také účinnými induktory výměny sesterských chromatid, což nasvědčuje tomu, že tyto replikačně závislé DSB jsou mnohdy vyřešeny výměnou sesterských chromatid [10].

## 2.3 Fanconiho anémie

Fanconiho anémie je autosomálně-recesivní porucha s výjimkou genu FANCB (z angl. Fanconi anemia complementation group B), který je vázán na chromosom X a RAD51, jehož nalezené mutace byly vždy dominantní. Pro projev autosomálně-recesivní poruchy je třeba mutace daného genu na obou alelách od otce a matky. Homozygoti mají vysoký výskyt vrozených vad a aplastických anémií a rovněž zvýšené poškození chromozomů po kultivaci buněk (obvykle lymfocytů) s klastogenními činnidly (činnidla poškozující DNA). Se zvyšujícím se věkem se u pacientů s FA zvyšuje riziko výskytu leukémie a maligních nádorů [16–18]. Základní diagnózou FA je poškození chromozomů a přecitlivělost na činnidla způsobující ICL. Skutečnost, že buňky s FA jsou hypersenzitivní na tento typ poškození DNA, naznačuje, že jedinci mají defekty v opravě těchto lézí [10]. Dosud bylo identifikováno

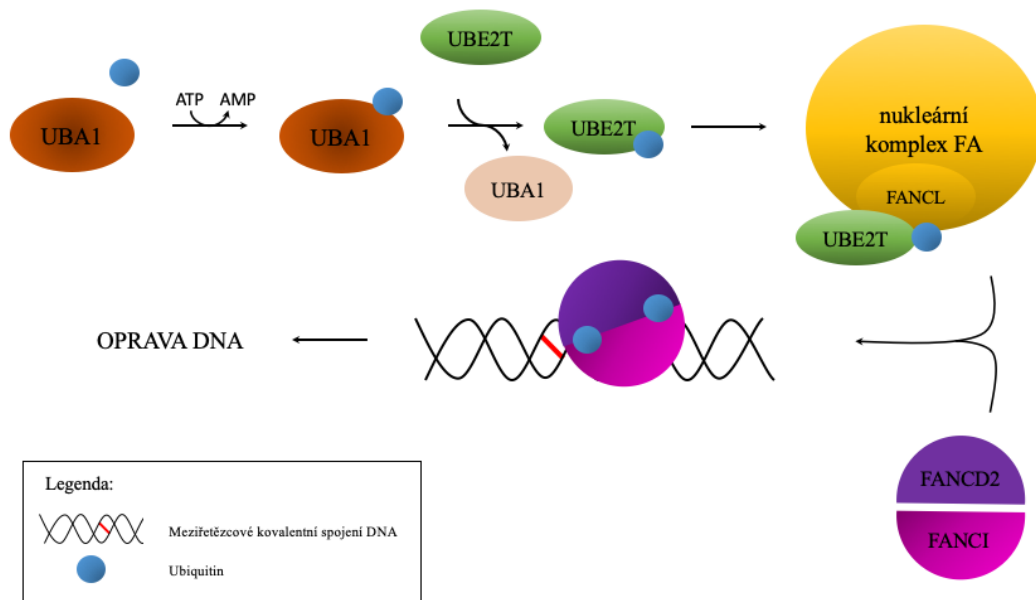
21 genů, jejichž proteiny se podílejí na opravě ICL a tedy bíaleická mutace v těchto genech vede k rozvoji FA [19].

Celosvětová prevalence Fanconio anémie je nízká, a to 1 až 5 případů na milion lidí, přičemž průměrná doba života pacientů s FA je 20 let. Léčba FA je v podstatě podpůrná, jedinou šancí na léčbu hematopoetických aspektů onemocnění je transplantace kostní dřeně [20].

## 2.4 Opravná dráha Fanconio anémie

### 2.4.1 Aktivace opravné dráhy

Opravná dráha FA je aktivována, když se DNA polymerasa zastaví při replikaci DNA v důsledku tvorby ICL. K aktivaci dochází v rámci S-fáze buněčného cyklu [21]. V tento okamžik dochází k přenosu ubiquitinu pomocí UBA1 na ubiquitin-konjugující enzym UBE2T. Ubiquitin je následně přenesen z UBE2T prostřednictvím nukleárního komplexu FA, zaujímajícího ubiquitin-ligasovou aktivitu, na komplex FANCD2-FANCI, jež interaguje s poškozenou částí DNA (viz Obrázek 2). Následkem této podstatné aktivace může být ICL odstraněno a DNA je nadále replikována [22,23].



Obrázek 2: Schéma aktivační části opravné dráhy FA.

Pro úplnost je třeba zdůraznit složení nukleárního komplexu FA, který je nedílnou součástí aktivační části opravné dráhy. Jedná se o komplex složený z proteinů FANCD2 a proteinů FAAP (z angl. Fanconi anemia-associated protein) jmenovitě FANCA, -B, -C,

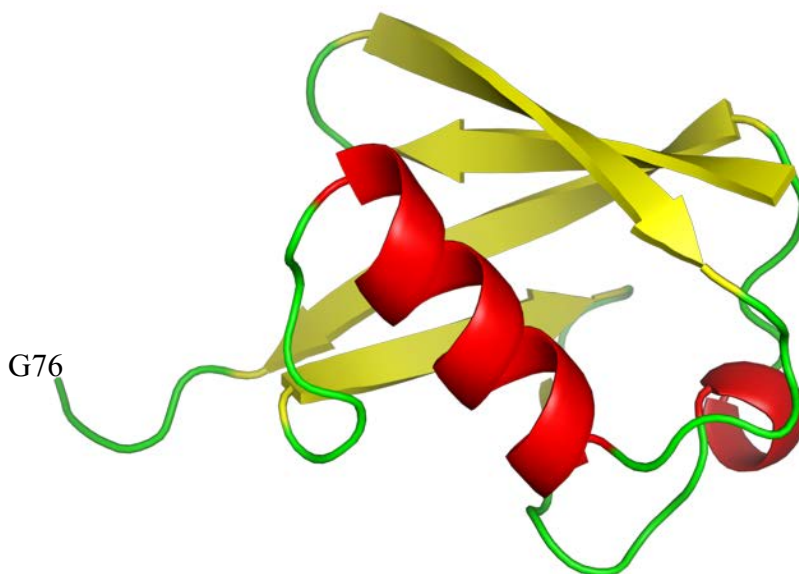
-E, -F, -G, -L, -M a FAAP20, FAAP24 a v neposlední řadě FAAP100 [24]. Sub-komplex FANCB, FAAP100 a FANCL tvoří v rámci nukleárního komplexu FA dimerní centrum, v němž FANCB poskytuje základnu pro dvě molekuly proteinu FANCL [25,26]. Tento sub-komplex je zodpovědný za ubiquitin-ligasovou aktivitu nukleárního komplexu FA [24].

Další sub-komplex tvoří FANCC, FANCE a FANCF, který vytváří interakční most mezi komplexem FANCB:FAAP100:FANCL a FANCI, FANCD2 pro katalýzu koordinované ubiquitylase obou proteinů v dimerním uspořádání [25].

## 2.4.2 Proteiny důležité pro aktivaci opravné dráhy

### 2.4.2.1 Ubiquitin

Ubiquitin (Ub) je malý regulační protein (8,6 kDa) nacházející se pouze v eukaryotických buňkách. Tento globulární protein (viz Obrázek 3) o délce 76 aminokyselin se nalézá v buňkách volný či kovalentně vázaný k jiným proteinům. Jedná se o jeden z nejvíce konzervovaných proteinů u eukaryot [27].



Obrázek 3: Struktura lidského ubiquitinu s vyznačeným vazebným místem na C-konci. Identifikační PDB kód: 1ubi.

Ubiquitin může být vázán karboxylovou skupinou glycínu na C-konci k lysinu, cysteinu, threoninu, serinu nebo *N*-terminální aminokyselinu cílového proteinu. Substrátové proteiny mohou být modifikovány ubiquitem různými způsoby. Monoubiquitylase je připojení jedné molekuly ubiquitinu na jednu  $\epsilon$ -aminoskupinu lysinu. Tato modifikace je reversibilní, neproteolytický signál, který se podílí na endocytóze, regulaci struktury histonů,

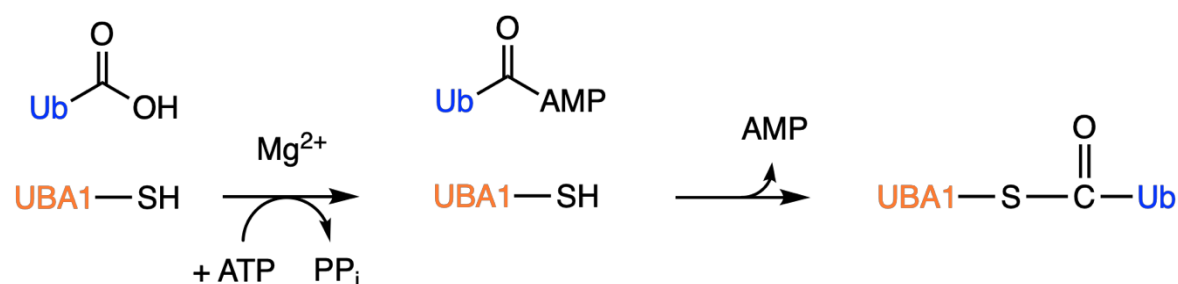
opravě DNA, pučení virů a na jaderném exportu. Jedna molekula ubiquitinů může modifikovat několik postranních řetězců lysinu substrátového proteinu, tato mnohočetná monoubiquitinylace hraje roli v internalizaci receptorů a endocytóze [28,29].

Ubiquitin sám obsahuje sedm lysinů, které jsou potenciálními akceptory další molekuly ubiquitinů, což umožňuje tvorbu ubiquitinových řetězců na cílovém proteinu (polyubiquitinylace). Různé polyubiquitinové řetězce přispívají k diverzitě ubiquitin-dependentní signalizaci. Příkladem může být polyubiquitinylace na K48, která nejčastěji vede k degradaci cílového proteinu prostřednictvím proteasomu, naopak polyubiquitinylace na K63 souvisí s četnými buněčnými signalizacemi, které nesouvisí s degradací modifikovaného proteinu [28,30].

#### 2.4.2.2 Ubiquitin-aktivující enzym UBA1

V lidském těle se nachází dva ubiquitin-aktivující enzymy, UBA1 a UBA6 (z angl. ubiquitin-like modifier-activating enzyme), avšak pouze UBA1 byl potvrzen jakožto enzym důležitý v ubiquitin-dependentní signalizaci DSB a replikačního stresu v lidských buňkách [31].

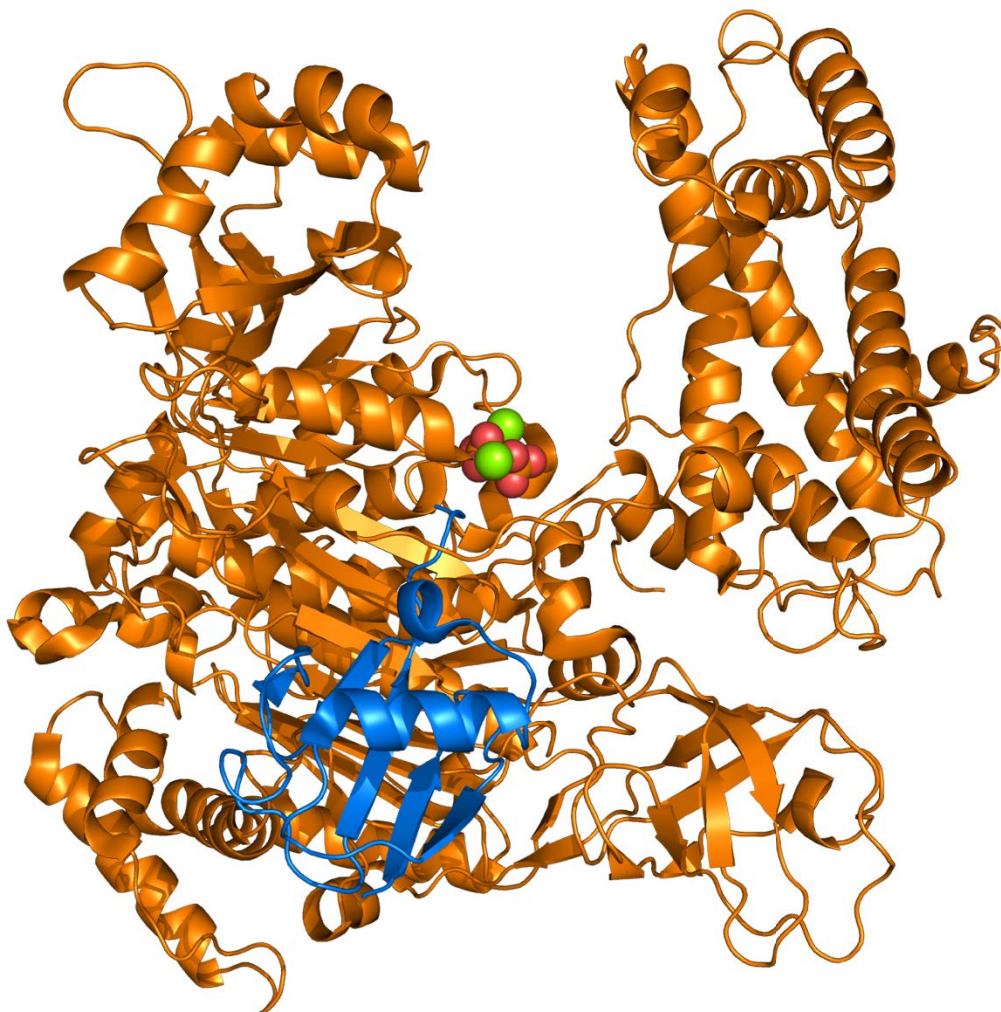
Působením ubiquitin-aktivujícího enzymu, UBA1 někdy také E1, dochází k tvorbě konjugátů ubiquitin-protein v opravné dráze FA a v dalších drahách závislých na signalizaci prostřednictvím ubiquitinů. Tento enzym o velikosti 117 kDa a délce 1058 aminokyselin katalyzuje ATP-dependentní aktivaci ubiquitinů, která spočívá v adenylaci C-koncové aminokyseliny ubiquitinů za přítomnosti  $Mg^{2+}$  iontů. Následně dochází k přenosu ubiquitinů na thiolovou skupinu cysteinu enzymu UBA1 za tvorby thioesterové vazby (viz Obrázek 4) [32,33].



Obrázek 4: Aktivace ubiquitinů pomocí ubiquitin-aktivujícího enzymu, UBA1. Vytvořeno v programu ChemDraw.

UBA1 je multidoménový enzym (Obrázek 5 na následující straně), který prochází velkými konformačními změnami k naplnění jeho funkce. Na bázi enzymu je inaktivní resp.

aktivní adenylační doména (IAD resp. AAD), které tvoří jakýsi pseudodimer sloužící jako rigidní tělo enzymu. Doména AAD váže ubiquitin, ATP a  $Mg^{2+}$  a nese adenylační aktivitu enzymu UBA1. Dále obsahuje cysteinylovou „dvoudoménu“ s katalytickým cysteinem (C632) a C-terminální doménu UFD (z angl. ubiquitin-fold domain), jež váže specificky ubiquitin-konjugující enzym E2. Promiskuita enzymu UBA1 dovoluje jeho interakci s přibližně 40 různými ubiquitin-konjugujícími enzymy E2 [34].

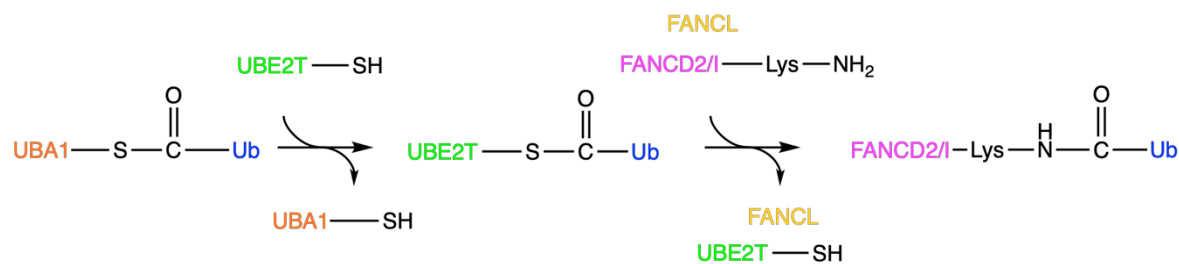


Obrázek 5: Krystalová struktura lidského ubiquitin-aktivujícího enzymu UBA1 s navázaným ubiquitinem (modře) v adenylačním místě enzymu. Identifikační PDB kód: 6dc6.

#### 2.4.2.3 Ubiquitin-konjugující enzym UBE2T

Enzym UBE2T (z angl. Ubiquitin-conjugating enzyme E2T), akceptuje ubiquitin od enzymu UBA1 a katalyzuje jeho přenos na  $\epsilon$ -aminoskupinu lysinu jiného proteinu za vzniku isopeptidové vazby (viz Obrázek 6 na následující straně). Je známo kolem 40 různých ubiquitin-konjugujících enzymů, avšak UBE2T (197 aminokyselin, 22,5 kDa, Obrázek 7,

str. 17) byl potvrzen jako specifický E2-enzym v opravné dráze FA [35]. Svoji funkci přenosu molekuly ubiquitinu na FANCD2 a FANCI vykonává za působení E3-ligasy, FANCL. Přenos molekuly ubiquitinu je ústředním krokem vedoucím k samotnému odstranění ICL z DNA [23].

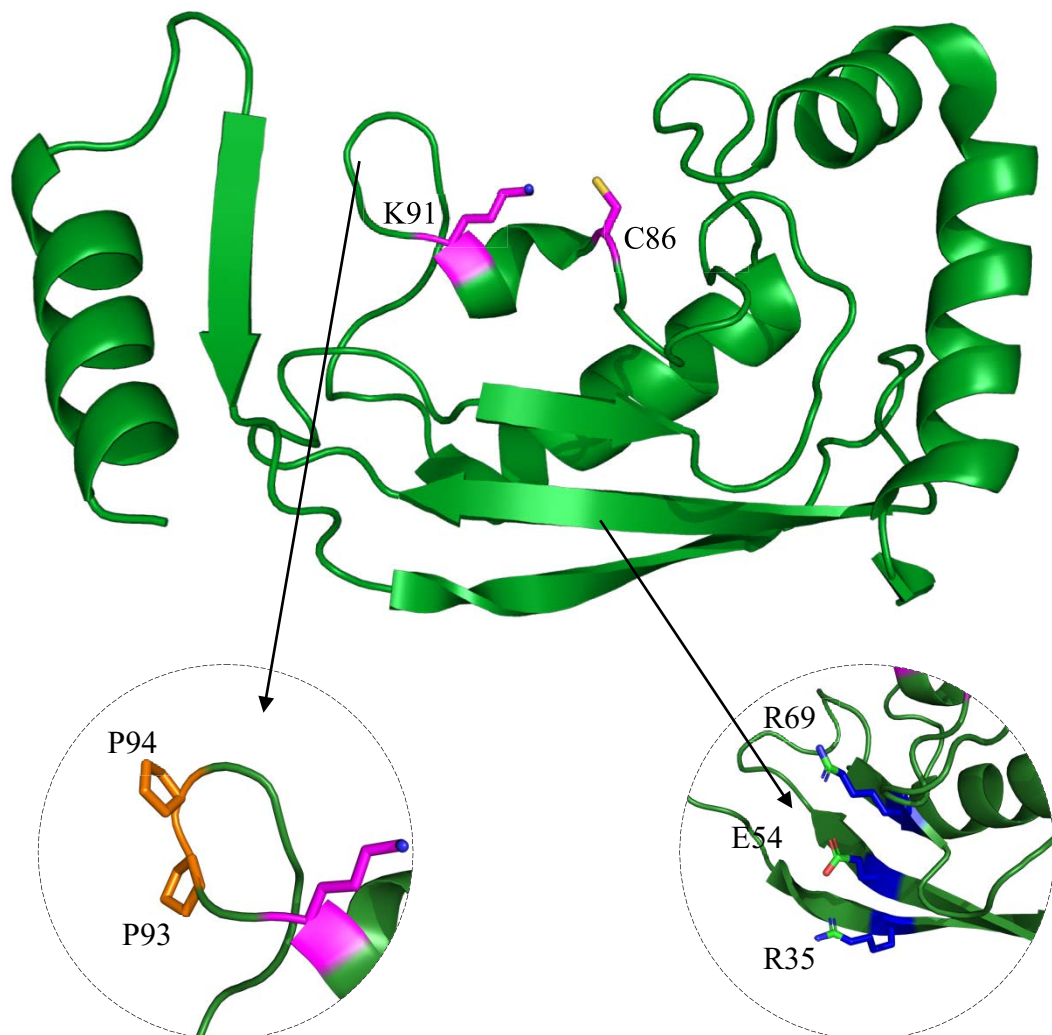


Obrázek 6: Postupný přenos ubiquitinu z UBA1, přes UBE2T až na substrát, FANCD2 resp. FANCI za pomoci E3-ligasy FANCL. Vytvořeno v programu ChemDraw.

Za přítomnosti FANCL přijímá UBE2T molekulu ubiquitinu od UBA1 za vzniku thioesterové vazby mezi C-terminální karboxylovou skupinou glycinu a thiolovou skupinou cysteinu (C86). UBE2T podléhá auto-monoubiquitinylationi na  $\epsilon$ -aminoskupině lysinu, konkrétně na K91 a dalších lysinech na C-terminálním konci. Role této auto-monoubiquitinylatione, konkrétně na K91, který je velmi blízko aktivnímu místu C86, zůstává neznámá. Nicméně auto-monoubiquitinylovaný UBE2T na K91 s delecí 18 aminokyselin na C-konci (UBE2T $\Delta$ C) není aktivním donorem ubiquitinu. Po přípravě enzymu UBE2T s mutací K91 na arginin (K91R) a nebo s delecí 18 aminokyselin na C-konci, bylo objeveno, že tento mutantní UBE2T, který není schopný auto-monoubiquitinylatione, je stále aktivní ve smyslu monoubiquitinylatione FANCD2 jak *in vivo* tak *in vitro* za přítomnosti FANCL [35,36].

UBE2T se váže na RING-doménu FANCL, tato vazba vyvolává některé lokální změny v oblasti helix\_1 – smyčky\_2 proteinu UBE2T a rovněž ve smyčkách 7 a 8, které lemují aktivní místo. Aminokyselinové zbytky v těchto posunutých oblastech (R3, L7, D32, D33, K91-K95 a D122) jsou převážně vystaveny povrchu a do značné míry konzervovány mezi homology UBE2T. Při delecí aminokyselin 92-95 dochází k narušení monoubiquitinylatione FANCD2 a FANCI. Po analýze změn v UBE2T ve vázaném a nevázaném stavu bylo objeveno, že E54 interaguje s R35 a R69 a jeho vazba se redukuje po interakci s FANCL<sup>RING</sup>. Mutací E54R bylo docíleno toho, že došlo k otevření brány tvořené E54 a monoubiquitinylační reakce FANCD2 a FANCI probíhala mnohem efektivněji [37]. Jak už bylo řečeno, při interakci UBE2T s RING-doménou FANCL, dochází k posunu smyčky 7 od aktivního místa. Smyčka 7 obsahuje aminokyseliny K91, L92, P93, P94 a K95. Dva konzervované proliny udržují rigiditu smyčky. Pokud byly tyto

proliny mutovány na glycin a E54 na arginin (E54R), bylo změnou flexibility v těchto oblastech docíleno k zvýšení aktivity o 2 až 4 násobek oproti hybridnímu UBE2T E54R. Překvapivě, prostřednictvím této hyperaktivní varianty UBE2T došlo k monoubiquitylaci FANCD2 a FANCI bez přítomnosti DNA. Tato studie prokázala, že UBE2T prochází velkými strukturálními změnami a mutací některých aminokyselin lze zásadně modifikovat jeho aktivitu [37].

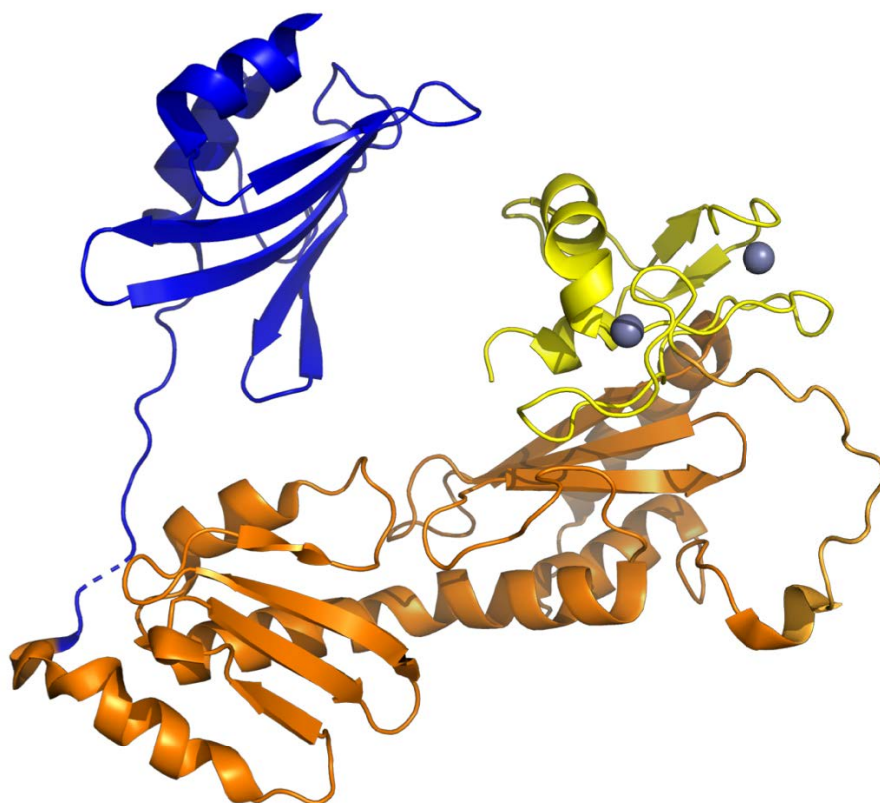


Obrázek 7: Struktura lidského ubiquitin-konjugujícího enzymu UBE2T. Ve struktuře jsou vyznačena vazebná místa pro ubiquitin, aktivní místo C86 a auto-ubiquitylační místo K91. V kruhových výřezech jsou vyznačeny aminokyseliny (E54, P93, P94), jejichž mutací byla zvýšena aktivita enzymu UBE2T [37]. UBE2T byl připraven s delecí 18 aminokyselin na C-konci [38]. Identifikační PDB kód:5ojj.

#### 2.4.2.4 FANCL („Fanconi anemia complementation group L“)

FANCL (z angl. Fanconi anemia complementation group L), o velikosti 375 aminokyselin a 42,9 kDa (z organismu *Homo sapiens*), je specifickou E3-ligasou v opravné dráze FA. Společně s dalšími proteiny je součástí FA-nukleárního komplexu, který zprostředkovává monoubiquitylaci FANCD2 za přítomnosti UBE2T, DNA a ubiquitinu. Přesto pro dostatečnou monoubiquitylaci FANCD2 *in vitro* stačí přítomnost FANCL jako E3-ligasy, FANCI, UBE2T a DNA, avšak FANCB a FAAP100, jež jsou součástí nukleárního komplexu (viz výše) a interagují s FANCL jsou třeba pro úplnou ubiquitin-ligasovou aktivitu *in vivo* [36,39,40].

Krystalová struktura enzymu FANCL (Obrázek 8, str. 19) z organismu *Drosophila melanogaster* odhalila 3 různé domény, N-terminální doménu ELF (z angl. E2-like fold), centrální doménu DRWD (z angl. double RWD-like fold) a doménu RING (z angl. really interesting new gene) [41]. Každá z domén má ve FANCL odlišnou funkci. Doména RING (301-381 aminokyselin) slouží k vazbě UBE2T. Doména DRWD (105-294 aminokyselin) obsahuje vazebné místo pro substrát, tedy FANCD2 a FANCI, přičemž doména ELF (1-104 aminokyselin) je nezbytná z hlediska nekovalentní interakce mezi ubiquitinem a FANCL. Tato interakce nicméně není potřebná pro rozpoznání nukleárního komplexu ani nezvyšuje interakci mezi FANCL a UBE2T a není důležitá pro monoubiquitylaci FANCD2 *in vitro*, ale je potřeba pro účinnou monoubiquitylaci FANCD2 *in vivo* [40–42]. RING doména ve své struktuře obsahuje tzv. motiv „zinkového prstu“ s dvěma ionty zinku vázanými v (Cys)<sub>4</sub>, His a (Cys)<sub>3</sub> uspořádání. Toto uspořádání se neliší ani ve struktuře lidské domény RING, nicméně se odlišuje od obvyklého uspořádání (Cys)<sub>3</sub>, His, (Cys)<sub>4</sub>. Doména RING obsahuje hydrofobní oblast zahrnující Ile313, Leu343, Pro365, Phe366 a konzervovaný Trp346. Tato hydrofobní oblast je exkluzivně určena pro vazbu UBE2T, což naznačuje i míra konzervovanosti této oblasti přes všechny FANCL homology. Ačkoliv lidský genom kóduje přibližně 40 různých ubiquitin-konjugujících enzymů E2, bylo prokázáno, že FANCL si přednostně pro vazbu a kooperaci v přenosu ubiquitinu vybírá UBE2T [41,43].



Obrázek 8: Krystalová struktura E3-ligasy FANCL z organismu *Drosophila melanogaster*. Modře označena doména ELF, oranžově doména DRWD a žlutě doména RING s motivem zinkového prstu s vázanými ionty  $Zn^{2+}$ . Identifikační PDB kód: 3k11.

#### 2.4.2.5 FANCD2 („Fanconi anemia complementation group D2“)

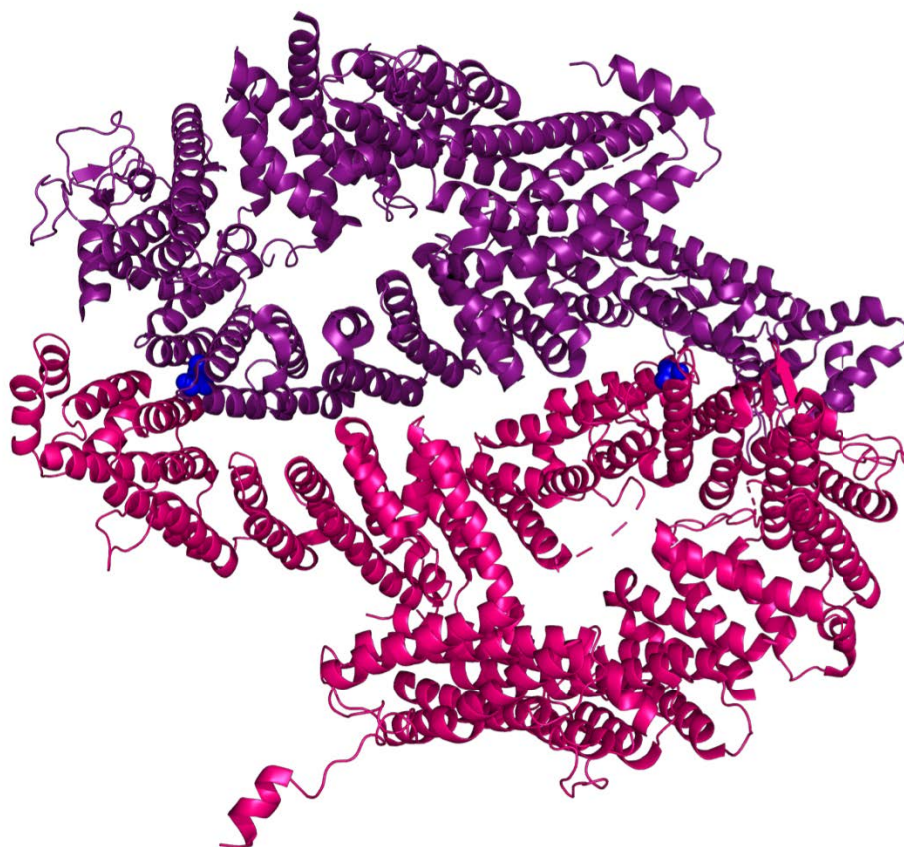
FANCD2 (z angl. Fanconi anemia complementation group D2) je protein kódovaný genem *FANCD2* [44]. FANCD2 je monoubiquitinylován v S-fázi buněčného cyklu nebo v reakci na poškození DNA zesítujícími činidly a je koncentrován ve formě nukleárních ohnisek [45]. Monoubiquitinylace FANCD2 vyžaduje přítomnost proteinu FANCI a je stimulována molekulou DNA jako vazebného substrátu [39]. Aby mohlo dojít k efektivní monoubiquitinylaci FANCD2 *in vivo*, dochází působením kinasy ATR (z angl. ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related) k fosforylaci FANCD2 na několika pozicích. Kinasa ATR se obecně chová jako proteinová kinasa, která fosforylaci proteinů koordinuje procesy opravy DNA a procesy zahrnuté v kontrolních bodech buněčného cyklu [46,47].

Dříve se uvádělo, že normální lymfoblasty exprimují dvě isoformy proteinu FANCD2, krátkou formu (FANCD2-S, 155 kDa) a dlouhou formu (FANCD2-L, 162 kDa). Isoforma 155 kDa (FANCD2-S) je primárním translačním produktem klonované cDNA FANCD2. Bylo prokázáno, že nukleární komplex FA reguluje přímo nebo nepřímo expresi

obou isoform, přičemž působením zesilujících činidel dochází k zvýšené expresi FANCD2-L. Jak se prokázalo, isoforma FANCD2-L je monoubiquitinována na lysinu 561, který je konzervován napříč organismy [45,48].

#### 2.4.2.6 FANCI („Fanconi anemia complementation group I“)

FANCI (z angl. Fanconi anemia complementation group I) je druhým substrátem FA-nukleárního komplexu a sdílí sekvenční homologii s FANCD2, která se pravděpodobně vyvíjí ze společného rodového genu. Společně s FANCD2 tvoří komplex (Obrázek 9), který se váže na chromatin jako odpověď na poškození DNA. Podobně jako FANCD2 je i FANCI monoubiquitinylován na lysinu 523 a tato ubiquitylace je simultánně důležitá pro udržení ubiquitinu vázaného na FANCD2, což nasvědčuje existenci duálního blokovacího mechanismu, který je nepostradatelný pro funkci komplexu FANCD2-FANCI. FANCI o velikosti 150 kDa a 1328 aminokyselin je taktéž jako FANCD2 fosforylován ATR-kinasou na několika místech [49,50].



Obrázek 9: Krystalová struktura komplexu FANCD2 (fialově) a FANCI (růžově) s vyznačenými vazebnými místy pro ubiquitin (modře). Identifikační PDB kód: 3s4w.

### 3 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo připravit a charakterizovat komponenty na strukturní studie mechanismů ubiquitinylation FANCD2. Prvním cílem byla příprava stabilního proteinového komplexu Ub-UBE2T, ověření jeho aktivity a charakterizace jeho interakcí s aktivní formou FANCL za účelem pozdější strukturní analýzy. Z tohoto důvodu bylo třeba připravit i zkrácené varianty FANCL a ověřit jejich aktivitu. Součástí této práce je i příprava mutantních variant UBE2T, které by byly užitečné v rámci komplexní interakční analýzy s jeho vazebnými partnery.

Dosažení tohoto cíle zahrnovalo dílčí kroky:

- příprava a izolace proteinového komplexu Ub-UBE2T
- příprava expresního vektoru pro bakteriální expresi zkrácených variant FANCL
- bakteriální exprese a izolace zkrácených variant FANCL
- ověření aktivity proteinového komplexu a charakterizace interakce Ub-UBE2T s aktivní zkrácenou variantou FANCL
- příprava expresních vektorů mutantních variant UBE2T
- bakteriální exprese a izolace mutantních variant UBE2T
- ověření aktivity mutantů UBE2T

## 4 Materiál

### 4.1 Použité přístroje

Analytické váhy	<i>Adventurer Pro, Ohaus</i>
Aparatura a zdroj pro horizontální elektroforesu	<i>EV 231, Consort</i>
Aparatura pro vertikální elektroforesu	<i>Mini-PROTEIN Tetra Systém, Bio-Rad</i>
Bloková lázeň	<i>SBH130D, Stuart</i>
Centrifugy	<i>Centrifuge 5415 R, rotor F54-24-11, Eppendorf</i> <i>Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-1, Eppendorf</i> <i>Allegra X-15 R Centrifuge, Beckman Coulter</i> <i>Avanti J-26S XPI, rotor JLA-9.1000, Beckman Coulter</i> <i>Avanti J30I, rotor JA 30.50, Beckman Coulter</i>
FPLC-systém	<i>ÄKTA purifier 10, GE Healthcare Life Sciences</i>
Inkubátor	<i>Innova 44, Incubator Shaker Series, New Brunswick Scientific</i> <i>IPP 400, Memmert</i> <i>Incubating Mini Shaker, VWR</i>
Kolona pro afinitní chromatografii	<i>HisTrap<sup>TM</sup> HP 1 ml, GE Healthcare Life Sciences</i>
Kolona pro iontovou chromatografii	<i>Q HP 5 ml, GE Healthcare Life Sciences</i>
Kolona pro odsolení proteinů	<i>Desalting 26/10, GE Healthcare Life Sciences</i>
Kolony pro gelovou chromatografii	<i>Superdex 75 16/600 GL, Superdex 200 16,600 GL, Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare Life Sciences</i>
Koncentrátory	<i>Amicon® Ultra 30K, Amicon® Ultra 3K, Millipore Ireland Ltd.</i>
Magnetická míchačka	<i>ARE, VELP</i>

Mikrospektrofotometr	<i>Spectrophotometer ND-1000, Nanodrop</i>
pH metr	<i>HI 3200 pH/ORP Meter, HANNA instrument</i>
Předvážky	<i>EMB 500-1 Kern</i>
Rotátor	<i>TubeRoller, Benchmark</i>
Sonikátor	<i>Bandelin Sonopro</i>
Termocykler	<i>Professional TRIO Thermocycler, Biometra Product Line</i>
UV-fotoaparát	<i>QUANTUM ST4-1100, Vilbert Lourmat</i>
Vodní lázeň	<i>JB Aqua 2 Plus, Grant</i>
Vortex	<i>Gene 2, Scientific Industries</i>
Zdroj pro vertikální elektroforesu	<i>PowerPac Basic, Bio-Rad</i>

## 4.2 Použité chemikálie

Agarosa	<i>Agarosa SERVA pro DNA elektroforézu, SERVA</i>
Akrylamid, bisakrylamid	<i>Rotiphorese gel 30 (37,5:1), Carl Roth</i>
Ampicilin	<i>Carl Roth</i>
ATP	<i>Sigma-Aldrich</i>
Coomassie Brilliant Blue G 250	<i>Sigma-Aldrich</i>
EDTA (ethylendiamin tetraoctová kyseliny)	<i>Carl Roth</i>
Ethidium bromid	<i>Carl Roth</i>
Gibson mix	<i>New England BioLabs</i>
HCl	<i>PENTA</i>
IGEPAL CA-630 (NP-40)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ni-NTA agarosa	<i>Protino</i>
Peroxodisíran amonný	<i>Carl Roth</i>
SDS	<i>Carl Roth</i>
Standard pro elektroforesu DNA	<i>Gene Ruler<sup>TM</sup> 1kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific</i>

Standard pro elektroforesu proteinů	<i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder</i> <i>10-250 kDa, Thermo Scientific</i>
TCEP	<i>Thermo Scientific</i>
TEMED	<i>Carl Roth</i>
Tris-HCl	<i>Carl Roth</i>
β-merkapt ethanol	<i>Sigma-Aldrich</i>

#### 4.2.1 Roztoky, pufrы a média

Tabulka 1: Pufrы pro afinitní chromatografii

Eluční pufr pro Ub-UBE2TΔC	20 mM Tris pH 8,0; 0,25 M NaCl; 0,3 M imidazol pH 8,0; 2 mM β-merkapt ethanol; 10% (v/v) glycerol
Eluční pufr pro UBE2TΔC	20 mM Tris pH 8,0; 0,35 M NaCl; 10 mM glutathion; 2 mM β-merkapt ethanol; 10 % (v/v) glycerol
Eluční pufr pro varianty FANCL	0,1 M Tris pH 8,0; 0,5 M NaCl; 0,3 M imidazol pH 8,0; 10 % (v/v) glycerol, 0,5 mM TCEP
Promývací pufr pro Ub-UBE2TΔC	20 mM Tris pH 8,0; 0,25 M NaCl; 2 mM β-merkapt ethanol
Promývací pufr pro UBE2TΔC	20 mM Tris pH 8,0; 0,35 M NaCl; 2 mM β-merkapt ethanol; 10 % (v/v) glycerol
Promývací pufr pro varianty FANCL	0,1 M Tris pH 8,0; 0,5 M NaCl; 20 mM imidazol pH 8,0; 10 % (v/v) glycerol, 0,5 mM TCEP

Tabulka 2: Pufrы pro gelovou chromatografii

Ub-UBE2TΔC	10 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl
UBE2TΔC	20 mM Tris pH 8,0; 0,35 M NaCl; 2 mM β-merkapt ethanol; 10 % (v/v) glycerol
Zkrácené varianty FANCL	0,1 M Tris pH 8,0; 0,5 M NaCl; 10 % (v/v) glycerol, 0,5 mM TCEP

Tabulka 3: Pufrы pro ionexovou chromatografii

Pufr pro ionexovou chromatografii FANCL – eluční	20 mM Tris pH 8,0; 1 M NaCl; 10 % (v/v) glycerol; 1 mM TCEP
Pufr pro ionexovou chromatografii FANCL – promývací	20 mM Tris pH 8,0; 50 mM NaCl; 10 % (v/v) glycerol; 1 mM TCEP

Tabulka 4: Reakční pufrы a pufrы pro „pull-down“ analýzu

Pufr pro „pull-down“ analýzu – eluční	20 mM Tris pH 8,0; 50 mM NaCl; 0,3 M imidazol pH 8,0; 10 % (v/v) glycerol; 1 mM TCEP
Pufr pro „pull-down“ analýzu – promývací	20 mM Tris pH 8,0; 50 mM NaCl; 10 mM imidazol pH 8,0; 10 % (v/v) glycerol; 1 mM TCEP
Reakční pufr pro monoubiquitinylaci FANCD2/FANCI	20 mM Tris pH 8,0; 20 mM NaCl; 10 % (v/v) glycerol; 1 mM TCEP
Reakční pufr pro produkci Ub-UBE2TAC	20 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM TCEP; 10 % (v/v) glycerol

Tabulka 5: Ostatní pufrы, roztoky a média

CBB barvicí roztok	3 mM Coomassie Brilliant Blue R250, 1,5 M CH <sub>3</sub> COOH
LB agar podle Lennoxе	P-Lab
LB médium podle Lennoxе	P-Lab
Ligační pufr	10× T4 DNA Ligase buffer, Thermo Scientific
Nanášecí pufr pro elektroforesu DNA	6× DNA Loading Dye, Thermo Scientific
Pufr pro SDS elektroforesu (Tris-glycinový pufr)	25 mM Tris NaCl, 0,25 M glycin 0,1 % (w/w) SDS, pH 8,8
Sada pro purifikaci DNA	QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen
TAE pufr	40 mM Tris, 20 mM CH <sub>3</sub> COOH, 1 mM EDTA, pH 8,0
Vzorkový pufr 5×	60 mM Tris pH 6,8, 25 % (v/v) glycerol, 2,9 % (w/w) SDS, 0,1 % (v/v) bromfenolová modř, 714 mM β-merkaptоethanol
ZY médium	1 % (w/v) tryptom, 0,5 % (w/v) kvasniční extrakt, 2,8 mM glukosa, 6 mM laktosa, 0,5 % (v/v) glycerol, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

## 4.2.2 Enzymy

Gibson mix	New England BioLabs
proteasa 3C PreScission	připravena v laboratoři
proteasa TEV	připravena v laboratoři
proteasa SUMO	připravena v laboratoři
Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix	New England BioLabs
T4 DNA ligasa	Thermo Scientific

## 4.2.3 Složení gelů pro SDS-PAGE

Zaostřovací	125 mM Tris-HCl pH 6,8 4 % (v/v) Akrylamid/Bisakrylamid (37,5 : 1) 0,1 % (w/v) SDS 0,005 % (v/v) TEMED 0,05 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
Separáční	375 mM Tris-HCl pH 8,8 15 % (w/v) Akrylamid/ Bisakrylamid (37,5 : 1) 0,1 % (w/v) SDS 0,001 % (v/v) TEMED 0,05 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

#### 4.2.4 Použité sekvence primerů pro přípravu konstruktů

Primer dle směru replikace	Sekvence (5'-3')
FANCL DRWD „forwardní“	CTCACCGCGAACAGATTGGTGGATCCTTCTGCAAAGA CCTTCTTACTG
FANCL DRWD „reversní“	GTAGGCCTTTGAATTCCGGATCAAACATCTTTCAAATT TTGTAACAGAC
FANCL RING „forwardní“	CTCACCGCGAACAGATTGGTGGATCCTTAGAA ATTGATTTCCCAGCTCGTAG
FANCL RING „reversní“	GTAGGCCTTTGAATTCCGGATCAAGGTTTTCT CCCAGACATTTTCAAGG
pSUMO „forwardní“	TCCGGAATTCAAAGGCCTAC
pSUMO „reversní“	TCCACCAATCTGTTTCGCG
UBE2TΔC E54R „forwardní“	GTTATCATTCCTGAGAGGTACCC
UBE2TΔC E54R „reversní“	TCGTAGCTTAAAAACACCTTTCTCATAAG
UBE2TΔC K91A „forwardní“	GCTTTGCCACCAAAGGTGCTTGG
UBE2TΔC K91A „reversní“	GAGAACATCCAGACAAATCCTTCCAGC
UBE2TΔC K91RP93GP94G „forwardní“	AAATTGGGAGGAAAAGGTGCTTGGAGACCATCC

## 5 Metody

### 5.1 Příprava vektorů pro bakteriální expresi

#### 5.1.1 Příprava konstruktů DNA

Expresní konstrukt pro ubiquitin a UBE2T $\Delta$ C byl již v naší laboratoři připraven. DNA vektoru pSUMO (viz Přílohy, str. 65) a zkrácených variant E3-ligasy FANCL (FANCL<sup>DRWD</sup>, FANCL<sup>RING</sup>, FANCL<sup>DRWD-RING</sup>) byla získána pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR). PCR reakční směs byla připravena dle Tabulky 6. Časové a teplotní podmínky jednotlivých kroků PCR jsou uvedeny v Tabulce 7 resp. Tabulce 8 na následující stránce.

Tabulka 6: Složky reakční směsi pro PCR

Reagencie	Množství
Templátová DNA	1 ng
10 $\mu$ M „forwardní“ primer	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M „reversní“ primer	1 $\mu$ l
Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix	10 $\mu$ l
MilliQ H <sub>2</sub> O	8 $\mu$ l

Tabulka 7: Časové a teplotní podmínky PCR pro přípravu zkrácených variant FANCL

Počet cyklů	Teplota / °C	Čas
1	98	30 s
32	98	15 s
	60	15 s
	72	40 s
1	70	2 min

Tabulka 8: Reakční podmínky PCR pro přípravu vektoru pSUMO

Počet cyklů	Teplota / °C	Čas
1	98	30 s
32	98	15 s
	55	15 s
	72	3 min
1	70	2 min

### 5.1.2 Cílená mutagenese konstruktů UBE2TΔC

Mutace K91A, K91R P93G P94G a E54R byly do konstruktů UBE2TΔC vneseny pomocí metody PCR za užití primerů uvedených v kap. 4.2.4, str. 27. Reakční směs byla připravena dle Tabulky 9. Reakční podmínky PCR jsou uvedeny v Tabulce 10 na následující stránce. Jako templátová DNA pro mutaci E54R byla použita DNA s mutací K91R P93G P94G. „Forwardní“ primer nesl triplet pro danou mutaci a „reversní“ obsahoval na svém 5' konci fosfát pro zacyklení linearizovaného plasmidu. Všechny formy UBE2TΔC byly v pGEX vektoru (viz Přílohy, str. 65) nesoucí fúzní gen pro glutathion-S-transferasovu (GST) za účelem afinitní chromatografie a sekvenci pro β-laktamasu, jež zajišťuje resistenci na ampicilin.

Tabulka 9: Složení reakční směsi pro cílenou mutagenesi

Reagencie	Množství
Templátová DNA	1 ng
10 μM „forwardní“ primer	1 μl
10 μM „reversní“ primer	1 μl
Q5 High-Fidelity Master Mix	10 μl
MilliQ H <sub>2</sub> O	8 μl

Tabulka 10: Reakční podmínky PCR

Počet cyklů	Teplota / °C	Čas
1	98	30 s
32	98	15 s
	63*	15 s
	72	3 min
1	70	2 min

Poznámka: \* Nasedací teplota primerů při přípravě mutantu E54R,K91R,P93G,P94G byla 59 °C.

### 5.1.3 Horizontální agarosová elektroforesa

Produkty PCR byly analyzovány pomocí horizontální agarosové elektroforesy. Na 1% agarosový gel obsahující 0,02% ethidium bromid byly naneseny vždy 2 µl vzorku smíchaného s 6x koncentrovaným vzorkovým pufrům (6× Loading Dye). Pro standardizaci produktů PCR byly na gel naneseny rovněž 2 µl standardu GeneRuler. Elektroforesa proběhla v pufru TAE 12 minut při napětí 300 V. Elektroforeticky separovaná DNA byla vizualizována prostřednictvím UV-fotoaparátu QUANTUM ST4-1100.

### 5.1.4 Izolace produktu PCR

Produkt PCR byl ředěn trojnásobným množstvím pufru PB a purifikován adsorpcí na silikagelovou mikrokolonku dle pokynů pro použití komerční soupravy QIAquick PCR Purification Kit [51]. Následně byly odstraněny nečistoty promytím pufrům PE a DNA eluována pufrům TE (zmíněné pufry jsou součástí komerční soupravy QIAquick PCR Purification Kit).

### 5.1.5 Gibsonovo klonování

Genová DNA byla vložena do vektoru pSUMO pomocí tzv. Gibsonova klonování (z angl. Gibson Assembly) [52]. Reakční směs byla připravena dle Tabulky 11 na následující straně. Genová DNA a vektor byly ligovány za časových a teplotních podmínek uvedených v Tabulce 12 na následující straně.

Tabulka 11: Složení ligační směsi

Reagencie	V / $\mu\text{l}$
Gibson mix	7
Vektor	1,25
Genová DNA	1,25

Tabulka 12: Časové a teplotní podmínky ligace

Teplota / $^{\circ}\text{C}$	Čas /min
50	15
55	15
60	15

### 5.1.6 Ligace mutantních variant UBE2TAC

Získané produkty PCR z kap.5.1.2 str. 29 byly pomocí ligační reakce „zacykleny“. Ligační směs byla připravena dle Tabulky 13 a inkubována 1 hodinu za laboratorní teploty.

Tabulka 13: Složení ligační směsi

Reagencie	V / $\mu\text{l}$
Produkt PCR	3
Ligační pufr (10 $\times$ )	1
T4 DNA ligasa	1
MilliQ H <sub>2</sub> O	5

### 5.1.7 Transformace kompetentních bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$

Na ledu byl smísen 1  $\mu\text{l}$  ligační směsi s 20  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze kompetentních bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$  a vše bylo inkubováno na ledu po dobu 10 minut. Následně byly buňky vystaveny teplotnímu šoku 42  $^{\circ}\text{C}$  45 sekund. Po 2-minutové inkubaci bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  LB média a buňky byly kultivovány 1 hodinu při 37  $^{\circ}\text{C}$ . Za aseptických podmínek byla bakteriální suspenze následně nanášena na Petriho misku s LB agarem obsahujícím 100  $\mu\text{g/ml}$  ampicilinu a inkubován přibližně 12 hodin při 37  $^{\circ}\text{C}$ .

### 5.1.8 Minipreparace plasmidové DNA

Kolonie, jež vyrostly na povrchu agarové plotny, byly jednotlivě přeneseny do 2 ml LB média s koncentrací ampicilinu 100 µg/ml. Bakteriální kultura byla inkubována za stálého míchání přibližně 12 hodin při 37 °C a následně odstředěna 10 minut při 4000 g (Allegra X-15 R). DNA byla separována na základě alkalické lýzy buněk a adsorpce DNA na silikagelovou mikrokolonku s následným promytím a elucí DNA. Izolace proběhla dle pokynů výrobce použité komerční soupravy QIAprep SpinMiniprep Kit [51].

### 5.1.9 Sekvenování plasmidové DNA

K ověření, zda-li je daný klon tzv. specifický, tedy nese genovou DNA, byla využita Sangerova metoda sekvenování firmou GATC Biotech. Reakční směs byla připravena dle Tabulky 14.

Tabulka 14: Složení sekvenační směsi

Reagencie	Množství
Plasmidová DNA	500 ng
10 µM primer	5 µl

## 5.2 Bakteriální exprese

### 5.2.1 Exprese rekombinantního proteinu v buňkách

Pro bakteriální expresi zkrácených variant FANCL byly chemicky kompetentní buňky bakteriálního kmene *E. coli* BL21 (DE3) STAR [pro expresi UBE2T a UBE2TΔC byl použit bakteriální kmen *E. coli* BL21 (DE3) NiCo] transformovány analogickým způsobem jako v kapitole 5.1.7. Po provedení teplotního šoku a 1-hodinové inkubaci v 200 µl LB média byly buňky přeneseny na Petriho misku s příslušným antibiotikem a po dobu přibližně 12 hodin inkubovány při 37 °C. Buňky z jedné kolonie byly přeneseny do 2 ml LB média s ampicilinem o finální koncentraci 100 µg/ml (pro zkrácené varianty FANCL, UBE2T a UBE2TΔC) a inkubovány přibližně 12 hodin v třepačce za stálého míchání (220 RPM) přibližně 12 hodin. Takto připraveným bakteriální inokulem byl zaočkován 1 l ZY-autoindukčního média s ampicilinem o konečné koncentraci 100 µg/ml. Kultivace probíhala při 37 °C za stálého míchání (220 RPM). Při absorbanci přibližně 0,6

byla teplota snížena na 18 °C a bakterie byly inkubovány dalších 12 hodin. Při snížení teploty bylo k bakteriím exprimujícím zkrácené varianty FANCL s přítomnou RING doménou přidán 1 ml 50 mM roztoku ZnSO<sub>4</sub>.

## **5.2.2 Izolace a purifikace proteinu**

### **5.2.2.1 Zpracování bakteriální kultury**

Bakteriální kultura, jejíž příprava probíhala dle předchozího odstavce byla odstředěna v litrových kyvetách 6 minut při 5000 g a 4 °C v centrifuze Beckman Coulter Avanti J-26S XPI. Supernatant byl slit a peleta zmrazena na -80 °C nebo resuspendována ve vychlazeném promývacím pufru (složení pufru viz kap. 4.2.1, str. 24) a homogenizována na ledu homogenizátorem podle Dounceho. Bakterie byly lyzovány pomocí sonikátoru Bandelin sonopro 3 × 20 s na ledu. Získaný lyzát byl centrifugován 25 min při 30 000 g a 4 °C v centrifuze Beckman Coulter Avanti J-30I .

### **5.2.2.2 Afinitní chelatační chromatografie pomocí histidinové kotvy**

Zkrácené varianty FANCL byly izolovány s využitím histidinové kotvy. Pro jejich purifikaci byla využita Ni-NTA agarosa. K supernatantu, který byl získán postupem uvedeným v kap 5.2.2.1, byly přidány 3 ml vodou promyté a promývacím pufrem ekvilibrované Ni-NTA agarosy (složení pufru kap. 4.2.1, str. 24). Agarosa byla inkubována po dobu 45 minut při teplotě 4 °C za stálého míchání na rotátoru TubeRoller. Po inkubaci byla suspenze odstředěna centrifugací 2 minuty při 500 g a 4 °C (centrifuga Beckman Coulter Allegra X-15R). Supernatant byl slit a agarosa resuspendována v asi 50 ml promývacího pufru a suspenze znovu odstředěna. Tento proces byl opakován třikrát, v posledním kroku byla agarosa nanášena na 15ml kolonu a protein byl eluován 5 ml elučního pufru (složení pufru viz kap. 4.2.1, str. 24).

### **5.2.2.3 Afinitní chromatografie pomocí glutathion-S-transferasy**

UBE2T a UBE2TΔC byly exprimovány jako fúzní proteiny značené glutathion-S-transferasou (GST). Purifikace postupovala analogicky jako ve výše uvedené kapitole, nicméně místo Ni-NTA agarosy byla použita glutathion-agarosa. Eluce probíhala za použití glutathionu jako elučního činidla (složení elučního a promývacího pufru viz kap. 4.2.1, str. 24).

#### **5.2.2.4 Štěpení GST-značky 3C PreScission proteasou**

Pro odstranění GST-značky bylo k izolovanému proteinu přidáno 300  $\mu$ l 3C-proteasy o koncentraci 20 mg/ml. Štěpení GST-značky probíhalo při 4 °C přibližně 24 hodin. Průběh štěpení byl sledován prostřednictvím diskontinuální elektroforesy v denaturačním prostředí viz kap. 5.2.2.6.

#### **5.2.2.5 Reversní afinitní chromatografie pro odstranění GST-značky**

Pro úplné odstranění GST-značky ze vzorku, byl proteinový vzorek odstředěn centrifugací 5 minut při 5000 g na centrifuze Beckman Coulter Allegra X-15R a nanesen na ekvilibrovanou kolonu GSTrap 1 ml. Po navázání vzorku na kolonu byl aplikován gradient pufru, který dosáhl 100 % po 15 minutách. Chromatografický proces byl prováděn na purifikačním systému ÄKTA purifier 10. Eluované frakce byly automaticky sbírány sběračem frakcí po 1,5 ml. Vývoj chromatografie byl pozorován prostřednictvím spektrofotometrického profilu měřeného při 254 a 280 nm. Frakce odpovídající přítomnosti proteinu byly podrobeny elektroforetické analýze.

#### **5.2.2.6 Diskontinuální elektroforesa v denaturačním prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)**

Pro analýzu proteinových vzorků byla aplikována metoda SDS-PAGE, což je metoda využívána k separaci proteinů v polyakrylamidovém gelu na základě jejich velikosti. Vzorky pro elektroforetickou analýzu byly smíchány s 5 $\times$  koncentrovaným vzorkovým pufrům (složení viz kap. 4.2.1 str. 24). Vzorky společně s 2,5  $\mu$ l standardu (PageRuler) byly nanesený na polyakrylamidový gel připravený z 4% zaostřovacího a 15% separačního gelu (složení viz kap. 4.2.1, str. 24). Elektroforesa probíhala v elektroforetickém pufru (složení viz kap. 4.2.1, str. 24) přibližně 50 minut při stálém napětí 220 V ve vertikálním uspořádání. Pro detekci separovaných proteinů byl polyakrylamidový gel obarven v roztoku Comassie Brilliant Blue (složení viz kap. 4.2.1, str. 24) a následně odbarven v destilované vodě.

#### **5.2.2.7 Koncentrování proteinu**

V závislosti na relativní molekulové hmotnosti purifikovaných proteinů byl protein koncentrován na požadovaný objem centrifugací v koncentrátoru AmiconUltra 30K resp. 3K na centrifuze Beckman Coulter Allegra X-15R při 3500 g.

#### **5.2.2.8 Chromatografie zkrácených variant FANCL na iontoměničích**

Vzorek proteinu byl odstředěn centrifugací 5 minut při 5000 g na centrifuze Beckman Coulter Allegra X-15R. Vzorek byl následně nanesen na ekvilibrovanou kolonu Q HP 5 ml (aniontový iontoměnič). Složení pufrů je uvedeno v kap 4.2.1, str. 24. Pokud se vzorek proteinu nacházel v roztoku s vysokou koncentrací NaCl, byl před ionexovou chromatografií odsolen pomocí odsolovací kolony (kolona Desalting 26/10). Po navázání proteinu na kolonu byl vzorek eluován gradientem elučního pufru, který dosáhl 100 % za 120 minut. Eluční objem byl sbírán po 1ml frakcích automatickým sběračem frakcí. Vybrané frakce vykazující absorbanci byly analyzovány separací na 15% polyakrylamidovém gelu.

#### **5.2.2.9 Gelová permeační chromatografie proteinů**

Vzorek proteinu byl odstředěn centrifugací 5 minut při 5000 g na centrifuze Beckman Coulter Allegra X-15R. Vzorek byl následně nanesen na ekvilibrovanou kolonu Superdex 75 16/600 GL nebo Superdex 200 16/600 GL. Chromatografický proces byl prováděn na purifikačním systému ÄKTA purifier 10. Eluované frakce byly automaticky sbírány sběračem frakcí po 1,5 ml. Vývoj chromatografie byl pozorován prostřednictvím spektrofotometrického profilu měřeného při 254 a 280 nm. Frakce odpovídající přítomnosti proteinu byly podrobeny elektroforetické analýze.

#### **5.2.2.10 Štěpení fúzního proteinu HisSUMO SUMO-proteasou**

Pro ověření, zda-li byl získán FANCL<sup>DRWD-RING</sup>, bylo 20 µl vzorku získaného gelovou permeační chromatografií štěpeno 1 µl SUMO-proteasy o koncentraci 3 mg/ml. Směs byla ředěna vodou do objemu 40 µl a ponechána 3 hodiny při laboratorní teplotě. Průběh štěpení byl elektroforetický analyzován.

### **5.3 Produkce komplexu Ub-UBE2TΔC**

Pro přípravu komplexu a stanovení optimálních reakčních podmínek Ub-UBE2TΔC byla měřena absorbance všech proteinových komponent reakční směsi (viz Tabulka 15 na následující straně) a použitím Lambert-Beerova zákona zjištěna koncentrace proteinů. Roztoky proteinů byly následně smíchány a přidáním reakčního pufru (složení viz kap. 4.2.1, str. 24) ředěny na požadovanou koncentraci. Po vytemperování na laboratorní teplotu byl přidán roztok ATP na konečnou koncentraci 0,5 mM. Průběh reakce byl elektroforetický analyzován.

Tabulka 15: Složky reakční směsi pro tvorbu komplexu Ub-UBE2TΔC

Reagencie	Finální koncentrace
UBA1	0,1 μM
UBE2TΔC	8 μM
His-Ub	20 μM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
ATP	0,5 mM

UBA1 a His-Ub byl připraven školitelem.

### 5.3.1 Izolace komplexu Ub-UBE2TΔC

#### 5.3.1.1 Afinitní chelatační chromatografie komplexu Ub-UBE2TΔC

Po 6 hodinách mohla být reakce, z kap 5.3. na předchozí straně, zastavena přidáním roztoku EDTA na konečnou 5 mM koncentraci. Nicméně tento způsob terminace by do izolačního procesu zanesl další purifikační krok ve formě odstranění chelatačního činidla odsolením reakční směsi, proto byla reakce zastavena šokovým zmrazením na -80 °C nebo byla odstředěna centrifugací při 5000 g po dobu 5 minut (centrifuga Beckman Coulter Allegra X-15R) a nejlépe ihned nanesa na ekvilibrovanou kolonu (HisTrap 1 ml) na purifikačním systému ÄKTA purifier 10 (složení ekvilibračního pufru viz kap. 4.2.1, str. 24). Po navázání směsi na kolonu byl pro eluci komplexu aplikován 100% gradient pufru s 300 mM imidazolem (složení kap. 4.2.1, str. 24), který svého vrcholu dosáhl po 40 minutách. Eluční objem byl sbírán po 1,5ml frakcích automatickým sběračem frakcí. Vybrané frakce vykazující absorbanci byly analyzovány separací na 15% polyakrylamidovém gelu.

#### 5.3.1.2 Štěpení histidinové kotvy TEV-proteasou

Vybrané frakce obsahující komplex Ub-UBE2TΔC byly spojeny a histidinová kotva přítomná na N-konci ubiquitinu byla štěpena přidáním 200 μl TEV-proteasy o koncentraci 4 mg/ml. Enzymatická digesce probíhala při 4 °C přibližně 38 hodin. Průběh štěpení byl sledován prostřednictvím elektroforetické analýzy na polyakrylamidovém gelu (viz kap.5.2.2.6, str. 34).

### **5.3.1.3 Reversní afinitní chelatační chromatografie komplexu Ub-UBE2TAC**

Po štěpení histidinové kotvy byl roztok proteinového komplexu odstředěn centrifugací 5 minut při 5000 g na centrifuze Beckman Coulter Allegra X-15R. Proteinový komplex byl následně nanesen na „tandemové“ uspořádání promývacím pufrem ekvilibrované odsolovací kolony (Desalting 26/10) a kolony HisTrap 1 ml (složení promývacího pufru viz kap. 4.2.1, str. 24). Po průtoku 31 ml pufru byla odpojována odsolovací kolona a na kolonu HisTrap 1 ml byl aplikován 100% gradient pufru s 300 mM imidazolem, který dosáhl vrcholu po 40 minutách a byly sbírány eluované frakce. Průběh chromatografie byl sledován měřením absorbance při 254 a 280 nm. Frakce vykazující absorbanci na spektrofotometrickém profilu byly analyzovány prostřednictvím elektroforesy.

### **5.3.1.4 Gelová permeační chromatografie komplexu Ub-UBE2TAC**

Finálním purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie. Proteinový komplex byl koncentrován v koncentrátoru AmiconUltra 3K na objem 1 ml (dle 5.2.2.7, str. 34), následně byl proteinovým komplexem analogickým postupem jako v kap. 5.2.2.9 na str. 35 nanesen na ekvilibrovanou kolonu Superdex 75 Increase 10/300 GL (složení ekvilibračního pufru kap. 4.2.1, str. 24) a přečištěn. Získaný proteinový komplex byl koncentrován a uchováván při -80 °C.

## **5.4 Interakční analýza FANCL**

Pro studium protein-proteinových interakcí *in vitro* byla zvolena „Pull-Down“ analýza. 20 µl ekvilibrované Ni-NTA agarosy bylo smícháno v promývacím pufru (složení viz kap. 4.2.1, str. 24) se zkrácenou variantou FANCL do finální 5 µM koncentrace a s UBE2TAC resp. proteinovým komplexem Ub-UBE2TAC na finální 5 µM koncentraci. Po 60 minutách inkubace při teplotě 4 °C byla suspenze odstředěna centrifugací při 15000 g na centrifuze Eppendorf Centrifuge 5415 R. Supernatant byl dekantován a agarosa resuspendována v promývacím pufru. Tento postup byl opakován třikrát. Poté byl pelet resuspendován ve 40 µl elučního pufru (složení kap. 4.2.1, str. 24) a po centrifugaci byla eluovaná frakce analyzována pomocí SDS-PAGE.

## 5.5 Monoubiquitinylační reakce FANCD2 a FANCI

Pro zjištění koncentrace složek reakční směsi byla měřena absorbance všech složek a pomocí Lambertova-Beerova zákona vypočtena koncentrace proteinů. Jelikož monoubiquitinylace FANCD2 a FANCI probíhá za přítomnosti DNA, byla měřena i její absorbance a vypočtena koncentrace. Roztoky proteinů byly následně smíchány a ředěny na požadovanou koncentraci reakčním pufrem (složení viz kap. 4.2.1, str. 24). Nejdříve byl připraven alikvot, kde byly ředěny FANCD2, FANCI a DNA v poměru 1:1:2, této směsi bylo do reakční směsi pipetováno vždy 15  $\mu$ l. Finální objem reakce byl vždy 30  $\mu$ l. Konečná koncentrace všech složek reakční směsi je uvedena v Tabulce 16. Reakce byla zahájena přidáním ATP na finální 1 mM koncentraci a ponechána inkubovat při laboratorní teplotě. Průběh reakce byl elektroforeticky analyzován.

Tabulka 16: Složky reakční směsi monoubiquitinylační reakce a finální koncentrace reagensů ve směsi

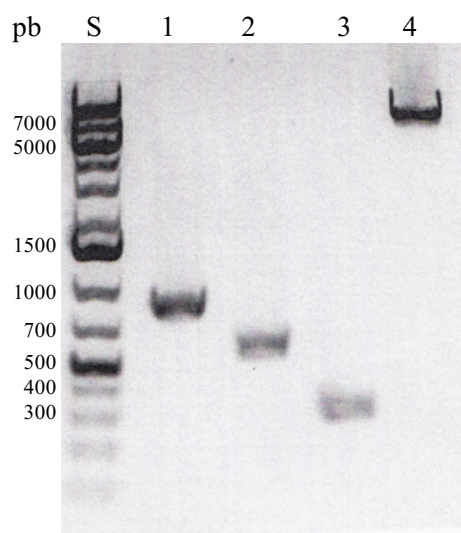
Reagencie	Koncentrace / $\mu$ M
UBA1	0,1
UBE2T	1
BL100 / FANCL <sup>DRWD-RING</sup>	0,15
HisSUMO ubiquitin	20
FANCD2	1
FANCI	1
DNA	2
MgCl <sub>2</sub>	4
ATP	1

Proteiny FANCD2 a FANCI byly získány od kolegyně Bc. Kateřiny Krejčové. DNA, ubiquitin s vázaným proteinem SUMO s histidinovou kotvou a proteinový komplex BL100, který vykazuje E3-ligasovou aktivitu, byly připraveny školitelem.

## 6 Výsledky

### 6.1 Příprava vektorů pro bakteriální expresi zkrácených variant FANCL

Geny pro zkrácené varianty FANCL, FANCL<sup>DRWD</sup>, FANCL<sup>DRWD-RING</sup>, FANCL<sup>RING</sup> a vektor pSUMO, byly získány pomocí metody PCR z dostupného templátu za použití primerů uvedených v kap. 4.2.4, str. 27. Templátová DNA byla získána od Dr. K. J. Patela z laboratoře MRC Laboratory of Molecular Biology v Cambridge. Elektroforetická pohyblivost produktů PCR na horizontální agarové elektroforese odpovídala velikosti požadovaného konstruktů (Obrázek 10). Složení reakční směsi a podmínky PCR jsou uvedeny v kap. 5.1, str. 28.



Obrázek 10: Produkty PCR analyzované na agarosové elektroforese. bp – počet párů bází, S – standard, 1 – FANCL<sup>DRWD-RING</sup>, 2 – FANCL<sup>DRWD</sup>, 3 – FANCL<sup>RING</sup>, 4 – pSUMO.

Produkty PCR genu *FANCL* byly přečištěny na silikagelové mikrokolonce a pomocí Gibsonova klonování byly produkty PCR vloženy do vektoru pSUMO (kap. 5.1.5, str. 30). Vektor pSUMO obsahuje histidinovou kotvu (8 x H) a sekvenci pro  $\beta$ -laktamasu, jež zajišťuje resistenci na ampicilin. Získané konstrukty byly transformovány do kompetentních buněk *E. coli* DH5 $\alpha$  a kultivovány na LB agaru. Přítomnost vložené DNA byla ověřena sekvenací (kap. 5.1.9, str. 32) izolované plasmidové DNA (kap. 5.1.8, str. 32).

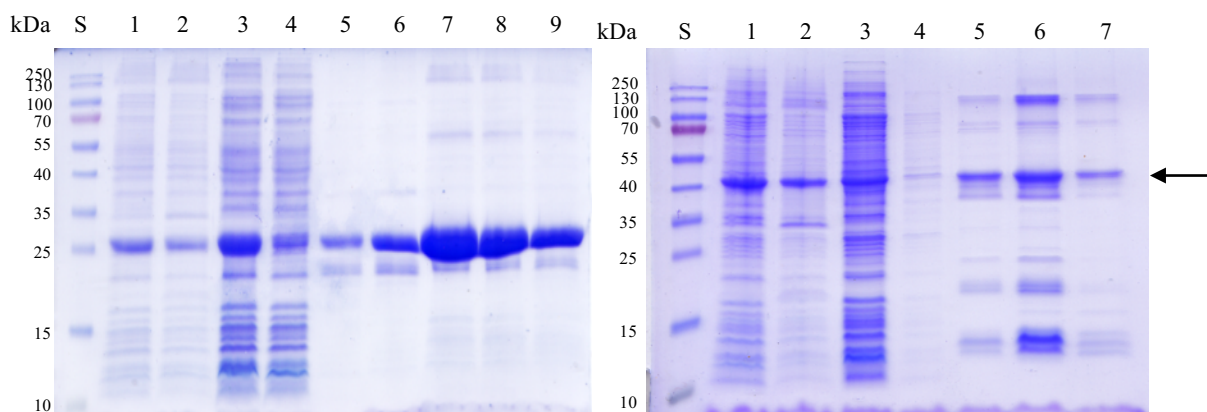
## 6.2 Exprese a purifikace zkrácených variant FANCL

Exprese domén DRWD, DRWD-RING a RING proteinu FANCL probíhaly vždy stejným způsobem. Expresní konstrukty (Obrázek 11) byly transformovány do kompetentních buněk *E. coli* BL21 (DE3) STAR a exprimovány v autoindukčním médiu (viz kap. 5.2.1, str. 32).



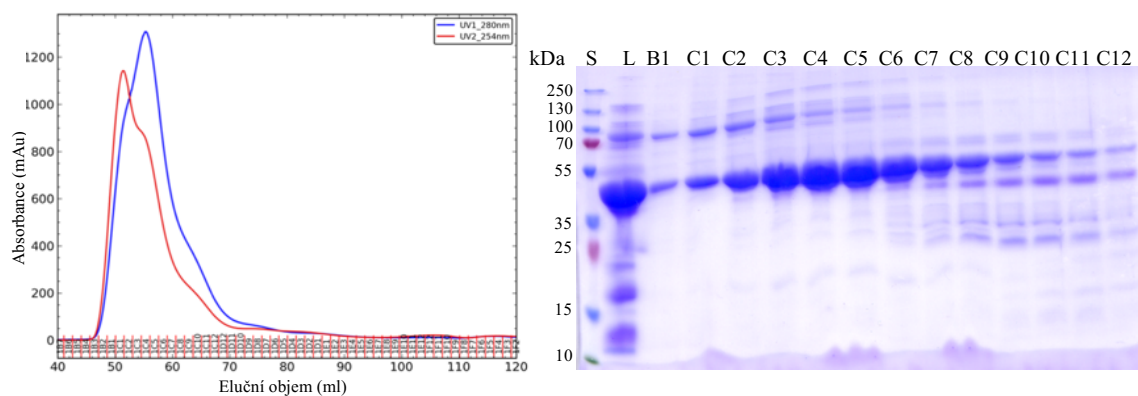
Obrázek 11: Schéma expresních konstruktů pro FANCL<sup>DRWD-RING</sup>, FANCL<sup>DRWD</sup> a FANCL<sup>RING</sup> a molekulové hmotnosti fúzních proteinů po expresi. Konstrukty obsahovaly na N-konci histidinovou kotvu (His) a fúzní protein SUMO (SUMO), černou šipkou je označeno štěpné místo pro SUMO-proteasu.

Proteiny byly izolovány pomocí afinitní chelatační chromatografie na Ni-NTA agarose (kap. 5.2.2.2, str. 33) (viz Obrázek 12). Jelikož velké množství proteinu zůstávalo v nerozpustné formě v peletě, byl při purifikaci FANCL<sup>RING</sup> ke zvýšení jeho rozpustnosti použit detergent – NP-40 (viz Obrázek 12 vlevo).



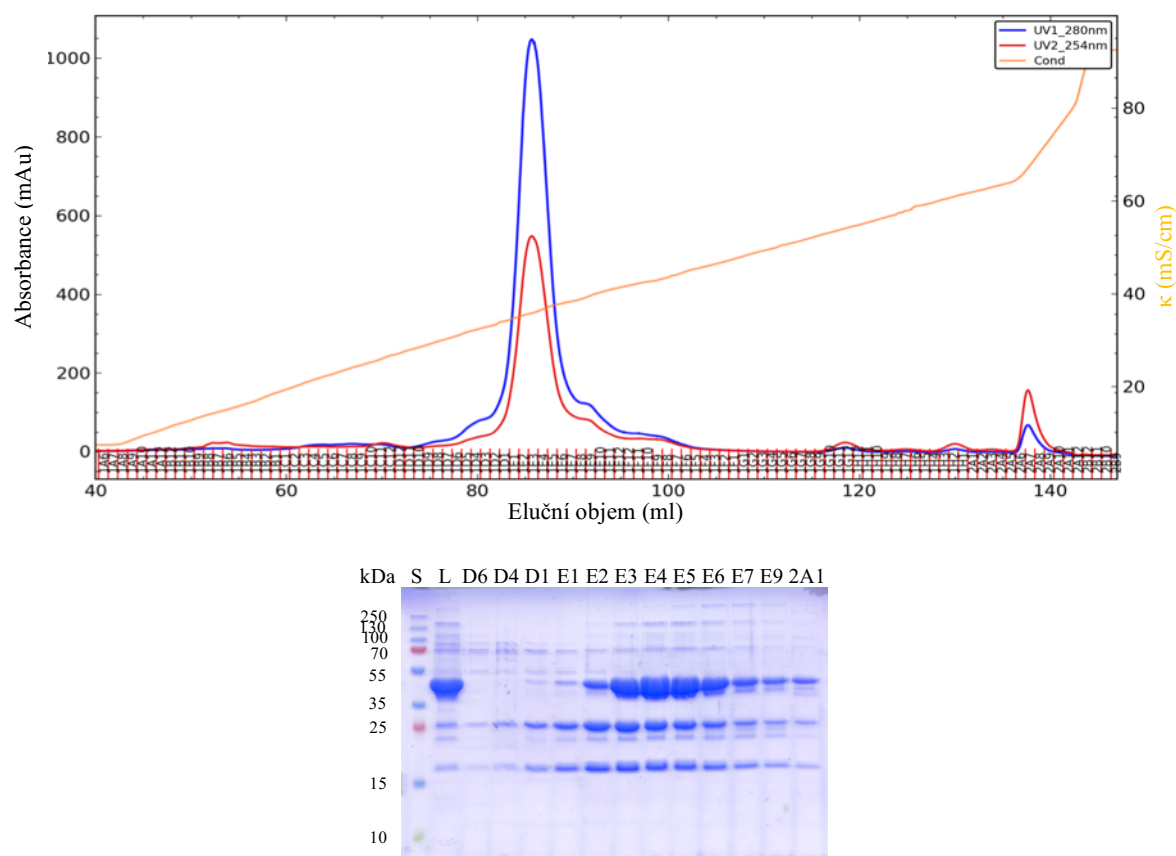
Obrázek 12: Elektroforeogram afinitní chelatační chromatografie FANCL<sup>RING</sup> (vlevo) a FANCL<sup>DRWD-RING</sup> (vpravo) na 15% gelu z SDS-PAGE. kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, 1 – lyzáta, 2 – peleta, 3 – supernatant, 4 – nenavázaná frakce, (5-9) – eluované frakce.

Dále byly proteiny přečištěny pomocí gelové permeační chromatografie (kolona Superdex 75 16/600) (viz Obrázek 13 na následující straně). Jako reprezentativní výstup jsou dále znázorněny výsledky pouze pro variantu FANCL<sup>DRWD-RING</sup>.



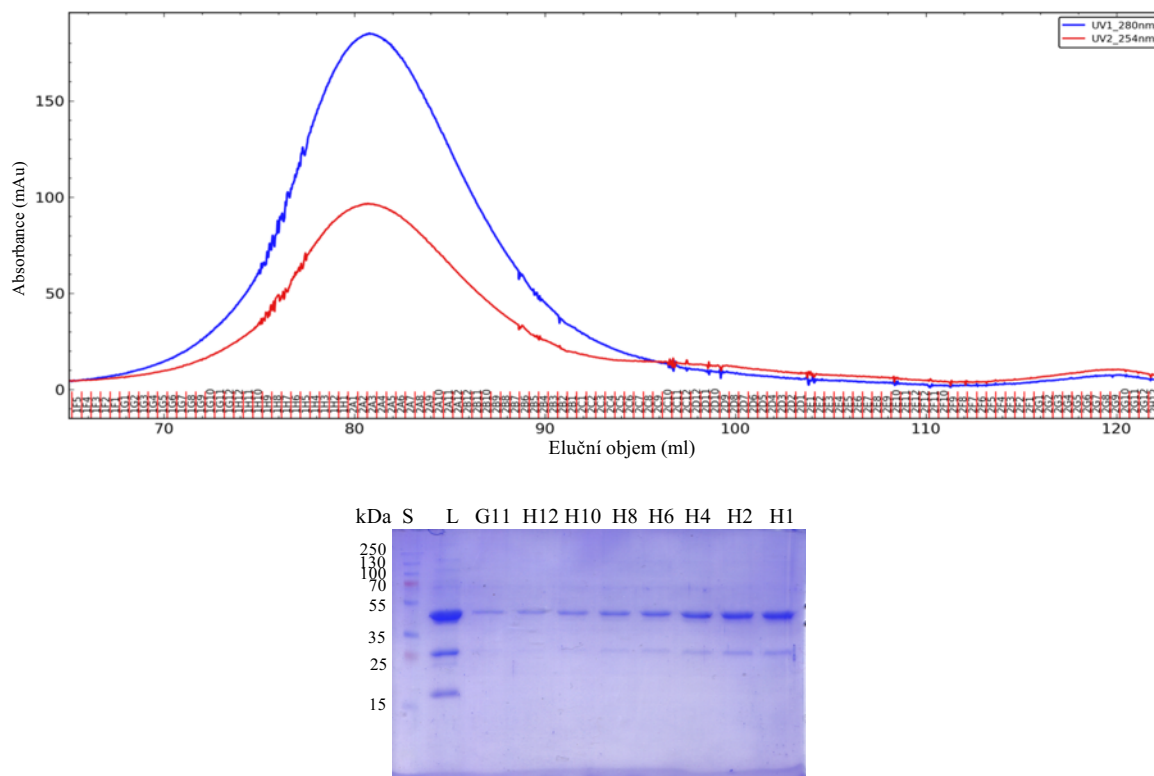
Obrázek 13: Eluční profil (vlevo) a elektroforetická kontrola frakcí získaných gelovou permeační chromatografií FANCL<sup>DRWD-RING</sup> (vpravo). kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, L – vzorek nanesený na kolonu.

Následně byl vzorek proteinu přečištěn pomocí chromatografie na iontoměničích na koloně Q HP (kap. 5.2.2.8, str. 35) (viz Obrázek 14).



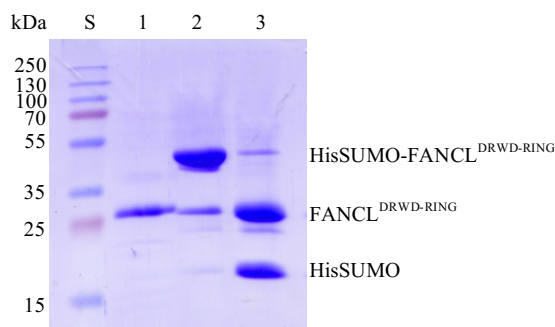
Obrázek 14: Eluční profil (nahore) a elektroforetická kontrola frakcí (vpravo) získaných chromatografií na iontoměničích proteinu FANCL<sup>DRWD-RING</sup>. Pro separaci byla použita kolona Q HP. kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, L – vzorek nanesený na kolonu.

A na závěr byl pomocí gelové permeační chromatografie (kolona Superdex 200 16/600) získán čistý protein viz Obrázek 15.



Obrázek 15: Eluční profil (nahore) a elektroforetická kontrola frakcí (dole) získaných gelovou permeační chromatografií proteinu FANCL<sup>DRWD-RING</sup>. kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, L – vzorek nanesený na kolonu.

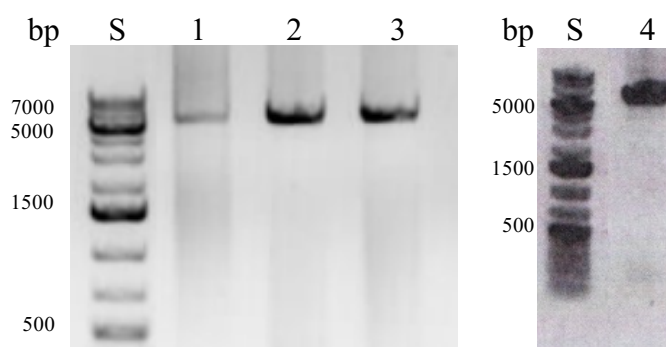
Pro ověření, že se jedná o FANCL<sup>DRWD-RING</sup> s vázaným proteinem HisSUMO, byl vzorek získaného proteinu štěpen přidáním 1  $\mu$ l SUMO-proteasy o koncentraci 3 mg/ml (viz kap. 5.2.2.10, str. 35). Štěpení probíhalo 3 hodiny při pokojové teplotě. Průběh štěpení byl analyzován pomocí SDS-PAGE (viz Obrázek 16).



Obrázek 16: 15% gel z SDS-PAGE znázorňující štěpení fúzního proteinu HisSUMO pomocí SUMO-proteasy. kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, 1 – SUMO-proteasa, 2 – vzorek proteinu před štěpením, 3 – vzorek proteinu po štěpení.

### 6.3 Příprava vektoru pro bakteriální expresi mutantních forem UBE2TΔC

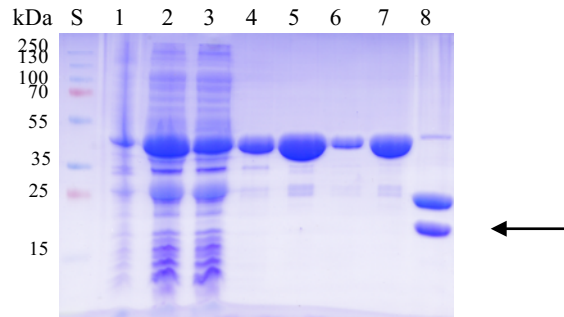
Expresní konstrukt pro UBE2TΔC byl v naší laboratoři již připraven dříve. Metodou mutagenesní PCR (kap. 5.1.2, str. 29) byl připraveny 3 mutantní formy UBE2TΔC; K91A; K91R,P93G,P94G a E54R,K91R,P93G,P94G. Pomocí specificky navržených primerů nesoucích danou mutaci ve své sekvenci a amplifikaci celého vektoru byly získány linearizované vektory s požadovanou mutací. Mutace E54R byla do konstrukt vložena provedením další reakcí PCR. Elektroforetická pohyblivost produktů PCR odpovídá očekávané velikosti plasmidu (viz Obrázek 17). Získané linearizované plasmidy byly spojeny dle kap. 5.1.5, str. 30.



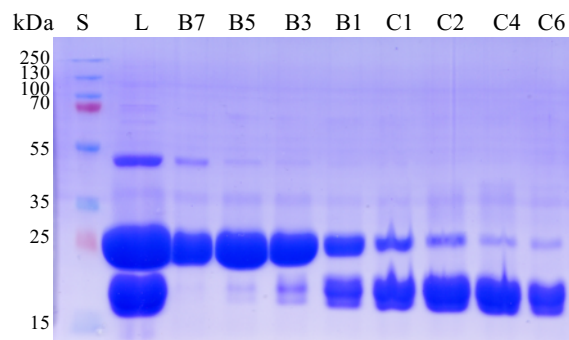
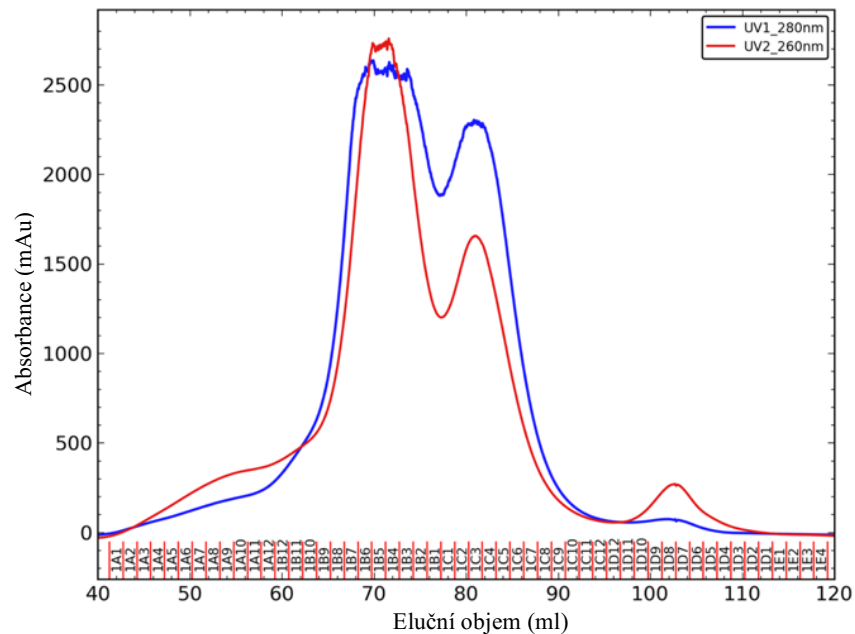
Obrázek 17: Agarosová elektroforesa produktů PCR mutantních forem UBE2TΔC. bp – počet párů bází; S – standard; 1 – mutace K91A; 2 – mutace P93G,P94G; 3 – mutace K91R,P93G,P94G; 4 – mutace E54R,K91R,P93G,P94G.

### 6.4 Exprese a purifikace UBE2TΔC a jeho mutantních variant

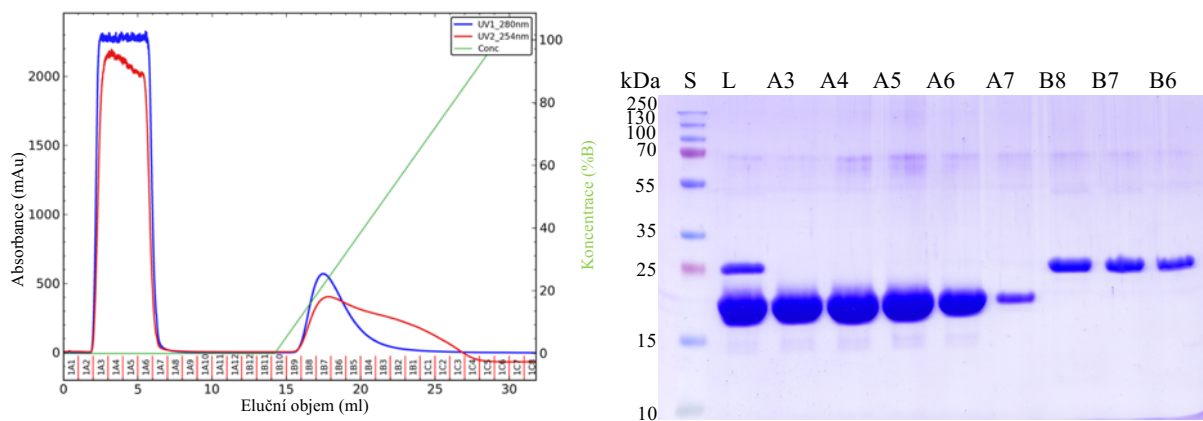
Expresní konstrukt s genem pro UBE2TΔC resp. s mutantním genem pro UBE2TΔC byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* BL21 (DE3) NiCo. Po expresi v autoindukčním médiu byl protein izolován pomocí GST-afinitní chromatografie, následně 3C-proteasou byla odštěpena GST-značka. Následně byly proteiny koncentrovány a poté byly purifikovány pomocí gelové permeační chromatografie (kolona Superdex 75 16/600) a reversní GST-afinitní chromatografie (kap. 5.2, str. 32). Pro názornost je zde uvedena pouze purifikace mutantní formy UBE2TΔC E54R,K91R,P93G,P94G (viz Obrázek 18 a Obrázek 19 na následující straně a Obrázek 20 na str. 45).



Obrázek 18: Purifikace mutantu UBE2T $\Delta$ C afinitní chromatografií pomocí fúzní GST-značky a štěpení GST. kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, 1 – peleta 2 – supernatant, 3 – nenavázaná frakce, (4-6) – eluované frakce, 7 – vzorek proteinu před štěpením a 8 – po štěpení 3C-proteasou. Černou šipkou je označen mutant UBE2T $\Delta$ C.



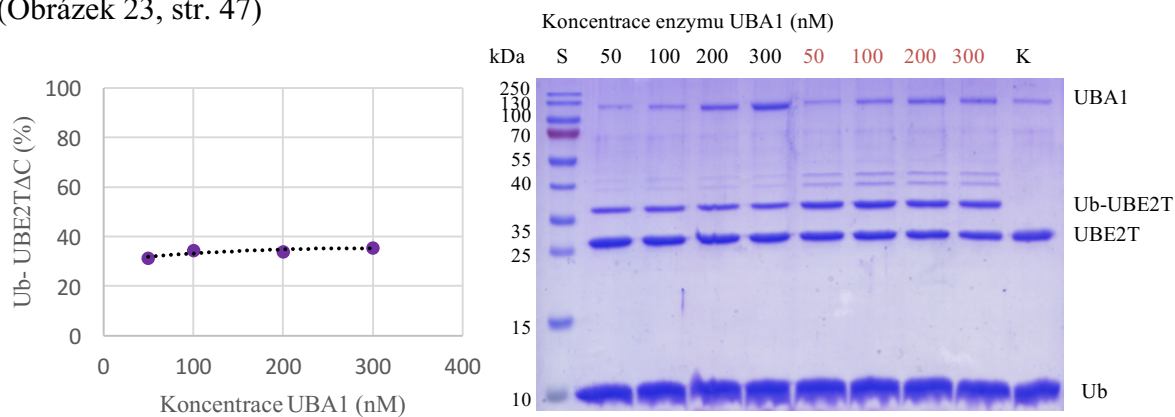
Obrázek 19: Eluční profil (nahore) a elektroforetická kontrola frakcí získaných gelovou permeační chromatografií mutantu UBE2T $\Delta$ C (dole). kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, L – vzorek nanesený na kolonu.



Obrázek 20: Eluční profil (vlevo) a elektroforetická kontrola frakcí získaných reversní GST-afinitní chromatografií (vpravo). kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, L – vzorek nanesený na kolonu, B – eluční pufr.

## 6.5 Optimalizace produkce a izolace komplexu Ub-UBE2TΔC

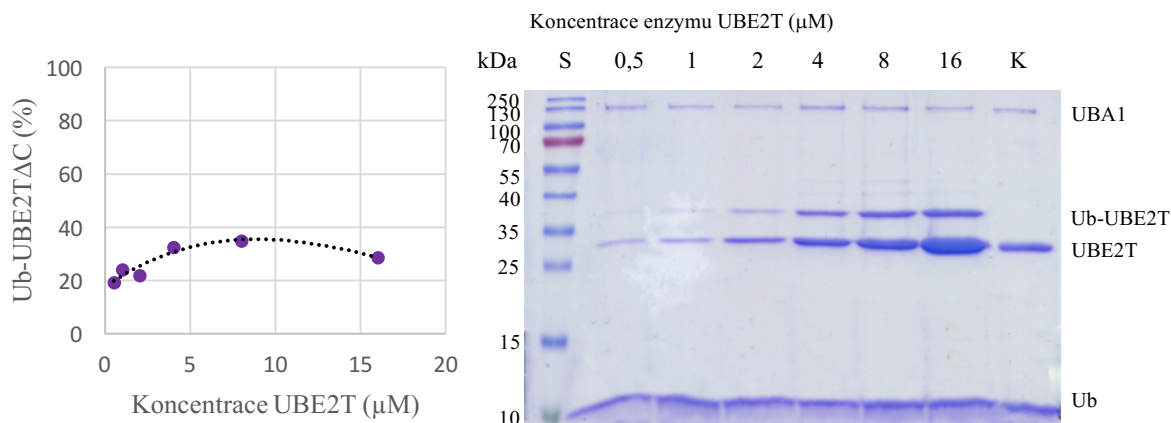
Pro získání co největšího množství proteinového komplexu Ub-UBE2TΔC bylo třeba optimalizovat podmínky reakce. Reakce probíhaly analogicky jako v kap. 5.3 na str. 35. Pro optimalizaci byla nejdříve použita forma UBE2T bez delece 18 aminokyselin na C-konci. Tento protein byl připraven v čisté formě analogicky jako UBE2TΔC. V této kapitole je uvedena optimalizace koncentrace UBA1 (Obrázek 21) a UBE2T (Obrázek 22, str. 46), pH reakčního pufru (Obrázek 23, str. 46) a použití variant UBE2T a ubiquitinu (Obrázek 23, str. 47)



Obrázek 21: Optimalizace koncentrace UBA1. Reakce probíhala 1 h (černě) resp. 2 h (červeně). Koncentrace ostatních reakčních složek byly neměnné a to 4 μM UBE2T, 40 μM Ub, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> a 1 mM ATP. Elektroforeogram byl následně denzitometricky vyhodnocen v programu ImageQuant TL (graf vlevo). kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, K – kontrolní vzorek bez ATP.

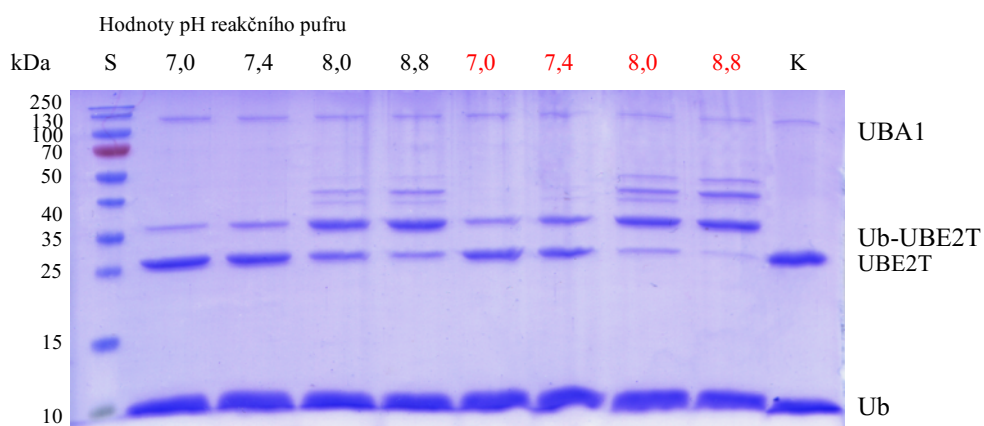
Při použití různé koncentrace UBA1 (Obrázek 21) lze dle velikosti proužků vytvořeného proteinového komplexu vidět jeho neměnné množství se vzrůstající

koncentrací UBA1. V rozsahu testovaných podmínek je tvorba komplexu Ub-UBE2T nezávislá na koncentraci UBA1, ale jeho přítomnost je nutná pro ATP-dependentní aktivaci ubiquitinu (viz kap. 2.4.2.2, str. 14).



Obrázek 22: Optimalizace koncentrace UBE2T. Reakce probíhala po dobu 1 hodiny. Koncentrace ostatních složek zůstaly neměnné, a to 0,1  $\mu\text{M}$  UBA1, 30  $\mu\text{M}$  Ub, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  a 1 mM ATP. kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, K – kontrolní vzorek reakce bez přidání ATP. Elektroforeogram byl denzitometricky analyzován pomocí ImageQuant TL. Výstup byl zpracován do grafu (vlevo).

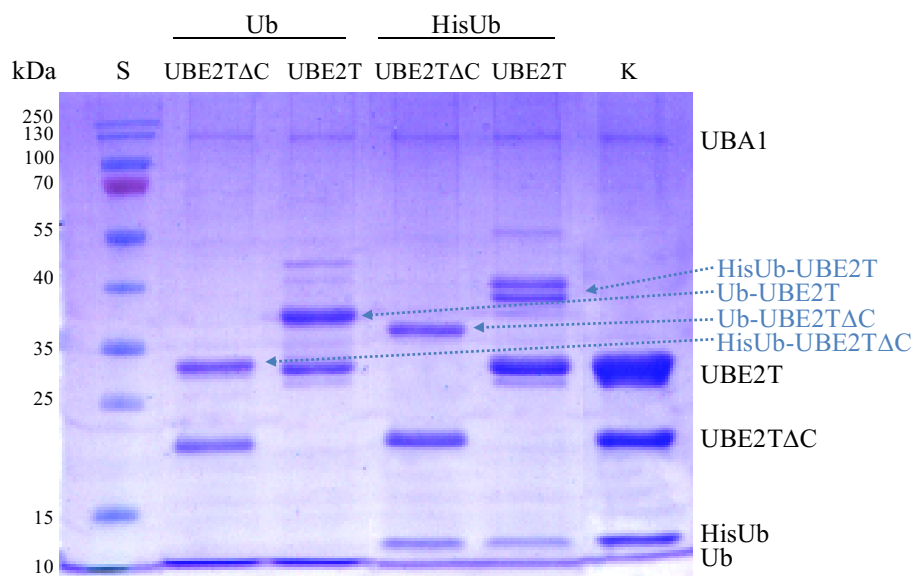
Se vzrůstající koncentrací UBE2T mírně vzrůstá množství proteinového komplexu (viz Obrázek 22). Nejvhodnější koncentrace UBE2T dle velikosti proužků vzniklého komplexu je 4 nebo 8  $\mu\text{M}$ , při této koncentraci nedochází ke snížení produkce cíleného komplexu. Následně byl testován vliv pH na tvorbu proteinového komplexu



Obrázek 23: Optimalizace pH reakčního pufru. Hodnota pH byla modifikována užitím 20 mM Tris v reakčním pufru s různou hodnotou pH. Koncentrace reakčních složek byly 0,1  $\mu\text{M}$  UBA1, 8  $\mu\text{M}$  UBE2T, 40  $\mu\text{M}$  Ub, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ATP. Černě označené dráhy jsou výsledky reakcí po hodinové inkubaci, červeně označené dráhy jsou výsledky po dvouhodinové inkubaci. kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, K – kontrolní vzorek reakce bez přidání ATP.

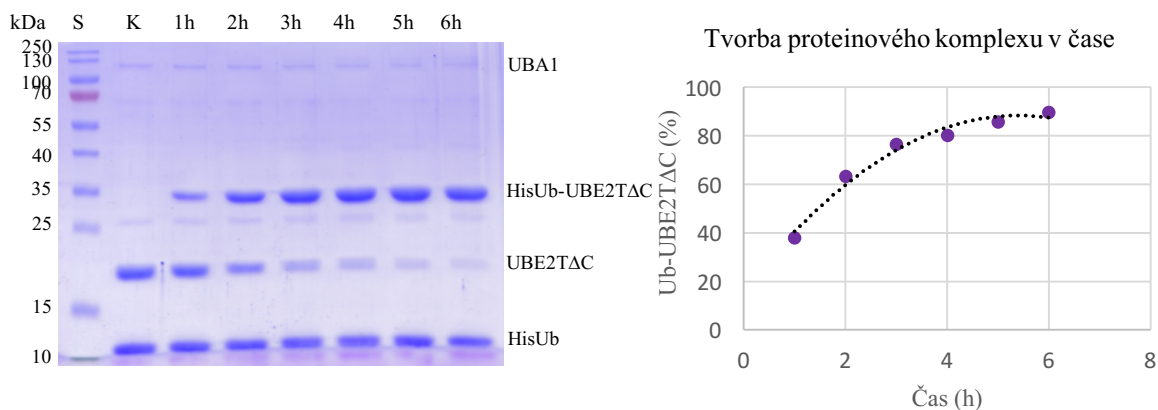
Z Obrázku 23 na předchozí straně je patrný významný vliv pH na tvorbu komplexu. V bazickém prostředí dochází k téměř naprosté konverzi UBE2T na ubiquitinylovanou formu. Jako optimální pH reakčního pufru bylo zvoleno pH= 8,0.

Obdobným způsobem byla testována různá koncentrace ubiquitinu a koncentrace soli v reakčním pufru (není součástí výsledků). Pro snadnější purifikaci proteinového komplexu byl dále testován ubiquitin s histidinovou kotvou a UBE2T s delecí na C-konci – UBE2T $\Delta$ C (viz Obrázek 24).



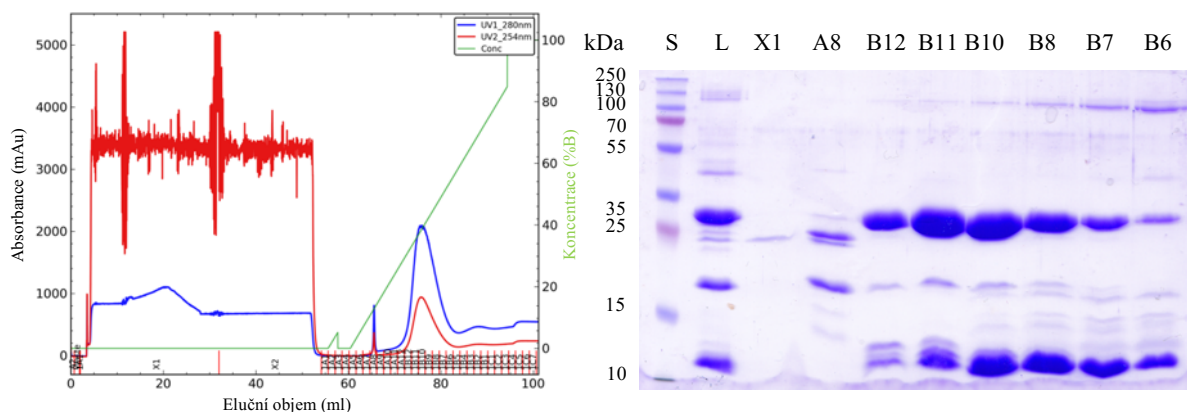
Obrázek 24: Elektroforeogram reakcí z optimalizace ubiquitinylace UBE2T na 15% gelu z SDS-PAGE. Reakce probíhaly 2 hodiny při pokojové teplotě. Koncentrace reakčních složek byly 0,1  $\mu$ M UBA1, 8  $\mu$ M UBE2T $\Delta$ C resp. UBE2T, 20  $\mu$ M Ub resp. HisUb, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM ATP. Modrými šipkami jsou označeny finální modifikační produkty UBE2T nebo UBE2T $\Delta$ C. kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, K – kontrolní vzorek bez přidání ATP.

Nejvýhodnější z hlediska snadné purifikace se ukázalo použití ubiquitinu s histidinovou kotvou a UBE2T s delecí 18 aminokyselin na C-konci (viz Obrázek 24). Při použití této varianty nedocházelo k tvorbě dalších produktů. Tato kombinace byla i následně použita k makroprodukcí proteinového komplexu za účelem dalších biochemických experimentů a pozdější proteinové krystalografie. Při splnění optimálních podmínek byla optimalizována tvorba komplexu v časové závislosti. Průběh tvorby komplexu je znázorněn na Obrázku 25 na následující straně.



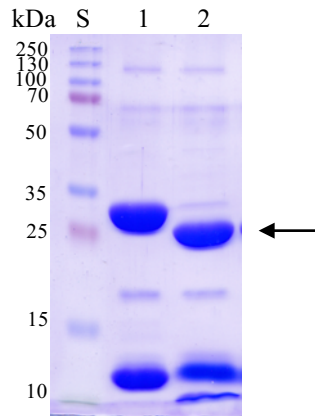
Obrázek 25: Časová závislost tvorby proteinového komplexu HisUb-UBE2ΔC na 15% gelu z SDS-PAGE. Reakce probíhala celkem 6 hodin při laboratorní teplotě. Finální koncentrace reakční složek byly 0,1 μM UBA1, 8 μM UBE2ΔC, 20 μM HisUb, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM ATP. Elektroforeogram (vlevo) byl denzitometricky vyhodnocen pomocí programu ImageQuant TL a výsledek graficky znázorněn (vpravo). kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, K – kontrolní vzorek bez přidání ATP.

Reakční směs byla po 6 hodinách nanesena na ekvilibrovanou kolonu (HisTrap 1 ml) pro zachycení proteinového komplexu dle kap. 5.3.1.1, str. 36. Průběh afinitní chelatační chromatografie byl sledován spektrofotometricky a frakce vykazující vyšší absorbanci byly analyzovány pomocí SDS-PAGE na 15% polyakrylamidovém gelu (viz Obrázek 26).



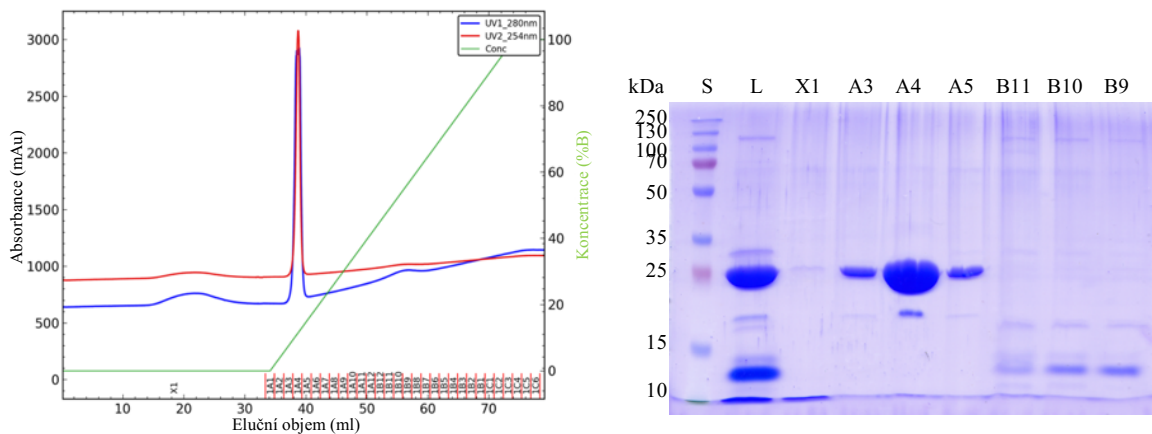
Obrázek 26: Eluční profil (vlevo) a elektroforetická kontrola frakcí získaných afinitní chelatační chromatografií komplexu HisUb-UBE2ΔC (vpravo). kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, L – vzorek nanesený na kolonu, B – eluční pufr.

Frakce obsahující proteinový komplex byly spojeny a histidinová kotva byla štěpena pomocí proteasy TEV dle kap.5.3.1.2, str. 36. Štěpení probíhalo přibližně 38 hodin a jeho průběh byl analyzován pomocí SDS-PAGE (viz Obrázek 27 na následující straně).



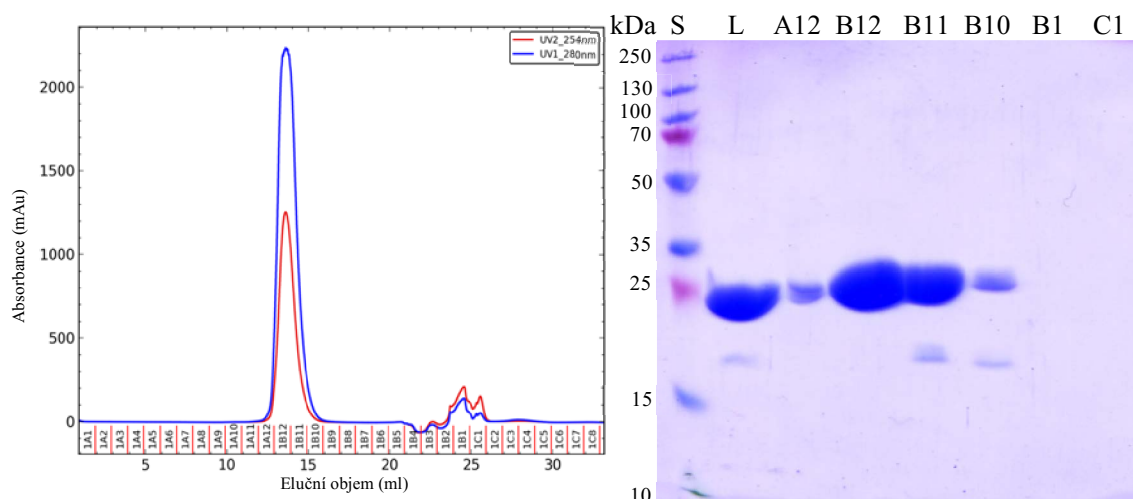
Obrázek 27: 15% gel z SDS-PAGE znázorňující štěpení histidinové kotvy pomocí proteasy TEV. kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard 1 – před štěpením, 2 – po štěpení. Černou šipkou je označen proteinový komplex Ub-UBE2TΔC.

Po odštěpení histidinové kotvy byl proteinový komplex Ub-UBE2TΔC nanesen na ekvilibrovanou odsolovací kolonu napojenou na histidinovou kolonu (viz Obrázek 28) dle kap. 5.3.1.3, str. 37.



Obrázek 28: Eluční profil (vlevo) a elektroforetická kontrola frakcí (vpravo) získaných reversní afinitní chelatační chromatografií komplexu Ub-UBE2TΔC. kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, L – vzorek nanesený na kolonu, B – eluční pufr.

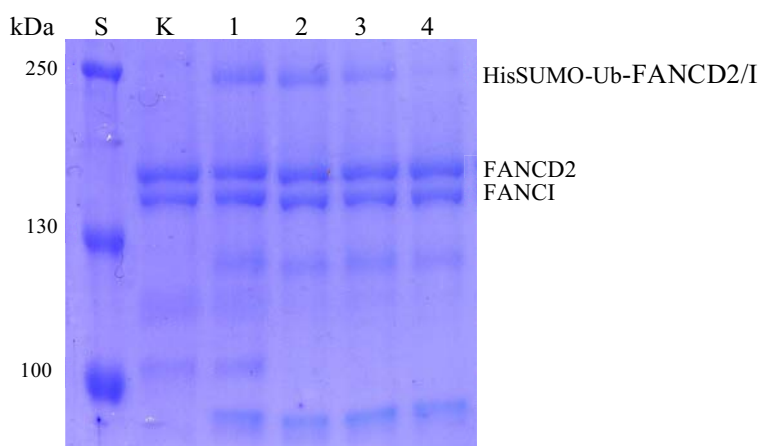
Jednotlivé frakce obsahující proteinový komplex Ub-UBE2TΔC byly spojeny, koncentrovány na 1 ml a přečištěny pomocí gelové permeační chromatografie (viz kap. 5.2.2.9, str. 37). Chromatogram frakcí získaných gelovou permeační chromatografií je znázorněn na Obrázku 29 na následující straně. Získaná čistá proteinová frakce byla koncentrována a následně uchována pro další analýzy při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Obrázek 29: Eluční profil (vpravo) a elektroforetická kontrola (vlevo) frakcí získaných gelovou permeační chromatografií Ub-UBE2TΔC na 15% gelu z SDS-PAGE. S – standard, L – vzorek nanesený na kolonu

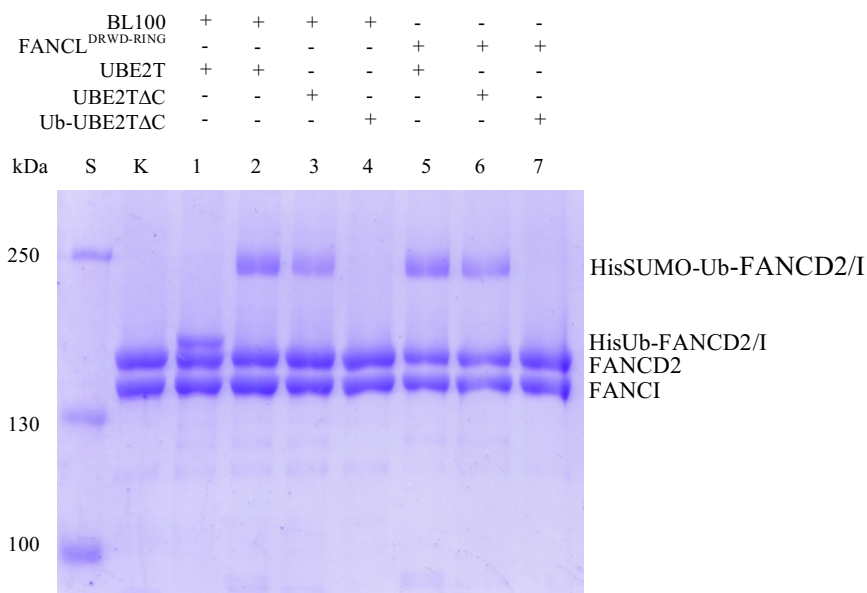
## 6.6 Monoubiquitinylační reakce FANCD2 a FANCI

Pomocí monoubiquitinylační reakce, která byla provedena dle kap. 5.5, str. 38, byla zjištěna aktivita získaných zkrácených variant FANCL (Obrázek 30) a aktivita proteinového komplexu Ub-UBE2TΔC (Obrázek 31 na následující straně). Jako pozitivní kontrola byl zvolen proteinový komplex FANCB, FANCL a FAAP100 (BL100).



Obrázek 30: Elektroforeogram monoubiquitinylační reakce na 7% gelu z SDS-PAGE. Reakce probíhaly 3 h při laboratorní teplotě. Finální koncentrace reakčních složek byly: 1  $\mu$ M FANCD2 a FANCI; 2  $\mu$ M DNA; 0,1  $\mu$ M UBA1; 0,15  $\mu$ M BL100 resp. FANCL<sup>DRWD-RING</sup> resp. FANCL<sup>DRWD</sup> resp. FANCL<sup>RING</sup>; 1  $\mu$ M UBE2T; 20  $\mu$ M HisSUMO-Ub; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM ATP. Reakce se lišily v použití zkrácené varianty FANCL. S – standard, K – kontrolní vzorek bez přidání ATP a UBA1, 1 – BL100, 2 – FANCL<sup>DRWD-RING</sup>, 3 – FANCL<sup>RING</sup>, 4 – FANCL<sup>DRWD</sup>

Dle Obrázku 30 uvedeném na předchozí straně je vidět, že zkrácená varianta FANCL, která neobsahuje doménu ELF ale pouze doménu DRWD a RING, má dostatečnou resp. obdobnou ligasovou aktivitu jako BL100 v rámci monoubiquitinylace FANCD2 a FANCI *in vitro*. Naopak v přítomnosti FANCL<sup>RING</sup> resp. FANCL<sup>DRWD</sup> dochází k horší, ale stále detekovatelné ubiquitinylaci.

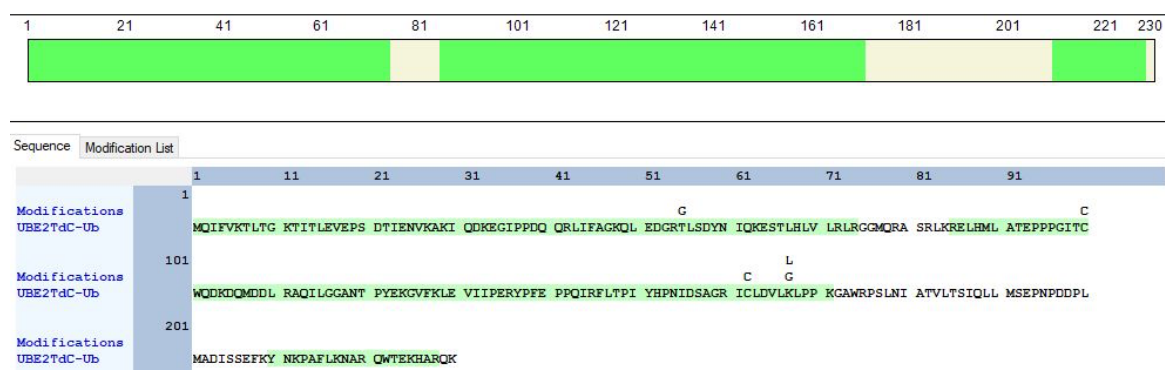


Obrázek 31: Elektroforeogram monoubiquitylační reakce na 7% gelu z SDS-PAGE. Monoubiquitylační reakce probíhaly 24 hodin. Finální koncentrace reakčních složek byly: 1  $\mu$ M FANCD2 a FANCI; 2  $\mu$ M DNA; 0,1  $\mu$ M UBA1; 0,15  $\mu$ M FANCL<sup>DRWD-RING</sup> resp. BL100; 1  $\mu$ M UBE2TΔC resp. UBE2T resp. Ub-UBE2TΔC, 20  $\mu$ M HisSUMO-Ub nebo 20  $\mu$ M HisUb (byl použit pouze v reakci v dráze 1), 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM ATP. kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, K – kontrolní vzorek reakce bez přidání ATP a UBA1.

Cílem experimentu, jehož elektroforeogram je uveden na Obrázku 31, bylo zjistit, zda-li je proteinový komplex Ub-UBE2TΔC aktivní. Pro potvrzení aktivity by byl očekáván proužek odpovídající velikosti HisUb-FANCD2/I. Reakce s proteinovým komplexem probíhala bez přítomnosti UBA1, volného ubiquitinu a UBE2T. Je zřejmé, že získaný proteinový komplex Ub-UBE2TΔC není aktivní ve smyslu monoubiquitylace FANCD2 a FANCI. Otázkou rovněž bylo, jestli by došlo k přenosu ubiquitinu, pokud by nebyla přítomna doména ELF FANCL, která je zodpovědná, za vazbu ubiquitinu a mohla by upřednostňovat interakci s volným ubiquitinem oproti vázanému. Proto byl v experimentu použit FANCL<sup>DRWD-RING</sup>. K monoubiquitylaci nedošlo ani v tomto případě. Výsledek tohoto experimentu naznačuje, že ubiquitin není vázán v aktivním místě enzymu

.Z elektroforeogramu je možné vidět, že monoubiquitinylace za přítomnosti UBE2TΔC není tolik efektivní jako s UBE2T, nicméně je dostačující.

K ověření vazebného místa ubiquitinu byl odeslán vzorek Ub-UBE2TΔC o koncentraci 2 mg/ml k analýze pomocí hmotnostní spektrometrie do laboratoře doc. RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D, kde byl štěpen trypsinem. Ten štěpí specificky peptidové vazby vycházející z karboxylové skupiny bazických aminokyselin argininu a lysinu. Následně byl komplex analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie, která byla provedena metodou ESI (z angl. electrospray ionization).

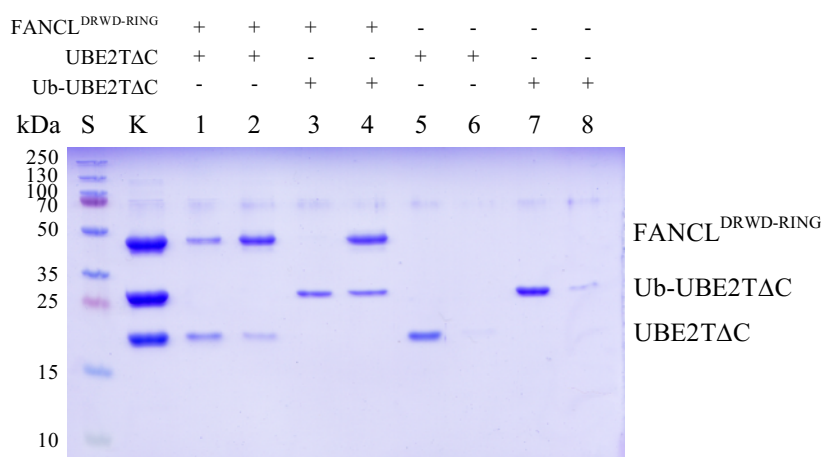


Obrázek 32: Data získaná z hmotnostní spektrometrie. Proteinový komplex byl štěpen trypsinem a analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie metodou ESI. Na výstupních datech z hmotnostní spektrometrie je vidět výsledné pokrytí sekvence – zeleně (sekvence je složena ze sekvence pro ubiquitin a UBE2TΔC), které bylo metodou rozpoznáno společně s modifikacemi na daných aminokyselinových zbytcích. Modifikace G a L označuje místo sekvence, na kterém došlo k ubiquitinylation. Modifikace C je vnesená modifikace pro bránění oxidace cysteinu k poskytnutí maximálního přístupu štěpným místům pro trypsin [53].

Analýza pomocí hmotnostní spektrometrie prokázala, že ubiquitin je vázán na UBE2TΔC na K91 (viz Obrázek 32), který je velmi blízko aktivnímu vazebnému místu C86.

## 6.7 Ověření interakce FANCL<sup>DRWD-RING</sup> s Ub-UBE2 $\Delta$ C

Jelikož užitím proteinového komplexu Ub-UBE2 $\Delta$ C nedošlo k monoubiquitylaci FANCD2 a FANCI (Obrázek 31, str. 51). Otázkou bylo, zda-li stále interaguje s E3-ligasou FANCL, konkrétně s FANCL<sup>DRWD-RING</sup>, který se ukázal jako minimální modul nesoucí ubiquitin-ligasovou aktivitu (viz Obrázek 30, str. 50). Pro analýzu protein-proteinové interakce byla zvolena metoda „pull-down“ (kap. 5.4, str. 37). Reakční směs obsahovala vždy FANCL<sup>DRWD-RING</sup> s histidinovou kotvou a UBE2 $\Delta$ C resp. Ub-UBE2 $\Delta$ C, jež byly ředěny na požadovanou koncentraci reakčním pufrem. Pro vyloučení nespecifické vazby byl na nosič jako negativní kontrola nanesen vzorek UBE2 $\Delta$ C resp. Ub-UBE2 $\Delta$ C bez FANCL<sup>DRWD-RING</sup> s histidinovou kotvou. Výsledky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

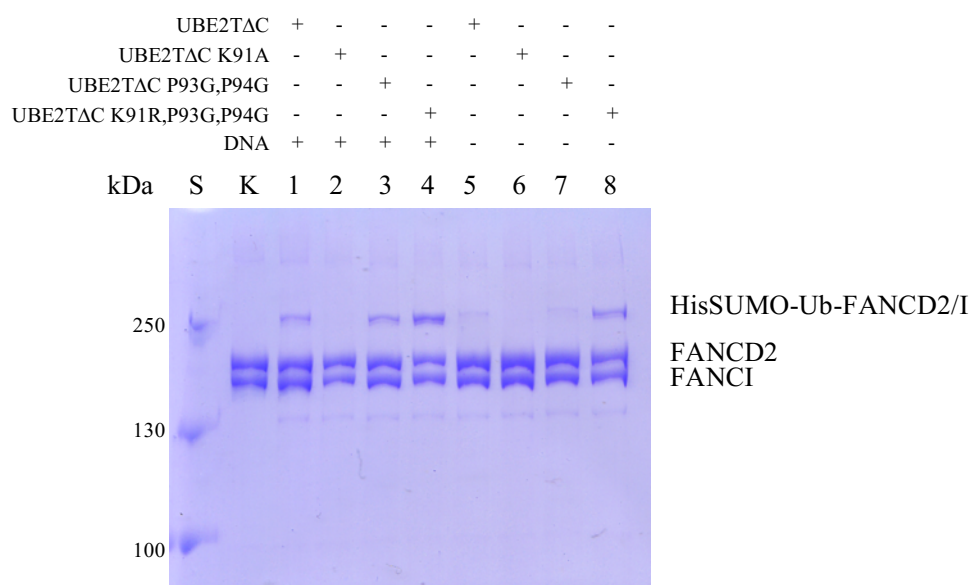


Obrázek 33: Elektroforeogram "pull-down" analýzy na 15% gelu z SDS-PAGE. Koncentrace všech složek byla 5  $\mu$ M. kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, K – vzorek FANCL<sup>DRWD-RING</sup>, Ub-UBE2 $\Delta$ C a UBE2 $\Delta$ C, 1 – nenavázaná resp. 2 – eluovaná frakce FANCL<sup>DRWD-RING</sup> a UBE2 $\Delta$ C, 3 – nenavázaná resp. 4 – eluovaná frakce FANCL<sup>DRWD-RING</sup> a Ub-UBE2 $\Delta$ C, 5 – nenavázaná resp. 6 – eluovaná frakce UBE2 $\Delta$ C, 7 – nenavázaná resp. 8 – eluovaná frakce Ub-UBE2 $\Delta$ C.

Z Obrázku 33 je patrné, že UBE2 $\Delta$ C a proteinový komplex Ub-UBE2 $\Delta$ C interagují s FANCL<sup>DRWD-RING</sup>. Dle analýzy negativních kontrolních vzorků se proteinový komplex a samotné UBE2 $\Delta$ C sice nescificky vážou na chromatografický nosič, ale pouze ve velmi malém množství.

## 6.8 Monoubiquitinylační reakce FANCD2/FANCI s mutantními formami UBE2TΔC

Prostřednictvím monoubiquitinylační reakci byla zjištěna aktivita mutantních forem UBE2TΔC v porovnání s UBE2TΔC bez bodových mutací, bez a s přítomností DNA. Reakce byly provedeny stejným způsobem popsaným v kap. 5.5 na str. 38, rovněž finální koncentrace reagensů byly stejné. Jako E3-ligasa byl použit FANCL<sup>DRWD-RING</sup>. V reakcích, jež měly probíhat bez DNA, byl objem DNA nahrazen reakčním pufrům. Reakce probíhaly 1 hodinu při laboratorní teplotě. Výsledný elektroforeogram je znázorněn na Obrázku 34.



Obrázek 34: Elektroforeogram monoubiquitinylační reakce na 7% gelu z SDS-PAGE. Monoubiquitinylační reakce probíhaly 1 hodinu. Finální koncentrace reakčních složek byly: 1  $\mu$ M FANCD2 a FANCI, 2  $\mu$ M DNA, 0,1  $\mu$ M UBA1, 0,15  $\mu$ M FANCL<sup>DRWD-RING</sup>, 1  $\mu$ M UBE2TΔC resp. mutantní UBE2TΔC, 20  $\mu$ M HisSUMO-Ub, 4 mM MgCl<sub>2</sub> a 1 mM ATP. kDa – jednotka molekulové hmotnosti, S – standard, K – kontrolní vzorek bez přidání ATP a UBA1.

Z elektroforeogramu je patrné, že mutantní forma UBE2TΔC E54R, K91R, P93G, P94G je schopna mnohem účinněji monoubiquitinylovat FANCD2 a FANCI v přítomnosti DNA než UBE2TΔC nebo UBE2TΔC K91R, P93G, P94G. Rovněž tato mutantní varianta jediná efektivně předává ubiquitin na FANCD2 a FANCI bez přítomnosti DNA. Působením UBE2TΔC K91A nedošlo k monoubiquitinylaci FANCD2 a FANCI

## 7 Diskuze

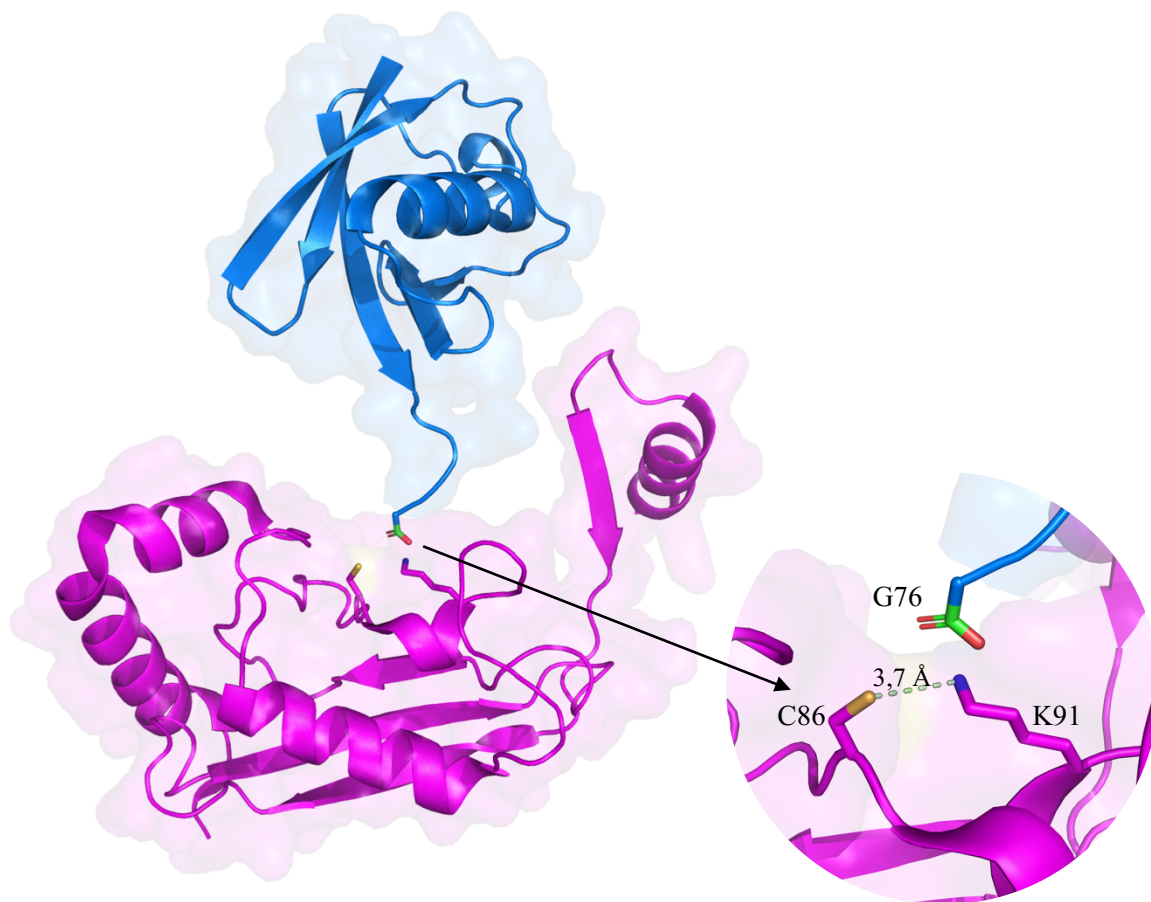
Cílem této diplomové práce bylo připravit a charakterizovat komponenty pro strukturní studie mechanismů ubiquitylace FANCD2.

Obecně při purifikaci FANCL<sup>DRWD-RING</sup>, FANCL<sup>DRWD</sup> a FANCL<sup>RING</sup> bylo velké množství proteinu uvězněno v nerozpustné podobě v peletě po lýzy buněk, nicméně se podařilo připravit tyto proteiny v dostatečném množství. V těchto variantách FANCL nejspíše dochází k odhalení hydrofobních míst proteinu a rozpustnost se snižuje. Z literatury a našich vlastních zkušeností je známo, že purifikace savčí formy nezkráceného FANCL je velmi obtížná [41]. Pro zvýšení rozpustnosti proteinu by bylo vhodné přidání detergentu, který by interagoval a „maskoval“ odhalená hydrofobní místa. Aplikace detergentu NP-40 byla využita pro purifikaci FANCL<sup>RING</sup>, kde byl výtěžek proteinu z bakteriálního lyzátu mnohonásobně zvýšen. Při purifikaci FANCL<sup>DRWD-RING</sup> s vázaným HisSUMO fúzním proteinem pomocí chromatografie na iontoměničích (Obrázek 14, str. 41) došlo nejspíše ke kontaminaci vzorku proteasou, jelikož se tvořil degradační produkt, který velikostně odpovídal FANCL<sup>DRWD-RING</sup> (29,9 kDa) bez navázaného HisSUMO a volnému proteinu HisSUMO (12,7 kDa). Patrně dochází k dimerizaci FANCL na gelové filtraci, neboť nebylo možné oddělit FANCL<sup>DRWD-RING</sup> bez HisSUMO od HisSUMO-FANCL<sup>DRWD-RING</sup> (Obrázek 15, str. 42). Z povahy dalších provedených analýz nebyla jeho přítomnost dále relevantní.

Při optimalizaci přípravy komplexu Ub-UBE2T docházelo v některých reakcích k tvorbě dalších produktů, které neodpovídaly monoubiquitylovanému UBE2T (Obrázek 21, str. 45 a Obrázek 23, str. 46). Z aminokyselinové sekvence je patrné, že na C-konci UBE2T, který byl zkrácen, je pět dalších lysinů, z nichž na třech byla potvrzena možnost vazby ubiquitinu [35]. Výsledky této práce přímo naznačují, že se jedná o polyubiquitylovaný UBE2T, jelikož ve srovnání s ubiquitylací UBE2TΔC takovéto produkty nevznikají. Zajímavá se zdá i skutečnost, že se zvýšením pH dochází k větší tvorbě těchto nespecifických produktů a rovněž k větší tvorbě monoubiquitylovaného UBE2T (Obrázek 23, str. 46). Lysin patří mezi bazické aminokyseliny a protonace a deprotonace jeho postranního řetězce je závislá na pH a taktéž na změnách v jeho mikrookolí. V bazickém pH dochází nejspíše ke změnám v podmínkách tvorby isopeptidové vazby mezi karboxyskupinou glycinu na C-konci ubiquitinu a ε-aminoskupinou lysinu. Nicméně pro určení, zda-li se doopravdy jedná o polyubiquitylovanou formu UBE2T, by bylo třeba tyto produkty analyzovat prostřednictvím hmotnostní spektrometrie.

Dle literatury je známo, že v přítomnosti E3-ligasy je upřednostňována vazba ubiquitinu na aktivní místo C86, naopak bez přítomnosti FANCL dochází k auto-ubiquitylaci na K91 a taktéž na dalších lysinech na C-terminálním konci. UBE2T $\Delta$ C, který je auto-monoubiquitylován na K91, je deaktivován [35]. V této práci bylo potvrzeno, že auto-monoubiquitylovaný UBE2T $\Delta$ C na K91 není aktivním donorem ubiquitinu (Obrázek 31, str. 51) při monoubiquitylaci FANCD2 a FANCI. Jeho aktivita nebyla obnovena ani při přidání UBA1, volného ubiquitinu nebo UBE2T a tedy k přenosu ubiquitinu nedošlo i přesto, že katalytický cystein byl volný (není součástí výsledků). UBE2T je auto-ubiquitylován na K91 i v buňkách [35]. Je možné, že dochází k bránění vazby další molekuly ubiquitinu a tím i jeho mimovolnému přenosu tímto enzymem a modifikaci jiných proteinů. Tato práce rovněž naznačuje, že auto-monoubiquitylovaný UBE2T také nejspíše kompletuje s volným UBE2T a reguluje množství přeneseného ubiquitinu na substrát. UBE2T by se tak mohl chovat jako kovalentně modulovaný enzym. Pro upřesnění této regulační aktivity auto-ubiquitylovaného UBE2T $\Delta$ C by bylo třeba provést titraci UBE2T ke komplexu Ub-UBE2T $\Delta$ C v rámci monoubiquitylační reakce FANCD2 a FANCI a další biologické experimenty.

Získání komplexu UBE2T $\Delta$ C s navázaným ubiquitinem na K91 je velmi výhodné, protože thioesterová vazba, jež by vznikla mezi thiolovou skupinou cysteinu na UBE2T $\Delta$ C (C86) a karboxyskupinou ubiquitinu (G76), je obecně velmi energeticky bohatá a snadno podléhá hydrolyze [54]. Vazbou ubiquitinu na  $\epsilon$ -aminoskupinu K91 byl naopak získán stabilní komplex. Pro názornost byl prostřednictvím programu PyMOL vytvořen strukturní model proteinového komplexu (viz Obrázek 35 na následující straně).



Obrázek 35: Strukturální model UBE2TAC s ubiquitinem. UBE2TAC (růžově), ubiquitin (modře) s vyznačenými vazebnými místy, C-terminální G76 ubiquitin, aktivní vazebné místo pro ubiquitin C86 a auto-ubiquitylační místo K91 na UBE2TAC. Vytvořeno v programu PyMOL. Identifikační PDB kódy: 1ubi, 5ojj.

Ze strukturálního modelu je zjevná proximita dvou vazebných míst pro ubiquitin, K91 a C86, na UBE2TAC. Vazebné místo na K91 je vzdáleno pouze 3,7 Å od aktivního místa, je však možné, že vazbou ubiquitinu na K91 dochází ke strukturálním změnám proteinu UBE2TAC. Nicméně „pull-down“ analýzou bylo potvrzeno, že ačkoliv je tento komplex neaktivní, stále interaguje s  $\text{FANCL}^{\text{DRWD-RING}}$  (Obrázek 33, str. 53). Získání krystalové struktury s produktem této práce by mělo odhalit interakční místa proteinového komplexu Ub-UBE2TAC s  $\text{FANCL}^{\text{DRWD-RING}}$  a taktéž potenciální konformační změny, kterými by mohl proteinový komplex podléhat a zamezit tak jeho aktivitě. Rovněž další strukturální studie s FANCD2 a FANCI může přispět k odhalení reakčního mechanismu díky proximitě C86

a K91, a to pokud by příčinou bránění přenosu ubiquitinu byla pouze stabilní isopeptidová vazba mezi C-terminálním glycinem ubiquitinu a K91 enzymu UBE2T $\Delta$ C. Dále s využitím poznatků a reagensí z této práce můžeme vytvořit minimální ubiquitinylovaný komplex pro získání komplexnější interakční analýzy ubiquitinu s jeho dalšími vazebnými partnery ve FA-opravné dráze pomocí krystalografie a kryo-elektronové mikroskopie vedoucí k detailnímu popisu iniciace opravy ICL.

V další části této práce byly úspěšně připraveny mutantní formy UBE2T $\Delta$ C, jejichž aktivita byla testována prostřednictvím monoubiquitylační reakce FANCD2 a FANCI (Obrázek 34, str. 54). Mutant UBE2T $\Delta$ C K91A nebyl schopen monoubiquitylace, tento výsledek naznačuje důležitost v zachování náboje v blízkosti aktivního místa tohoto enzymu. Rovněž bylo potvrzeno, že aktivita mutantu UBE2T $\Delta$ C E54,P93G,P94G i s mutací na K91R je vysoká během monoubiquitylace FANCD2 a FANCI v a bez přítomnosti DNA, přičemž přítomnost DNA je při monoubiquitylaci FANCD2 za užití nemutantního UBE2T podstatná. V porovnání s mutantní variantou UBE2T $\Delta$ C K91R,P93G,P94G je nutno podotknout, že mutace E54R se zdá zásadní z hlediska vazby DNA. Ač nebylo potvrzeno, že UBE2T interaguje s DNA, změna náboje v tomto mikrokolím má viditelné důsledky [37]. Je ale také možné, že dochází k strukturní reorganizaci, která mimikuje přítomnost DNA. Pro získání souhrnnější strukturní informace bude mutant UBE2T $\Delta$ C E54R,K91R,P93G,P94G využit v budoucí strukturní analýze v komplexu s FANCD2, FANCI a FANCL.

## 8 Závěr

Cílem této práce bylo připravit a izolovat proteinový komplex Ub-UBE2T, ověřit jeho aktivitu a charakterizovat jeho interakci s aktivní formou FANCL. Z tohoto důvodu bylo třeba připravit i zkrácené varianty FANCL a ověřit jejich aktivitu. Součástí této práce byla i příprava mutantních variant UBE2T. Cílem byla rovněž příprava těchto proteinů za účelem strukturních studií a zjištění role v monoubiquitinylaci FANCD2.

- Byly připraveny expresní vektory pro bakteriální expresi zkrácených variant FANCL, FANCL<sup>DRWD</sup>, FANCL<sup>RING</sup>, FANCL<sup>DRWD-RING</sup> a třech mutantních forem UBE2T – UBE2TΔC K91A; K91R,P93G,P94G a E54R,K91R,P93G,P94G.
- Výše zmíněné proteiny, UBE2T a UBE2TΔC byly exprimovány v kompetentních buňkách *E. coli* a úspěšně izolovány.
- Prostřednictvím monoubiquitylační reakce byla testována aktivita všech zmíněných proteinů.
- Byla potvrzena „hyperaktivita“ mutantní formy UBE2TΔC E54R,K91R,P93G,P94G.
- Příprava proteinového komplexu byla optimalizována a komplex byl izolován ve formě Ub-UBE2TΔC. Dále byla ověřena jeho autoinhibiční role, která zdá se blokuje tvorbu Ub-FANCD2 a to i v kompetici s aktivním UBE2T.
- Pomocí metody „pull-down“ byla úspěšně ověřena interakce Ub-UBE2TΔC s aktivní variantou FANCL<sup>DRWD-RING</sup>. Interakce Ub-UBE2TΔC s FANCL<sup>DRWD-RING</sup> je základním předpokladem pro budoucí strukturní charakterizaci.

## 9 Seznam literatury

1. Tubbs, A., Nussenzweig, A. (2017) Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer. *Cell* **168**, 644–56.
2. Friedberg, E.C. (2008) A brief history of the DNA repair field. *Cell Research* **18**, 3.
3. Lindahl, T., Nyberg, B. (1972) Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **11**, 3610–18.
4. Lindahl, T., Barnes, D.E. (2000) Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **65**, 127–33.
5. Murray, R.K. (2003) *Harper's illustrated biochemistry*, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York
6. Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709–15.
7. Sancar, A. (1994) Mechanisms of DNA excision repair. *Science* **266**, 1954–56.
8. Modrich, P. (2006) Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J. Biol. Chem.* **281**, 30305–9.
9. Kunkel, T.A. (2015) Celebrating DNA's repair crew. *Cell* **163**, 1301–3.
10. Niedernhofer, L.J., Lalai, A.S., Hoeijmakers, J.H.J. (2005) Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. *Cell* **123**, 1191–98.
11. Deans, A.J., West, S.C. (2011) DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews Cancer* **11**, 467–80.
12. Goodman, L.S. (1946) Nitrogen mustard therapy: Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and Tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *Journal of the American Medical Association* **132**, 126.
13. Gonzalez-Hunt, C.P., Wadhwa, M., Sanders, L.H. (2018) DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes. *Current Opinion in Toxicology* **7**, 87–94.
14. Langevin, F., Crossan, G.P., Rosado, I.V., Arends, M.J., Patel, K.J. (2011) FANCD2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature* **475**, 53–58.
15. Elcock, A.H., Lyne, P.D., Mulholland, A.J., Nandra, A., Richards, W.G. (1995) Combined quantum and molecular mechanical study of DNA crosslinking by nitrous

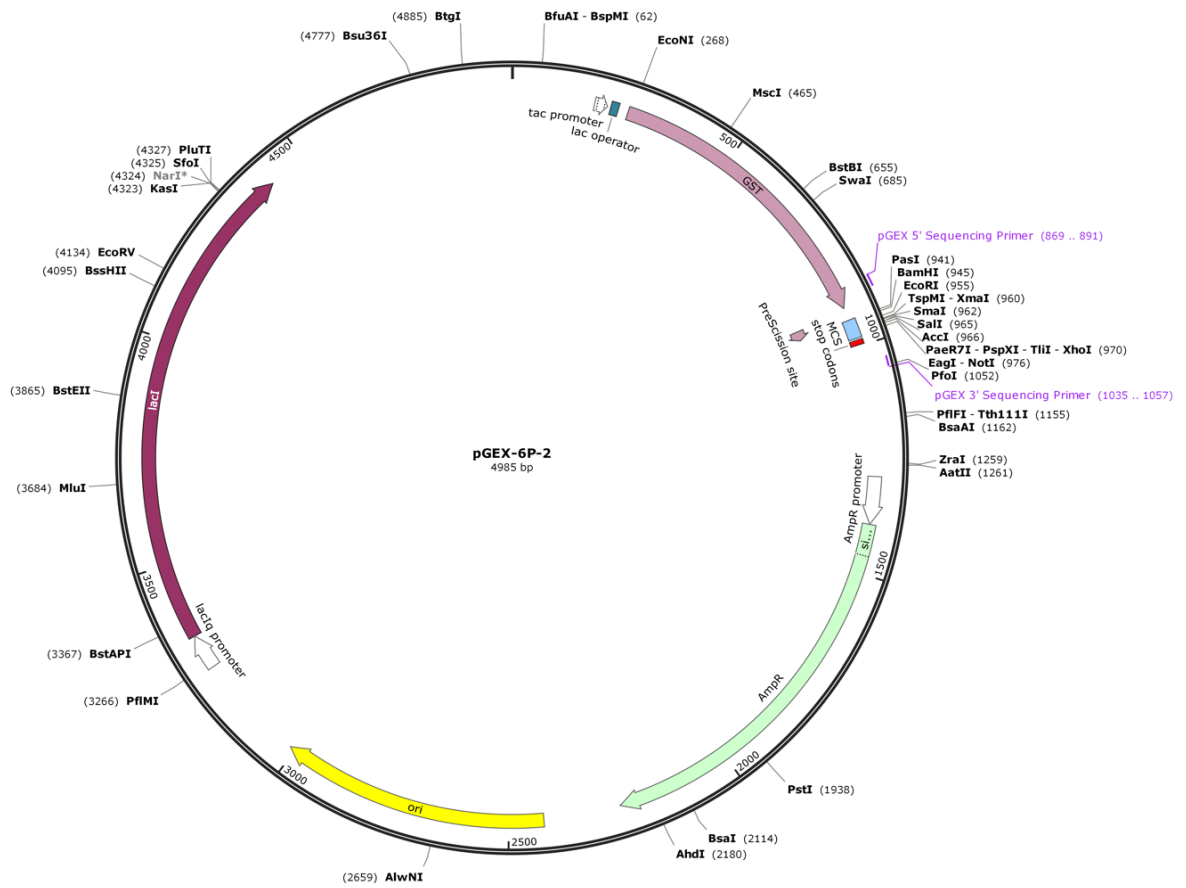
- acid. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 4706–7.
16. Meetei, A.R., Levitus, M., Xue, Y., Medhurst, A.L., Zwaan, M., Ling, C., Rooimans, M.A., Bier, P., Hoatlin, M., Pals, G., de Winter, J.P., Wang, W., Joenje, H. (2004) X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nature Genetics* **36**, 1219–24.
  17. Alter, B.P. (1996) Fanconi's anemia and malignancies. *American Journal of Hematology* **53**, 99–110.
  18. Ameziane, N., May, P., Haitjema, A., van de Vrugt, H.J., van Rossum-Fikkert, S.E., Ristic, D., Williams, G.J., Balk, J., Rockx, D., Li, H., Rooimans, M.A., Oostra, A.B., Velleuer, E., Dietrich, R., Bleijerveld, O.B., Maarten Altelaar, A.F., Meijers-Heijboer, H., Joenje, H., Glusman, G., Roach, J., Hood, L., Galas, D., Wyman, C., Balling, R., den Dunnen, J., de Winter, J.P., Kanaar, R., Gelinas, R., Dorsman, J.C. (2015) A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51. *Nature Communications* **6**.
  19. Gueiderikh, A., Rosselli, F., Neto, J.B.C. (2017) A never-ending story: the steadily growing family of the FA and FA-like genes. *Genetics and Molecular Biology* **40**, 398–407.
  20. Joenje, H., Patel, K.J. (2001) The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nature Reviews Genetics* **2**, 446–58.
  21. Räschle, M., Knipscheer, P., Enoiu, M., Angelov, T., Sun, J., Griffith, J.D., Ellenberger, T.E., Schärer, O.D., Walter, J.C. (2008) Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. *Cell* **134**, 969–80.
  22. Duxin, J.P., Walter, J.C. (2015) What is the DNA repair defect underlying Fanconi anemia? *Current Opinion in Cell Biology* **37**, 49–60.
  23. Knipscheer, P., Raschle, M., Smogorzewska, A., Enoiu, M., Ho, T.V., Scharer, O.D., Elledge, S.J., Walter, J.C. (2009) The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science* **326**, 1698–1701.
  24. Rajendra, E., Oestergaard, V.H., Langevin, F., Wang, M., Dornan, G.L., Patel, K.J., Passmore, L.A. (2014) The genetic and biochemical basis of FANCD2 monoubiquitination. *Molecular Cell* **54**, 858–69.
  25. van Twest, S., Murphy, V.J., Hodson, C., Tan, W., Swuec, P., O'Rourke, J.J., Heierhorst, J., Crismani, W., Deans, A.J. (2017) Mechanism of ubiquitination and deubiquitination in the Fanconi anemia pathway. *Molecular Cell* **65**, 247–59.

26. Swuec, P., Renault, L., Borg, A., Shah, F., Murphy, V.J., van Twest, S., Snijders, A.P., Deans, A.J., Costa, A. (2017) The FA core complex contains a homo-dimeric catalytic module for the symmetric mono-ubiquitination of FANCI-FANCD2. *Cell Reports* **18**, 611–23.
27. Varshavsky, A. (2001), Ubiquitin v knize *Encyclopedia of Genetics*, Academic Press, United States, 2091–93.
28. Woelk, T., Sigismund, S., Penengo, L., Polo, S. (2007) The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Division* **2**, 11.
29. Miranda, M., Sorkin, A. (2007) Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: New insights into surprisingly similar mechanisms. *Molecular Interventions* **7**, 157–67.
30. Tenno, T., Fujiwara, K., Tochio, H., Iwai, K., Morita, E.H., Hayashi, H., Murata, S., Hiroaki, H., Sato, M., Tanaka, K., Shirakawa, M. (2004) Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains. *Genes Cells* **9**, 865–75.
31. Moudry, P., Lukas, C., Macurek, L., Hanzlikova, H., Hodny, Z., Lukas, J., Bartek, J. (2012) Ubiquitin-activating enzyme UBA1 is required for cellular response to DNA damage. *Cell Cycle* **11**, 1573–82.
32. Haas, A.L., Rose, I.A. (1982) The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *Journal of Biological Chemistry*. **257**, 10329–37.
33. Cook, J.C., Chock, P.B. (1992) Isoforms of mammalian ubiquitin-activating enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 24315–21.
34. Lv, Z., Williams, K.M., Yuan, L., Atkison, J.H., Olsen, S.K. (2018) Crystal structure of a human ubiquitin E1–ubiquitin complex reveals conserved functional elements essential for activity. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 18337–52.
35. Machida, Y.J., Machida, Y., Chen, Y., Gurtan, A.M., Kupfer, G.M., D’Andrea, A.D., Dutta, A. (2006) UBE2T Is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. *Molecular Cell* **23**, 589–96.
36. Alpi, A.F., Pace, P.E., Babu, M.M., Patel, K.J. (2008) Mechanistic insight into site-restricted monoubiquitination of FANCD2 by Ube2t, FANCL, and FANCI. *Molecular Cell* **32**, 767–77.
37. Chaugule, V.K., Arkinson, C., Toth, R., Walden, H. (2018) Allosteric network in Ube2T drives specificity for RING E3 catalysed ubiquitin signals. *BioRxiv*, 429076
38. Morreale, F.E., Testa, A., Chaugule, V.K., Bortoluzzi, A., Ciulli, A., Walden, H.

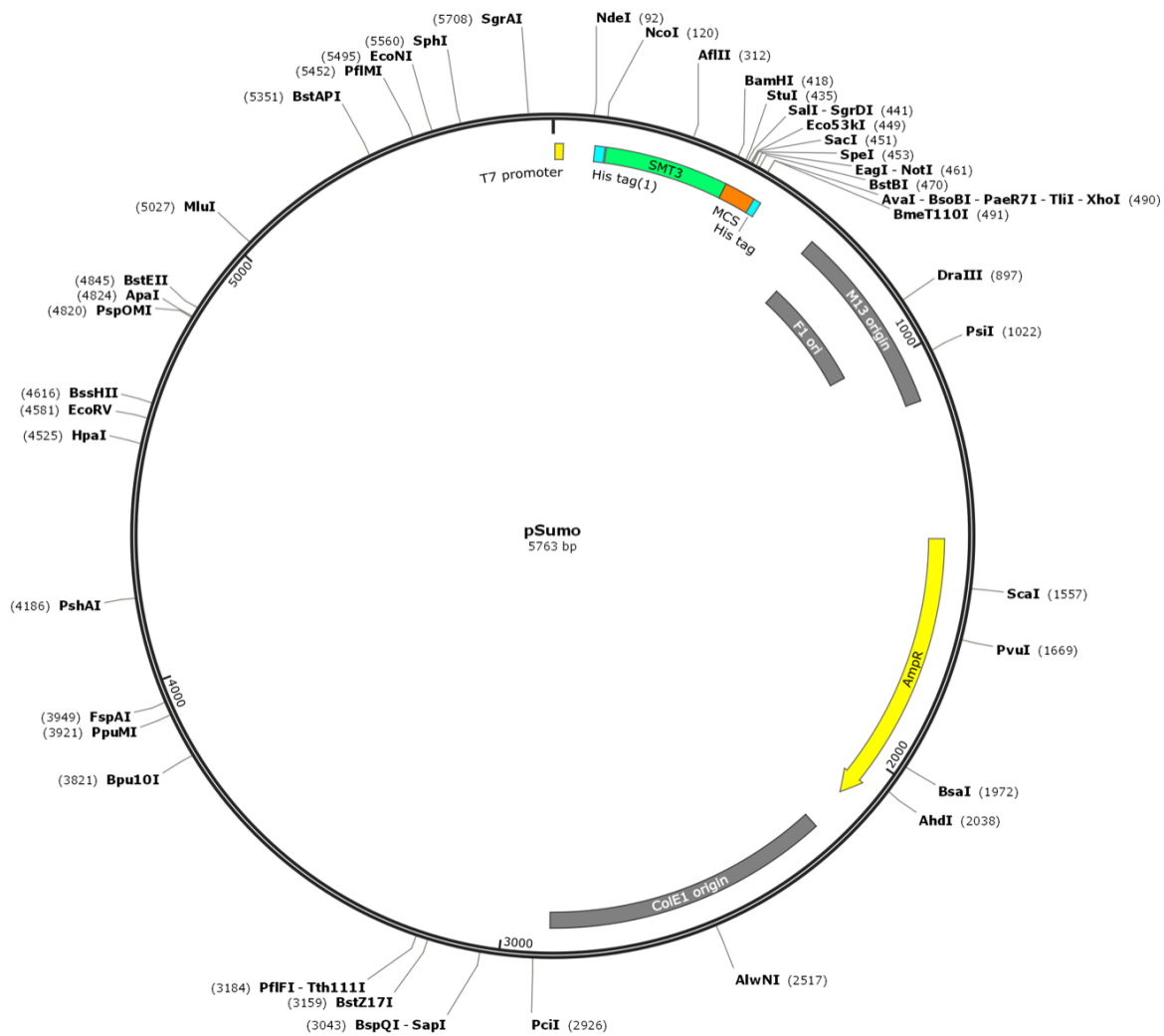
- (2017) Mind the metal: A fragment library-derived zinc impurity binds the E2 Ubiquitin-conjugating enzyme Ube2T and induces structural rearrangements. *Journal of Medicinal Chemistry* **60**, 8183–91.
39. Sato, K., Toda, K., Ishiai, M., Takata, M., Kurumizaka, H. (2012) DNA robustly stimulates FANCD2 monoubiquitylation in the complex with FANCI. *Nucleic Acids Research* **40**, 4553–61.
  40. Miles, J.A., Frost, M.G., Carroll, E., Rowe, M.L., Howard, M.J., Sidhu, A., Chaugule, V.K., Alpi, A.F., Walden, H. (2015) The Fanconi anemia DNA repair pathway Is regulated by an interaction between ubiquitin and the E2-like fold domain of FANCL. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 20995–6.
  41. Cole, A.R., Lewis, L.P.C., Walden, H. (2010) The structure of the catalytic subunit FANCL of the Fanconi anemia core complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**, 294–98.
  42. Hodson, C., Cole, A.R., Lewis, L.P.C., Miles, J.A., Purkiss, A., Walden, H. (2011) Structural analysis of human FANCL, the E3 ligase in the Fanconi anemia pathway. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 32628–37.
  43. Hodson, C., Purkiss, A., Miles, J.A., Walden, H. (2014) Structure of the human FANCL RING-Ube2T complex reveals determinants of cognate E3-E2 selection. *Structure* **22**, 337–44.
  44. Timmers, C., Taniguchi, T., Hejna, J., Reifsteck, C., Lucas, L., Bruun, D., Thayer, M., Cox, B., Olson, S., D'Andrea, A.D., Moses, R., Grompe, M. (2001) Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Molecular Cell* **7**, 241–48.
  45. Taniguchi, T. (2002) S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* **100**, 2414–20.
  46. Andreassen, P.R. (2004) ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes & Development* **18**, 1958–63.
  47. Abraham, R.T. (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development* **15**, 2177–96.
  48. Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., D'Andrea, A.D. (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Molecular Cell* **7**, 249–62.
  49. Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Ballif, B.A., Gygi, S.P., Hofmann, K., D'Andrea, A.D., Elledge, S.J. (2007)

- Identification of the FANCI Protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* **129**, 289–301.
50. Sims, A.E., Spiteri, E., Sims, R.J., Arita, A.G., Lach, F.P., Landers, T., Wurm, M., Freund, M., Neveling, K., Hanenberg, H., Auerbach, A.D., Huang, T.T. (2007) FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nature Structural & Molecular Biology* **14**, 564–67.
  51. QIAGEN QIAquick® Spin handbook URL: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=95f10677-aa29-453d-a222-0e19f01ebe17&lang=en> [Viděno duben 17, 2019].
  52. Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O. (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* **6**, 343–45.
  53. Gundry, R.L., White, M.Y., Murray, C.I., Kane, L.A., Fu, Q., Stanley, B.A., Van Eyk, J.E. (2009) Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Current Protocols in Molecular Biology* **10**, 1-23.
  54. Chandru, K., Gilbert, A., Butch, C., Aono, M., Cleaves, H.J. (2016) The Abiotic chemistry of thiolated acetate derivatives and the origin of life. *Scientific Reports* **6**, 29883.

# 10 Přílohy



Příloha 1: Klonovací vektor pGEX-GP-2 – genetická mapa



Příloha 2: Klonovací vektor pSUMO – genetická mapa

