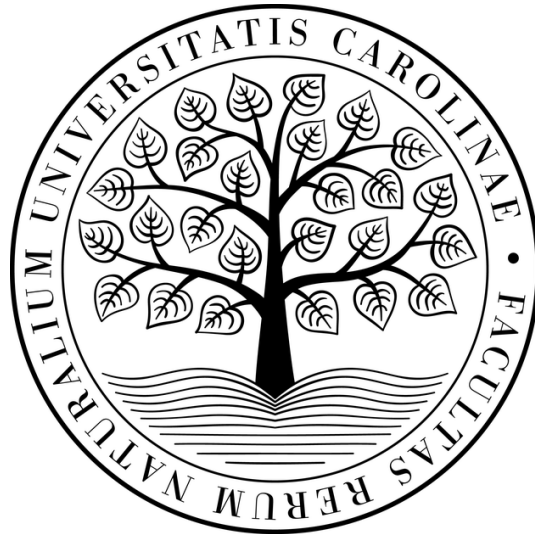


UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Molekulární mechanismus regulace opravné dráhy Fanconiho anémie
fosforylací proteinu FANCI**

**The role of FANCI phosphorylation in the Fanconi anemia DNA repair
pathway**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Krejčová

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jan Šilhán, Ph.D.

Praha, 2019

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jana Šilhána Ph.D., a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Šilhánovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a odborné vedení mé diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Jitce Bartošové Ph.D. za starostlivou péči o hmyzí buňky a za pomoc při přípravě bakulovirů. Ráda bych též poděkovala Mgr. et Mgr. Evženovi Bouřovi Ph.D. za podporu a celému kolektivu laboratoře za příjemné a přátelské prostředí a ochotu kdykoliv pomoci. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům, kteří mi byli oporou při celém studiu.

ABSTRAKT

Fanconiho anémie je autosomálně recesivní onemocnění způsobené mutací v jednom z Fanconiho genů. Mezi projevy tohoto onemocnění patří vývojové abnormality, poruchy tvorby kostní dřeně, zvýšená citlivost na činnidla způsobující tvorbu meziřetězcových spojení komplementárních vláken DNA predispozice k rakovině a mnoho dalších. Takto vzniklá spojení vláken DNA jsou opravena za pomoci opravné dráhy Fanconiho anémie, která pro správnou funkci vyžaduje monoubiquitylaci proteinu FANCD2, která je závislá na fosforylaci proteinu FANCI pomocí ATR kinasy. Bylo zjištěno, že fosforylace FANCI spouští tuto opravnou dráhu, ovšem přesný molekulární mechanismus není doposud znám.

V této práci byl studován molekulární mechanismus regulace opravné dráhy Fanconiho anémie za pomoci fosforylace proteinu FANCI. Za tímto účelem byly vytvořeny fosfomimetické mutanty tohoto proteinu, s jejichž pomocí byla sledována vazba na DNA. Hlavním cílem této diplomové práce bylo odhalit jak fosforylace proteinu FANCI ovlivňuje jeho vazbu na DNA, a to s i bez přítomnosti jeho vazebného partnera FANCD2. Fosfomimetické mutace na určitých fosforylačních místech byly zkoumány a porovnány v DNA vazebných testech a také za pomoci anizotropie fluorescence. Vliv fosforylace FANCI na monoubiquitylaci FANCD2 byl zkoumán pomocí monoubiquitylačních reakcí.

Klíčová slova: Fanconiho anémie, opravná dráha Fanconiho anémie, oprava poškozené DNA, FANCI, FANCD2, DNA vazebné testy, fosforylace FANCI, monoubiquitylace FANCD2

ABSTRACT

Fanconi anemia is an autosomal recessive disorder caused by mutation in one of Fanconi genes and it is manifested by developmental abnormalities, bone marrow failure, predisposition to cancer, cellular sensitivity to cross-linking agents and many other symptoms. Proteins encoded by Fanconi genes and some other proteins are part of Fanconi anemia pathway (FA pathway), which is responsible for DNA repair of an interstrand cross-link (ICL). The repair by this pathway requires monoubiquitination of FANCD2, which is induced and regulated by ATR dependent FANCI phosphorylation. The FANCI phosphorylation initiates the FA pathway but the molecular mechanism of this initialization is not known. Furthermore the proper function of entire pathway requires both: sequence of phosphorylation events of FANCI and monoubiquitination of FANCI:FANCD2 complex .

The principle of this work was to study molecular mechanism of initiation and regulation of FA pathway by FANCI phosphorylation. Therefore phosphomimetic mutants of FANCI have been created to investigate their role in processes leading to FANCD2 monoubiquitination. The main aim was to reveal how the phosphorylation of FANCI affects DNA binding and also DNA binding of FANCI:FANCD2 complex. Since both DNA and FANCI phosphorylation are required for proper FANCD2 monoubiquitination, individual phosphorylation mimetic and phosphorylation dead mutants of FANCI were measured and compared in DNA binding assays and by fluorescence anisotropy. The effect of FANCI phosphorylation on monoubiquitination of FANCD2 was studied using monoubiquitination assays.

Key words: Fanconi anemia, Fanconi anemia pathway, DNA repair pathway, FANCI, FANCD2, phosphorylation of FANCI, monoubiquitination of FANCD2, DNA binding assays

(In Czech)

SEZNAM ZKRATEK

<i>AG20</i>	komplex proteinů FANCA, FANCG, FAAP20
<i>APS</i>	peroxodisíran amonný, z angl. ammonium persulfate
<i>ATM</i>	z angl. ataxia-telangiectasia mutated
<i>ATR</i>	z angl. ataxia-telangiectasia and Rad3-related
<i>BL100</i>	komplex proteinů FANCB, FANCL, FAAP100
<i>BME</i>	β-merkptoethanol
<i>BRCA</i>	rakovina prsu, z angl. breast cancer
<i>CEF</i>	komplex proteinů FANC, FANCE a FANCF
<i>dH₂O</i>	deionizovaná voda
<i>DNA</i>	deoxyribonukleová kyselina, z angl. deoxyribonucleic acid
<i>dsDNA</i>	dvouřetězcová DNA (z angl. double-stranded DNA)
<i>EDTA</i>	kyselina ethylendiamintetraoctová, z angl. ethylenediaminetetraacetic acid
<i>ESI</i>	„elektrosprejová“ ionizace, z angl. electrospray ionization
<i>FA</i>	Fanconiho anémie
<i>FAAP</i>	asociovaný protein základního nukleárního komplexu Fanconiho anémie, z angl. Fanconi anemia core complex-associated protein
<i>FANC</i>	komplementační skupina Fanconiho anémie, z angl. Fanconi anemia complementation group
<i>FANCD2</i>	komplementační skupina Fanconiho anémie D2, z angl. Fanconi anemia complementation group D2
<i>FANCI</i>	komplementační skupina Fanconiho anémie I, z angl. Fanconi anemia complementation group I
<i>FPLC</i>	střednětlaká kapalinová chromatografie, z angl. fast protein liquid chromatography
<i>FW</i>	přední, z angl. forward
<i>HBOC</i>	dědičný nádorový syndrom karcinomu prsu a vaječníků, z angl. hereditary breast and ovarian cancer syndrome
<i>HEX</i>	hexachlorofluorescein
<i>HRP</i>	křenová peroxidasa, z angl. horseradish peroxidase
<i>ICL</i>	meziřetězcové spojení komplementárních vláken DNA, z angl. interstrand cross-link
<i>ID2</i>	heterodimer proteinů FANCI a FANCD2

<i>IPTG</i>	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
<i>LB</i>	kultivační médium, z angl. lysogeny broth
<i>MCS</i>	mnohočetné klonovací místo, z angl. multiple cloning site
<i>MMC</i>	mitomycin C
<i>NTA</i>	nitrilotrioctová kyselina, z angl. nitrilotriacetic acid
<i>PB</i>	fosfátový pufr, z angl. phosphate buffer
<i>PBS</i>	fosfátový pufr, z angl. phosphate buffered saline
<i>PE</i>	„phosphate/ethanol“
<i>PCR</i>	polymerasová řetězová reakce, z angl. polymerase chain reaction
<i>REV</i>	zadní, z angl. reverse
<i>RPM</i>	otáčky za minutu, z angl. revolutions per minute
<i>SDS</i>	dodecylsírán sodný, z angl. sodium dodecyl sulfate
<i>SDS-PAGE</i>	SDS polyakrylamidová elektroforéza
<i>ssDNA</i>	jednořetězcová DNA
<i>TAE</i>	tris-acetátový pufr s EDTA
<i>TBE</i>	tris-borátový pufr s EDTA
<i>TE</i>	tris/EDTA
<i>TEV</i>	virus tabákové mozaiky, z angl. tobacco etch virus
<i>TCEP</i>	tris(2-karboxyethyl)fosfin, z angl. tris(2-carboxyethyl)phosphine
<i>TEMED</i>	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
<i>TRIS</i>	tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>UAF1</i>	z angl. USP1 associated factor-1
<i>USP1</i>	z angl. ubiquitin-specific protease 1
<i>WT</i>	divoký kmen, z angl. wild-type
<i>X-Gal</i>	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galaktosid
<i>YA</i>	jeden řetězec DNA replikační vidličky označený A
<i>YAB</i>	DNA replikační vidlička
<i>YB</i>	druhý řetězec replikační vidličky označený B
<i>YFP</i>	žlutý fluorescenční protein, z angl. yellow fluorescent protein

OBSAH

1	TEORETICKÝ ÚVOD	9
1.1	Fanconiho anémie	9
1.2	Meziřetězcová spojení komplementárních vláken DNA	10
1.3	Fanconiho opravná dráha	12
1.4	Hlavní proteiny aktivace Fanconiho opravné dráhy	13
1.4.1	FANCD2 („Fanconi anemia complementation group D2“)	13
1.4.2	FANCI („Fanconi anemia complementation group I“)	14
1.4.3	Popis struktury obou proteinů	14
1.4.4	Fosforylace FANCD2 proteinu	15
1.4.5	Fosforylace FANCI proteinu	16
1.4.6	Monoubiquitinylace proteinového komplexu ID2	17
1.4.7	Deubiquitinylace proteinového komplexu ID2	18
1.4.8	Vazba FANCD2 a FANCI na DNA	18
1.5	Fanconiho anémie a nádorová onemocnění	18
2	CÍLE PRÁCE	20
3	PŘÍSTROJE A MATERIÁL	21
3.1	Přístroje a pomůcky	21
3.2	Materiál a chemikálie	22
3.3	Roztoky, pufrý a média	22
3.4	Enzymy	23
3.5	Bakteriální kmeny	23
3.6	Oligonukleotidy	24
3.6.1	Oligonukleotidy pro přípravu fosfomimetických mutantů	24
3.6.2	Sekvenační oligonukleotidy	24
3.6.3	Oligonukleotidy pro tvorbu DNA	24
4	METODY	25
4.1	Příprava mutantů FANCI	25
4.1.1	Návrh mutantu 5A genu <i>FANCI</i>	25
4.1.2	Mutagenese pomocí PCR	25
4.1.3	Elektroforéza v agarosovém gelu	26
4.1.4	Přečištění PCR produktu	27
4.1.5	Stanovení koncentrace DNA	27
4.1.6	Ligační reakce	27
4.1.7	Transformace kompetentních buněk DH5- α	28
4.1.8	Nízkoobjemová příprava plasmidové DNA	28
4.1.9	Sekvenování DNA	28
4.1.10	Návrh a příprava fosfomimetických mutantů FANCI	28
4.2	Příprava monoubiquitinylačních mutantů FANCI a FANCD2	29
4.3	Příprava bakulovirové plasmidové DNA	30
4.3.1	Transformace kompetentních buněk DH10EmBacY <i>E. coli</i>	30
4.4	Expresse proteinu v hmyzích buňkách <i>Sf9</i>	31
4.4.1	Infekce hmyzích buněk <i>Sf9</i>	31
4.4.2	Infekce hmyzí buněčné linie <i>Sf9</i> pro produkci proteinů	32
4.4.3	Sklizení produkci	32
4.5	Izolace proteinu	33
4.6	Purifikace proteinu	33
4.6.1	Afinitní chromatografie	33
4.6.2	Diskontinuální elektroforéza v prostředí SDS (SDS-PAGE)	34
4.6.3	Heparinová chromatografie	34

4.6.4	Štěpení proteasou TEV.....	35
4.6.5	Koncentrování proteinu	35
4.6.6	Gelová permeační chromatografie.....	35
4.7	Přenos proteinu pomocí metody western blot a imunodetekce	36
4.7.1	Přenos proteinů na membránu	36
4.7.2	Blokování	36
4.7.3	Vizualizace proteinů na membráně.....	37
4.8	Vazba proteinů na DNA.....	38
4.8.1	Vytvoření replikační vidličky	38
4.8.2	DNA vazebné analýzy	39
4.8.3	Měření anizotropie fluorescence	40
4.8.4	Monoubiquitylační reakce	42
5	VÝSLEDKY.....	44
5.1	Příprava mutantních proteinů FANCI a FANCD2.....	44
5.2	Izolace proteinu	46
5.3	Imunodetekce histidinové kotvy.....	49
5.4	Vazba proteinů na DNA.....	50
5.4.1	DNA vazebné testy	50
5.4.2	Anizotropie fluorescence	54
5.5	Monoubiquitylační reakce.....	56
6	DISKUZE	58
7	ZÁVĚR	61
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	62
9	PŘÍLOHY.....	66

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Fanconiho anémie

Fanconiho anémie (FA) je autosomálně recesivní onemocnění způsobené zárodečnou mutací obou alel v jakémkoliv z 21 Fanconiho genů, které se označují *FANC* (z angl. FA complementation group) a společně s dalšími pomocnými proteiny se podílejí na Fanconiho opravné dráze [1]. Existují ovšem dvě výjimky, první je mutace v genu *FANCB*, která je vázána na chromosom X a projevuje se zejména u mužů a druhou je mutace v genu *FANCR/RAD51*, která je dominantní [2]. Mutace, kterou trpí nejvíce pacientů, je v genu *FANCA* a postihuje až 65 % pacientů trpících FA. Označení genů *FANC* se odvíjí od jejich schopnosti nahradit (komplementovat) funkci mutovaných genů v buněčné linii získané z pacientů s fenotypem FA a znovuobnovit fenotyp jako u zdravého jedince [3].

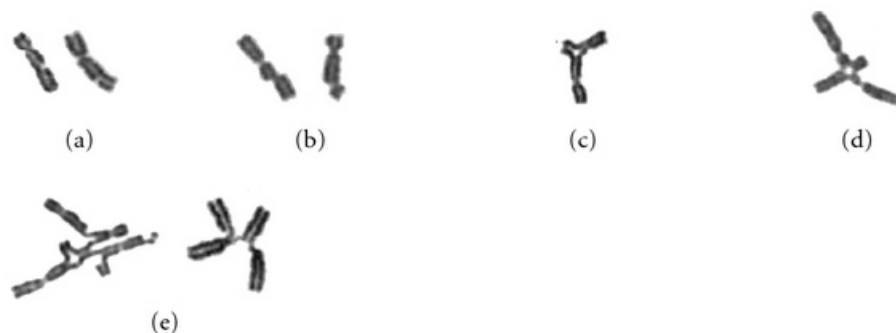
Tato nemoc byla objevena roku 1927 švýcarským pediatrem Guido Fanconim, po němž bylo toto onemocnění následně pojmenováno. Ten si všiml, že v rodině s pěti dětmi zemřeli tři bratři na nemoc mající podobné příznaky jako perniciózní anémie. Jejich krevní obraz byl typický pro toto onemocnění ovšem červené krvinky nejevily známky zvýšené hemolýzy. Rovněž u nich pozoroval různé vývojové abnormality, což není pro perniciózní anémii typické. Posléze Fanconi zjistil, že onemocnění chlapců nezasáhlo pouze červené krvinky, ale všechny hematopoetické kmenové buňky, což ho přesvědčilo o tom, že se jedná o jiné onemocnění spojené mimo jiné i s fyzickými abnormalitami [4].

FA je způsobena neschopností buněk odstranit poškození DNA vzniklé meziřetězcovým kovalentním spojením komplementárních vláken DNA (ICL, z angl. interstrand cross-link). Projevy FA jsou různorodé, zahrnují progresivní pancytopenii, malou stavbu těla, nadměrnou pigmentaci kůže, chromozomální nestabilitu, poruchy tvorby kostní dřevě, vývojové abnormality (může být postižen jak vývoj kostry, tak jakýkoliv orgánový systém), predispozici k nádorovým onemocněním (od vzniku nádorů, leukemie až po vznik asociovaných syndromů jako například dědičného nádorového syndromu karcinomu prsu a vaječníků (HBOC, z angl. hereditary breast and ovarian cancer syndrome)) [5,6]. U pacientů trpících Fanconiho anémií je značné riziko vyvinutí myelodysplastického syndromu nebo akutní myeloidní leukémie (v roce 2010 se toto riziko u pacientů do 40 let

života pohybovalo kolem 52 %). Nádorová onemocnění se tedy u pacientů s FA vyvíjejí již v raném věku [6].

Incidence tohoto onemocnění je po celém světě různorodá. V průměru postihuje 1 dítě na 136000 narozených. Je pozoruhodné, že například ve španělské romské populaci je jeho incidence nejvyšší z celého světa a postihuje až 1 ze 70 narozených dětí [7].

K odhalení FA se provádí analýza založená na sledování tvorby chromozomálních zlomů (příklady sledovaných chromozomálních aberací jsou na obrázku 1) [8]. Buňky pacientů s podezřením na tuto nemoc jsou vystaveny nízké dávce mitomycinu C (MMC) nebo diepoxybutanu, tedy látek způsobujících právě tyto zlomy. Jejich výskyt v lymfocytech nebo případně ve fibroblastech je následně zkoumán. Doplňkovým testem může být ještě detekce monoubiquitinylovaného FANCD2 po vystavení buněk činidlům způsobující ICL pomocí blotovací techniky (western blot) [6].

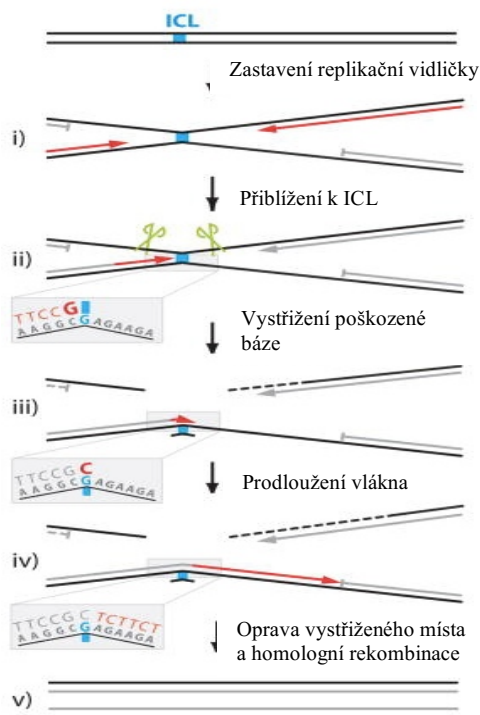


Obrázek 1: Příklady nejčastěji odhalených chromozomálních aberací pomocí analýzy založené na tvorbě chromozomálních zlomů po vystavení buněk MMC. (a) chromatidová mezera, (b) chromatidový zlom, (c, d, e) chromatidové výměny [8].

1.2 Meziřetězcová spojení komplementárních vláken DNA

Meziřetězcová spojení komplementárních vláken DNA zastavují základní procesy v buňkách jako replikaci a transkripci, což může vést k následné buněčné smrti. Modifikované či jinak poškozené báze DNA mohou být mutagenní a potenciálně cytotoxické, což může vést až k tvorbě nádorů. Je tedy nutné tato poškození opravit. Oprava DNA pomocí opravné dráhy FA (obrázek 2, str. 11) je spojená s replikací. Tato oprava je zahájena, jakmile replikační vidlička narazí na ICL. Na počátku se dvě replikační vidličky přibližují k ICL, přičemž se vedoucí vlákna zastaví asi 20-40 nukleotidů

před poškozením (obrázek 2, i). Následně se jedno z vedoucích vláken začne přibližovat blíže k ICL a zastaví se 1 nukleotid před poškozenou bází (obrázek 2, ii). Poté dojde k vystřížení ICL na templátovém vlákně (obrázek 2, iii), což je následováno dvěma kroky. Prvním krokem je vložení nukleotidu naproti původní bázi a následně je vlákno syntetizováno pomocí DNA polymerázy (obrázek 2, iv). Konečné kroky opravy zahrnují opravu vystříženého místa a homologní rekombinaci (obrázek 2, v) [9]. Kromě této opravné dráhy existují i jiné dráhy, které jsou schopny opravit ICL [10].



Obrázek 2: Oprava ICL. i) Replikační vidlička se přibližuje k ICL a zastaví se 20-40 nukleotidů před ním. ii) Jedno z vláken se dále přibližuje a zastaví 1 nukleotid před poškozením. iii) Vystřížení poškozené báze. iv) Vložení nukleotidu naproti původní bázi. v) Opravená DNA [9].

ICL mohou být způsobeny chemickými modifikacemi, environmentálními vlivy, endogenními látkami produkovanými při buněčných procesech nebo také různými chemickými činidly [11]. Mezi chemické látky způsobující ICL patří bifunkční alkylační činidla jako například dusíkaté yperity, mitomycin c a také cisplatina. Dusíkaté yperity, které reagují s N7 guanidylovou skupinou na DNA, byly prvními látkami používanými v protinádorové terapii a stále hrají významnou roli v boji proti různým typům nádorových onemocnění [12]. I v dnešní době se při vývoji protinádorových léčiv využívají reakce s činidly způsobujícími ICL [13].

Látka, která byla hojně používána při zkoumání Fanconihovo opravné dráhy, je již zmíněný mitomycin c. Ten reaguje s guanidylovou skupinou skrz malý žlábek na DNA.

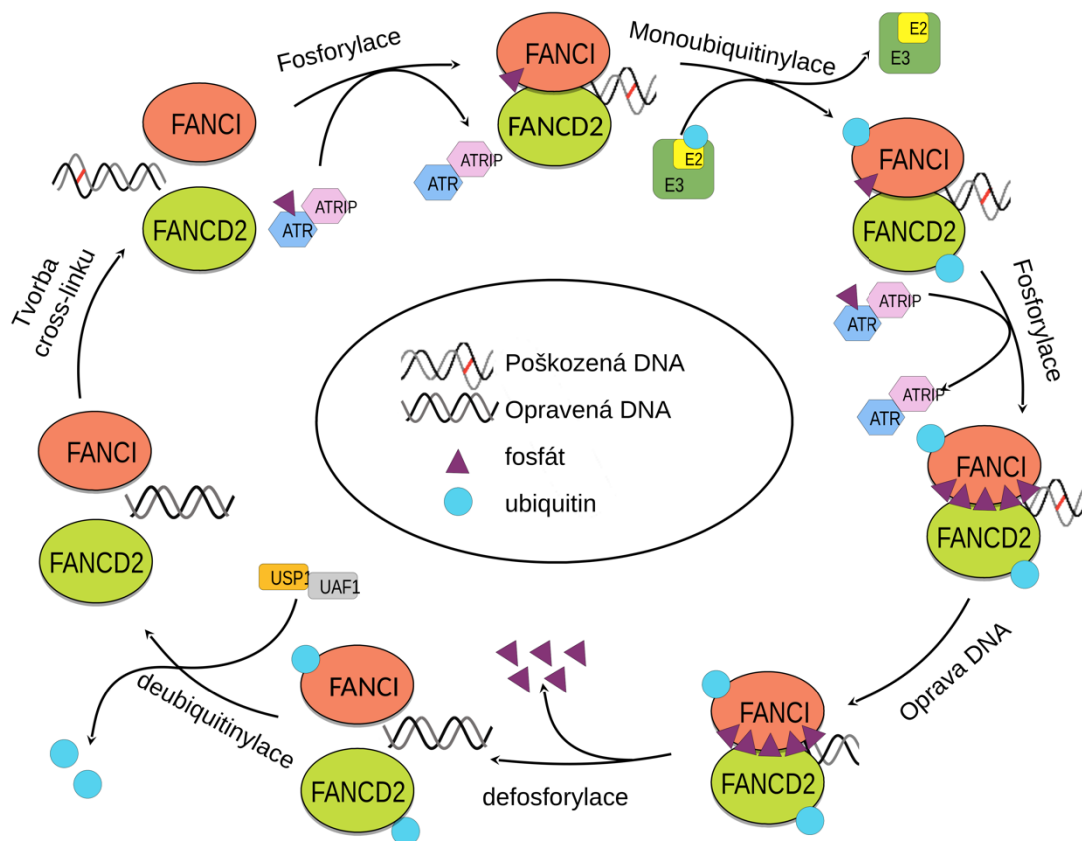
MMC je sám o sobě relativně inertní a proto je pro jeho alkylační funkci nutná jeho chemická či enzymatická aktivace [14].

1.3 Fanconiho opravná dráha

Fanconiho opravná dráha je, jak již bylo zmíněno v kapitole 1.1, složena z 21 Fanconiho genů [9]. Hlavní úlohou této opravné dráhy je zajistit opravu poškození DNA za pomoci monoubiquitylace heterodimeru FANCI:FANCD2 (dále jen ID2) a jeho lokalizace v chromatinu [6].

Správná funkce této opravné dráhy je tedy závislá na monoubiquitylaci FANCD2, pro kterou je nutná předchozí fosforylace FANCI proteinu (obrázek 3, str. 13), přičemž oba tyto děje budou detailněji popsány v dalších kapitolách. Monoubiquitylace FANCD2 je katalyzována základním nukleárním komplexem Fanconiho anémie (z angl. Fanconi anemia core complex) (ubiquitin E3 ligasovým komplexem), který je složen z FANCA a FAAP (asociovaný protein základního nukleárního komplexu Fanconiho anémie, z angl. Fanconi anemia core complex-associated protein) proteinů, konkrétně FANCA, –B, –C, –E, –F, –G, –L a –M a FAAP20, FAAP24 a FAAP100. Ačkoliv je integrita tohoto komplexu pro tuto modifikaci esenciální, k *in vitro* monoubiquitylačním reakcím není nukleární komplex nutný [15–17].

Ve Fanconiho opravné dráze byla zaznamenána tvorba tří sub-komplexů. Proteiny FANCB, FAAP100 spolu s FANCL tvoří dimerní sub-komplex označovaný jako BL100. Dimerizaci zajišťuje výhradně FANCB a zbylé dva komponenty se vážou každý k jednomu monomeru tohoto proteinu. FANCC, FANCE a FANCF proteiny se formují v další sub-komplex nazývaný CEF, který podporuje interakci mezi BL100 a ID2 a tak urychluje katalýzu monoubiquitylační reakce. Poslední komplex není nutný pro *in vitro* monoubiquitylaci, ale i přesto se váže ve stechiometrickém poměru k BL100, jedná se o komplex AG20, složený z FANCA, FANCG a FAAP20 [18].



Obrázek 3: Souhrnný model role fosforylace a monoubiquitinylace FANCI proteinu při regulaci monoubiquitinylace FANCD2 vedoucí k opravě ICL ve Fanconiho opravné dráze.

Po vzniku ICL dochází k vytvoření komplexu ID2, jeho navázání na DNA a fosforylaci FANCI proteinu na místě S556 zprostředkované ATR kinasou. Následuje monoubiquitinylace komplexu a fosforylace zbylých fosforylačních míst na FANCI proteinu. Poté dochází k opravě DNA, defosforylaci, uvolnění DNA a rozpadu komplexu ID2. Posledním krokem je deubiquitinylace obou proteinů.

1.4 Hlavní proteiny aktivace Fanconiho opravné dráhy

1.4.1 FANCD2 („Fanconi anemia complementation group D2“)

FANCD2 je protein skládající se z 1451 aminokyselin, jeho molekulová hmotnost činí 164 kDa a jeho struktura je popsána v kapitole 1.4.3 a znázorněna na obrázku 4 (str. 15). Byl objeven roku 2001 pomocí pozičního klonování genů [19]. Byly odhaleny dvě isoformy tohoto proteinu: nemodifikovaná forma (164 kDa) a forma s vyšší molekulovou hmotností (173 kDa), která je posttranslačně modifikována kovalentním připojením jednoho ubiquitinu na místo K561 v lidském genu [20]. Mutaci v genu pro FANCD2 má asi 6% pacientů trpících Fanconiho anémií. Přestože vrozené abnormality má asi 30% jedinců trpících FA, každý jedinec s mutací v tomto genu vykazuje vrozený defekt [21].

1.4.2 FANCI („Fanconi anemia complementation group I“)

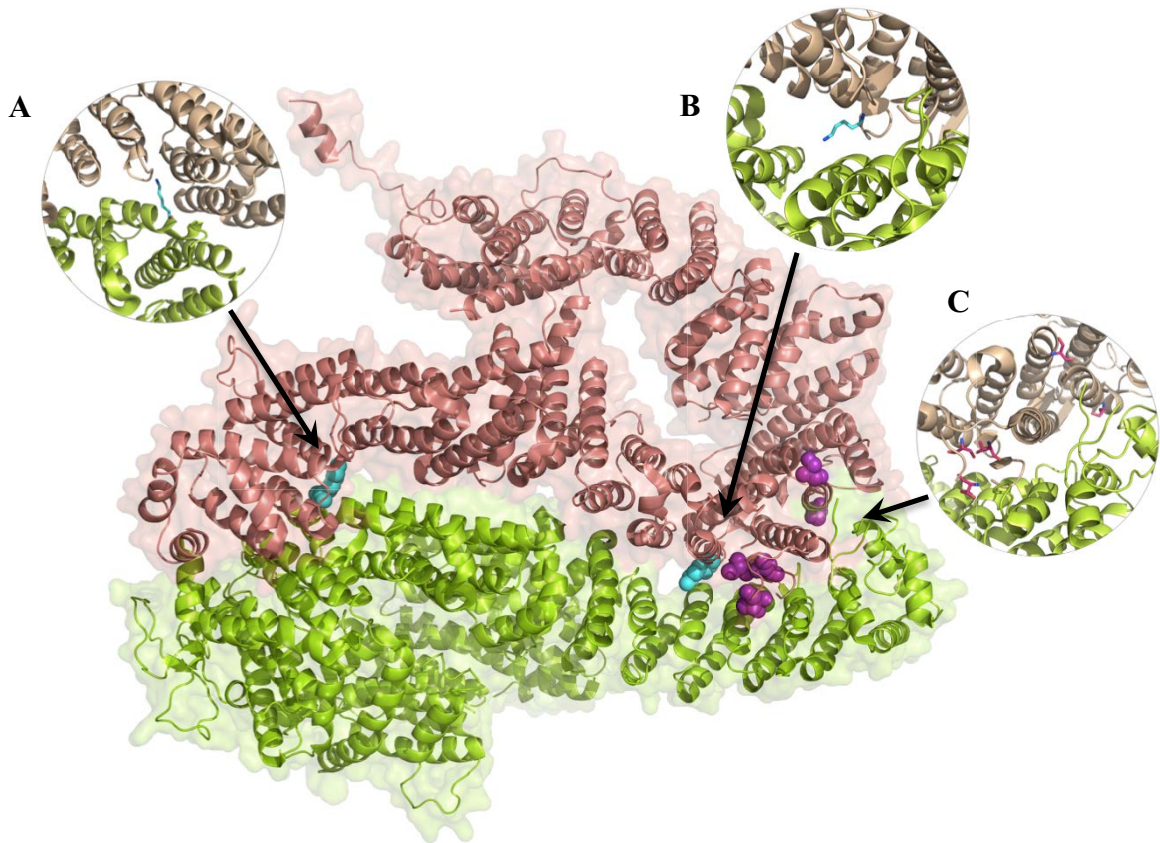
Existence FANCI byla poprvé prokázána na základě komplementační analýzy v roce 2004 [22]. Gen *FANCI* byl identifikován roku 2007 při pátrání po homologu pro FANCD2 v databázi a také za pomoci pozičního klonování, rovněž také při identifikaci substrátů pro ATM/ATR kinasy [23]. Jedná se o 1328 aminokyselin dlouhý protein s molekulovou hmotností 149 kDa. Stejně jako u FANCD2 byla u tohoto proteinu odhalena monoubiquitinylovaná isoforma o molekulové hmotnosti 158 kDa [16]. FANCI přímo interaguje s FANCD2 za vzniku I:D2 heterodimeru, který je zobrazen na obrázku 4 na následující straně [24].

1.4.3 Popis struktury obou proteinů

Struktury obou proteinů mají velmi podobný tvar a jejich dimer je znázorněn na obrázku 4 (str. 15). Oba proteiny jsou tvořeny převážně α helixy, které jsou většinou orientovány antiparalelně a vytváří tak α - α superhelikální struktury označované jako α selenoidy. Každý z těchto dvou proteinů obsahuje 4 α selenoidy o délce od 156 do 310 aminokyselinových zbytků. Oba proteiny obsahují ještě další 2 helikální segmenty, první helikální doména (HD1) se nachází mezi selenoidy 1 a 2 a druhá leží mezi selenoidy 2 a 3 a označuje se jako doména HD2. Oba proteiny se skládají do struktury podobné saxofonu s dlouhým protáhlým N-terminálním koncem, prostřední částí do tvaru U a C-terminální částí. ID2 komplex utváří prstencovou strukturu.

Monoubiquitinylační místa FANCD2 (K559 v případě myšího genu a K561 v případě lidského) a FANCI (K522 u myšího genu a K523 u lidského) se nachází na rozhraní komplexu ID2, konkrétně v tunelech přístupných rozpouštědлу (obrázek 4, A,B, str. 15). Tyto tunely jsou natolik veliké a široké, aby bylo umožněno navázání 4 aminokyselin dlouhému C-konci ubiquitinu, který je napojen na epsilon aminoskupinu lysinu. Tento konec ubiquitinu je sice konformačně flexibilní, což by mohlo pomoci při průchodu k monoubiquitinylačním místům, ale je rovněž možné, že před samotnou monoubiquitylací dochází ke konformační změně, která by dané lysiny zpřístupnila ubiquitinu a celé ubiquitinylační mašinerii a tedy usnadnila celou tuto modifikaci. Tuto teorii také podporuje fakt, že zmíněné tunely jsou příliš malé pro aktivní místo E2 enzymu, který ID2 monoubiquitinyluje.

Oba proteiny (FANCI i FANCD2) mají značnou strukturní homologii, díky které byl protein FANCI objeven. Největší homologii mají selenoidy 2 obou proteinů, a to až 82%. Rozhraní obou proteinů obsahuje téměř shodný počet hydrofobních (42) a polárních (44) postranních řetězců [25].



Obrázek 4: Krystalová struktura heterodimeru mFANCI:mFANCD2.

mFANCI protein je znázorněn červeno-oranžově a mFANCD2 zeleně. Písmeno „m“ před názvy proteinů označuje původ proteinů, tedy z myšího genu (m=mouse). Modrou barvou jsou zvýrazněna monoubiquitinylační místa obou proteinů a barvou fialovou fosforylační místa FANCI. (A) Detailní pohled na ubiquitinylační místo FANCD2. (B) Detail ubiquitinylačního místa FANCI. (C) Detail fosforylačních míst FANCI. Obrázek byl vytvořen v programu MacPyMOL dle krystalové struktury (PDB kód 3S4W) [25].

1.4.4 Fosforylace FANCD2 proteinu

FANCD2 protein je posttranslačně modifikován fosforylací pomocí ATM/ATR kinas (ATM z angl. ataxia-telangiectasia mutated, ATR z angl. ataxia-telangiectasia and Rad3-related). ATM kinasa hraje hlavně koordinační roli při buněčné odpovědi na tvorbu disulfidových můstku v DNA a fosforyluje různé substráty, čímž spouští opravu DNA. ATR kinasa řídí jednotlivé kontrolní body při DNA replikaci a reaguje na přítomnost činidel, které tento proces narušují (jako například UV záření či hydroxyurea) [26–28].

Fosforylace FANCD2 ATM kinasou nemá vliv na jeho monoubiquitinylaci a utvoření nukleárních ohnisek (angl. foci formation), důležitou roli hraje převážně ATR kinasa.

V lidském genu byla identifikována dvě fosforylační místa, konkrétně T691 a S717 pro ATR [29]. Jak fosforylace na těchto dvou místech podporuje monoubiquitinylaci FANCD2 je doposud nejasné.

1.4.5 Fosforylace FANCI proteinu

Jak již bylo zmíněno výše, FANCI byl původně objeven při pátrání po substrátu pro ATM/ATR kinasy. Fosforylace FANCI funguje jako jakýsi molekulární spínač opravné dráhy FA. V lidském genu bylo pro tento protein identifikováno 6 S/TQ klastrů (S556, S559, S565, S596, S617 a S629), které jsou závislé na fosforylaci ATR/ATM kinasou a jsou nezbytné ve Fanconiho opravné dráze [30]. V myším genu (který byl během této práce používán) je těchto míst 5 (S555, T558, T564, S616 a S628). Tato místa jsou znázorněna na obrázku 4C (str. 15). Tři z těchto míst se nachází v oblasti, která podléhá konformační změně při vazbě na FANCD2 a mají pravděpodobně největší význam při opravě ICL [25]. Za pomoci specifických protilátek proti těmto třem místům byli Cheung et al. schopni detekovat fosforylaci závislou na ATR kinase a rovněž zjistili, že pro fosforylaci FANCI na místech S559 a S565 je potřeba předchozí monoubiquitinylace tohoto proteinu. Toto zjištění bylo nečekané, neboť předešlé studie naznačovaly, že pro tuto fosforylaci není předchozí monoubiquitinylace zapotřebí [31]. Odhalili také, že místo S556 je nezávislé na předešlé monoubiquitinylaci („ubiquitination-independent“) a další dvě místa označili jako s ubiquitinem svázaná („ubiquitination-linked“). Všechna tato místa ovšem pozitivně regulují fosforylaci FANCI [30]. Rovněž zjistili, že USP1 deubiquitinasa je důležitá pro správný chod opravné dráhy. Při vyřazení USP1 dochází ke zvýšení monoubiquitinylace FANCD2, ovšem nedochází ke zvýšení fosforylace FANCI na místech svázaných s ubiquitinem, což naznačuje, že i deubiquitinylace pomocí USP1 je nutná ke správné fosforylaci na těchto místech [30].

Je možné vytvořit fosfomimetické mutanty, které jsou ideální pro zkoumání mechanismu aktivace FA opravné dráhy. Byla ověřena funkčnost těchto mutantů ve tkáňových kulturách, a je tedy možné s jejich pomocí studovat molekulární mechanismus aktivace Fanconiho opravné dráhy [31]. Mutanty se připravují nahrazením aminokyseliny (threoninu nebo serinu) na fosforylačním místě proteinu kyselinou

asparagovou, která se díky své karboxylové skupině chová podobně, jako kdyby bylo dané místo fosforylováno. Pokud je účelem zkoumat i částečnou fosforylaci, tedy pouze na některých místech, je třeba zajistit, aby na zbylých místech nedocházelo k přirozené fosforylaci v buňkách, ve kterých se protein exprimuje. V takovém případě se aminokyseliny na těchto místech nahradí alaninem, což fosforylaci znemožní.

1.4.6 Monoubiquitinylace proteinového komplexu ID2

Monoubiquitinylace je esenciální pro průběh opravy DNA. Ubiquitinylace proteinu je víceřadová posttranslační modifikace, při které dochází ke kovalentnímu připojení jedné molekuly ubiquitinu (v případě monoubiquitinylace) nebo řetězce spojených molekul ubiquitinu (polyubiquitinylace) na lysinový zbytek cílového proteinu. Obě tyto modifikace řídí celou řadu procesů. Zatímco polyubiquitinylace má za cíl například označení proteinů určených k degradaci, monoubiquitinylace je nejčastěji spojována s cílenou lokalizací proteinů do specifických subcelulárních oblastí [32,33].

Monoubiquitinylace obou proteinů je zásadní pro jejich akumulaci na místo poškození DNA v chromatinu (utvoření nukleárních ohnisek), kde jsou lokalizovány spolu s dalšími proteiny jako například produktem genu *BRCA 1 (FANCS)* (z angl. breast cancer), což je jeden z hlavních genů způsobující nádorová onemocnění vaječnicků a prsu [20]. Za monoubiquitinylací FANCD2 jsou zodpovědné produkty genů *FANCT* a *FANCL*, tedy E2 a ligasa E3, společně s E1 enzymem a ubiquitinem [17]. Ubiquitin-konjugující enzym E2 a ubiquitin ligasa E3 pro FANCD2 a FANCI jsou UBE2T a FANCL. Je zajímavé, že u pacientů nebyla prozatím odhalena mutace v UBE2T. Bylo prokázáno, že tento protein podléhá autoubiquitinylaci na lysinu 91 [34,35]. Jak monoubiquitinylace FANCD2, tak vytvoření tzv. nukleárních ohnisek probíhá během S fáze buněčného cyklu [20].

Schéma monoubiquitinylace je možné znázornit v několika krocích. Nejprve ubiquitin-aktivující enzym E1 aktivuje ubiquitin tvorbou thioesterové vazby mezi katalytickým cytosinem na E1 a C-terminálním guaninem ubiquitinu v pozici 76. Ubiquitin je poté přenesen z E1 na aktivní místo (cytosin) UBE2T. Následně je přímo přenesen na substrát pomocí E3 ligasy. V lidském genomu jsou kódovány dva E1 enzymy, asi čtyřicet E2 a více než šest set E3 ligas. Ovšem pouze dvacet osm ze zmíněných čtyřiceti E2 enzymů jsou monoubiquitinylační. [36].

1.4.7 Deubiquitylace proteinového komplexu ID2

Rovněž deubiquitylace FANCD2 probíhá za pomoci proteasy USP1 (z angl. ubiquitin-specific protease 1) v komplexu s UAF1 (z angl. USP1 associated factor 1) a je nutná pro správnou funkci této dráhy [17]. N-terminální konec UAF1 obsahuje doménu, která váže a aktivuje USP1, zatímco C-terminální konec obsahuje 2 domény, které zprostředkovávají vazbu na substrát, v tomto případě interagují s FANCI a umožňují tak vazbu komplexu. USP1:UAF1 je jaderný proteinový komplex, jeho monoubiquitylovaná verze je vázaná v chromatinu [37,38].

Monoubiquitylované FANCD2 nikdy zcela nevyumizí, ale je deubiquitylováno pomocí tohoto komplexu pouze do poměru Ub-FANCD2:Ub-FANCI 1:1. FANCI se rovněž částečně deubiquityluje, ovšem vždy za udržení tohoto poměru. Tato skutečnost naznačuje, že monoubiquitylace FANCI určuje hladinu deubiquitylace FANCD2. Deubiquitylační aktivita USP1 je rovněž důležitá pro optimální fosforylaci FANCI [18,30].

1.4.8 Vazba FANCD2 a FANCI na DNA

Několik studií potvrdilo, že ID2 komplex se váže na různé typy DNA, zahrnující jednovláknovou i dvouvláknovou DNA, Holidayovu strukturu (z angl. holiday junctions), a různé rozvětvené struktury DNA, jako například DNA replikační vidličku [24,39]. Jak již bylo řečeno výše, FANCD2 monoubiquitylace je silně stimulována vazbou na DNA. Nedávno bylo prokázáno, že zatímco FANCD2 monoubiquitylace je stimulována lineární a cirkulární dsDNA, monoubiquitylace FANCI je silně stimulována ssDNA a pouze slabě lineární a cirkulární dsDNA. FANCD2 je lokalizováno v chromatinu dříve než FANCI a nezávisle na něm [40].

1.5 Fanconiho anémie a nádorová onemocnění

Přestože je Fanconiho anémie vzácné onemocnění, anomálie ve Fanconiho opravné dráze jsou poměrně časté a podílejí se na vzniku nádorových onemocnění i u jedinců, kteří Fanconiho anémií netrpí. Heterozygotní mutace některého z genů FA v rámci BRCA opravné dráhy způsobují predispozici k nádorovým onemocněním. Zárodečné mutace

jedné alely *BRCA2* (*FANCD1*) zvyšují riziko vzniku nádorového onemocnění prsu téměř na 50 % a vaječníků na 15 % [41,42]. Mutace obou alel vede ke vzniku FA (stejně je tomu i v případě bialelní mutace *BRCA1* (*FANCS*)), nádorů mozku a nádorů měkkých tkání [43]. Mutace v dalších genech spojovaných s BRCA opravnou dráhou (*FANCN* a *FANCI*) mohou způsobovat nádorová onemocnění prsu a vaječníků [44,45].

Ačkoliv některé FA geny mohou sloužit jako somatické nádorové supresory, somatické mutace v FA genech mohou být rakovinotvorné, a to stejně jako v případě heterozygotních mutací bez příznaků Fanconioho anémie. Příkladem je nadměrná tvorba *FANCD2*, která podporuje přežití nádorů závislých na *BRCA1* a *BRCA2* a umožňuje průběh S fáze buněčného cyklu, která je náchylná k chybám [46,47]. Tato přílišná tvorba *FANCD2* byla nalezena u kolorektálních nádorů či metastazujících melanomů [48,49].

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo objasnit funkci fosforylace proteinu FANCI při aktivaci Fanconiho opravné dráhy. Dále také odhalit případný vliv fosforylace na monoubiquitylaci komplexu ID2. Pro dosažení těchto cílů byl zvolen následující postup:

- příprava expresních vektorů mutantů FANCI (1D; 2,3D; 2D3A; 3D2A; 5D; KR) i FANCD2 (KR)
- exprese proteinů v hmyzím expresním systému Sf9
- purifikace všech mutantních forem proteinů FANCI a FANCD2 a odštěpení histidinové kotvy
- porovnání vazby mutantních proteinů FANCI na DNA pomocí DNA vazebných analýz a pomocí měření anizotropie fluorescence, obojí v i bez přítomnosti FANCD2
- stanovení vlivu fosforylace proteinu FANCI na monoubiquitylaci FANCD2

3 PŘÍSTROJE A MATERIÁL

3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy	Adventure Pro, Ohaus
Aparatura a zdroj pro horizontální elektroforézu	EV 231, Consort
Aparatura a zdroj pro vertikální elektroforézu	Mini-PROTEIN Tetra System, Bio-Rad
Bloková lázeň	SBH130D, Stuart
Centrifugační kyvety	Oak Ridge, Sigma
Centrifugy	Allegra X-15 R, rotor SX47910A, Beckmann Coulter Avanti Centrifuge J30I, rotor JA-30.50 Ti, Beckmann Coulter Avanti Centrifuge J26S XPI, rotor JLA-9.1000, Beckmann Coulter Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-1, Eppendorf Centrifuge 5415 R, rotor X, Eppendorf, IX81, Olympus
Fluorescenční mikroskop	FluoroMax-4, HORIBA Scientific
Fluorescenční spektrofotometr	ÅKTA purifier 10, GE Healthcare Life Sciences
FPLC system	Bright-Line™, Sigma-Aldrich
Hemacytometr	Incubating Mini Shaker, VWR
Incubátory	Innova 44, Incubator Shaker Series, New Brunswick Scientific IPP 400, Memmert CO ₂ inkubátor, Sanyo
Kolona pro gelovou chromatografii	Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare Life Sciences
Kolona pro afinitní chromatografii	HiTrap™ Heparin HP 5 ml, GE Healthcare Life Sciences
Koncentrátor	Amicon Ultra 30 kDa, Millipore Ireland Ltd.
Kyveta	High Precision Cell, Hellma Analytics
Laminární box	Clean air, Telstar
Magnetická míchačka	ARE, VELP
Míchačka	Mini Rocker-Shaker, bioSan
Mikroskop	TS100 Eclipse, Nikon
Mikrospektrofotometr	Spectrophotometer ND-1000, Nanodrop
pH metr	HI 3220 pH/ORP Meter; HANNA instrument
Předvážky	EMB 500-1, Kern
Rotační inkubátor	Innova 44, New Brunswick
Rotátor	TubeRoller, Benchmark
Sonikátor	Bandelin sonopro
Termocykler	Professional TRIO Thermocycler, Biometra Product Line
UV-fotoaparát	QUANTUM ST4-1100, Vilbert Lourmat
Vizualizační přístroje	LAS-3000 Imager Fujifilm TYPHOON FLA 9500, GE Healthcare Life Sciences
Vodní lázeň	JB Aqua 2 Plus, Grant
Vortex	Gene 2, Scientific Industries
Zdroj pro vertikální elektroforézu	PowerPac Basic, Bio-Rad

3.2 Materiál a chemikálie

Agarosa	Agarosa SERVA pro DNA elektroforézu, SERVA
Akrylamid/bisakrylamid	Rotiphorese gel 30 (37,5:1), Carl Roth
Ampicilin	Carl Roth
ATP	Sigma-Aldrich
B-merkapt ethanol	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma-Aldrich
EDTA (ethylendiamin tetraoctová kyselina)	Carl Roth
Ethidium bromid	Carl Roth
FuGENE® 6	Thermo Fisher Scientific
Gentamicin	Carl Roth
HCl	PENTA
Chloramfenikol	Carl Roth
IPTG	Thermo Fisher Scientific
Kanamycin	Carl Roth
LB agar podle Lennox	P-Lab
LB medium podle Lennox	P-Lab
Médium na hmyzí buňky	Lonza
Insect-Xpress	
Nanášecí pufr pro DNA elektroforézu	6× DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific
Ni-NTA agarosa	QIAGEN
PB pufr	QIAGEN
PE pufr	QIAGEN
Peroxodisíran amonný	Carl Roth
Protilátka Anti-6× His tag® (HRP)	Abcam
Protilátka Anti-FANCD2	K.J.Patel
Protilátka Anti-FANCI	K.J.Patel
Protilátka Swine Anti-Rabbit	Dako
Immunoglobulins /HRP	
Sady pro purifikaci DNA	QIAquick® PCR Purification kit, Qiagen QIAprep® Spin Miniprep Kit, Qiagen
SDS	Carl Roth
Standard pro DNA elektroforézu	Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific
Standard pro proteinovou elektroforézu	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa, Thermo Fisher Scientific
TCEP	Thermo Fisher Scientific
TEMED	Carl Roth
Tetracyklin	Carl Roth
Tris-Cl	Carl Roth
X-Gal	Thermo Fisher Scientific

3.3 Roztoky, pufrы a média

Coomassie Brilliant Blue barvicí roztok	3 mM Coomassie Brilliant Blue R250; 1,5 M CH ₃ COOH; 50% (V/V) methanol
-----------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

Eluční pufr	20 mM Tris (pH 8,0); 200 mM NaCl; 300 mM imidazol; 3 mM BME; 10% (V/V) glycerol
Ligační pufr T4	5× Rapid Ligation pufr, Thermo Scientific
PBS pufr	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Promývací pufr	20 mM Tris (pH 8,0); 300 mM NaCl; 20 mM imidazol; 3 mM BME; 10% (V/V) glycerol
Pufr pro anizotropii fluorescence	20 mM Tris (pH 7,0); 50/75/100/125/150 mM NaCl; 5% glycerol; 1 mM TCEP
Pufr pro gelovou chromatografii	20 mM Tris (pH 8,0); 200 mM NaCl; 3 mM BME; 10% (V/V) glycerol
Pufr A (pro heparinovou chromatografii)	20 mM Tris (pH 8,0); 200 mM NaCl; 3 mM BME; 10% (V/V) glycerol
Pufr B (pro heparinovou chromatografii)	20 mM Tris (pH 8,0); 1 M NaCl; 3 mM BME; 10% (V/V) glycerol
Pufr pro SDS elektroforézu (Tris-glycinový pufr)	25 mM Tris NaCl; 0,25 M glycin; 0,1% (W/W) SDS; pH 8,8
Reakční pufr pro DNA vazebné analýzy	20 mM Tris (pH 7,4); 150 mM NaCl; 5% (V/V) glycerol; 1mM TCEP
Reakční pufr pro monoubiquitinylaci	20 mM Tris (pH 8,0); 20 mM NaCl; 10% (V/V) glycerol; 1 mM TCEP
Resuspendační pufr	20 mM Tris (pH 8,0); 200 mM NaCl; 20 mM imidazol; 3 mM BME; 10% (V/V) glycerol
TAE pufr 1×	40 mM Tris; 20 mM CH ₃ COOH; 1mM EDTA, pH 8,0
TBE pufr 1×	89 mM Tris; 2 mM EDTA; 89 mM kyselina boritá
TE pufr	10 mM Tris (pH 8,0); 1mM EDTA
Transférovní pufr	39 mM glycin; 48 mM Tris-Cl; 0,037% SDS; 20 mM methanol
Vzorkový pufr 5×	60 mM Tris (pH 6,8); 25% glycerol; 2,9% SDS; 714 mM BME; 0,1% bromfenolová modř

3.4 Enzymy

Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix	New England BioLabs
T4 DNA ligasa	Thermo Scientific
TEV proteasa	připravena v laboratoři

3.5 Bakteriální kmeny

Escherichia coli DH5α	Invitrogen
Escherichia coli DH10EmBacY	Geneva Biotec

3.6 Oligonukleotidy

3.6.1 Oligonukleotidy pro přípravu fosfomimetických mutantů

Mutace na A proteinu FANCI	S555A	rev	[phos]TGggcGCACTGggcGGACGGCAGGCTGCCTAGG
	T558A		
	T564A	fw	GTCTATTGGTGTGcgcCAGGTGCGCGTGGACG
	S616A	rev	[phos]TAGCCAGCTGggcGTTCCGTCGAAGGACATCGTAG
	S628A	fw	GTCAATCATGCAGACTCTCTCgacCAGTTAAAACAGTTCTATGAGCCAGAG
Mutace na D proteinu FANCI	S555D	rev	[phos]CGGCAGGCTGCCTAGGACTTTAAAG
		fw	TCCgacCAGTGCgacCAGTCTATTG
	T558D	rev	[phos]CAATAGACTGgacGCACTGggcGGA
		fw	GTGTCgacCAGGTGCGCGTGGAC
	T564D	rev	[phos]CAATAGACTGggcGCACTGggcGGA
		fw	GTGTCgacCAGGTGCGCGTGGAC
	S616D	rev	[phos]TAGCCAGCTGgacGTTCCGTCGAAGGACATCGTAG
	S628D	fw	GTCAATCATGCAGACTCTCTCgacCAGTTAAAACAGTTCTATGAGCCAGAG
KR mutace proteinu FANCI	KR	rev	[phos]CCGCAAGACGAGGATCAAGGA
	KR	fw	AGGGCTATGTTTGCCAGCCAG
KR mutace proteinu FANCD2	KR	rev	[phos]CCGGATCACCAGGTGCATGTCG
	KR	fw	agaCAGCTCTCTAGCACTGTGTTCAAG

3.6.2 Sekvenační oligonukleotidy

FANCI	687	fw	TCTGGACGGAATCATAGCC
	1236	fw	AATGACAAACCAGCACGC
	1809	fw	GCTTTACAACGGTTTCTACG
	2409	fw	CCTGTCCTTGAAGTTTGTGTC
	3180	fw	AGAGATTGAGAAGACAGACCAC
	3652	fw	CAAATAAGAGCAGTGACGC
	798	rev	GTGATAGAGTTCGTCTGCTGG
	1838	rev	CGAAGGACATCGTAGAAACC
	3253	rev	GAACAAGTAAACAGACAGTGGG
	3916	rev	CGTTTTCGTCTTCCTCATC
FANCD2	1403	fw	GCAGGAAGTGTTGGTGC
	pACEBacI	fw	CGGATTATTCATACCGTCCCACC
	992	fw	GGACTAGCAAGCTCTTCAGG
	1912	fw	GATGAATTTGCCAACCTGATCC
	2914	fw	CTTGCTGGAAGATCTTCCC
	3831	fw	CCGAGATTCAGCATCCTTCTC

3.6.3 Oligonukleotidy pro tvorbu DNA

YA	ATGCCTGCACGAATTAAGCCATTCGTAATCACTCGAGC
YB	GCTCGAGTGATTACGAATGGCGTGGAATCCTGAGCATGC
YA HEX	[HEX]ATGCCTGCACGAATTAAGCCATTCGTAATCACTCGAGC

4 METODY

4.1 Příprava mutantů FANCI

4.1.1 Návrh mutantu 5A genu *FANCI*.

Ke zkoumání molekulárního mechanismu fosforylace proteinu FANCI v opravné dráze FA bylo využito fosfomimetických mutantů na základě jejich použití ve tkáňových liniích v několika článcích [31][50].

Pro přípravu mutantů z obrázku 5 (str. 29) byl využit divoký kmen (WT, z angl. wild-type) myšního genu *FANCI*, který byl již dříve zaklonován do vektoru pACEBac1 RNDr. Janem Šilhánem, PhD. (příloha 1). Tento vektor obsahuje v kódující sekvenci histidinovou kotvu, štěpné místo pro TEV proteasu a ve čtecím rámci gen *FANCI*, který je vložen do klonovacího místa (MCS, z angl. multiple cloning sites) obklopené polh promotorem a SV40 polyA signální sekvencí. Dále se ve vektoru nachází místo kódující gentamicinovou rezistencí a transponovatelné elementy (Tn7L, Tn7R), které kódují transpozázu umožňující místně specifickou inzerci.

Pro přípravu fosfomimetických mutantů byly nejprve navrženy primery (oligonukleotidy jejichž sekvence je znázorněna v kapitole 3.6.1), které měly za cíl mutaci WT genu *FANCI* na určených fosforylačních místech, konkrétně záměnu původního tripletu bází kódující serin nebo threonin za triplet bází kódující alanin. S nimi byla následně provedena mutagenezní PCR reakce (kapitola 4.1.2). Přední primer byl navržen tak, aby obsahoval mutovanou sekvenci bází kódující alanin (v tomto případě GCC) a zadní primer nasedal před místem mutace a na 5' konci byl umístěn fosfátový zbytek. Takto byly připraveny mutační primery pro všech pět fosforylačních míst (obr. 5, str. 29).

4.1.2 Mutageneze pomocí PCR

Pro přípravu mutantů FANCI byla využita metoda PCR (polymerázová řetězová reakce, z angl. polymerase chain reaction). Celkový objem reakce byl 20 μ l a do reakce byly přidány postupně následující roztoky dle tabulky 1 (str. 26), tedy templátová DNA (WT *FANCI*), primery, Q5 master mix a sterilní voda.

Zkumavka byla poté umístěna do termocykleru, kde byly nastaveny jednotlivé teploty, doby trvání a počet opakování cyklů (tabulka 2, str. 26). Teplotu nasedání primerů je možné spočítat pomocí online kalkulatoru New England Biolabs [51]. Po ukončení

posledního cyklu byl vzorek analyzován elektroforeticky na 1% agarosovém gelu (kapitola 4.1.3).

Během reakce vznikla dvě komplementární vlákna, jedno obsahovalo na svém 5' konci fosfátový zbytek (původně pocházející z primeru) a na 3' konci OH skupinu, což zajistilo, že toto vlákno bude možné následně spojit pomocí T4 ligasy. Druhé vlákno fosfátový zbytek neneslo ani na jednom konci, na obou byla tedy OH skupina. Toto vlákno potřebuje pro své spojení ligační aparát buněk do kterých bude vloženo, konkrétně *E.coli* DH5- α .

Tabulka 1: Složení PCR směsi pro amplifikaci mutovaného úseku DNA.

Složky	Množství
Templátová DNA	1 μ l (100 ng)
Přední primer	0,5 μ l (5 μ M)
Zadní primer	0,5 μ l (5 μ M)
Q5 Master mix	10 μ l
dH ₂ O	8 μ l

Tabulka 2: Průběh PCR reakce. Po čtvrtém kroku došlo k navrácení ke kroku dva. Takto proběhlo 30 opakování tohoto cyklu a poté proběhl krok 5 a 6, ve kterém vzorky zůstaly do doby vyzvednutí.

Krok cyklu	Teplota [°C]	Doba trvání [s]
1.	98	30
2.	95	15
3.	67	15
4.	72	105
6.	70	120
7.	4	∞

4.1.3 Elektroforéza v agarosovém gelu

Na agarosovou elektroforézu byl připraven 1% gel. Bylo připraveno více gelů, které byly následně skladovány v lednici v pufru TAE. Do Erlenmeyerovy baňky byly naváženy 2 g agarosy a bylo přidáno 200 ml pufru TAE. Roztok byl následně krátce povařen v mikrovlnné troubě. Jakmile gel zchladl na teplotu, kdy bylo možné na baňku přiložit ruku, bylo přidáno 50 μ l ethidiumbromidu. Gel byl poté přelit do předem připravené aparatury s hřebeny. Po ztuhnutí byly hřebeny odebrány a gel byl přenesen do aparatury na horizontální agarovou elektroforézu.

Na gel byly naneseny 2 μ l 1 kb standardu (Gene ruler) a 2 μ l vzorku byly smíchány se 2 μ l vzorkového pufru (5 \times DNA Loading Dye) a rovněž naneseny na gel. Elektroforéza probíhala 12 minut v horizontálním uspořádání při stejnosměrném napětí 300 V. Následně byly vzorky prohlédnuty pod UV lampou a byla provedena fotodokumentace.

4.1.4 Přečištění PCR produktu

Zbylé množství PCR produktu, u kterého byla elektroforeticky ověřena přítomnost mutovaného genu, bylo následně přečištěno. Do mikrozkušavky s PCR produktem bylo přidáno trojnásobné množství PB pufru a vše bylo následně přeneseno na silikagelovou mikrokolonku (QIAquick® PCR Purification Kit [52]). DNA byla centrifugací po dobu 1 minuty při 14000 \times g zachycena na kolonci a případné nečistoty byly odstraněny přidáním 750 μ l pufru PE a následnou centrifugací za stejných otáček a po stejnou dobu jako v předchozím kroku. DNA byla eluována 20 μ l pufru TE, který byl nanesen na mikrokolonku, ta byla umístěna do nové mikrozkušavky a po minutové inkubaci byla centrifugována za stejných podmínek jako v předešlých případech. Následně byla stanovena koncentrace DNA.

4.1.5 Stanovení koncentrace DNA

Stanovení koncentrace DNA bylo provedeno spektrofotometricky. Jako slepý vzorek byl zvolen eluční pufr. Koncentrace DNA byla vypočtena spektrofotometrem na základě srovnání s empirickým vztahem, podle kterého má dvouvláknová DNA o koncentraci 50 μ g/ml absorbanci rovnou 1.

4.1.6 Ligační reakce

Pro spojení vlákna vzniklého mutagenezní PCR (kapitola 4.1.2), přesněji fosfátového zbytku na 5' konci s OH skupinou na jeho 3' konci, slouží ligační reakce. Byla připravena smícháním 1 μ l přečištěného PCR produktu s 1 μ l ligačního pufru T4, 1 μ l ligasy T4 (10 \times) a 7 μ l sterilní vody a následnou hodinovou inkubací při pokojové teplotě. Vzniklá plasmidová DNA byla následně vložena do kompetentních buněk *E. coli* DH5- α .

4.1.7 Transformace kompetentních buněk DH5- α

K transformaci byly využity kompetentní buňky *E. coli* DH5- α . Na ledu bylo smícháno 30 μ l buněk s 5 μ l ligační směsí a suspenze byla inkubována na ledu asi 20 minut. Poté byly buňky podrobeny teplotnímu šoku 42 °C po dobu 45 s a následně byly ponechány na ledu asi 2 minuty. K buňkám bylo přidáno 300 μ l LB média a buňky byly kultivovány při 37 °C po dobu jedné hodiny. Po inkubaci byla buněčná suspenze nanášena na předem připravené agarové misky s gentamicinem o výsledné koncentraci 7 ng/ μ l a misky byly inkubovány přes noc při 37 °C.

4.1.8 Nízkoobjemová příprava plasmidové DNA

Nejprve byly izolovány jednotlivé kolonie pomocí sterilních špiček, ty byly následně umístěny do zkumavek se 3 ml LB média s gentamicinem o konečné koncentraci 7 μ g/ml. Suspenze byla inkubovaná přes noc při 37 °C a 220 otáčkách za minutu. Druhý den byly zkumavky 5 minut centrifugovány při 4000 \times g a následně byla DNA izolována pomocí soupravy QIAprep® Spin Miniprep Kit, Qiagen [53]. U získané DNA byla změřena koncentrace.

4.1.9 Sekvenování DNA


Pro ověření úspěšné mutace fosforylačních míst byly vzorky poslány na sekvenaci. Ta byla provedena Sangerovou metodou firmou GATC Biotech. Do 10 μ l reakce bylo přidáno 5 μ l 5 μ M sekvenačního primeru, a 5 μ l DNA o koncentraci 100 ng/ μ l. Sekvence sekvenačních primerů jsou uvedeny v kapitole 3.6.2.

4.1.10 Návrh a příprava fosfomimetických mutantů FANCI

Obdobně jako mutant 5A byly připraveny i fosfomimetické mutanty z obrázku 5 (str. 29). V tomto případě se jednalo o záměnu alaninu na příslušných pozicích za asparagovou kyselinu, která se díky své karboxylové skupině chová podobně, jako kdyby bylo dané místo fosforylováno. Primery byly navrženy stejným způsobem jako v kapitole 4.1.1, tentokrát se jednalo o záměnu tripletu bází GCC kódujících alanin za GAC kódující kyselinu asparagovou (sekvence primerů je znázorněna v kapitole 3.6.1).

Následná příprava mutantů probíhala naprosto stejně jako u mutantu 5A a byla popsána ve všech výše zmíněných kapitolách.

myší gen *FANCI*



Myší WT	S555	T558	T564	S616	S628
5A	A	A	A	A	A
1D	D	A	A	A	A
2,3D	A	D	D	A	A
2D3A	A	A	A	D	D
3D2A	D	D	D	A	A
5D	D	D	D	D	D

Obrázek 5: Schéma myšího FANCI genu.

Znázornění myšího genu *FANCI* s vyznačenými 5 fosforylačními místy. V tabulce jsou vyznačeny jednotlivé záměny pro fosfomimetické mutanty připravené mutací S/TQ míst na AQ, případně DQ.

4.2 Příprava monoubiquitinylačních mutantů FANCI a FANCD2

V této práci byl rovněž zkoumán vliv fosforylace FANCI na monoubiquitinylací komplexu FANCI:FANCD2. Jak již bylo zmíněno v teoretickém úvodu ve FANCI získaném z myšího genu je ubiquitinylační místo na lysinu v pozici 522 a ve FANCD2 získaném z myšího genu na lysinu 559. Tato místa je možné monoubiquitinylovat pomocí enzymů E1, E2 a E3 za účasti ubiquitinu. Pro porovnání monoubiquitinylace pouze FANCI a pouze FANCD2, které byly v monoubiquitinylační reakci součástí komplexu ID2, byly připraveny monoubiquitinylační mutanty (FANCI KR a FANCD2 KR), které mají místo lysinu arginin, což monoubiquitinylací znemožňuje.

Nejprve byly navrženy primery stejně jako v kapitole 4.1.1, triplet bází kódující lysin byl zaměněn na triplet bází kódující arginin, konkrétně změna z AAA na AGG. Tyto mutanty byly připraveny stejně jako fosfomimetické mutanty FANCI a 5A mutant, což je popsáno ve všech výše uvedených kapitolách.

4.3 Příprava bakulovirové plasmidové DNA

K produkci proteinů byly využity hmyzí buňky. Na rozdíl od bakteriálních buněk jsou schopny dosáhnout posttranslačních modifikací i sbalení proteinu [54]. Byla využita rekombinantní exprese proteinů v hmyzích buňkách s využitím bakulovirového systému, konkrétně systému MultiBac. V této práci byla použita hmyzí buněčná linie Sf9, která je odvozena od ovarii druhu *Spodoptera frugiperda* kultivovaných *in vitro*.

Pro produkci proteinů v hmyzích buňkách bylo nejprve potřeba připravit bakulovirus, kterým byly následně buňky infikovány.

4.3.1 Transformace kompetentních buněk DH10EmBacY *E. coli*

Pro získání bakulovirové plasmidové (dále jen bacmidové) DNA byla provedena transformace získané plasmidové DNA do kompetentních buněk *E. coli* DH10EmBacY podle protokolu [55]. Na ledu byl k 30 μ l buněk přidán 1 μ l plasmidové DNA a směs byla ponechána na ledu asi 5 minut. Následoval teplotní šok 92 °C po dobu 45 sekund a poté byly buňky umístěny na 2 minuty na led a bylo k nim přidáno 300 μ l LB média. Buňky byly inkubovány při 37 °C a 220 otáčkách za minutu 3 hodiny. Po inkubaci byly buňky nanášeny na agarové misky obsahující IPTG (40 μ g/ml), X-Gal (20 μ g/ml), kanamycin (50 μ g/ml), gentamicin (7 μ g/ml) a tetracyklin (5 μ g/ml). Misky byly inkubovány přes noc při 37 °C. Druhý den byly izolovány bílé kolonie z misek, přítomné modré kolonie bakterií nenesou rekombinovaný plasmid. Následně byla provedena nízkoobjemová příprava bakulovirové plasmidové DNA obdobně jako v kapitole 4.1.8, avšak přečištění nebylo provedeno přes kolonku. DNA byla precipitována za pomoci isopropanolu, následovalo přečištění ethanolem a eluce pufrům TE.

Úspěšnost vnášení DNA fragmentů do cílených buněk byla sledována pomocí α komplementace. V tomto případě vede exprese dvou genů, kdy jeden kóduje N-terminální konec galaktosidasy (α fragment) a druhý C-terminální konec (ω fragment), k vytvoření funkčního enzymu. Následně bylo v přítomnosti substrátu (galaktosidasy) možné prokázat přítomnost vložených genů, neboť galaktosidasa slouží jako reportérový gen. Na agarové misky byl přidán X-Gal, což je 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galaktosid, jehož enzymově katalyzovaná hydrolýza způsobuje modré zbarvení buněk, do nichž nebyla vnesena požadovaná DNA. Plasmidy, do kterých má být vložen požadovaný gen

mají MCS místo umístěné uvnitř *lacZ* genu, který kóduje enzym β -galaktosidasu. Hostitelské buňky exprimují ω fragment galaktosidasy a po vnesení DNA do MCS dojde k rozrušení *lacZ* genu, a tak při translaci dochází k porušení aminokyselinové sekvence galaktosidasy a nemůže být tedy vytvořen funkční enzym vedoucí k tvorbě bílých kolonií.

4.4 Exprese proteinu v hmyzích buňkách Sf9

4.4.1 Infekce hmyzích buněk Sf9

Bakuloviry jsou obalené tyčinkovité DNA viry z čeledi Baculoviridae schopné infikovat a případně zahubit širokou škálu bezobratlých živočichů, zejména hmyz. V bakulovirovém expresním systému je přítomen rekombinantní bakulovirus nesoucí heterologní gen, který je pod kontrolou polyhedrinového promotoru polh.

Získaná bacmidová DNA byla nejprve sterilizována při 72 °C po dobu 5 minut. Mezitím byla připravena kultura hmyzí buněčné linie Sf9 určené k transdukcii. Ty byly spočítány pomocí hemacytometru a v laminárním boxu naředěny médiem Insect-Xpress na koncentraci jeden milion buněk na mililitr. Následně bylo na 24-jamkovou destičku do příslušného počtu jamek přidáno 0,5 ml naředěných buněk a destička byla inkubována při 27 °C asi půl hodiny, aby došlo k usazení buněk na dno jednotlivých jamek. Do zbylých jamek bylo přidáno 0,5 ml sterilního PBS pro zamezení vysychání vzorků. Mezitím byl připraven roztok transfekčního činidla FuGENE® 6. Do 50 μ l sterilního PBS pufru byl přidán 1 μ l FuGENE® 6 (1 μ g). Rovněž byl připraven roztok bacmidové DNA smícháním 1 μ g DNA v 50 μ l sterilního PBS. Obě směsi (roztok FuGENE® 6 a roztok bacmidové DNA) byly smíchány v poměru 1:1 a ponechány při pokojové teplotě 20 minut.

Destička byla vyndána z inkubátoru a médium na povrchu bylo odstraněno pomocí pipety a nahrazeno 0,5 ml čerstvého média Insect-Xpress. Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l směsi FuGENE® 6:DNA a destička byla následně umístěna do inkubátoru na 27 °C určeného na infekční materiál, kde byla ponechána po dobu 4 dnů. Úspěšnost infekce byla pozorována pod fluorescenčním mikroskopem Olympus IX81. Pod mikroskopem byla sledována fluorescence žlutého fluorescenčního proteinu, respektive produktu reportérového genu (YFP, z angl. yellow fluorescent protein), který je součástí bacmidové DNA vložené do *E. coli* DH10EmBacY. Pozorovaná fluorescence YFP odpovídá expresi virových proteinů a zároveň také expresi proteinu z kýženého genu v případě, že byl tento

gen do bakuloviru integrován. Poměr fluoreskujících a nefluoreskujících buněk udává úspěšnost transfekce funkčního bakuloviru.

Pro ověření, že se opravdu jedná o expresi cílového proteinu, byl proveden expresní test. Z destičky bylo odebráno 50 μ l buněk, které byly smíchány se vzorkovým pufrům na SDS elektroforézu, vzorky byly nanášeny na 10% denaturující polyakrylamidový gel a elektroforéza probíhala 45 minut při 220 V.

Následovala amplifikace bakuloviru za účelem získání dostatečného množství pro následnou infekci. Do 250ml sterilní Erlenmeyerovy baňky s prodyšným víčkem bylo převedeno 50 ml buněk Sf9 naředěných na koncentraci 1 mil. buněk/ml. Následně bylo přidáno 0,5 ml viru z 24-jamkové destičky a buňky byly inkubovány 4 dny (135 RPM, 27 °C). Poté byl virus centrifugován 5 minut (4000 \times g, na centrifuze Avanti J-26S XPI, rotoru JLA-9.1000), aby došlo k usazení buněk na dno. Supernatant byl v laminárním boxu určeném na infekční materiál přenesen do sterilní 50ml zkumavky typu Falcon a opět stočen za stejných podmínek za účelem odstranění všech zbytků buněk, které mohou vést ke znehodnocení preparátu. Takto připravený virus pro následné infekce buněk Sf9 byl uchováván v chladničce při 5 °C.

4.4.2 Infekce hmyzí buněčné linie Sf9 pro produkci proteinů

Hmyzí buňky Sf9 byly spočítány opět pomocí hemacytometru a naředěny médiem Insect-Xpress na koncentraci 3 mil. buněk/ml. Do sterilních Erlenmeyerových baněk o objemu 2 litry s prodyšnými víčky bylo převedeno vždy 500 ml buněk a následně byla provedena infekce příslušným virem do buněk v poměru 1:200. Proteiny byly většinou připravovány ve 2 litrech. Infikované buňky byly následně kultivovány 4 dny (135 RPM, 27 °C).

4.4.3 Sklizení produkci

Buněčná kultura, jež byla připravena v předešlé kapitole, byla po čtyřdenní inkubaci odstředěna (3500 \times g, 10 minut při 4 °C na centrifuze Avanti J-26S XPI, rotoru JLA-9.1000). Peleta byla následně resuspendována ve vychlazeném resuspendačním pufru (20mM Tris 8,0; 200mM NaCl; 20mM imidazol; 10% glycerol; 3mM BME) a následně byl buď protein izolován nebo byl vzorek zamražen a uchováván při -80 °C.

4.5 Izolace proteinu

Protein byl z hmyzích buněk izolován v několika po sobě jdoucích krocích. Po převedení pelety do suspenze byla provedena lýze buněk pomocí sonikátoru Bandelin sonopro (3× 20 s). Rozrušené buňky byly následně přeneseny do centrifugačních kyvet a stočeny na centrifuze Avanti J-30 I, rotoru JA. 30.50 Ti (30000×g, 20 minut, 4 °C). Supernatant získaný po centrifugaci byl následně přečištěván.

4.6 Purifikace proteinu

4.6.1 Afinitní chromatografie

Exprimovaný protein nese afinitní kotvu (dále jen histidinovou kotvu) složenou ze šesti po sobě jdoucích histidinů, pomocí nichž ho je možné izolovat na imobilizovaných iontech kovu. V tomto případě se jednalo o nikelnaté ionty chelatované na NTA (nitrilotrioctovou kyselinu), která je navázaná na agarosové matrici. Na nikelnaté ionty se histidinová kotva váže koordinačně-kovalentní vazbou díky volným elektronovým pářům dusíku na imidazolu.

Nejprve byla připravena Ni-NTA agarosa, která byla uchovávána v 15% isopropanolu. Byla promyta vodou v HPLC kvalitě a následně ekvilibrována resuspendačním pufrem.

K supernatantu z kapitoly 4.4.3 byly přidány asi 3 ml Ni-NTA agarosy. Po hodinové inkubaci na rotátoru TubeRoller (8 RPM, 15 °C) byl supernatant odstředěn (500×g, 3 min, 4 °C, centrifuga Allegra X-15R). K Ni-NTA agarose se zachyceným proteinem byl přidán promývací pufr do výsledného objemu 50 ml a suspenze byla opět centrifugována za stejných podmínek na stejné centrifuze. Takto byla peleta promývána 3×, aby došlo k odstranění nečistot a případných kontaminací.

Následně byla Ni-NTA agarosa přenesena na kolonu o objemu 15 ml a převedena opět do resuspendačního pufru. Navázaný protein byl eluován 10 ml elučního pufru, byla odebrána ještě další frakce o objemu 1 ml, která byla následně proměřena na spektrofotometru a v případě, že byl ještě detekován protein, byl jímáný objem větší. Přítomnost žádaného proteinu ve frakcích byla analyzována pomocí SDS elektroforézy (kapitola 4.6.2).

4.6.2 Diskontinuální elektroforéza v prostředí SDS (SDS-PAGE)

Pro ověření přítomnosti žádaného proteinu a jeho čistoty byla zvolena elektroforéza v 10% polyakrylamidovém gelu s přidaným SDS, jehož složení je v tabulce 3. Vzorky byly připraveny smícháním vzorkového pufru (5× koncentrovaného) a proteinu. Vzorky byly nanесeny na gel a elektroforéza probíhala 45 minut (při 220 V). Gel byl následně vizualizován pomocí barvení v roztoku Coomassie Brilliant Blue, který byl i s gelem zahřát v mikrovlnné troubě po dobu 20 s a následně odbarvován v deionizované vodě.

Tabulka 3: Složení 10% polyakrylamidového gelu.

Složky	Zaostřovací gel	Separáčnй gel
Tris-Cl	125 nM (pH 6,8)	375 nM (pH 8,8)
Akrylamid/bisakrylamid (37,5:1)	4% (V/V)	10% (V/V)
SDS	0,1% (W/V)	0,1% (W/V)
TEMED	0,005% (V/V)	0,005% (V/V)
APS	0,05% (V/V)	0,05% (V/V)

4.6.3 Heparinová chromatografie

Heparinová chromatografie je adsorpční chromatografie, kterou je možné dále zařadit mezi chromatografie afinitní. Protein je v tomto případě reverzibilně adsorbován na heparin imobilizovaný na nerozpustném nosiči. Purifikace s použitím této kolony je vysoce specifická, a to zejména díky podstatě interakce mezi heparinem a cíleným proteinem. Heparin je polydisperzní lineární polysacharid nesoucí záporný náboj a obsahující 1-4 polysacharidové jednotky. Samotný heparin je glykoaminoglykan, ve kterém se střídají zbytky kyseliny hexuronové a D-glukosaminu. Heparin je značně sulfonován a právě díky kyselým sulfátovým skupinám nese záporný náboj. Bylo prokázáno, že je schopen vázat celou řadu molekul, mezi které patří i DNA vazebné proteiny, což je i FANCI a FANCD2. Tato metoda je vhodná pro odstranění nukleových kyselin z DNA vazebných proteinů [56].

Tato chromatografie byla provedena na FPLC systému ÄKTA purifier. Jelikož byla heparinová kolona uchovávána v 15% isopropanolu, byla nejprve promyta vodou v HPLC

kvalitě a následně převedena do pufru A (20 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl; 10% glycerol; 3 mM BME). Vzorek byl nanesen do 5 ml smyčky pomocí injekční jehly a stříkačky (v případě vyššího objemu, než je objem smyčky, byla nanáška provedena vícekrát). Již při nanášení vzorku na kolonu byly frakce o objemu 1 ml jímány do 96 jamkové destičky pro případ nezachycení proteinu na kolonu. Eluce proteinu byla prováděna postupným gradientem pufru B (20 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl; 3 mM BME; 10% glycerol) po dobu 10 minut až do koncentrace 50 % při průtoku 1ml/min. V průběhu chromatografie byla sledována vlnová délka 254 nm a 280 nm a rovněž vodivost mobilní fáze opouštějící kolonu. Frakce, které tvořily v chromatogramu pík, byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy (viz. kapitola 4.6.2) a frakce odpovídající kýženému proteinu byly poté spojeny.

4.6.4 Štěpení proteasou TEV

Histidinová kotva, která byla v proteinu pro jeho snazší purifikaci, byla odštěpena pomocí TEV proteasy. Proteiny se mohou pomocí této kotvy rovněž vázat na DNA a rozdíl v jejich vazbě na DNA by mohl být touto skutečností ovlivněn. K proteinu bylo přidáno 250 μ l této proteasy o koncentraci 4 mg/ml a štěpení probíhalo 2 dny při 4 °C.

4.6.5 Koncentrování proteinu

Před purifikací pomocí gelové permeační chromatografie bylo potřeba protein koncentrovat na maximální objem 4 ml. Roztok proteinu byl tedy odstředován při 4000 \times g 10 minut v koncentrátoru Amicon Ultra s celulosovou membránou, která nepropouští proteiny větší než 30 kDa. Následně byl roztok proteinu promíchán a případně odstředěn dále dokud nedošlo ke snížení obsahu na požadovaný objem.

4.6.6 Gelová permeační chromatografie

Získaný protein byl následně přečištěn pomocí gelové permeační chromatografie, při které je možné rozdělit molekuly lišící se svou velikostí. Kolona Superdex 200 16/600 prep grade byla nejprve promyta 30 ml HPLC vody a následně ekvilibrována v pufru pro gelovou permeační chromatografii (20 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl; 3 mM BME; 10% glycerol). Roztok proteinu byl poté nanesen do 5ml nanášecí smyčky pomocí injekční

jehly a stříkačky. Maximální tlak kolony je 0,5 MPa a maximální průtok 1 ml/min. Frakce byly opět jímány do 96 jamkové destičky po 1 ml a byla sledována vlnová délka 254 nm, 280 nm a vodivost. Následně byly frakce, kde byla zvýšená absorbance při 280 nm a ve kterých se tedy vyskytoval protein, analyzovány elektroforeticky pomocí SDS-PAGE (kapitola 4.6.2). Frakce, ve kterých se vyskytoval kýžený protein byly následně koncentrovány na koncentraci 20 μ M a vyšší (kapitola 4.6.5). Roztok proteinu byl poté rozdělen do několika zkumavek po 50 μ l, zamražen a uchováván při -80 °C.

4.7 Přenos proteinu pomocí metody western blot a imunodetekce

4.7.1 Přenos proteinů na membránu

Pro ověření úspěšného odštěpení histidinové kotvy byl proveden přenos proteinu pomocí metody western blot a následná imunodetekce pomocí protilátek proti histidinové kotvě.

Nejprve byla pro separaci proteinů provedena elektroforéza v 10% polyakrylamidovém gelu s SDS viz. kapitola 4.6.2. Po jejím ukončení nebyl gel obarven, ale byl 3 \times opláchnut deionizovanou vodou a následně přenesen do transferového pufru (39 mM glycin; 48 mM Tris-Cl; 0,037% SDS; 20 mM methanol), ve kterém byl inkubován 20 minut při pokojové teplotě na míchačce Mini Rocker-Shaker. Filtrační papíry i nitrocelulosová membrána byly do tohoto pufru před přenosem rovněž ponořeny. Následně byl proveden přenos na membránu takzvanou polosuchou metodou. Do blotovací aparatury byly nejprve umístěny filtrační papíry, následně nitrocelulosová membrána, gel z elektroforézy a navrch opět filtrační papíry. Poté bylo do aparatury přivedeno stejnosměrné napětí 24 V a přenos probíhal 24 minut, což způsobilo přenos proteinů z gelu na membránu.

4.7.2 Blokování

Nespecifické vazbě protilátek na membránu, která má zpravidla vysokou afinitu k proteinům, bylo zabráněno takzvaným blokováním. To bylo provedeno hodinovou inkubací membrány v 10 ml roztoku 5% sušeného odstředěného mléka v PBS pufru.

4.7.3 Vizualizace proteinů na membráně

Poté byl do roztoku přidán 1 μ l protilátky (protilátka se ředí 1:10000) a membrána byla inkubována při 4 °C a 30 RPM přes noc na míchačce Mini Rocker-Shaker. Všechny používané protilátky jsou uvedeny v tabulce 4. Membrána s navázanými proteiny byla poté promývána PBS puftrem s přidaným detergentem (0,05% Tween 20), aby došlo k odstranění či snížení nespecificky navázaných protilátek. Promývání probíhalo 3 \times a membrána byla mezi jednotlivými kroky vždy na 5 minut umístěna na míchačku Mini Rocker-Shaker. V případě, že bylo pro detekci zapotřebí použití i sekundární protilátky, byla membrána 1 hodinu inkubována se sekundární protilátkou na míchačce při pokojové teplotě. Membrána byla poté opět promyta a vizualizována za pomoci chemoluminiscence, která byla zajištěna pomocí soupravy SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate. Jedná se o substrát pro detekci křenové peroxidázy (HRP, z angl. horseradish peroxidase) na „imunoblotech“ pomocí luminolu. Na membráně dochází při reakci s tímto substrátem k oxidaci luminolu v přítomnosti HRP a peroxidu. Souprava obsahuje 2 roztoky, jeden obsahující peroxid a druhý luminol, oba roztoky byly smíchány v poměru 1:1, a to po 250 μ l a následně byl celý objem (500 μ l) nanesen na membránu. Následně byla membrána inkubována jednu minutu při pokojové teplotě a vizualizována na zařízení LAS-3000 pomocí zobrazovacího programu LAS-3000 Imager.

Tabulka 4: Používané protilátky

cíl	Primární protilátka	Sekundární protilátka
His tag	Anti-6 \times His tag® antibody (HRP)	–
FANCI	Anti-FANCI	Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins /HRP
FANCD2	Anti-FANCD2	Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins /HRP

4.8 Vazba proteinů na DNA

Vazba proteinů na DNA byla zkoumána DNA vazebnými analýzami, které byly prováděny na 6% nativních polyakrylamidových gelech. Na gely bylo do všech jamek nanášeno vždy stejné množství DNA a bylo zvyšováno množství přidaného proteinu, případně proteinového komplexu. Vazebné testy byly změřeny vždy s DNA a samotným mutantem proteinu FANCI, FANCI-WT a samotné FANCD2 a následně byly změřeny komplexy I:D2. Pro měření byla zvolena DNA replikační vidlička, která by měla být pro toto měření optimální [50].

4.8.1 Vytvoření replikační vidličky

Před samotným měřením afinity proteinů k DNA bylo nutné vytvořit DNA replikační vidličku (dále jen YAB). Ta byla připravena ze dvou vláken označených YA a YB, které byly připraveny firmou Sigma-Aldrich a jejichž sekvence je uvedena v kapitole 3.6.3. Tato vlákna nesou fluorescenční sondu HEX, kterou je možné detekovat při 532 nm. Doručené oligonukleotidy byly naředěny pufrům TE na koncentraci 100 μ M a následně byly smíchány roztoky obou oligonukleotidů (YA:YB) v poměru 1:1 a bylo přidáno NaCl o výsledné koncentraci 50 mM. Poté byly vzorky umístěny do termobloku vytemperovaném na 90 °C, kde byly ponechány 5 minut a poté vyndány a zchlazeny na pokojovou teplotu. Vytvoření křížené vidličky bylo analyzováno pomocí elektroforézy na 15% nativním polyakrylamidovém gelu, který byl připraven stejně jako v kapitole 4.8.2, pouze bylo místo 2 ml přidáno 5 ml akrylamidu/bisakrylamidu. Gel byl vizualizován na přístroji TYPHOON FLA 9500.

Rovněž byla vytvořena replikační vidlička, která nese barevnou značku, a to jako substrát pro monoubiquitylační reakce. Jelikož byla připravena stejným způsobem jako výše zmíněná DNA, byla HEX značená DNA použita jako kontrola tvorby neznačené DNA.

4.8.2 DNA vazebné analýzy

Nejprve byly připraveny 6% nativní polyakrylamidové gely (tabulka 5). Po jejich ztuhnutí byly převedeny do aparatury pro vertikální elektroforézu a převrstveny TBE pufrem.

Tabulka 5: Složení 6% nativního gelu.

Výsledný objem	10 ml
Akrylamid/bisakrylamid (37,5:1) 30%	2 ml
TBE	1 ml
TEMED	1 μ l
APS	10 μ l

Byly připraveny vzorky proteinů a DNA dle tabulky 6 (str. 41). Byly ředěny pufrem o složení 20 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM TCEP. I když je v tabulce zaznamenán pouze protein FANCI, všechny vzorky s jeho mutanty byly připraveny obdobně. Následující postup se tedy týká všech zkoumaných mutantních proteinů stejně jako WT. Dále byl připraven proteinový komplex smícháním FANCI a FANCD2 v poměru 1:1, došlo tedy k naředění proteinu na poloviční koncentraci. V případě měření vazby samotného proteinu na DNA byl druhý protein nahrazen přidáním příslušného objemu pufru, aby bylo docíleno stejného naředění. Bylo připraveno vždy 40 μ l této výchozí směsi.

Jak je zaznamenáno v tabulce 6 (str. 40), byly připraveny 2 koncentrace proteinů. Jelikož vazebné testy byly prováděny s různou koncentrací proteinu, bylo tímto způsobem docíleno optimálního rozestupu koncentrací. Byla připravena ředící řada, kdy bylo do 14 zkumavek přidáno 20 μ l pufru a patnáctou zkumavku představoval připravený protein/proteinový komplex. Z této směsi bylo odebráno 20 μ l a předáno do předešlé zkumavky, směs byla promíchána a 20 μ l bylo opět předáno do předešlé zkumavky. Takto byla provedeno ředění až do zkumavky číslo 2, jelikož první jamka představuje pouze DNA bez proteinu.

Následně byla ke všem vzorkům přidána DNA v objemovém poměru 1:1 pomocí multikanálové pipety, čímž došlo k minimalizaci chyb vzniklých při pipetování. Připravená

DNA byla 200 nM, tudíž výsledná DNA byla 100 nM, koncentrace proteinu/proteinového komplexu opět klesla na polovinu.

Vzorky byly poté nanесeny na připravený gel a elektroforéza probíhala 15 minut při 300 V. Gely byly poté analyzovány a vizualizovány na přístroji TYPHOON FLA 9500 a vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu ImageQuant TL 8.1. Rovněž bylo provedeno srovnání vazby proteinu na DNA v závislosti na koncentraci soli, byla porovnána vazba v 50 mM a 150 mM soli, tedy byl připraven i pufr s 50 mM soli.

Byly také připraveny vazebné analýzy s využitím pouze 2 koncentrací proteinů, a to z důvodu snazšího porovnání proteinů mezi sebou. Vše bylo připraveno stejně, jak je popsáno výše, pouze výsledné koncentrace proteinů byly 450 a 900 nM.

Tabulka 6: Příprava vzorků na DNA vazebné testy.

složky	koncentrace připravených složek [nM]	koncentrace připravených složek [nM]	výsledná koncentrace ve směsi [nM]	výsledná koncentrace ve směsi [nM]
FANCI	3600	4800	900	1200
FANCD2	3600	4800	900	1200
YAB		200	100	100

4.8.3 Měření anizotropie fluorescence

Vazba proteinu na DNA byla také zkoumána za pomoci anizotropie fluorescence. Tato technika je založena na excitaci fluorescenčně značené částice (v tomto případě DNA nesoucí HEX značku) vertikálně polarizovaným světlem o vlnové délce, která selektivně excituje pouze fluorofory mající vhodnou orientaci k přicházejícímu záření, což je charakterizováno vektorem elektrické intenzity. Směr emitovaného záření je závislý na pohybu molekul a je analyzován měřením emisního záření v horizontálním i vertikálním směru. Anizotropie (r) je definována takto :

$$\text{Rovnice 1: } r = \frac{I_{vv} - G \cdot I_{vh}}{I_{vv} + 2 \cdot G \cdot I_{vh}}$$

kde I označuje intenzitu světla, dolní indexy označují kombinaci polarizace excitačního a emisního záření, která je buď vertikální (v) nebo horizontální (h). Písmenem G je označen G faktor, který popisuje charakteristiku přístroje a je definován touto rovnicí:

$$\text{Rovnice 2: } G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

V tomto experimentu je tedy porovnáván rozdíl mezi polarizací excitačního a emisního záření. Tento rozdíl vzniká vlivem rotace molekul v roztoku, která je závislá na jejich velikosti. Malá molekula, jako například DNA se v roztoku pohybuje rychleji než molekula větší jako například DNA s navázaným proteinem.

Použitá DNA pro toto měření byla opět replikační vidlička (YAB) nesoucí HEX značku, jejíž příprava byla popsána v kapitole 4.8.1. Nejprve bylo nutné zjistit excitační a emisní spektrum značené DNA (HEX-YAB). To bylo určeno měřením nejprve excitačního a posléze emisního spektra na přístroji FluoroMax-4 ve vzorku DNA o koncentraci 50 nM, který byl umístěn do měrné kyvety. Získaná excitační i emisní vlnová délka byla následně použita při nastavení přístroje pro měření anizotropie fluorescence.

Pro samotné měření byla do kyvety nejprve umístěna samotná DNA o koncentraci 50 nM a byla změřena anizotropie, poté byla DNA titrována zvyšujícím se množstvím proteinu/proteinového komplexu. Po každém přidání byla proměřena anizotropie fluorescence včetně jednotlivých intenzit pro všechny orientace monochromátorů pro výpočet faktoru G . Anizotropie byla vypočtena dosazením získaných intenzit a faktorů G do rovnice 1. Frakce navázaného proteinu (f_v) byla spočítána ze získaných dat podle rovnice 3 a tato data byla poté vynesena do grafu.

$$\text{Rovnice 3: } f_v = \frac{(A_{poz} - A_{min})}{(A_{max} - A_{poz}) \cdot Q + (A_{poz} - A_{min})}$$

kde A_{poz} označuje pozorovanou anizotropii pro jakoukoliv koncentraci proteinu/proteinového komplexu, A_{min} minimální pozorovanou anizotropii, A_{max} anizotropii v oblasti saturace a Q poměr kvantového výtěžku vázané formy k formě volné. Ten byl stanoven poměrem intenzity vázaného fluoroforu ku intenzitě fluoroforu volného.

Získané hodnoty frakcí navázaného proteinu byly vyneseny oproti koncentraci proteinu a pro stanovení vazebné konstanty (K_D) pro vazbu proteinu na DNA byla data dosazena do rovnice 4. Jednotlivé parametry a proměnné byly korigovány na změnu objemu při titraci.

$$\text{Rovnice 4: } f_v = \left(\frac{1}{2 \cdot [DNA]} \right) \cdot (K_D + [prot] + [DNA]) - \frac{\sqrt{(K_D + [DNA] + [prot])^2 - 4 \cdot [DNA] \cdot [prot]}}{2 \cdot [DNA]}$$

Byla také optimalizována koncentrace soli pro získání optimálních podmínek na měření vazebné konstanty. Optimální koncentrace soli pro získání největšího výtěžku monoubiquitinylovaného proteinu v monoubiquitinylační reakci, které budou popsány v následující kapitole, byla 50 mM. Jelikož fyziologická koncentrace soli je 150 mM, bylo zkoumáno, jak se mění data z anizotropie fluorescence v závislosti na koncentraci soli v pufru. Výše popsané měření anizotropie fluorescence bylo tedy provedeno v pufrch o různých koncentracích soli (50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM a 150 mM). Složení pufrů bylo tedy následující 20 mM Tris pH 7,0; 50/75/100/125/150 mM NaCl; 5% glycerol; 1 mM TCEP.

4.8.4 Monoubiquitinylační reakce

Kromě DNA vazebných analýz byl také zkoumán vliv fosforylace FANCI na monoubiquitinylacii ID2 komplexu, který je, jak již bylo zmíněno v teoretickém úvodu, esenciální pro opravu poškozené DNA. Enzymy, které byly použity při této reakci, byly připraveny v naší laboratoři, konkrétně enzym E1 a E3 (BL100) byly připraveny RNDr. Janem Šilhánem, PhD., enzym E2 (UBE2T) Bc. Andreou Huškovou.

Nejprve byl připraven komplex proteinů, ke kterým byla přidána DNA (koncentrace jsou zaznamenány v tabulce 7, str. 43). V tabulce jsou vyznačeny proteiny FANCI a FANCD2, ty představují jak divoké kmeny těchto proteinů tak vybrané připravené mutanty, které byly na toto měření použity. Poté byly přidávány všechny další složky reakce tak, aby výsledná koncentrace odpovídala hodnotám v tabulce 8 (str. 43). HtSUMO-ubiquitin byl zvolen pro snazší vyhodnocení, jelikož je větší než ht-ubiquitin a putuje v gelu pomaleji a je tedy značný rozdíl ve velikosti ubiquitinylovaného

a neubiquitinylovaného proteinu. Jako negativní kontrola byl použit vzorek bez přidaného ATP a E1 enzymu. Reakce byly zastaveny po 1, 3 a 24 hodinách přidáním SDS vzorkového pufru v poměru k reakční směsi 1:1 a následně byly vzorky analyzovány elektroforeticky v 10% denaturujícím polyakrylamidovém gelu. Elektroforéza probíhala 150 minut při 120 V. Gel byl poté obarven barvou Coomassie Brilliant Blue.

Tabulka 7: Příprava proteinů a DNA na monoubiquitinylační reakci.

složky	Výsledná koncentrace [μM]
FANCI	4
FANCD2	4
DNA	8

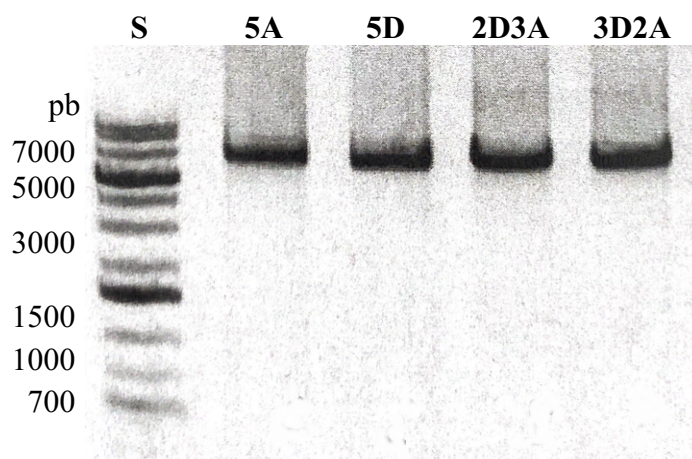
Tabulka 8: Složení monoubiquitinylační reakce.

složky	Výsledná koncentrace [μM]
E1	0,1
E2 (UBE2T)	1
E3 (BL100)	0,3
htUB	20
htSUMO Ub	20
D2I:YAB 1:2	1
MgCl ₂	4
ATP	1

5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava mutantních proteinů FANCI a FANCD2

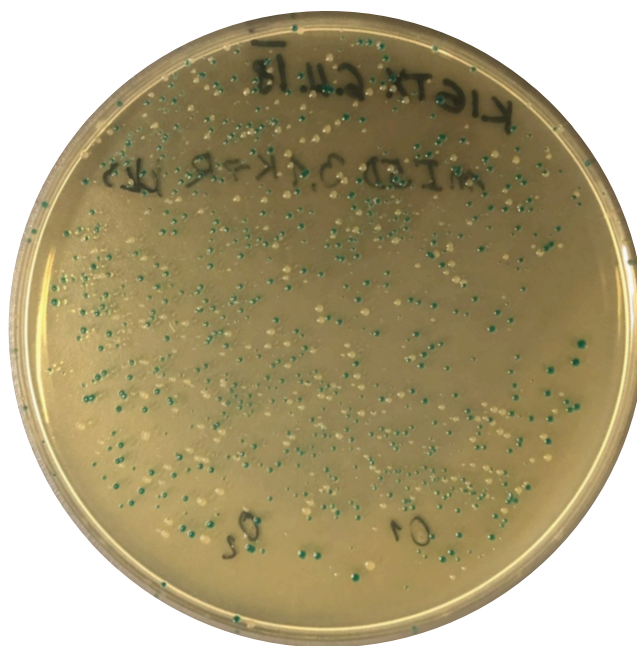
Pro zkoumání molekulárního mechanismu fosforylace proteinu FANCI a jeho vlivu na monoubiquitinylation FANCD2 byly připraveny mutanty obou genů (obrázek 5, str. 29). Ty byly získány pomocí mutagenezní PCR reakce z divokých kmenů, které byly dříve vloženy do vektoru pACEBac1 s N-terminálním fúzním peptidem obsahujícím histidinovou kotvu a štěpné místo pro TEV proteasu. Elektroforetický byl vyhodnocena úspěšnost mutagenezní PCR. Elektroforetická pohyblivost vzorků na gelu odpovídala velikosti genu *FANCI* vloženého do plasmidu pACEBac1 (6964 párů bází). Jelikož byla elektroforetická pohyblivost PCR produktů z přípravy všech mutovaných genů stejná (respektive velikost PCR produktů genu *FANCD2* odpovídala velikosti 7313 pb), byl zvolen reprezentativní gel (obrázek 6). Pozitivní PCR produkty byly následně přečištěny a vzniklé řetězce DNA byly spojeny v ligační reakci. Připravené vektory byly poté vloženy do kompetentních buněk *E. coli* DH5- α a po izolaci plasmidové DNA byla připravena bacmidová DNA.



Obrázek 6: Agarosová elektroforéza PCR produktů genu *FANCI*. Písmenem S je označen standard, dále jsou vyznačeny mutanty *FANCI*. Jedná se o ilustrativní gel.

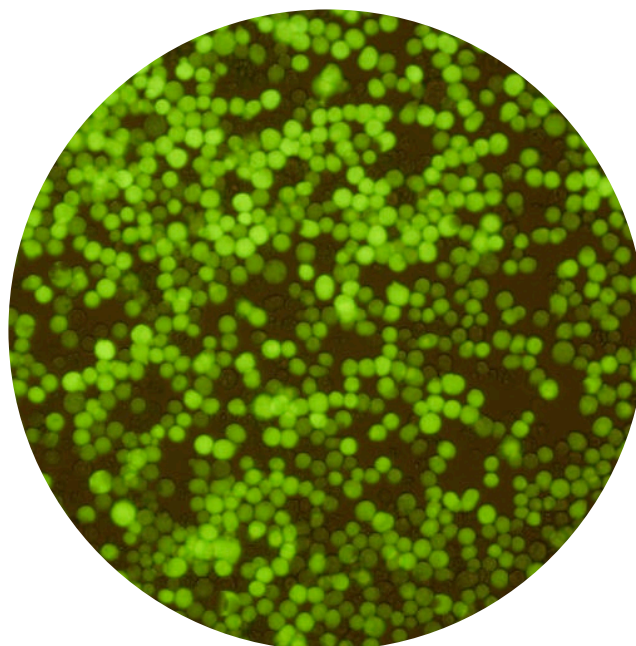
Pro produkci proteinů byl zvolen bakulovirový systém určený pro přípravu proteinů v hmyzím expresním systému. Byla použita hmyzí buněčná linie Sf9. Plasmidová DNA byla vložena do kompetentních buněk *E. coli* DH10EmBacY a po inkubaci na agarových miskách obsahujících IPTG, X-Gal, kanamycin, gentamicin a tetracyklin byly izolovány bílé kolonie, které na rozdíl od kolonií modrých obsahují požadovanou DNA. Ilustrativní

agarová miska s narostlými koloniemi je znázorněna na obrázku 7 (str. 45). Modrá barva kolonií je způsobena hydrolýzou X-Galu za pomoci galaktosidasy. Jelikož byl cílový gen vložen dovnitř *lacZ* genu, bylo znemožněno vytvoření funkční galaktosidasy a nedošlo tedy k modrému zbarvení kolonií. Pozitivní kolonie nesoucí rekombinovaný plasmid jsou tedy bílé barvy.

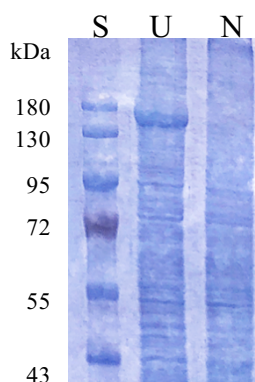


Obrázek 7: Agarové misky s koloniemi získanými po transformaci genu do kompetentních buněk *E. coli* DH10EmBacY. Bílé kolonie nesou rekombinovaný plasmid, modré nikoliv.

Bacmidová DNA byla následně smíchána s transfekčním činidlem FuGENE® 6 a touto směsí byly infikovány buňky Sf9. Úspěšnost infekce byla sledována pomocí fluorescence YFP, což odpovídá expresi virových proteinů a také expresi kýženého proteinu. Úspěšnost infekce je posuzována z poměru fluoreskujících a nefluoreskujících buněk. Na obrázku 8 (str. 46) je ilustrativní snímek z fluorescenčního mikroskopu, kde je možné pozorovat úspěšnou infekci. Rovněž byla provedena analýza exprese proteinu kýženého genu elektroforeticky na 10% SDS gelu, ilustrativní gel je znázorněn na obrázku 9 (str. 46). Na gelu je vyznačena úspěšná i neúspěšná exprese genu. Virové proteiny nesoucí kýžený gen byly poté připraveny v 50 ml a následně byla provedena infekce hmyzích buněk v objemu 2 l.



Obrázek 8: Úspěšná infekce buněk Sf9. Zeleně svítící buňky znázorňují úspěšnou infekci, buňky do kterých nebyl vnesen kýžený bacmid nevykazují fluorescenci a tudíž nejsou v tomto nastavení mikroskopu vidět. Obrázek byl pořízen z fluorescenčního mikroskopu IX81 od firmy Olympus a při zvětšení 20×.



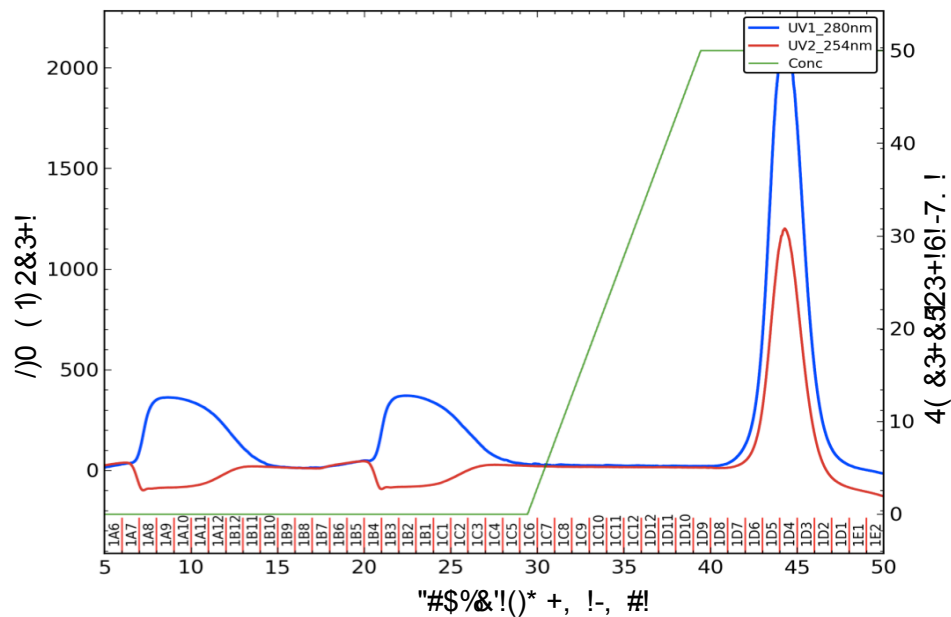
Obrázek 9: Expresní test proteinů na 10% SDS gelu. S označuje standard, N označuje neúspěšnou a U úspěšnou produkci proteinu FANCI 1D.

5.2 Izolace proteinu

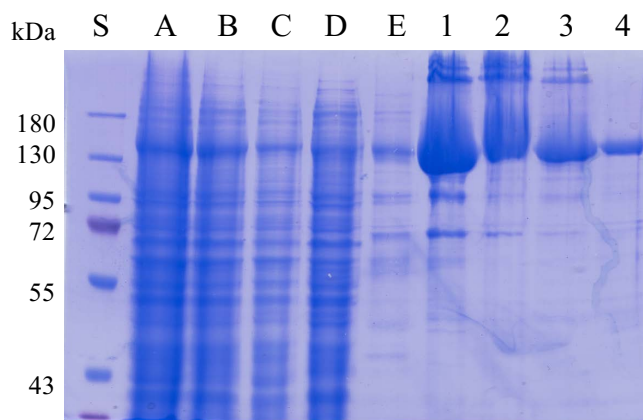
Proteiny obsahující histidinovou kotvu byly izolovány z buněčného lyzátu pomocí afinitní chromatografie. Ta se navázala koordinačně–kovalentně na nikelnaté ionty imobilizované na Ni-NTA agarose a protein nesoucí tuto kotvu byl vymyt pufrém o vysoké koncentraci imidazolu. Takto získané frakce byly následně analyzovány elektroforeticky na 10% SDS gelu při 220 V, gel je znázorněn na obrázku 10 (str. 47). Všechny získané

proteiny měly téměř totožnou pohyblivost v gelu a také podobný eluční profil, pro ilustraci byla tedy zvolena pouze purifikace proteinu 5A.

Následovalo přečištění získaných proteinů pomocí adsorpční chromatografie s využitím heparinové kolony, která mimo jiné váže DNA vazebné proteiny. Eluční profil je na obrázku 10. Jímané frakce byly analyzovány elektroforeticky (obrázek 11).

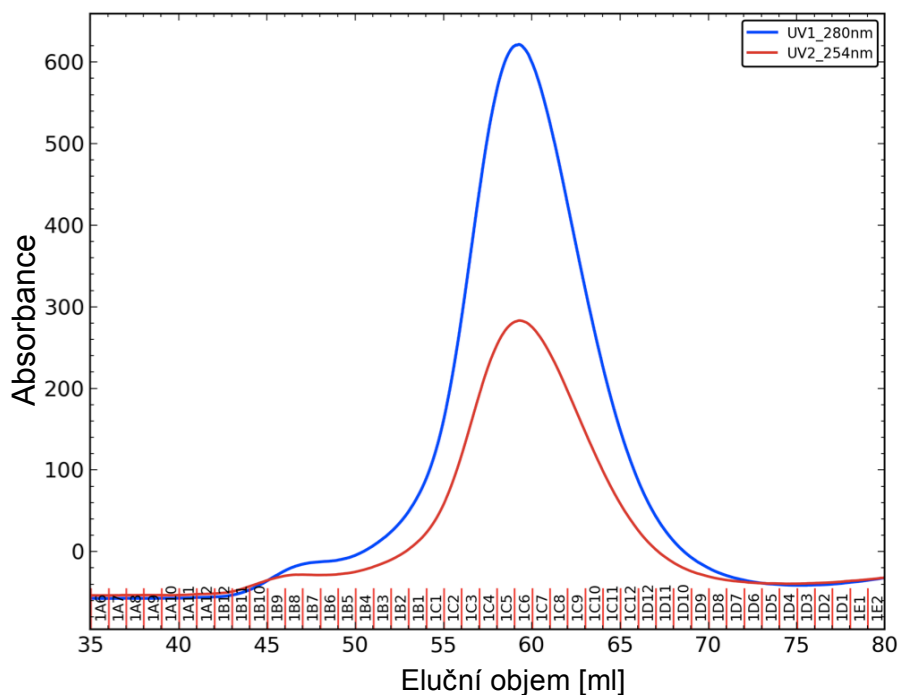


Obrázek 10: Průběh adsorpční chromatografie na heparinové koloně proteinu FANCI 5A. Jsou zaznamenány dvě nanášky vzorku a následuje eluce proteinu postupným gradientem do 50 % pufru B. Byly spojeny frakce D6-D2.

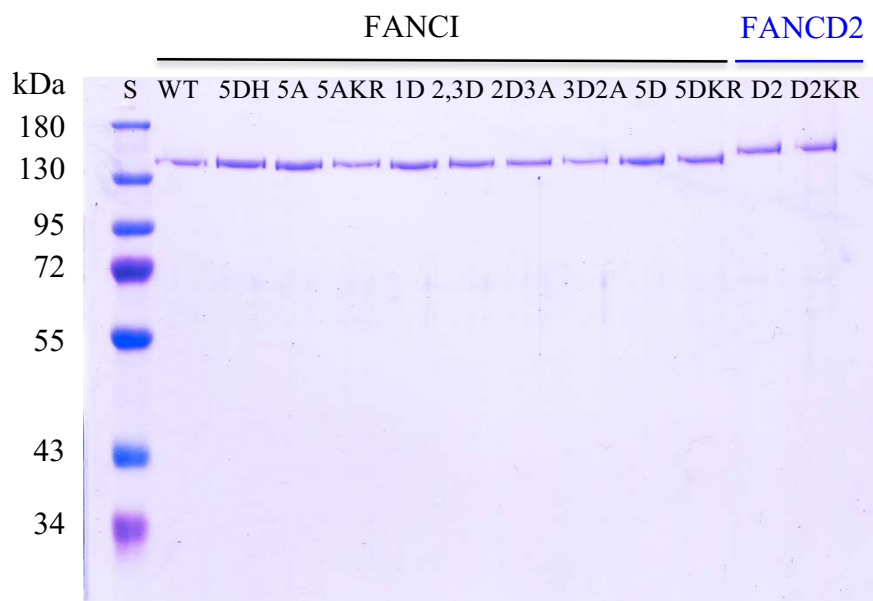


Obrázek 11: SDS elektroforéza proteinu FANCI 5A v 10% polyakrylamidovém gelu po afinitní a adsorpční chromatografii. S označuje standard, A vzorek získaný ze sonikovaných buněk, B supernatant sonikátu, C pelet, D protečený objem, E nanášku, vzorky 1-4 jsou vzorky frakcí. Vzorek 1 je frakce B2, 2 frakce D6, 3 frakce D4 a 4 frakce D2.

Histidinová kotva byla následně odštěpena proteasou TEV, jelikož mohla ovlivňovat vazbu proteinu na DNA, a proteiny byly následně přečištěny pomocí gelové permeační chromatografie. Na obrázku 12 je znázorněn chromatogram, který je stejně jako v předchozím případě ilustrován na proteinu 5A, jelikož měl u všech proteinů téměř totožný profil. Čistota všech proteinů byla ověřena na 10% denaturujícím polyakrylamidovém gelu (obrázek 13, str. 49), na kterém je mimo jiné vyznačen i protein 5DH, který označuje mutant 5D proteinu FANCI, kterému nebyla odštěpena histidinová kotva, aby mohl sloužit jako kontrola při imunoblotu. Pro ověření přítomnosti kýžených proteinů byla využita hmotnostní spektrometrie provedená servisní skupinou ÚOCHB AV ČR metodou ESI (z angl. electrospray ionization)



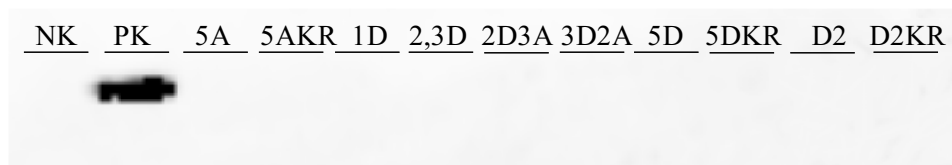
Obrázek 12: Průběh gelové permeační chromatografie proteinu FANCI 5A. Kolona Superdex 200 16/600 prep grade.



Obrázek 13: SDS elektroforéza všech získaných proteinů po gelové permeační chromatografii. Byl použit 10% denaturujícím polyakrylamidový gel. S označuje standard, písmeny jsou dále označeny jednotlivé proteiny. 5DH označuje mutant 5D proteinu FANCI s histidinovou kotvou.

5.3 Imunodetekce histidinové kotvy

Pro ověření úspěšného odštěpení histidinové kotvy byly proteiny přeneseny na membránu a následně byla detekována histidinová kotva pomocí cílené protilátky. Nejprve byla provedena separace proteinů na 10% denaturujícím polyakrylamidovém gelu, následoval přenos na membránu, inkubace s protilátkou obsahující křenovou peroxidázu proti histidinové kotvě a detekce za pomoci soupravy reagující právě na přítomnost této peroxidázy. Záznam detekce histidinové kotvy je na obrázku 14. Je patrné, že histidinová kotva je přítomna pouze ve vzorku pozitivní kontroly, tedy u proteinu, který tuto kotvu nese, u sledovaných vzorků není histidinová kotva detekována

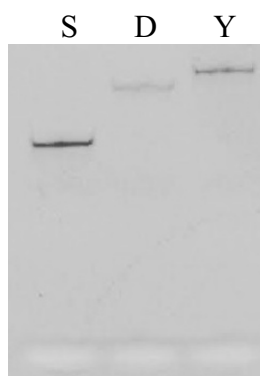


Obrázek 14: Imunodetekce histidinové kotvy ve všech získaných proteinech. Jako negativní kontrola (NK) byl zvolen WT FANCI, u kterého bylo předem ověřeno úspěšné odštěpení histidinové kotvy. PK označuje pozitivní kontrolu, což byl protein 5D, kterému nebyla histidinová kotva odštěpena.

5.4 Vazba proteinů na DNA

5.4.1 DNA vazebné testy

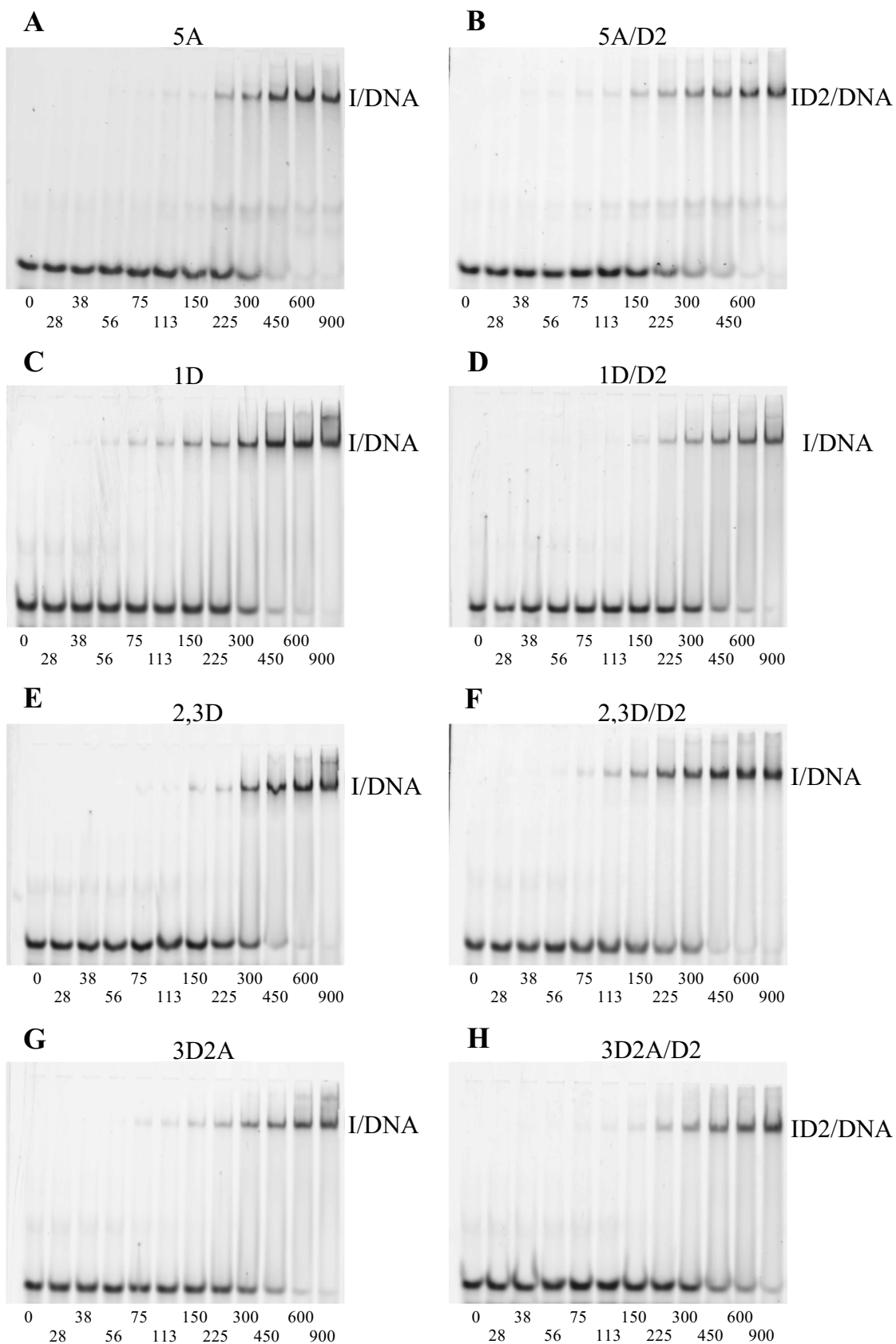
Vazba proteinů na DNA byla nejprve měřena pomocí DNA vazebných analýz. Bylo nutné připravit fluorescenčně značenou dvouřetězcovou DNA, kterou byla v tomto případě replikační vidlička (YAB) nesoucí barevnou značku (HEX), díky které mohla být následně vazba proteinů analyzována při 532 nm. Úspěšnost utvoření YAB byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy (obrázek 15).



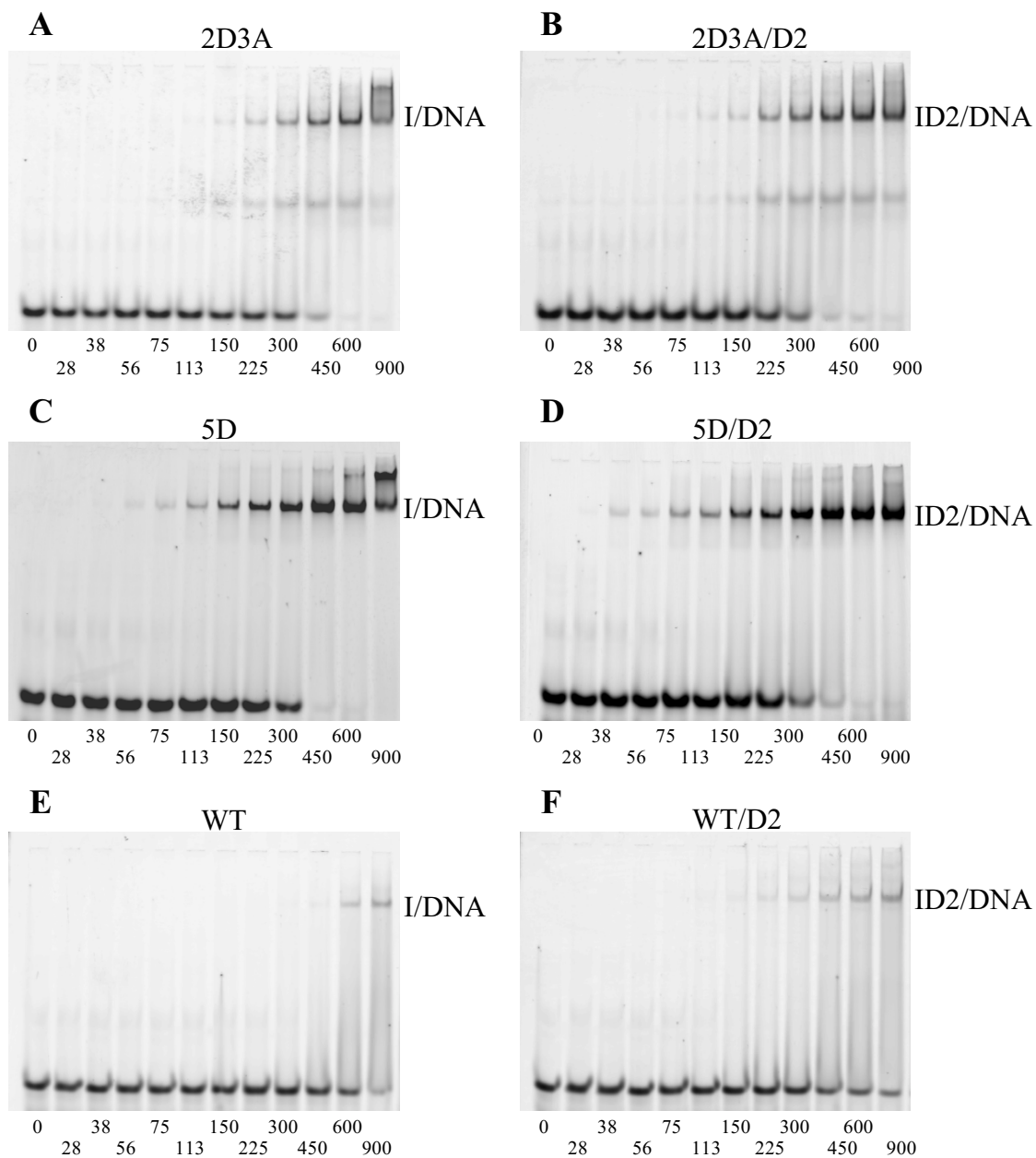
Obrázek 15: Agarosová elektroforéza pro ověření úspěšnosti utvoření replikační vidličky. S označuje jednořetězcovou DNA, D dvouřetězcovou DNA a Y připravenou YAB (sekvence jednotlivých oligonukleotidů jsou uvedeny v kapitole 3.6.3).

Vazba připravených fosfomimetický mutantů na DNA byla zkoumána pomocí DNA vazebných testů. DNA o koncentraci 100 nM byla titrována vzrůstajícím množstvím proteinu FANCI či proteinového komplexu ID2. Vzorky byly analyzovány na 6% nativním polyakrylamidovém gelu a vizualizovány na přístroji TYPHOON FLA 9500. Na obrázcích 16 (str. 51) a 17 (str.52) jsou znázorněny vazebné testy všech fosfomimetických mutantů FANCI, stejně tak mutantu 5A a WT proteinu na DNA pokaždé bez a s přidáním proteinu FANCD2. Získaná data z vazebných testů byla vyhodnocena také graficky (obrázek 18 a 19, str. 53).

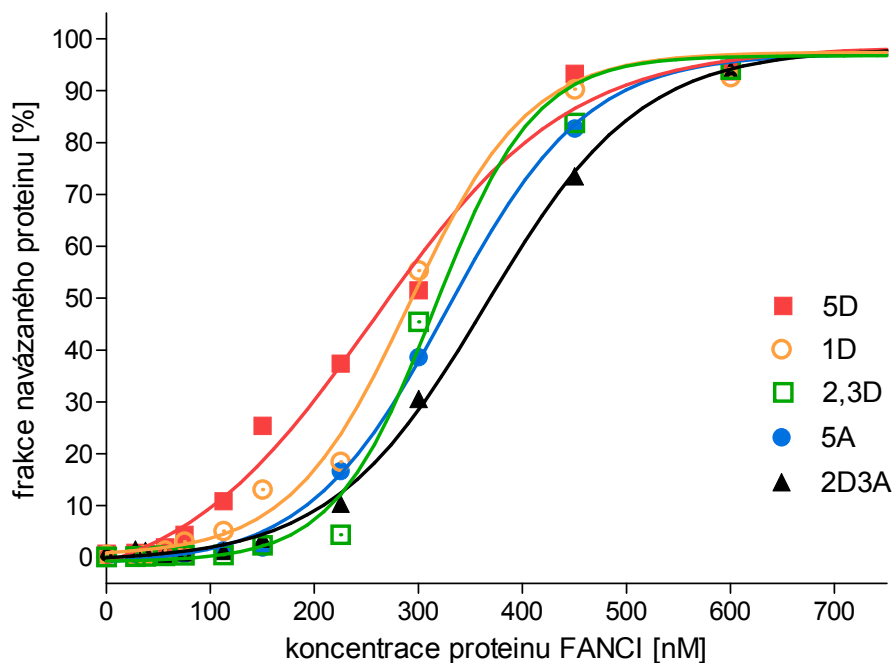
Dále bylo ověřeno pomocí imunoblotu, že se při vazbě proteinového komplexu ID2 se na této vazbě podílí i protein FANCD2. Byla použita primární protilátka proti FANCD2 (laskavě darovaná K.J.Patelem) a rovněž sekundární protilátka „Swine Anti-Rabbit“. Jelikož byl signál z vizualizace membrány v případě všech proteinů téměř totožný, byl zvolen ilustrativní imunoblot proteinu 3D2A (obrázek 20, str. 54)



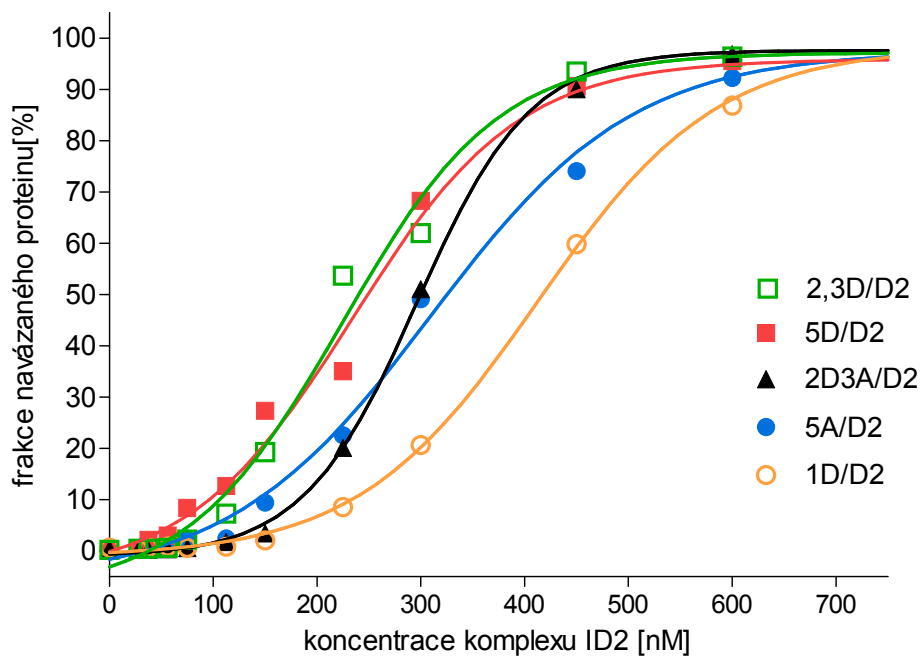
Obrázek 16: DNA vazebné testy. Byla použita vždy stejná koncentrace DNA (100 nM), v řadě se zvyšovala koncentrace proteinu (nM). Vlevo je vždy zaznamenána vazba mutantů FANCI na DNA, vpravo je vazba proteinového komplexu ID2 na DNA.



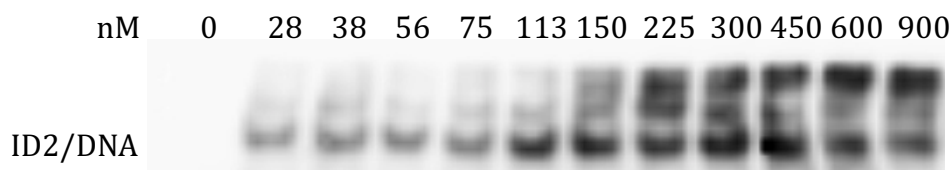
Obrázek 17: DNA vazebné testy (pokračování). Byla použita vždy stejná koncentrace DNA (100 nM), v řadě se zvyšovala koncentrace proteinu (nM). Vlevo je vždy zaznamenána vazba mutantů FANCI na DNA, vpravo je vazba proteinového komplexu ID2 na DNA.



Obrázek 18: Grafické vyhodnocení vazby vybraných mutantů proteinu FANCI na DNA získané DNA vazebnou analýzou.



Obrázek 19: Grafické vyhodnocení vazby mutantů proteinového komplexu ID2 na DNA získané DNA vazebnou analýzou.



Obrázek 20: Imunodetekce proteinu FANCD2 při vazbě komplexu 3D2A/D2 na DNA. V horní části obrázku jsou vyznačeny koncentrace proteinu 3D2A, kterým byla DNA titrována.

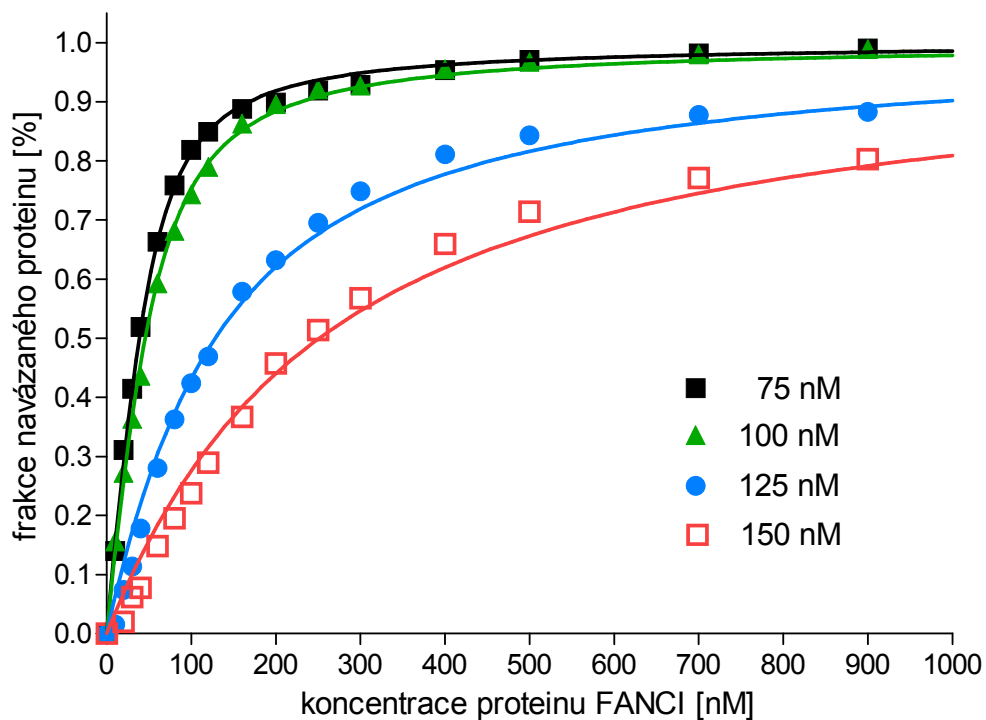
5.4.2 Anizotropie fluorescence

Byla změřena anizotropie fluorescence pro protein o různých koncentracích soli v pufru. Data byla vyhodnocena jako v případě porovnávání mutantů mezi sebou a získané vazebné konstanty jsou zaznamenány v tabulce 9. Graf s vyhodnocenými daty z programu MATLAB je na obrázku 21 (str. 55).

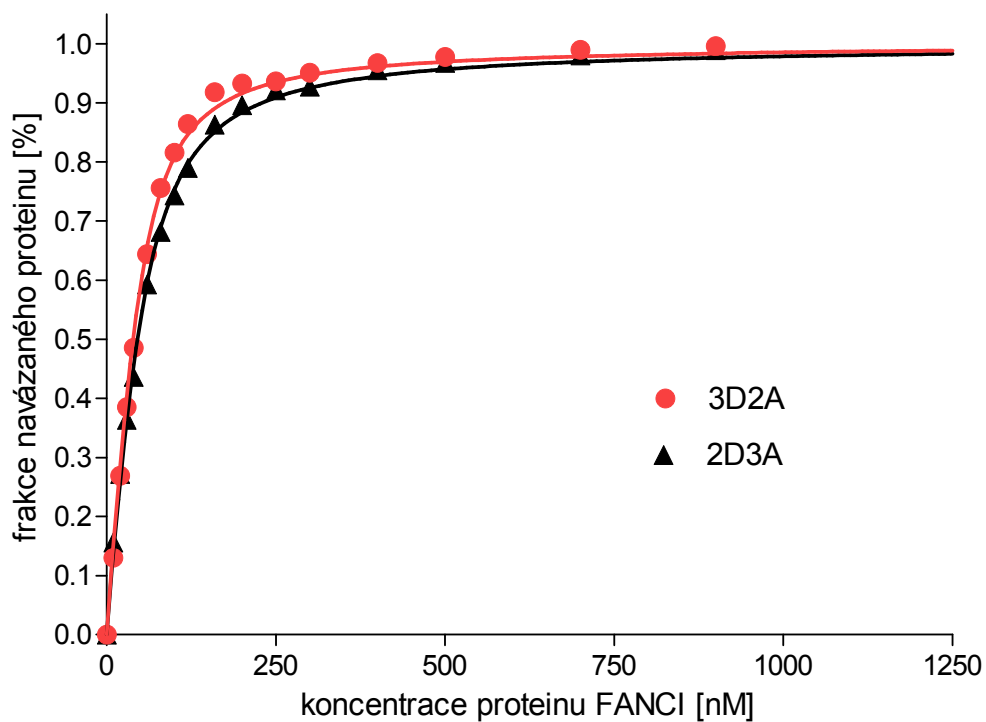
Vazba proteinů na DNA byla rovněž ověřována pomocí anizotropie fluorescence. Stejně jako u DNA vazebných testů byla HEX-YAB titrována vzrůstajícím množstvím proteinu či proteinového komplexu a v každém bodě byla změřena anizotropie fluorescence. Získaná data byla pro zjištění vazebné konstanty (K_D) dosazena do rovnice 4 (str. 41). Vypočtené hodnoty vazebných konstant a chyby jsou zaznamenány v tabulce 9. V grafu na obrázku 22 (str. 55) jsou vyznačeny vazebné křivky mutantních proteinů 2D3A a 3D2A a v grafu na obrázku 23 (str. 56) srovnání vazebných křivek proteinu 2D3A v a bez přítomnosti proteinu FANCD2.

Tabulka 9: Vypočítané hodnoty vazebných konstant pro vazbu proteinů na DNA.

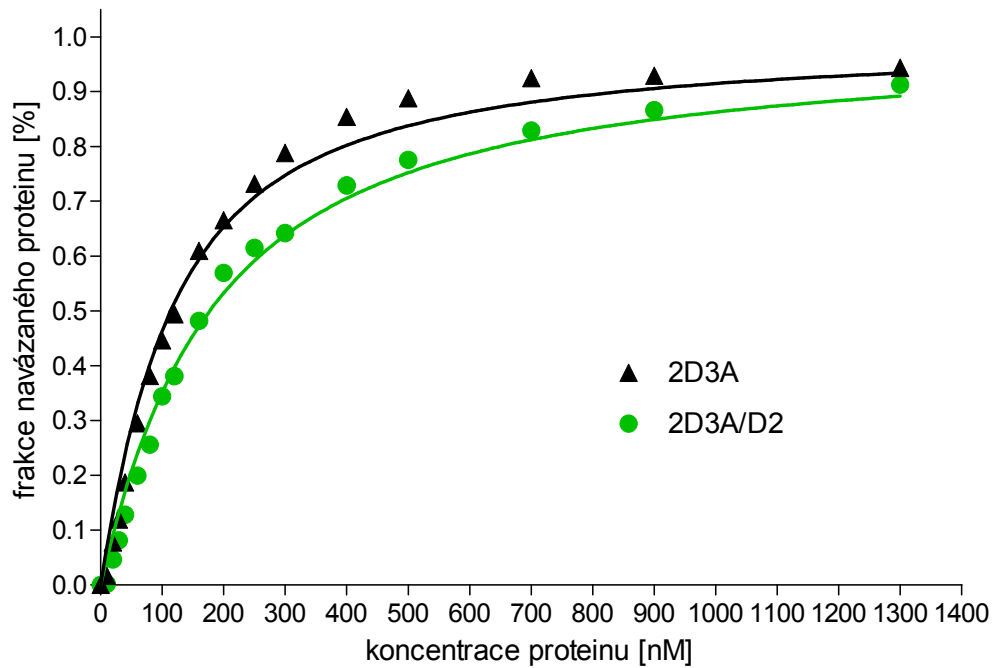
Protein	Vazebný partner	Koncentrace ligandu (YAB) [nM]	Koncentrace soli [mM]	K_D
FANCI 2D3A	-	50	75	13,72
FANCI 2D3A	-	50	100	20,5
FANCI 2D3A	-	50	125	103,4
FANCI 2D3A	-	50	150	226,6
FANCI 2D3A	-	50	100	20,47
FANCI 3D2A	-	50	100	14,15
FANCI 2D3A	-	50	125	152,3
FANCI 2D3A	FANCD2 WT	50	125	88,8



Obrázek 21: Grafické srovnání vazby proteinu 2D3A na DNA v pufrch o různých koncentracích solí.



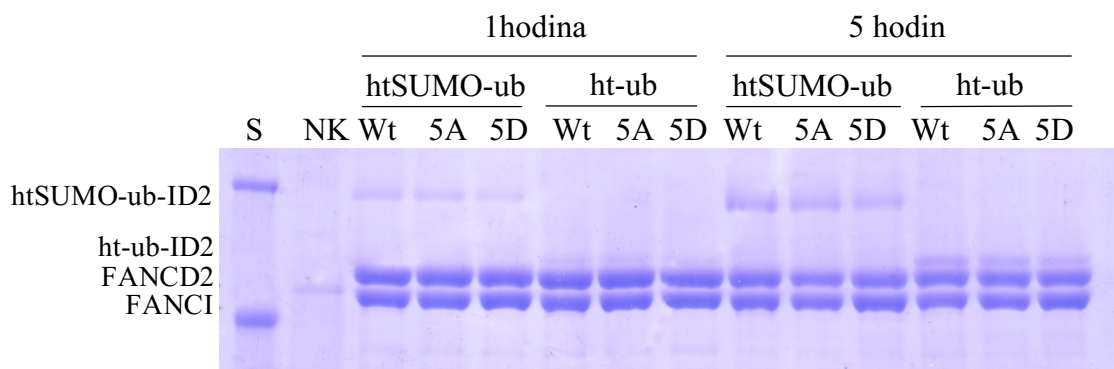
Obrázek 22: Grafické srovnání vazby mutantních proteinů 2D3A a 3D2A na DNA ve 100 mM NaCl získané metodou anizotropie fluorescence.



Obrázek 23: Grafické srovnání vazby proteinu 2D3A a proteinového komplexu 2D3A/D2 ve 125 mM NaCl získané metodou anizotropie fluorescence.

5.5 Monoubiquitylační reakce

Zkoumání vlivu fosforylace proteinu FANCI na monoubiquitylacii komplexu ID2 bylo provedeno pomocí monoubiquitylačních reakcí a jejich následnou analýzou na 7% denaturujících polyakrylamidových gelech (obrázek 24, str. 57). Byly připraveny komplexy ID2 s DNA tak, že byly k FANCD2 přidány mutanty FANCI a rovněž WT. Následně byly přimíchány další složky monoubiquitylační reakce, tedy enzymy E1, UBE2T, BL100, MgCl₂, ATP, ht-ubiquitin, případně htSUMO-ubiquitin. HtSUMO-ubiquitin má vyšší molekulovou hmotnost a je na gelu pozorován větší rozdíl mezi ubiquitylovaným a neubiquitylovaným komplexem. Jako negativní kontrola byl použit vzorek, do kterého nebyl přidán enzym E1 ani ATP. Reakce byla zastavena po 1 hodině a po 5.



Obrázek 24: SDS elektroforéza monoubiquitylační reakce v 7% polyakrylamidovém gelu. S označuje standard, NK negativní kontrolu, 5A, 5D a WT označují jednotlivé proteiny FANCI.

6 DISKUZE

Opravná dráha Fanconiho anémie slouží k odstranění meziřetězcových spojení komplementárních vláken DNA. Pro pochopení, proč je pro aktivaci této dráhy nutná fosforylace proteinu FANCI, po které následuje monoubiquitylace FANCD2, je nutné porozumět mechanismu vlivu postupné fosforylace FANCI právě na monoubiquitylacii FANCD2. Jedna z možných hypotéz je, že fosforylace proteinu FANCI pozitivně ovlivňuje vazbu komplexu ID2 na DNA, resp. vazbu FANCD2 na DNA. K ověření této hypotézy a pro objasnění vlivu fosforylace na monoubiquitylacii byly využity fosfomimetické mutanty FANCI.

Mutantní formy proteinů FANCI i FANCD2 byly připraveny v hmyzím expresním systému Sf9 v dostatečném množství a čistotě (obrázek 13, str. 49). U všech připravených proteinů byla úspěšně odštěpena histidinová kotva (obrázek 14, str. 49), která by mohla zkoumání vazby proteinů na DNA ovlivnit.

Pro porovnání vazby mutantních forem proteinu FANCI či proteinových komplexů těchto mutantů s proteinem FANCD2 na DNA byly provedeny vazebné testy a změřena anizotropie fluorescence, obojí titrací DNA vzrůstajícím množstvím proteinu či proteinového komplexu.

Z porovnání vazeb jednotlivých fosfomimetických mutantů (obrázky 16, 17, str. 51, 52), i z dat vynesných v grafech 18 a 19 (str. 53) je možné pozorovat mírný rozdíl ve vazbách proteinů na DNA a ve vazebných křivkách, ovšem není patrný žádný trend, který byl očekáván (např. že s přibývajícím fosforylací proteinu FANCI by byla vazba proteinu na DNA silnější). Pozorovaný rozdíl může být způsoben vlivem několika faktorů, a to jak mírně rozdílnou koncentrací proteinu, nedostatečnou homogenitou gelu či například nepatrně vyšší či naopak nižší koncentrací soli. Vzorky byly sice do reakce přidávány ve stejném pufru, ovšem po purifikaci byly v pufru o koncentraci NaCl 300 mM a jelikož koncentrace všech měřených proteinů nebyla stejná, byly přidávány v různých objemech, což patrně mohlo výslednou koncentrací soli nepatrně ovlivnit. Jamky na gelu bylo nutné předem promýt pufrům, aby v nich nezůstaly fragmenty gelů, které by znesnadnily nanesení vzorků na dna jamek. Je také možné, že tato technika nebyla pro toto měření optimální. V rámci měření jsme se snažili tyto nepříznivě ovlivňující faktory omezit na minimum, tudíž byly po optimalizaci metody všechny uvedené titrace měřeny ve stejný den, ve stejném pufru, na gelech o stejném složení. Po optimalizaci této metody

s částí připravených mutantů bylo nutné s dalším měřením počkat na úspěšnou přípravu zbylých fosfomimetických mutantů.

Jako komplementární metoda byla zvolena ještě fluorimetrická technika měření anizotropie fluorescence. Tato technika byla jako v případě DNA vazebných testů použita pro stanovení vazby fosfomimetických mutantů na DNA a také pro stanovení vlivu koncentrace soli v pufru na průběh vazebné křivky, což je znázorněno v grafu na obrázku 21 (str. 55). Z výsledků vynesných v tomto grafu a rovněž ze získaných vazebných konstant z tabulky 9 (str. 54) je patrné, že vliv koncentrace soli je opravdu značný a zvýšení koncentrace soli o 75 mM může zvýšit vazebnou konstantu více než 10×. Tímto zjištěním by tedy mohla být vysvětlena fluktuace jednotlivých křivek v grafech získaných z DNA vazebných testů.

Jak již bylo zmíněno výše, touto metodou byla zkoumána také vazba fosfomimetických mutantů na DNA. V grafu na obrázku 22 (str. 55) je znázorněn rozdíl ve vazbě mutantů FANCI 2D3A a 3D2A na DNA. Je patrné, že rozdíl je zde opravdu minimální, což podporuje závěry z měření DNA vazebných testů, tedy že postupná fosforylace proteinu FANCI neovlivňuje jeho vazbu na DNA. Byl rovněž stanoven rozdíl mezi vazbou proteinu FANCI a proteinového komplexu ID2 na DNA. V grafu na obrázku 23 (str. 56) jsou vyneseny získané křivky z měření proteinu 2D3A bez a s přidavkem FANCD2. I zde je rozdíl minimální, což opět naznačuje, že ani tato vazba není fosforylací ovlivněna.

Data z fluorimetrických vazebných studií poukazují na správnost vazebných testů prováděných na nativních gelech. Obě techniky ukazují shodný výsledek, tedy že je vliv fosforylace proteinu FANCI na vazbu DNA minimální. Lze tedy usuzovat, že vazba proteinu FANCI na DNA není fosforylací ovlivněna přímo. Vazba samotného proteinu FANCD2 na DNA je o několik řádů nižší než v případě FANCI, ovšem přesné stanovení nebylo možné provést, zejména z důvodu nedostatečné rozpustnosti proteinu. Na druhou stranu při vazbě proteinů do komplexu ID2 je protein FANCD2 dostatečně navázán na FANCI a tudíž je „přivolán“ na DNA. Další testování vlivu fosforylace FANCI na vazbu FANCD2 v přítomnosti i nepřítomnosti DNA bylo nad rámec této diplomové práce a je dalším logickým krokem v pokračování tohoto projektu, kterého by mělo být nedílnou součástí i měření s poškozenou DNA a případně s monoubiquitylovaným proteinem FANCD2.

Posledními experimenty provedenými v rámci této diplomové práce byly monoubiquitylační reakce, které měly objasnit zda a případně jak ovlivňuje fosforylace

proteinu FANCI monoubiquitylací FANCD2. Reakce byly provedeny s několika mutanty. Nejvíce nás zajímal rozdíl mezi mutantem 5A, který představuje nefosforylovaný protein a mutantem 5D, který představuje protein kompletně fosforylovaný. Výsledný gel pro tuto reakci je prezentován na obrázku 24 (str. 57). Tato měření byla provedena opakovaně a ani zde jsme nezaznamenali výrazný rozdíl v míře monoubiquitylace komplexu ID2 v závislosti na přítomnosti jednotlivých mutantů.

Výsledky této diplomové práce naznačují, že fosforylace proteinu FANCI neovlivňuje ani jeho vazbu na DNA při zahájení opravné dráhy ani míru monoubiquitylace proteinu FANCD2. Toto zjištění tedy nabádá k zamyšlení, jakým způsobem fosforylace proteinu FANCI spouští opravnou dráhu Fanconiho anémie a také z jakého důvodu je fosforylace tohoto proteinu zásadní pro monoubiquitylací FANCD2. Jednou z možností, které by mohly funkci fosforylace vysvětlit, je přítomnost dalšího faktoru (případně faktorů), které by se účastnily zahájení opravné dráhy Fanconiho anémie a jejich funkce by mohla být ovlivněna fosforylací proteinu FANCI. Dále by fosforylace mohla ovlivňovat konformaci proteinového komplexu navázaného na DNA. Jelikož se fosforylací proteinu FANCI změní náboj v místě fosforylace, mohlo by dojít ke změně konformace nebo spíše k její stabilizaci po navázání na DNA. To by mohlo usnadnit navázání ubiquitinu na monoubiquitylační místa FANCD2 i FANCI, která jsou skryta na rozhraní obou proteinů vázaných v komplexu (obrázek 4A, B, str. 15). Fosforylace by tedy mohla umožnit přístup aktivnímu místu enzymu E2, který je pro monoubiquitylací FANCD2 nutný a který je příliš velký pro přiblížení k monoubiquitylačnímu místu samotného komplexu FANCI:FANCD2.

Získaná data tedy hypotézu o ovlivnění vazby proteinu FANCI či proteinového komplexu ID2 na DNA fosforylací vyvracejí. V dalším studiu této problematiky je důležité prověřit další možnosti, které by mohly potřebu fosforylace vysvětlit.

7 ZÁVĚR

- Byly navrženy mutantní konstrukty proteinu FANCI (1D; 2,3D; 3D2A; 2D3A; 5D; KR) i FANCD2 (KR), které byly úspěšně připraveny.
- Mutantní proteiny i jejich divoké kmeny byly připraveny expresí v hmyzím expresním systému a následně přečištěny pomocí afinitní, heparinové a gelové permeační chromatografie.
- U získaných proteinů byla úspěšně odštěpena histidinová kotva a jejich správnost byla ověřena hmotnostní spektrometrií.
- Pomocí DNA vazebných testů a měření anizotropie fluorescence byla získána data pro objasnění vlivu fosforylace proteinu FANCI na vazbu na DNA. Tato data ukazují, že fosforylace proteinu FANCI nemá vliv jak na vazbu tohoto proteinu na DNA, tak na vazbu proteinového komplexu ID2 na DNA.
- Vliv fosforylace proteinu FANCI na monoubiquitylaci ID2 byl zkoumán pomocí monoubiquitylačních reakcí. Ze získaných dat vyplývá, že fosforylace rovněž neovlivňuje míru monoubiquitylace.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. 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.
2. 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., Gelinis, R., Dorsman, J.C. (2015) A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51. *Nature Communications* **6**.
3. Buchwald, M. (1995) Complementation groups: one or more per gene? *Nature Genetics* **11**, 228–30.
4. Lobitz, S., Velleuer, E. (2006) Guido Fanconi (1892–1979): a jack of all trades. *Nature Reviews Cancer* **6**, 893–98.
5. Nalepa, G., Clapp, D.W. (2018) Fanconi anaemia and cancer: an intricate relationship. *Nature Reviews Cancer* **18**, 168–85.
6. Auerbach, A.D. (2009) Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **668**, 4–10.
7. Rosenberg, P.S., Tamary, H., Alter, B.P. (2011) How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. *American Journal of Medical Genetics Part A* **155**, 1877–83.
8. Oostra, A.B., Nieuwint, A.W.M., Joenje, H., de Winter, J.P. (2012) Diagnosis of Fanconi Anemia: Chromosomal Breakage Analysis. *Anemia* **2012**, 1–9.
9. 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.
10. Wu, R.A., Semlow, D.R., Kamimae-Lanning, A.N., Kochenova, O.V., Chistol, G., Hodskinson, M.R., Amunugama, R., Sparks, J.L., Wang, M., Deng, L., Mimoso, C.A., Low, E., Patel, K.J., Walter, J.C. (2019) TRAIIP is a master regulator of DNA interstrand crosslink repair. *Nature* **567**, 267–72.
11. Lawley, P.D., Phillips, D.H. (1996) DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutation Research* **355**, 13–40.
12. Noll, D.M., Mason, T.M., Miller, P.S. (2006) Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA. *Chemical Reviews* **106**, 277–301.
13. Singh, R.K., Kumar, S., Prasad, D.N., Bhardwaj, T.R. (2018) Therapeutic journey of nitrogen mustard as alkylating anticancer agents: Historic to future perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **151**, 401–33.
14. Rajska, S.R., Williams, R.M. (1998) DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. *Chemical Reviews* **98**, 2723–96.
15. 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.

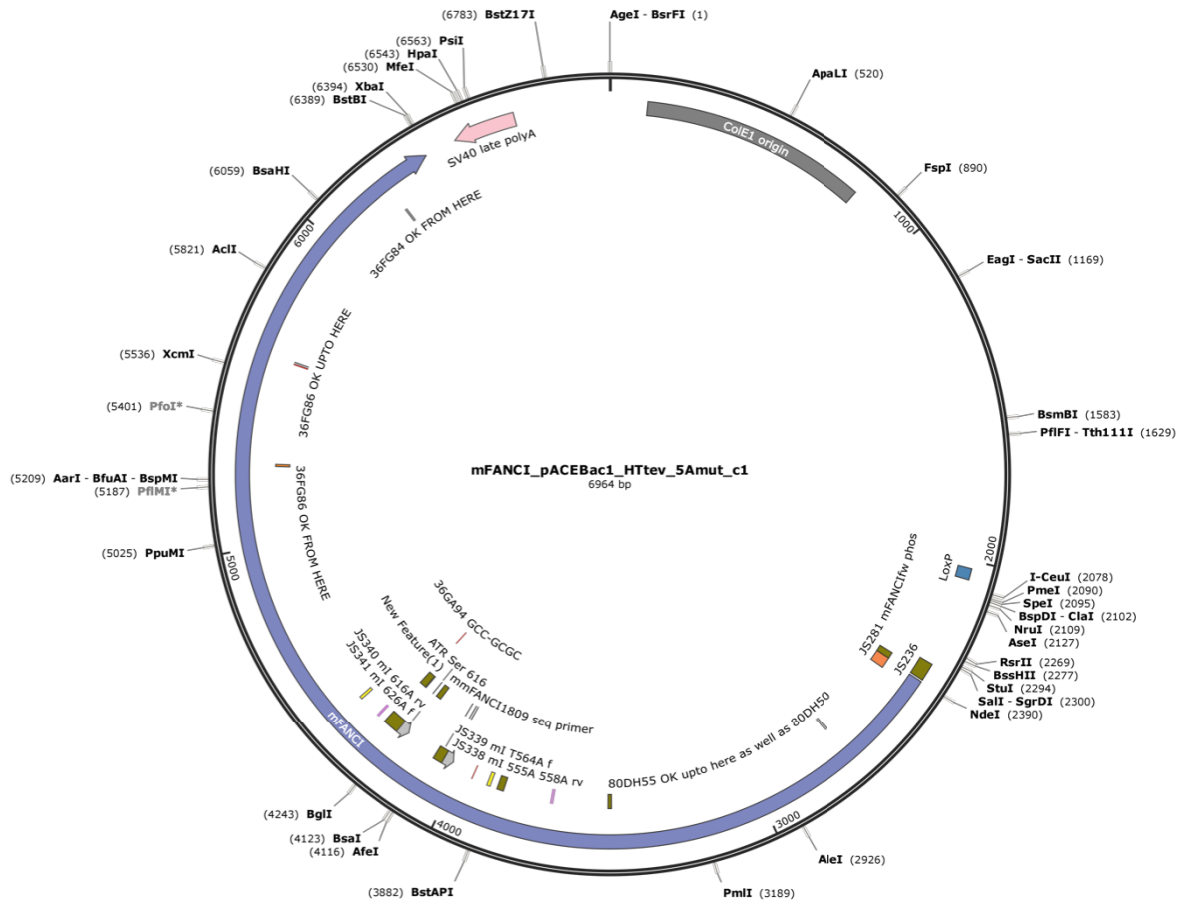
16. Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Ballif, B.A., Gygi, S.P., Hofmann, K., D'Andrea, A.D., Elledge, S.J. (2007) Identification of the FANCI Protein, a Monoubiquitinated FANCD2 Paralog Required for DNA Repair. *Cell* **129**, 289–301.
17. Alpi, A.F., 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Kalb, R., Neveling, K., Hoehn, H., Schneider, H., Linka, Y., Batish, S.D., Hunt, C., Berwick, M., Callén, E., Surrallés, J., Casado, J.A., Bueren, J., Dasí, Á., Soulier, J., Gluckman, E., Zwaan, C.M., van Spaendonk, R., Pals, G., de Winter, J.P., Joenje, H., Grompe, M., Auerbach, A.D., Hanenberg, H., Schindler, D. (2007) Hypomorphic Mutations in the Gene Encoding a Key Fanconi Anemia Protein, FANCD2, Sustain a Significant Group of FA-D2 Patients with Severe Phenotype. *The American Journal of Human Genetics* **80**, 895–910.
22. Levitus, M., Rooimans, M.A., Steltenpool, J., Cool, N.F.C., Oostra, A.B., Mathew, C.G., Hoatlin, M.E., Waisfisz, Q., Arwert, F., de Winter, J.P., Joenje, H. (2004) Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood* **103**, 2498–2503.
23. 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.
24. Yuan, F., El Hokayem, J., Zhou, W., Zhang, Y. (2009) FANCI protein binds to DNA and interacts with FANCD2 to recognize branched structures. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 24443–52.
25. Joo, W., Xu, G., Persky, N.S., Smogorzewska, A., Rudge, D.G., Buzovetsky, O., Elledge, S.J., Pavletich, N.P. (2011) Structure of the FANCI-FANCD2 Complex: Insights into the Fanconi Anemia DNA Repair Pathway. *Science* **333**, 312–16.
26. Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., Elledge, S.J. (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 10389–94.
27. Cimprich, K.A., Cortez, D. (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **9**, 616–27.
28. Paulsen, R.D., Cimprich, K.A. (2007) The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair (Amst.)* **6**, 953–66.

29. Ho, G.P.H., Margossian, S., Taniguchi, T., D'Andrea, A.D. (2006) Phosphorylation of FANCD2 on two novel sites is required for mitomycin C resistance. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 7005–15.
30. Cheung, R.S., Castella, M., Abeyta, A., Gafken, P.R., Tucker, N., Taniguchi, T. (2017) Ubiquitination-Linked Phosphorylation of the FANCI S/TQ Cluster Contributes to Activation of the Fanconi Anemia I/D2 Complex. *Cell Reports* **19**, 2432–40.
31. Ishiai, M., Kitao, H., Smogorzewska, A., Tomida, J., Kinomura, A., Uchida, E., Saberi, A., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., Tashiro, S., Elledge, S.J., Takata, M. (2008) FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nature Structural & Molecular Biology* **15**, 1138–46.
32. Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., Varshavsky, A. (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**, 1576–83.
33. Sigismund, S., Polo, S., Di Fiore, P.P. (2004) Signaling through monoubiquitination. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **286**, 149–85.
34. 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.
35. Meetei, A.R., Sechi, S., Wallisch, M., Yang, D., Young, M.K., Joenje, H., Hoatlin, M.E., Wang, W. (2003) A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 3417–26.
36. Deshaies, R.J., Joazeiro, C.A.P. (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual Review of Biochemistry* **78**, 399–434.
37. Cohn, M.A., Kowal, P., Yang, K., Haas, W., Huang, T.T., Gygi, S.P., D'Andrea, A.D. (2007) A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. *Molecular Cell* **28**, 786–97.
38. Yang, K., Moldovan, G.-L., Vinciguerra, P., Murai, J., Takeda, S., D'Andrea, A.D. (2011) Regulation of the Fanconi anemia pathway by a SUMO-like delivery network. *Genes & Development* **25**, 1847–58.
39. Park, W.-H., Margossian, S., Horwitz, A.A., Simons, A.M., D'Andrea, A.D., Parvin, J.D. (2005) Direct DNA Binding Activity of the Fanconi Anemia D2 Protein. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 23593–98.
40. Sareen, A., Chaudhury, I., Adams, N., Soback, A. (2012) Fanconi anemia proteins FANCD2 and FANCI exhibit different DNA damage responses during S-phase. *Nucleic Acids Research* **40**, 8425–39.
41. Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., Micklem, G. (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**, 789–92.
42. Antoniou, A., Pharoah, P.D.P., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D.M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Tulinius, H., Thorlacius, S., Eerola, H., Nevanlinna, H., Syrjäkoski, K., Kallioniemi, O.-P., Thompson, D., Evans, C., Peto, J., et al. (2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2

- mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *American Journal of Human Genetics* **72**, 1117–30.
43. Howlett, N.G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., Ikeda, H., Fox, E.A., D'Andrea, A.D. (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* **297**, 606–9.
 44. Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., Jasin, M., Couch, F.J., Livingston, D.M. (2006) Control of BRCA2 Cellular and Clinical Functions by a Nuclear Partner, PALB2. *Molecular Cell* **22**, 719–29.
 45. Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B.C., de Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W.W., Elghalbzouri-Maghrani, E., Steltenpool, J., Rooimans, M.A., Pals, G., Arwert, F., Mathew, C.G., Zdzienicka, M.Z., Hiom, K., De Winter, J.P., Joenje, H. (2005) The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nature Genetics* **37**, 934–35.
 46. Kais, Z., Rondinelli, B., Holmes, A., O'Leary, C., Kozono, D., D'Andrea, A.D., Ceccaldi, R. (2016) FANCD2 Maintains Fork Stability in BRCA1/2-Deficient Tumors and Promotes Alternative End-Joining DNA Repair. *Cell Reports* **15**, 2488–99.
 47. Michl, J., Zimmer, J., Buffa, F.M., McDermott, U., Tarsounas, M. (2016) FANCD2 limits replication stress and genome instability in cells lacking BRCA2. *Nature Structural & Molecular Biology* **23**, 755–57.
 48. Kauffmann, A., Rosselli, F., Lazar, V., Winnepeninckx, V., Mansuet-Lupo, A., Dessen, P., van den Oord, J.J., Spatz, A., Sarasin, A. (2008) High expression of DNA repair pathways is associated with metastasis in melanoma patients. *Oncogene* **27**, 565–73.
 49. Ozawa, H., Iwatsuki, M., Mimori, K., Sato, T., Johansson, F., Toh, H., Watanabe, M., Mori, M. (2010) FANCD2 mRNA Overexpression is a Bona Fide Indicator of Lymph Node Metastasis in Human Colorectal Cancer. *Annals of Surgical Oncology* **17**, 2341–48.
 50. 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.
 51. <https://tmcalculator.neb.com/#!/main>.
 52. QIAquick Spin Handbook: www.qiagen.com/HB-1196.
 53. QIAGEN, QIAprep® Miniprep Handbook (2006).
 54. Kost, T.A., Condreay, J.P., Jarvis, D.L. (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology* **23**, 567–75.
 55. <https://geneva-biotech.com/wp-content/uploads/2018/10/MultiBac-Manual-v7.0.pdf>.
 56. Xiong, S., Zhang, L., He, Q.-Y. (2008) Fractionation of proteins by heparin chromatography. *Methods in Molecular Biology* **424**, 213–21.

9! PŘÍLOHY

Created with SnapGene®



Příloha 1: Vektorová mapa mutantního genu *FANCI 5A* vloženého do plasmidu pACEBac1.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka

