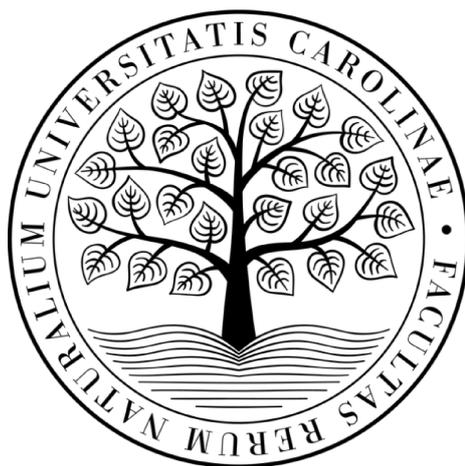


Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a žádám, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Michael Adámek

Role Wss1 proteasy v DNA reparačních procesech kvasinkové buňky
Role of Wss1 protease in yeast DNA repair

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Klára Grantz Šašková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Michal Svoboda

Praha, 2019

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29. května 2019

.....
Bc. Michael Adánek

Tímto bych chtěl bych poděkovat své školitelce Kláře Grantz Šaškové, Michalu Svobodovi, Janu Konvalinkovi, kolegům z „koutku úspěchu“ i ostatním kolegům z laboratoře.

ABSTRAKT

Zachování integrity DNA je v průběhu života kritické pro každý živý organismus. Organismy si proto vyvinuly mnoho způsobů, jak detekovat a opravit různé typy poškození DNA, způsobené endogenními i exogenními vlivy, vyúsťující dále v replikační stres. Chyby v těchto opravných mechanismech mohou vést k závažným lidským onemocněním, jako jsou neurologické poruchy, familiární druhy onkologických onemocnění nebo vývojové syndromy. V této diplomové práci byla zkoumána funkce kvasinkového proteinu Wss1, metaloproteasy, která se podílí na nedávno objevené DNA opravné dráze, která proteolyticky odstraňuje proteiny kovalentně zachycené na DNA. Wss1 vykazuje silnou negativní interakci s jinou proteasou opravující DNA, Ddi1, přičemž bylo objeveno, že kvasinkový kmen postrádající současně geny *WSS1* a *DDI1* je hypersenzitivní na hydroxyureu. Hydroxyurea inhibuje ribonukleotidreduktasu, čímž v konečném důsledku způsobuje zastavení buňky v S-fázi buněčného cyklu. V rámci této diplomové práce byly na základě předchozích studií provedeny tzv. „rescue“ experimenty s různými variantami Wss1, postrádajícími jednotlivé domény či obsahujícími bodové aminokyselinové záměny. Tyto experimenty následně posloužily k posouzení účasti jednotlivých domén proteinu Wss1 v odpovědi na replikační stres vyvolaný hydroxymočovinou.

Klíčová slova: Wss1, Ddi1, poškození DNA, oprava DNA, proteasa, kvasinky

ABSTRACT

Sustaining the integrity of DNA throughout the lifetime is critical for every living organism. Therefore organisms evolved numerous ways to detect and repair different types of DNA damage caused by various endogenous and exogenous factors resulting in replication stress. Defects in these repair mechanisms can lead to severe human diseases such as neurological disorders, familial cancers or developmental syndromes. In presented master thesis, we investigated the function of a yeast protein named Wss1, a metalloprotease that participates in a recently discovered DNA repair pathway that proteolytically removes DNA-protein crosslinks. Wss1 shows strong negative interaction with another DNA repair protease, Ddi1, in which case was discovered, that double-deleted yeast strain lacking WSS1 and DDI1 is hypersensitive to hydroxyurea. Hydroxyurea is a ribonucleotide reductase inhibitor that, in the end, arrests cells in the S-phase of cell-cycle. Based on previous studies, we performed rescue experiments with various deletions and single-site mutants of Wss1p to assess the involvement of particular yeast Wss1p domains in the replication stress response to hydroxyurea.

Key words: Wss1p, Ddi1p, DNA damage, DNA repair, protease, yeasts

OBSAH

Abstrakt	iii
Abstract	iv
Seznam použitých zkratk	vii
1 Úvod	1
2 Cíle práce	3
3 Literární přehled	4
3.1 Struktura a funkce DNA.....	4
3.1 Poškození DNA a jeho důsledky	5
3.1.1 Typy poškození molekul DNA	6
3.2 Buněčná odpověď na poškození DNA.....	9
3.2.1 Oprava DPC	12
3.2.2 Role proteolytických enzymů při opravě DPC.....	14
4 Materiál a metody	24
4.1 Materiál	24
4.1.1 DNA.....	24
4.1.2 Enzymy.....	25
4.1.3 Protilátky.....	25
4.1.4 Roztoky a pufry	25
4.1.5 Komerční soupravy.....	25
4.1.6 Chemikálie pro přípravu médií.....	26
4.1.7 Ostatní činidla a chemikálie	26
4.1.8 Bakteriální a kvasinkové kultury	26
4.2 Metody	27
4.2.1 Příprava pufrů a gelů	27
4.2.2 Příprava médií	28
4.2.3 Příprava genu <i>wss1^{E116Q}</i> kódující katalyticky neaktivní variantu Wss1p	29
4.2.4 Agarosová elektroforéza PCR produktů.....	29
4.2.5 Transformace bakterií.....	30
4.2.6 PCR bakteriálních kolonií.....	30
4.2.7 Minipreparace plasmidů.....	31
4.2.8 Klonování DNA konstruktů pro komplementační experimenty technologií GATEWAY®.....	31
4.2.9 Izolace DNA z agarosového gelu.....	35
4.2.10 Úpravy vstupních klonů technologií Gibson Assembly®	36
4.2.11 Transformace kvasinkových buněk	39

4.2.12	Analýza komplementačních experimentů pomocí bodového testu	40
4.2.13	Extrakce proteinů z kvasinkových buněk.....	40
4.2.14	Analýza exprese proteinů pomocí imunodetekce proteinů po přenosu na membránu (Western blot)	41
5	Výsledky	43
5.1	Klonování katalyticky inaktivní varianty Wss1p.....	45
5.2	Klonování rekombinačních sekvencí <i>attB1</i> , <i>attB2</i>	45
5.3	Příprava vstupních klonů	47
5.4	Klonování HA- afinitní značky	48
5.5	Příprava vstupních klonů s upravenými interakčními doménami	50
5.6	Rekombinační příprava expresních klonů	52
5.7	Analýza vlivu inaktivovaného katalytického místa na aktivitu proteinu wss1	53
5.8	Analýza role wss1p v buněčné odpovědi na genotoxické působení hydroxymočoviny.....	54
5.9	Ověření exprese zkoumaných genů v kvasinkových buňkách.....	55
6	Diskuze	57
7	Souhrn.....	63
8	Seznam citované literatury	64

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Význam
AAA	ATPasy spojované s různými buněčnými aktivitami (z angl. ATPases Associated with diverse cellular Activities)
ATP	adenosintrifosfát
Cdc48p	AAA ATPasa Cdc48 (z angl. Cell Division Control protein 48)
Cps1p	karboxypeptidasa S (z angl. Carboxypeptidase S)
DBD	doména proteinu Wss1 vázající DNA (z angl. DNA Binding Domain)
DDI1, DDI2	homology kvasinkového proteinu Ddi1
Ddi1p	aspartátová proteasa indukovaná poškozením DNA (z angl. DNA damage-inducible protein)
Doa1p	adaptor proteinu Cdc48 vázající ubikvitinovaný substrát (z angl. Degradation Of Alpha protein 1)
dNTP	deoxyribotukleotidtrifosfáty
DPC	proteiny kovalentně zachycené na DNA (z angl. DNA-Protein Crosslinks)
Dsk2p	protein podobný ubikvitinu vázající polyubikvitinové řetězce
FA	signální dráha Fanconio anémie
FANCD2	protein komplementační skupiny D2 Fanconio anémie (angl. Fanconi Anemia Complementation Group D2)
HDD	doména rodiny proteinů Ddi bohatá na α -helixy (z angl. Helical-Domain of DDI)
HO	místně specifická endonukleasa vyžadovaná při výměně alel v lokusu MAT (z angl. HOmothallic switching endonuclease)
HR	homologní rekombinace
Hsp70	chaperon Hsp70 (z angl. Heat-Shock Protein 70)
MAT	lokus určující párující typ kvasinek (z angl. mating-type lokus)
MRE11	savčí homolog Mre11p; nukleasová podjednotka savčího komplexu MRN opravující dvouvláknové zlomy DNA (z angl. Metotic Recombination 11 homolog 1)
Mre11p	nukleasová podjednotka komplexu MRX opravující dvouvláknové zlomy DNA (z angl. Meiotic REcombination 11)
MRN	komplex proteinů MRE11-RAD50-NBS1
MRX	komplex proteinů Mre11-Rad50-Xrs2
NBS1	nibrin; součást komplexu MRN
NER	oprava vystřížením nukleotidů (z angl. Nucleotide excision repair)
NHEJ	oprava nehomologním spojováním volných konců DNA (z angl. Non-Homologous end joining)
NRF1	jaderný respirační faktor 1; součást komplexu MRN (angl. Nuclear respiratory factor 1)
O ⁶ -meG	O ⁶ -metylguanin
OCT-1	transkripční faktor 1 z rodiny proteinů POU; alternativně značen POU2F1 (z angl. Octamer-binding protein 1)
PARP	poly-(ADP-ribose) polymerasa
PCNA	svorkový protein DNA polymerasy δ (z angl. Proliferating Cell Nuclear Antigen)
Pds1p	sekurin (z angl. Precocious Dissociation of Sisters 1)

Pgk1p	fosfoglycerát kinasa 1 (z angl. 3-PhosphoGlycerate Kinase)
Rad4p	protein Rad4 účastní se NER (z angl. Radiation sensitive 4)
Rad23p	protein Rad23 účastní se opravy DNA a proteasomální degradace proteinů (z angl. Radiation sensitive 23)
RAD50.....	savčí homolog Rad50p; součást komplexu MRN opravující dvouvláknové zlomy DNA (z ang. Radiation sensitive 50 homolog)
Rad50p	protein účastní se opravy DNA; součást komplexu MRX opravující dvouvláknové zlomy DNA (z ang. Radiation sensitive 50 homolog)
Rad52p	protein účastní se opravy DNA pomocí HR (z ang. Radiation sensitive 52)
<i>recA</i>	gen kódující rekombinasi A (z angl. Recombinase A)
<i>recB</i>	gen kódující rekombinasi B (z angl. Recombinase B)
RNS.....	reaktivní formy dusíku (z angl. Reactive nitrogen species)
ROS.....	reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive oxygen species)
RTF2	terminační faktor replikace 2
RVP	doména podobná aspartátovým proteasám retrovirů (z angl. Retroviral-like protease)
SATB1.....	protein vázající DNA; transkripční faktor; účastní se organizace struktury chromatinu (z angl. Special AT-rich sequence-binding protein-1)
SCF.....	E3 ubikvitin-protein ligasový komplex proteinů Skp1-Cul1-F-box
SHP	SHP box
SIM1, SIM2	motivy interagující s proteiny SUMO
SPRTN	savčí ortholog Wss1p (z angl. SprT-Like Domain-Containing Protein Spartan)
Spo11	protein účastní se tvorby dvouvláknových zlomů DNA během meiotické rekombinace (z angl. Sporulation)
Stch	člen rodiny proteinů Hsp70
SUMO	malý modifikační protein podobný ubikvitinu
TDP1.....	Tyrosil DNA-fosfodiesterasa 1 a 2; savčí homology Tdp1p
Tdp1p.....	Tyrosil DNA-fosfodiesterasa 1
TOP1.....	Topoisomerasa 1, savčí homology Top1p
TOP2	Topoisomerasa 2; savčí homolog Top2p
UBA	doména asociovaná s ubikvitinem
UBL.....	doména podobná ubikvitinu
Ufo1	F-box receptorový protein; podjednotka komplexu SCF (z angl. UV-F-box-HO)
VCP/p97.....	savčí homolog Cdc48p (z angl. Valosin-containing protein)
VIM.....	motiv interagující s proteinem Cdc48 (VCP/p97)
WLM	metalopeptidasová doména charakteristická pro protein Wss1
Wss1p	slabý supresor <i>smt3</i> (z angl. Weak Suppressor of Smt3)
XRCC1.....	protein účastní se opravy jednovláknových zlomů DNA (z angl. X-ray repair cross-complementing protein 1)
8-oxo-dG	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin

1 ÚVOD

DNA je klíčovou součástí každé živé buňky, jelikož je v ní uložena takřka veškerá nezbytná genetická informace. Struktura těchto molekul je ale neustále ohrožena působením řady faktorů způsobující různé formy poškození DNA. Vzniklé léze, zvláště pokud nejsou adekvátně opraveny, mohou vést k poruchám v buněčné fyziologii, mutacím a v konečném důsledku až ke smrti dané buňky.

Jedním z těchto poškození jsou kovalentně zachycené proteiny na DNA (zkr. DPC, z angl. DNA-protein crosslinks). DPC vznikají zachycením DNA-proteinových meziproduktů enzymatických reakcí v místech poškozené DNA nebo při působení enzymových jedů. Současně DPC vznikají i v důsledku působení ionizujícího, UV a IR záření, ROS a NOR i některých aldehydů, které chemickými reakcemi vyvolávají vazbu proteinů nacházejících se v těsné blízkosti na DNA (Klages-mundt & Li 2017). Přítomnost DPC silně ovlivňuje metabolismus DNA, zejména brání postupu klíčových proteinů během replikace a transkripce, což dále vede k tvorbě mutací, zlomů vláken DNA a přestavbám genomu (Nakano *et al.* 2012, 2013, Stingle *et al.* 2014, Duxin *et al.* 2014).

Eukaryotické buňky disponují systémem několika mechanismů, které opravují vzniklé DPC, popřípadě zajišťují toleranci jejich přítomnosti. Aktivita těchto mechanismů je pak úzce spojena s regulací buněčného cyklu (Ide *et al.* 2018). Mezi tyto mechanismy přibyla nedávno objevená proteolytická oprava DPC pomocí proteas, kdy dochází ke štěpení proteinové části DPC. Jedním ze dvou doposud známých zástupců této dráhy je kvasinková metaloproteasa Wss1, jejíž proteolytická aktivita je aktivována vazbou DNA, a která dále interaguje se segregasou Cdc48p a SUMO proteiny Smt3 (Stingle *et al.* 2014, Balakirev *et al.* 2015).

Další proteasou, u níž bylo nově objeveno, že se také účastní buněčné odpovědi na replikační stres, je aspartátová proteasa Ddi1 (Kottemann *et al.* 2017; Svoboda *et al.* 2019). Exprese *DDI1* je indukována při poškození DNA (Zhu & Xiao 1998), přičemž konkrétně kvasinkový Ddi1 se účastní několika procesů jako je ubikvitin-proteasomální degradace, regulace buněčného cyklu, výměny párovacích alel či regulace exocytosy skrze vyvazování SNARE proteinů (Clarke *et al.* 2001, Saeki *et al.* 2002, Marash & Gerst 2003, Kaplun *et al.* 2005, Díaz-Martínez *et al.* 2006, Gabriely *et al.* 2008). Protein Ddi1 má ve své struktuře doménu podobnou aspartátovým proteasám retrovirů, detailní mechanismus její proteolytické aktivity však nebyl doposud zcela objasněn (Trempe *et al.* 2016). Z několika nedávných studií je však zřejmé, že proteolytická aktivita je zcela zásadní jak při DNA opravných procesech (Svoboda *et al.* 2019; Serbyn *et al.* 2019), tak při proteolytickém štěpení a aktivaci transkripčního faktoru NRF1, který reguluje například

syntézu proteasomálních podjednotek (Koizumi *et al.* 2016) a NRF3, který je zásadní v regulaci buněčné proliferace (Chowdhury *et al.* 2017).

Při zevrubné genetické analýze neletálních kvasinkových mutací bylo objeveno, že současná delece *WSS1* a *DDI1* způsobuje výrazné snížení životaschopnosti (Costanzo *et al.* 2016). Tento pozorovaný fenotyp se navíc výrazně zesiluje při působení hydroxymočoviny, která skrze inhibici syntézy dNTP zastavuje replikační aparát (Svoboda *et al.* 2019; Serbyn *et al.* 2019). Pozorovanou přecitlivělost na HU lze zvrátit nadprodukcí Ddi1p, avšak jeho aktivita je závislá na funkci katalytického místa a přítomnosti domény HDD, o níž se předpokládá, že zajišťuje vazbu na DNA (Svoboda *et al.* 2019).

Cílem této diplomové práce bylo objasnit, zda lze tento fenotyp komplementovat i nadprodukcí Wss1p. Další úlohou bylo zjistit, které domény Wss1p jsou pro jeho funkci v odpovědi na replikační stres vyvolaný hydroxymočovinou za daných podmínek důležité.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo pomocí molekulárně biologických a mikrobiologických metod objasnit roli kvasinkové proteasy Wss1 v DNA opravných procesech během působení genotoxické hydroxymočoviny (HU) u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

Konkrétní cíle:

- Příprava plasmidových konstruktů nesoucí gen *WSS1*, nebo jeho upravené varianty s různými kombinacemi inaktivovaných či deletovaných interakčních domén a katalyticky aktivního místa.
- Transformace vybraných mutantních kmenů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a ověření exprese vložených genů.
- Ověření role proteasy Wss1 v buněčné odpovědi na působení genotoxické hydroxymočoviny pomocí bodového testu.
- Analýza vlivu jednotlivých domén a aktivního místa na funkci Wss1p.

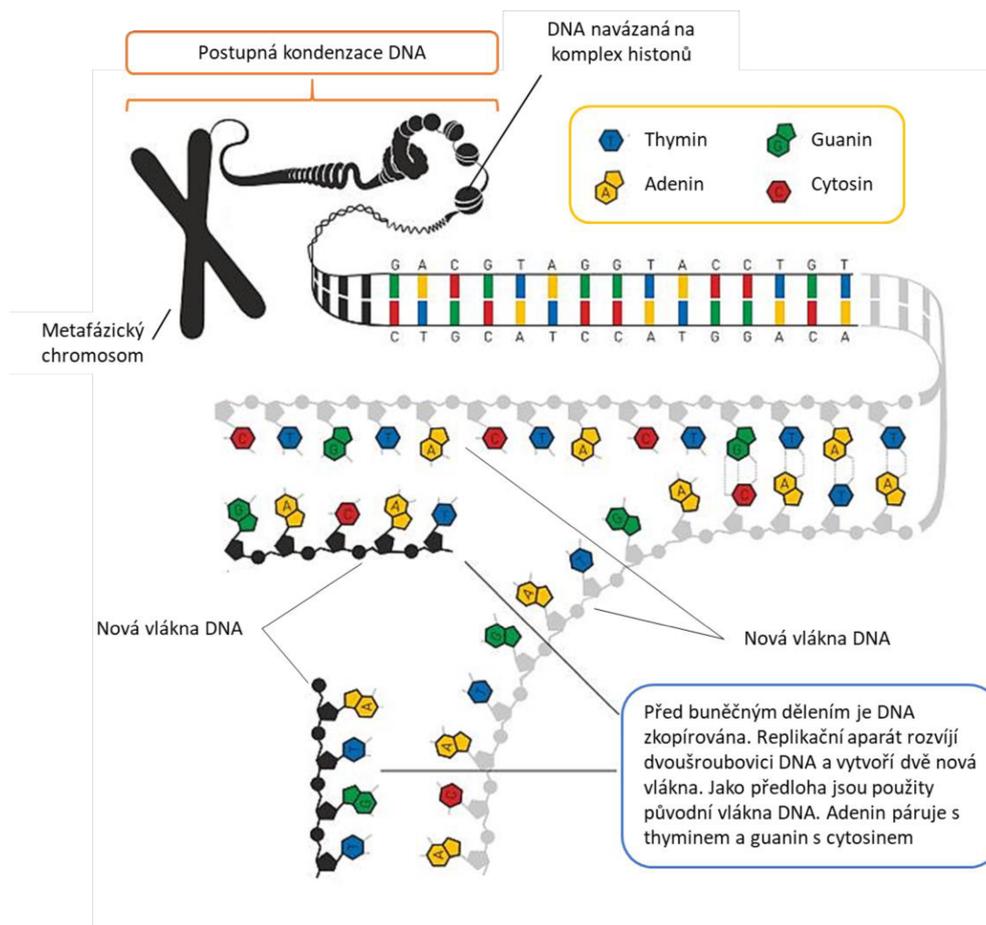
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 STRUKTURA A FUNKCE DNA

Deoxyribonukleová kyselina (obecně známá jako DNA, z angl. deoxyribonucleic acid) je nositelkou genetické informace ve všech živých organismech. Strukturu DNA lze obecně charakterizovat jako polymer základních stavebních jednotek – nukleotidů, které jsou dále tvořeny třemi složkami: (1) cukrem deoxyribózou, (2) zbytkem kyseliny fosforečné a (3) dusíkatou bází. Jednotlivé deoxyribózy jsou spojeny do řetězce tzv. fosfátovým můstkem, který spojuje třetí uhlík jedné deoxyribózy s pátým uhlíkem následující deoxyribózy. Tím vzniká typická „cukr-fosfátová kostra“ (na obr. 1. vyznačená šedě), která je z jedné strany zakončená hydroxylovou skupinou cukru (3' konec) a ze strany druhé fosfátovou skupinou (5' konec). Na první uhlík každé deoxyribózy je pak pomocí N-glykosidické vazby navázána jedna ze čtyř dusíkatých heterocyklických bází – adenin (A), guanin (G), cytosin (C) nebo thymin (T) (na obr. 1. vyznačeny červeně, žlutě, modře a zeleně). Dvě vlákna DNA s opačnou orientací svých konců (3'→5' a 5'→3') se k sobě váží skrze vodíkové můstky mezi protilehlými bázemi a v naprosté většině případů tvoří charakteristickou pravotočivou dvoušroubovici. Molekuly DNA jsou v buňce pak dále organizovány do vyšších struktur díky koordinované superspiralizaci a četnými interakcemi s proteiny, zejména komplexy histonů (viz obr. 1).

Aby byla umožněna distribuce DNA do dalších generací, dochází před dělením buňky ke zdvojení její genetické informace pomocí semi-konzervativní replikace. Během tohoto procesu jsou dvoušroubovice DNA činností enzymů topoisomeras a helikas rozpleteny na jednotlivá vlákna, která pak slouží jako předloha pro syntézu nového párujícího vlákna pomocí DNA polymeras. Z jedné dvoušroubovice DNA tak vznikají dvě, které jsou tvořeny jedním původním vláknem a jedním nově syntetizovaným.

Genetická informace je obsažena v samotné sekvenci DNA a slouží jako instrukce pro tvorbu buněčných bílkovin. Čtecí mechanismus, jenž je zodpovědný za tvorbu nových proteinů, rozpoznává tzv. kodony, tedy trojice po sobě jdoucích dusíkatých bází. Každému kodonu odpovídá určitá aminokyselina, která je posléze specificky přiřazena do nově vznikajícího peptidového řetězce. Vzhledem k tomu, že je v DNA zaznamenána sekvence všech bílkovin, které dále podmiňují vznik ostatních biomolekul a buněčných struktur, je pro živou buňku zcela zásadní umět genetickou informaci správně skladovat, replikovat a dále přenášet.



Obr. 1. | Struktura DNA. Upraveno podle (Lindahl *et al.* 2015).

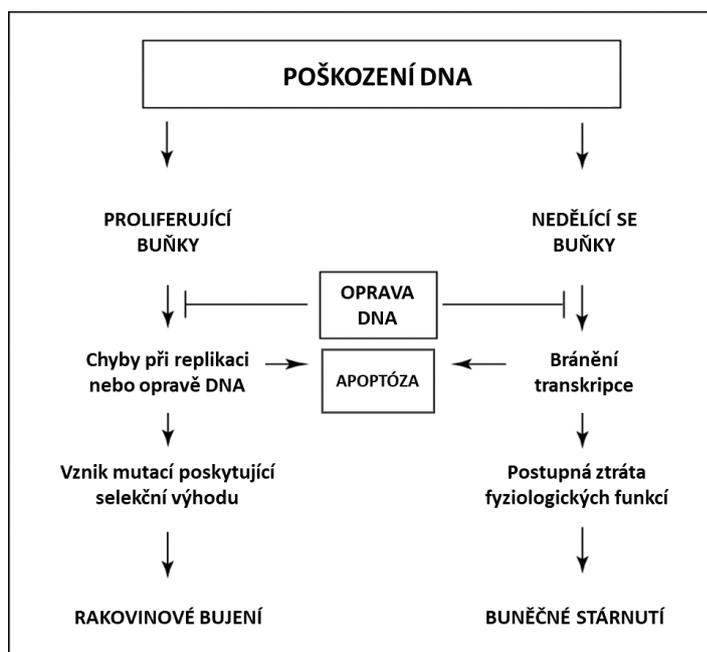
3.1 POŠKOZENÍ DNA A JEHO DŮSLEDKY

DNA je v buňce neustále vystavena vlivu mnoha endogenních i exogenních faktorů a činidel, které svým působením vyvolávají desítky tisíc změn v její chemické struktuře. V nedělicích nebo pomalu se množících buňkách pak při případné nedostatečné funkci opravných systémů dochází k postupnému hromadění poškození molekul DNA (Hamilton *et al.* 2001, Wolf *et al.* 2005), která ovlivňují či zcela blokují transkripci genů v postižených oblastech. Tyto změny vedou v konečném důsledku k postupné ztrátě fyziologických funkcí dané buňky, což je jednou z hlavních příčin buněčného stárnutí (Bernstein *et al.* 2008, Best 2009, Freitas & De Magalhães 2011). V rychle se dělících buňkách zase neopravená poškození brání průběhu replikačního aparátu, což vyústí v zahájení apoptózy (Cotta-Ramusino *et al.* 2005, Brnzei & Foiani 2008). Pokud ovšem nejsou apoptotické dráhy aktivovány, dochází při replikaci poškozeného templátového řetězce nebo při opravě některými opravnými mechanismy k tvorbě chyb a vzniku potenciálně škodlivých mutací a epigenetických alterací (Shibutani *et al.* 1991, O'Hagan, *et al.* 2008) (viz. obr. 2).

Mutace se od obecného poškození liší tím, že se jedná o změnu primární sekvence DNA a tedy i změnu zapsané genetické informace. Navíc, pokud je stejná mutace přítomna

v obou řetězcích, nemůže být rozpoznána a následně opravena příslušnými enzymy. Při replikaci jsou pak tyto chyby přeneseny do nového řetězce a během buněčného dělení předány do následující generace buněk (Shibutani *et al.* 1991).

Vzniklé mutace mohou změnit funkci proteinu nebo regulaci genové exprese (e Freitas & De Magalhães 2011). Většina mutací, které nemají neutrální vliv, je pro buňky škodlivá a způsobuje v replikující se populaci postupnou ztrátu takto mutantních buněk. Nastává ale i méně častá situace, kdy mutace v kritických genech inhibují důležité regulační funkce, což poskytuje příslušné mutantní buňce selekční výhodu, avšak současně značně zvyšuje pravděpodobnost vzniku nádorů (Bernstein *et al.* 2008) (viz obr. 2).



Obr. 2. | Poškození DNA v často se dělících buňkách způsobuje vznik mutací, jež vedou ke vzniku nádorového bujení. Oproti tomu poškození DNA v nereplikujících nebo pomalu se dělících buňkách je pravděpodobně významnou příčinou stárnutí. Upraveno podle (Bernstein *et al.* 2013)

3.1.1 Typy poškození molekul DNA

Oxidace bází

Interakcí DNA s reaktivními formami kyslíku (ROS, z ang. Reactive Oxygen Species) a dusíku (Inoue & Kawanishi 1995), oxidačními činidly, a také v důsledku nepřímého působení ionizujícího záření na DNA (Dizdaroglu 1992), vzniká více než 20 typů pozměněných bází (Valavanidis *et al.* 2013, Yu *et al.* 2016). Nejčastěji je pozorována oxidace guaninu, a to kvůli jeho vysokému oxidačnímu potenciálu (Steenken & Jovanovic 1997). Jedním z produktů takovéto oxidace je 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxo-dG), který je využíván jako biomarker oxidativního poškození a zhoubného bujení (Wolf *et al.* 2005, Kant *et al.* 2016, Bhatti *et al.* 2017). Přítomnost oxidovaných bází v DNA může způsobit epigenetické alterace a tím měnit genovou expresi (Nishida *et al.* 2013). Neopravené

oxidace dále indukují vznik mutací, kupříkladu oxidace páru G:C na 8-oxo-dG:C způsobuje transverzi na T:A (Yasui *et al.* 2014).

Alkylace bází

Alkylační činidla způsobují vazbu methylových či ethylových zbytků na dusíkové a kyslíkové atomy bází DNA (Richardson *et al.* 1987, Hecht 1999, Onizuka *et al.* 2018). Vznikají tak modifikované báze (např. 1-metyladenin, 6-O-metylguanin [O6-meG]) s cytotoxickými a mutagenními účinky (Abbott & Saffhill 1979, Delaney & Essigmann 2004). Kupříkladu, pár O6-meG:T spouští opravné mechanismy, které, nejsou-li provedeny správně, mohou zapříčinit dvouvláknové zlomy a spuštění apoptózy (Noonan *et al.* 2012). Některá alkylační činidla se tak pro svoji schopnost indukovat apoptózu používají jako protirakovinná léčiva (Drabløs *et al.* 2004).

Deaminace bází

Všechny báze kromě thyminu podléhají v buňce spontánní deaminaci. Nejčastěji dochází ke ztrátě aminoskupiny cytosinu za vzniku uracilu, a to s frekvencí 100-500 bází na buňku za den (Friedberg *et al.* 2006). Běžným zdrojem jednobodových mutací je 5-metylcytosin, který může být spontánně deaminován na přirozeně se vyskytující thymin. Pokud nejsou tyto léze opraveny před replikací, buňka použije vlákno obsahující U nebo T jako šablonu a tím vytvoří trvalou změnu v sekvenci DNA (Sassa *et al.* 2016).

Depurinace a depyrimidinace nukleotidů

V buňkách běžně dochází ke spontánní hydrolýze N-glykosidové vazby mezi bází a deoxyribosou, což vede ke vzniku tzv. abazických míst. Ztráta pyrimidinu bývá mnohem méně častá, jelikož N-glykosidová vazba mezi pyrimidinovou bází a deoxyribosou je stabilnější než odpovídající vazba na purinové báze (Lindahl 1993). Abazická místa vznikají také při opravě DNA poškozené ROS nebo alkylačními činidly (Xiao & Samson 1993, Fleming *et al.* 2017). Neopravená abazická místa blokují replikaci a transkripci, což může vyústit až ve zlomy vláken DNA, popřípadě zapříčiňují vznik mutací (Boiteux and Guillet 2004).

Vznik cyklobutanových dimerů

Absorpce UV záření vyvolává vznik pyrimidinových dimerů mezi sousedícími T-T a T-C bázemi DNA. Takto modifikované báze tvořící tzv. „cyklobutanový kruh“ nejsou schopny párovat s protějším vláknem DNA. Dochází proto k narušení struktury dvoušroubovice DNA, což může blokovat replikaci a transkripci (Protić-Sabljić *et al.* 1986, You *et al.* 2001).

Vazba chemických sloučenin

Některé planární molekuly tvořené polycyklickými uhlovodíky (kupř. proflavin, ethidiumbromid, akridiny), se mohou pomocí nekovalentních interakcí vmezeřit do prostoru mezi přilehlými páry dusíkatých bází, čímž dochází k narušení struktury DNA (Lerman 1961, Neto and Lapis 2009). Tyto změny dále blokují replikaci a transkripci (De Carvalho *et al.* 2018), popřípadě může přítomnost interkalačních činidel zapříčinit během replikace či oprav inserce či delecí nukleotidů v řetězci (Nial *et al.* 2007).

Jiné sloučeniny, jako je aflatoxin nebo Benzo[a]pyren, se kovalentně připojují na DNA, kdy vznikají tzv. „DNA-adykty“ (Volk *et al.* 2003). Obdobně jako interkalační činidla inhibují DNA-adykty replikaci a transkripci, popřípadě zapříčiňují chyby při replikaci (Aguilar *et al.* 1993, La & Swenberg 1996).

Poslední kategorii pak představují sloučeniny, které svojí strukturou připomínají dusíkaté báze, díky čemuž bývají během replikace DNA chybně zabudovány do nově syntetizovaného řetězce. Jiné vazebné vlastnosti těchto molekul následně způsobují chybné párování bází a narušení struktury DNA. Příkladem takových sloučenin jsou 5-bromouracil, 2-aminopurin (Benzert & Freese 1957, Sampath *et al.* 2003, Brovarets' *et al.* 2017).

Štěpení vláken DNA

V důsledku oxidačního poškození (Sharma 2007), alkylace bází (Hecht 1999), ionizujícího záření (Sutherland *et al.* 2000) i působením některých enzymových jedů (Hsiang *et al.* 1985, Covey *et al.* 1989) dochází k přerušení fosfodiesterové kostry DNA. Přerušení obou protilehlých vláken dvoušroubovice mohou být důsledkem zastavení replikačního aparátu, kdy dojde ke kolapsu replikační vidličky za vzniku volných konců DNA (Engels *et al.* 2007). Neopravená přerušení obou vláken DNA představuje pro buňku hrozbu, jelikož způsobuje značné změny v uspořádání genomu (Gorbunova *et al.* 2007).

Zesíťování DNA molekul

Působením endogenních i exogenních činidel, jež mají ve své struktuře dvě nezávislé reaktivní skupiny interagující s DNA, může docházet ke kovalentnímu propojení dvou nukleotidů v jednom vlákně, nebo mezi protějšími vlákny dvoušroubovice DNA. Zvláště propojení protilehlých vláken je pro buňky velmi toxické, jelikož je omezeno rozplétání dvoušroubovice, což brání replikaci i transkripci (Fu *et al.* 2011). Z látek endogenního původu jsou to např. malondialdehyd (Niedernhofer *et al.* 2003) spojující GC páry v 5'-CG sekvencích, nebo kyselina dusičná, která vytváří kovalentní spojení mezi atomy guanosinových bází v 5'-CG sekvencích (Kirchner *et al.* 1992). Řada exogenních zesíťovacích činidel, jako jsou např. rostlinné psoraleny spojující protilehlé TT báze po

aktivaci UV zářením (Cimino *et al.* 1985), nebo deriváty cisplatin (Rudd *et al.* 1995) jsou využívány jako chemoterapeutika (Parrish *et al.* 1974, Dasari & Tchounwou 2014).

Vazba proteinových aduktů

K nevratnému kovalentnímu zachycení nejrůznějších proteinů na DNA dochází z mnoha příčin. Při absorpci UV záření dochází k excitaci bází DNA, které se následně váží na aminokyseliny okolních proteinů (Zhang *et al.* 2004). Ionizující záření způsobuje vznik DPC přímo, a to tvorbou reaktivních kationtových radikálů DNA, nebo nepřímo, tedy ionizací okolních molekul vody vyvolávající vznik ROS, které mohou dále reagovat s DNA a okolními proteiny (Barker *et al.* 2005). Vznik DPC je ovšem indukován i léky proti rakovinnému bujení. Například platinové deriváty nescificky váží proteiny interagující s chromatinem, čímž vytváří tzv. neenzymatické DPC (Chválová *et al.* 2007). Kamptotecinové deriváty naopak stabilizují kovalentně navázanou topoizomerasu I vmezeřením na rozhraní DNA-enzym (Pommier 2009). Inkorporovaný cytosinový analog 5-aza-2'-deoxycytidine zase slouží jako ireverzibilní inhibitor pro (cytosin-5)-metyltransferasu 1, která na něm zůstává dále navázána (Maslov *et al.* 2013). Oba poslední příklady produkují tzv. enzymatické DPC. Jiným mechanismem působí inhibitory poly(ADP-ribosy) polymeras (PARP), které způsobují velmi těsné navázání PARP1, které se projevuje stejně jako kovalentní vazba (Murai *et al.* 2012). DPC jsou indukovány také řadou endogenních faktorů. Příkladem může být kovalentní vazba histonů v abazických místech nebo zachycení DNA polymerasy β během opravy oxidovaných abazických míst (Demott *et al.* 2002, Sczepanski *et al.* 2014).

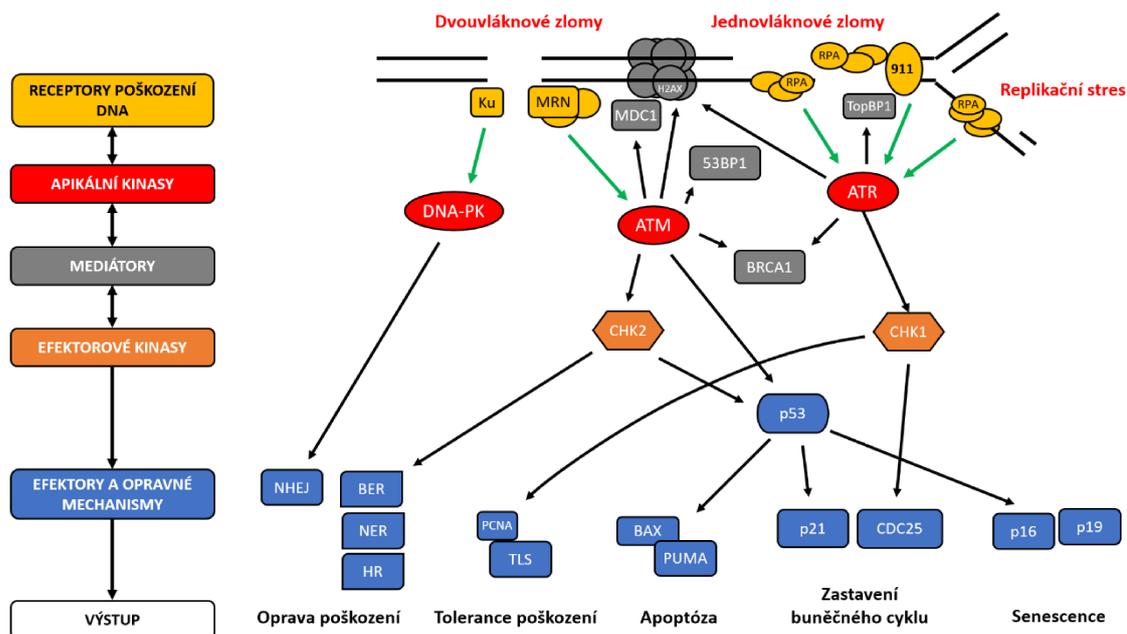
Vliv DPC se odvíjí od jejich struktury, velikosti i umístění. Velké DPC na vedoucím vlákně brání helikase rozplétat dvoušroubovici DNA, což dále vede ke kolapsu replikační vidličky (Nakano *et al.* 2012). Pokud se DPC vyskytne na opožděujícím se vlákně, způsobuje zastavení DNA polymerasy (Nakano *et al.* 2012). K výše zmíněným efektům ale nedochází, pokud je proteinová část DPC menších rozměrů (Chválová *et al.* 2007, Yeo *et al.* 2014). Obecně se dá říci, že DPC způsobují vznik mutací a mají genotoxický a cytotoxický účinek, jelikož narušují replikaci, transkripci i některé opravné mechanismy.

3.2 BUNĚČNÁ ODPOVĚĎ NA POŠKOZENÍ DNA

Pro obranu před poškozením DNA a případným zastavením replikačního aparátu si eukaryotické buňky vyvinuly důmyslný systém *buněčné odpovědi na poškození DNA* (zkr. DDR, z angl. DNA-Damage Response). Tento systém se skládá z mnoha navzájem provázaných a spolupracujících drah, které rozpoznávají dané poškození či zastavené replikační vidličky a následně skrze signální kaskády přesně regulují činnost mechanismů,

zajišťující opravu nebo toleranci daného poškození (viz obr. 3). Společně s opravou molekul DNA dochází současně i ke změnám transkripce genů a rozvolnění struktury chromatinu v místě poškození. V případě, že poškození není opraveno, nebo je lézí příliš mnoho, jsou spuštěny mechanismy vedoucí k přechodu buňky do senescence či spuštění programované buněčné smrti. Poruchy v některé z částí DDR způsobují zvýšenou citlivost postižených buněk vůči faktorům poškozující jejich DNA (Ciccia & Elledge 2010, Blackford & Jackson 2017).

Aktivita DDR pak úzce souvisí s regulací buněčného cyklu. Po spuštění DDR dochází k aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu – signálních drah, které zajišťují, že je DNA neporušena a připravena pro následnou replikaci a rozdělení buňky. Aktivace kontrolních bodů způsobuje pozastavení buněčného cyklu, což dává buňce čas na opravu poškození, než pokračuje v replikaci nebo mitóze. Současně, odpověď na dané poškození je ovlivněno tím, v jaké fázi buněčného cyklu se buňka právě nachází (Blackford & Jackson 2017, Hustedt & Durocher 2017).



Obr. 3. | Schematické znázornění Buněčné odpovědi na poškození DNA a replikační stres.

Prvním krokem DDR je rozpoznání poškození molekul DNA senzorymi proteiny (vyznačeny žlutou barvou). Dvouvláknové zlomy DNA jsou rozpoznány komplexem proteinů MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) a proteiny Ku. Odhalená oblast jednovláknové DNA je rozpoznána replikačními proteiny A (RPA) a komplexem proteinů RAD9-RAD1-HUS (9-1-1). Senzorové proteiny dále zajišťují vazbu a aktivaci apikálních serin/threoninových kinas (vyznačeny červenou barvou) - ATM (z angl. Ataxia-telangiectasia mutated), ATR (z angl. Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) a katalytické podjednotky proteinové kinasy závislé na DNA (DNA-PKcs; z angl. DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit). Aktivované apikální kinasy dále přenášejí signál na efektorové kinasy (vyznačeny oranžovou barvou) - ATR na kinasu kontrolního bodu buněčného cyklu 1 (CHK1, z angl. Checkpoint kinase 1) ATM na kinasu kontrolního bodu buněčného cyklu 2 (CHK2, z angl. Checkpoint kinase 2). Efektorové kinasy pak dále přenášejí signál do okolí, kdy fosforylují příslušné efekty. Regulace DDR je zajištěna činností mediátorů (vyznačeny šedou barvou), které jsou současně substráty i regulátory apikálních i efektorových kinas. Mezi mediátory DRR se řadí především protein karcinomu prsu 1 (BRCA1, z angl. Breast cancer type 1 susceptibility protein), protein 1 vázající p53 (53BP1, z angl. p53-binding protein), protein 1 vázající DNA topoisomerasu 2 (TopBP1, z angl. DNA topoisomerase 2-binding protein 1), histonová varianta H2AX (z ang. H2A histone family member X) a mediátorový protein kontrolního bodu buněčného cyklu 1 (MDC1, z angl. Mediator of DNA damage checkpoint protein 1). Konečným důsledkem spuštění DDR je zastavení buněčného cyklu a oprava poškození pomocí příslušných opravných mechanismů, jako je např. oprava nehomologním spojováním volných konců DNA (NHEJ, z angl. Non-Homologous end joining), oprava vyštěpováním bazí (BER, z angl. base excision repair) a nukleotidů (NER, z angl. Nucleotide Excision Repair), nebo homologní rekombinace (HR). V některých případech dochází alternativně k toleranci přítomného poškození činností translesních polymeras (TLS, z angl. Translesion DNA synthesis). Pokud není poškození opraveno (ať už v důsledku poruchy či nedostatečné funkce opravných mechanismů) dochází ke spuštění apoptózy. V opačném případě dochází k hromadění poškození zapříčiňující buněčné stárnutí (Ciccio & Elledge 2010, Blackford & Jackson 2017). Upraveno podle (Sulli *et al.* 2012).

3.2.1 Oprava DPC

Většina mechanismů účastnících se opravy poškozené DNA je již vcelku dobře prostudována. Oproti tomu ale stále není příliš známo o opravě DPC. Výsledky současných studií ukazují, že je většina vzniklých DPC opravena v průběhu S- fáze buněčného cyklu (Vaz *et al.* 2016). Tato skutečnost není nikterak překvapivá vzhledem k tomu, že přítomnost DPC způsobuje zastavení, popřípadě kolaps replikačního aparátu končící zastavením buněčného cyklu. V následujících kapitolách jsou shrnuty informace o doposud známých mechanismech oprav DPC.

Štěpení kovalentní vazby Tyrosil-DNA fosfodiesterasami

Tyrosil DNA-fosfodiesterasy 1 a 2 (TDP1, TDP2) jsou specializované buněčné enzymy, které odstraňují ireversibilně zachycené DNA topoisomerasy 1 (TOP1) na 3' konci jednovláknového zlomu DNA, a DNA topoisomerasy 2 (TOP2) zachycené na 5' koncích dvouvláknových zlomů DNA, a to pomocí hydrolýzy kovalentní vazby mezi DNA a tyrosinem v aktivním centru proteinů (Pommier *et al.* 2014). TDP1 i TDP2 ovšem nejsou schopny odstraňovat celé TOP1 a TOP2, a proto je proteinová část nejprve, skrze ubiquitinovou signalizaci proteolyticky naštěpena proteasomem (Lin *et al.* 2008, Interthal & Champoux 2011). Po odstranění TOP2 pomocí TDP2 zůstanou na DNA dvouvláknové zlomy, které jsou dále opraveny pomocí NHEJ či HR (Gómez-Herreros *et al.* 2013). Naopak TDP1 zanechává po odstranění TOP1 pouze jednovláknové zlomy, přičemž konce vláken jsou nejprve upraveny polynukleotid kinasou 3' phosphatasou a posléze spojeny Poly (ADP-ribosa) polymerasou 1, proteinem XRCC1 a DNA ligasou 3 (El-Khamisy 2011).

Činnost TDP1 je regulována skrze řadu post-translačních modifikací, např. sumoylace Lysinu 111 a poly(ADP)ribosilace C-konce TDP1 indukují přesun TDP1 do místa poškození, kde dále podporuje vazbu dalších opravných faktorů (Hudson *et al.* 2012, Das *et al.* 2014). Činnost TDP2 je pravděpodobně regulována ubiquitinovým signálem skrze N-koncovou ubiquitin-vazebnou doménu (Rao *et al.* 2016).

Nukleasová oprava pomocí komplexu MNR/MRX

Dalším mechanismem opravy DPC je odstranění narušených oblastí DNA pomocí buněčných nukleas. Komplex proteinů MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), v kvasinkových buňkách tvořený podjednotkami Mre11p-Rad50p-Xrs2p (MRX), zajišťuje opravu proteinových aduktů kovalentně zachycených na koncích dvouvláknových zlomů DNA. Tento opravný mechanismus, popř. jeho příbuzné alternativy, byl pozorován v bakteriálních, kvasinkových i lidských buňkách, přičemž ve všech případech vedla ztráta některé podjednotky ke kumulaci enzymatických DPC, tvořených proteiny TOP1, TOP2 či SPO11 (Connelly *et al.* 2003, Neale *et al.* 2005, Lee *et al.* 2012, Hoa *et al.* 2016). Výsledky

studie (de Graaf *et al.* 2009) mimo jiné naznačují, že MRN komplex odstraňuje i neenzymatické DPC.

Aktivita MRN je regulována na několika úrovních. Přítomnost DPC společně s podjednotkou NBS1 podněcuje endonukleázovou aktivitu MRE11, která v těsné blízkosti DPC štěpí jedno z vláken DNA. Následně dochází k odstranění poškozené části řetězce a současnému štěpení komplementárního vlákna DNA (Deshpande *et al.* 2016). Aktivita MRN komplexu je dále stimulována proteinem CtBP (v kvasinkách Sae2p), který dále interaguje s proteiny BRCA1 a CDK (Sartori *et al.* 2007, Hartsuiker *et al.* 2009). Po odstranění DPC jsou vlákna DNA dále opravena pomocí NHEJ nebo homologní rekombinace.

Oprava pomocí nukleotidové excizní reparače

Do opravy DPC a zároveň ochrany před působením některých DPC indukujících činidel, zejména pak reaktivních aldehydů, je zapojena i *nukleotidová excizní reparače (NER)*, která umožňuje opravení DPC skrze tvorbu jednovláknových zlomů v řetězci DNA (Nakano *et al.* 2007, 2009). Signálem pro využití této dráhy je pravděpodobně rychlý nárůst velkého množství DPC, jelikož např. v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* je NER důležitá při opravě DPC vzniklých v důsledku krátkého působení vysokých koncentrací formaldehydu (de Graaf *et al.* 2009, Stingle *et al.* 2014).

Z výsledků studií je také patrné, že je tento opravný systém kvůli své struktuře schopen odstranit pouze malé proteinové adukty o maximální velikosti ~14 kDa v případě bakterií (Minko & 2002, Nakano *et al.* 2007), do 10 kDa u vyšších organismů (Reardon & Sancar 2006, Nakano *et al.* 2009).

Účast homologní rekombinace

Jinou možností, jak se buňka dokáže chránit před působením reaktivních činidel indukujících DPC, je HR. Ztráta genů pro HR vyvolává u buněk zvýšenou senzitivitu k reaktivním aldehydům. Názorným příkladem může být delece genů *recA* a *recB* v bakteriích *E. coli* způsobující zvýšení citlivosti buněk na cytotoxické působení formaldehydu a azacytidinu (Nakano *et al.* 2007). Stejný efekt byl pozorován i při deleci genu *RAD52* u buněk *S. cerevisiae* (Stingle *et al.* 2014).

Z dosavadních výsledků studií vyplývá, že HR restartuje replikační vidličky blokové DPC, a zajišťuje opravu dvouvláknových zlomů vzniklých v důsledku akumulace DPC či opravy DPC pomocí MRN komplexu (Ide *et al.* 2011). Účast HR v toleranci DPC je podpořena výsledky studie (Nakano *et al.* 2009), kde ztráta genů pro HR vedla u savčích buněk k akumulaci dvouvláknových zlomů DNA. Pro toleranci DPC pomocí HR je navíc nezbytná funkce nukleasy Mre11 (Hoa *et al.* 2016).

Zajímavé jsou pak výsledky výzkumu (de Graaf *et al.* 2009) poukazující na rozdílnou roli NER a HR při opravě DPC. Na rozdíl od genů pro NER vedla delece HR genů *MRE11*, *RAD50*, *RAD52* v kvasinkových buňkách ke zvýšení citlivosti na dlouhodobé působení nízkých dávek formaldehydu. Výsledky studií dále ukazují, že oproti NER není činnost HR nikterak omezena velikostí proteinové části navázané na DNA. V *E. coli* byly objemnější DPC výhradně zpracovávány pomocí HR, zřejmě tedy představuje universálnější mechanismus tolerance DPC (Nakano *et al.* 2007, 2009).

Dráha Fanconiho anémie

Účast Fanconi anemia dráhy (FA) při opravě DPC je doposud rozporuplná. Delece genů FA dráhy vede ke zvýšení citlivosti buněk na působení DPC indukujících látek - reaktivních aldehydů (Garaycochea *et al.* 2012), enzymových jedů - kupř. 5-aza-2'-deoxycytidinu zachycující DNA-methyltransferasu 1 (Orta *et al.* 2013) či PARB inhibitorů (Murai *et al.* 2012). Nicméně, při studiu oprav plasmidů s DPC prováděných ve vaječných extraktech *X. laevis* bylo dokázáno, že odstranění FANCD2, jedné z hlavních komponent FA dráhy, nemělo na opravu DPC probíhající s replikací žádný vliv (Duxin *et al.* 2014). Navíc, buňky postrádající FANCD2 nevykazovaly oproti WT buňkám zvýšené množství DPC, ani u nich nebyla zaznamenána změna v opravě DPC vzniklých v důsledku působení formaldehydu (Stingele *et al.* 2016). Zdá se tak, že úloha FA dráhy při opravě DPC souvisí spíše s opravou mezi-vláknových prokřížení vyvolaných reaktivními činidly než se samotnou opravou DPC.

3.2.2 Role proteolytických enzymů při opravě DPC

K ochranným mechanismům zajišťujícím integritu a stabilitu DNA přibyla relativně nedávno objevená, avšak nesmírně důležitá, *proteolytická oprava DPC*. Tento univerzální opravný mechanismus je konzervován u vyšších i nižších eukaryot, avšak doposud nebyl pozorován u bakterií (Stingele *et al.* 2014, Vaz *et al.* 2016).

Univerzálnost proteas při opravě DPC spočívá v jejich nízké substrátové specifitě, která umožňuje štěpení, pravděpodobně jakékoliv proteinové složky DPC zachycené na vláknech DNA (Stingele *et al.* 2014, 2016).

Proteolytická oprava je indukována zastavením replikačního aparátu v důsledku přítomnosti DPC, které blokuje postup helikas na vedoucím vlákně či polymeras na opožděujícím se vlákně DNA. Po štěpení proteinové složky opravnou proteasou zůstává na DNA navázaný malý peptidový zbytek, který již nebrání postupu helikas, ale dále blokuje činnost polymeras. Oddělení činnosti helikas od polymeras způsobuje hromadění jednovláknové DNA, jež vyvolá ubikvitinaci a sumoylaci proteinu PCNA/Pol30p v kvasinkách. Tento protein, indukuje nahrazení blokových polymeras za

mutagenní translesní polymerasy, které pokračují v syntéze DNA i přes peptidový zbytek. Peptidový zbytek může být odstraněn i pomocí výše uvedených opravných mechanismů – NER, Tdp1p a Tdp2p (Hoegge *et al.* 2002, Duxin *et al.* 2014, Stinglee *et al.* 2014).

Doposud byly identifikovány dvě proteasy zajišťující proteolytickou opravu DPC, a to kvasinková metaloproteasa **Wss1p** (z angl. Weak Suppressor of Smt3) a její savčí ortolog **Spartan** (DVC1 nebo také SPRTN, z angl. SprT-like domain-containing protein Spartan). Oba tyto proteiny spadají do miniglucininové podskupiny zinkových metalopeptidas, které se vyznačují přítomností konzervovaného motivu HEXXH tvořící aktivní místo enzymu (Stinglee *et al.* 2014, 2016, Vaz *et al.* 2016, Yang *et al.* 2017). Vedle HEXXH motivu mají Wss1 i SPRTN podobnou organizaci proteinových domén a sdílejí určité specifické vlastnosti (Balakirev *et al.* 2015). Unikátní charakteristický prvek těchto proteas je závislost jejich proteolytické aktivity na přímé či zprostředkované vazbě s DNA (Stinglee *et al.* 2014, 2016, Lopez-Mosqueda *et al.* 2016). Aktivita Wss1 a SPRTN je dále stimulována vazbou ubikvitinu nebo SUMO proteinů skrze interakční domény, které jsou umístěny na C-konci proteinu (Centore *et al.* 2012, Stinglee *et al.* 2014) a interakcí s AAA ATPasou Cdc48/p97/VCP (z angl. Cell Division Cycle) (Ghosal *et al.* 2012, Stinglee *et al.* 2014).

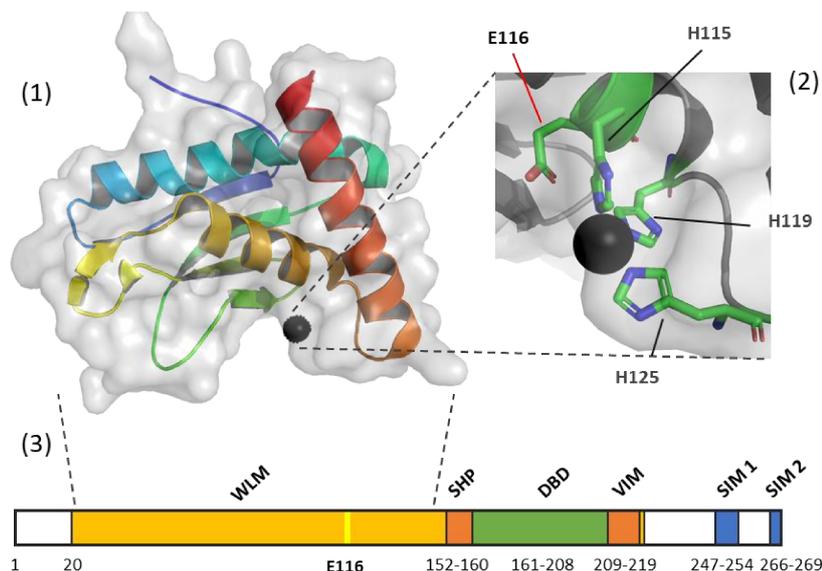
Wss1p v Saccharomyces cerevisiae

Kvasinková metalo(endo)peptidasa Wss1p je první objevenou proteasou účastnící se opravy poškozené DNA. Klíčovou studií odhalující roli Wss1p a její funkční charakteristiky byl výzkum prováděný v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, dokazující účast této proteasy při opravě kovalentně zachycené Top1p po působení formaldehydu (Stinglee *et al.* 2014).

Wss1 je 269 aminokyselin dlouhý protein kódovaný na chromosomu č. VII. Je součástí podskupiny WLM (z ang. Wss1-like metalloprotease) zinkových metaloproteas. Členové proteinové WLM rodiny se vyskytují u kvasinek, hub a rostlin, ale chybí u zvířat a bakterií (Lakshminarayan *et al.* 2004, Balakirev *et al.* 2015).

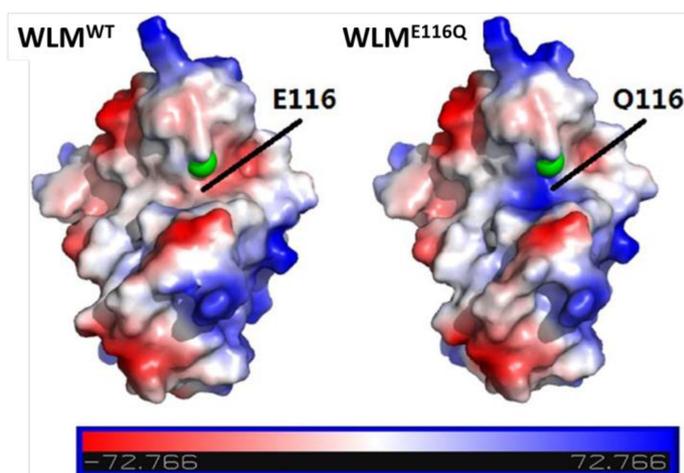
Struktura proteinu Wss1 se sestává z N-koncové proteasové domény WLM obsahující aktivní místo tvořené aminokyselinami H115, E116, H119 (součást sekvence HEXXH) a H125, které společně vážou ion zinku (viz obr. 4-1, 4-2). Katalytické místo může být inaktivováno nahrazením negativně nabitého E116 za neutrální glutamin (Stinglee *et al.* 2014). Tato mutace způsobuje změnu povrchového náboje aktivního místa z mírně negativního na pozitivní, přičemž není ovlivněna celková struktura Wss1p (Yang *et al.* 2017) (viz obr. 5). Ve struktuře Wss1p jsou dále přítomny motivy VIM (z ang. VCP-interaction motif) a SHP, jež jsou společně zodpovědné za interakci se proteinem Cdc48 (Stapf *et al.* 2011, Stinglee *et al.* 2014) (viz obr. 4-3). Mezi motivy SHP a VIM se dále

nachází oblast zajišťující vazbu s DNA (DBD, z angl. DNA-binding domain) (Stingele *et al.* 2014). Na C- konci proteinu se pak nacházejí interakční motivy SIM1 a SIM2 (z ang. SUMO interaction motif), které jsou důležité pro vazbu kvasinkového SUMO proteinu Smt3 (Mullen *et al.* 2010, Stingele *et al.* 2014).



Obr. 4. | Struktura proteinu Wss1.

- (1) Krystalová struktura proteasové domény WLM (aminokyseliny 21-148) s barevně vyznačenými sekundárními strukturami – 3 α helixy a 4 β listy. Ion zinku nacházející se v aktivním místě je vyobrazen černě.
- (2) Detailní vyobrazení aktivního místa tvořeného iontem zinku, histidiny H115, H119, H125 a katalytickým glutamátem E116.
- (3) Schématické znázornění uspořádání domén a umístění aktivního glutamátu E116.



Obr. 5. | Vliv mutace E116Q na povrchový náboj aktivního místa. Porovnání povrchového potenciálu nativní WLM domény (WLM^{WT}) (aminokyseliny 21-148) a její upravené varianty s mutací E116Q (WLM^{E116Q}) (aminokyseliny 24-149). Červená barva značí záporný povrchový potenciál, modrá barva kladný. Upraveno podle (Yang *et al.* 2017).

Substrátem Wss1p jsou proteinové části enzymatických i neenzymatických DPC, přičemž aktivita Wss1p zřejmě není omezena strukturou substrátu. Důkazem jsou experimenty, při kterých byly *in vitro* podmínkách štěpeny Top1p, histony H1 i 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reduktasa (Stingele *et al.* 2014).

Proteolytická aktivita Wss1p je regulována několika mechanismy. Prvním z nich je její závislost na interakci s DNA. Ve studii (Stingele *et al.* 2014) je prokázáno štěpení testovaných substrátů *in vitro* po přidání DNA, zejména jednovláknové, přičemž štěpeny byly pouze proteiny se schopností vazby na DNA. Balakirev a kolegové ovšem prokazují i štěpení Cdc48p (Balakirev *et al.* 2015), který interaguje s Wss1p, ale sám nedisponuje schopností vázat se na DNA. Stejná práce dále pak ukazuje, že proteolytická aktivita může být namísto DNA aktivována i thiol-modifikujícími činidly: thiramem a octanem p-aminofenylrutnatým. Z výsledků autoři usuzují, že stejně jako některé další metaloproteasy je Wss1 regulována mechanismem cysteinového spínače, kdy je aktivní místo inhibováno negativně nabitou C-koncovou částí Wss1p nesoucí inhibiční cystein C226. Interakce kladně nabitě WLM domény s DNA následně způsobuje konformační změny usnadňující vytěsnění C226 z aktivního místa. Tuto teorii podporuje přítomnost flexibilní oblasti za WLM doménou vázající DNA, jež by mohla umožňovat potřebný ohyb, i strukturní podobnost WLM domény s proabylysinem, který je regulován podobným mechanismem (Yang *et al.* 2017). Aktivace konformační změnou po vazbě DNA je známa i u savčího SPRTN, kdy vazba na jednovláknovou DNA spouští úplnou aktivaci enzymu, což umožňuje štěpení proteinového substrátu. Naproti tomu vazba na dvouvláknovou DNA vyvolává štěpení SPRTN *in-trans* (Stingele *et al.* 2016).

I Wss1p je regulován štěpením sebe sama. V *in vitro* experimentech bylo pozorováno štěpení Wss1p *in-trans* po přidání jednovláknové i dvouvláknové DNA. Z výsledků experimentů je též patrné, že je vyžadována DNA o jisté minimální délce, pohybující se okolo 16 bp (Stingele *et al.* 2014, Balakirev *et al.* 2015). Vzhledem k těmto skutečnostem se tak předpokládá, že DNA aktivuje proteolytickou aktivitu Wss1p a současně slouží jako nosič, který zajišťuje těsné přiblížení Wss1p a štěpeného proteinu (Stingele *et al.* 2014, Balakirev *et al.* 2015).

Wss1 se štěpí na více místech v C-oblasti proteinu: (1) mezi doménami SHP a VIM, (2) v oblasti SHP, (3) za C-koncem WLM domény (Stingele *et al.* 2014, Balakirev *et al.* 2015, Yang *et al.* 2017). Dá se předpokládat, že nejprve dochází ke štěpení (1) a (2), což může zajišťovat zvýšení proteolytické aktivity odstraněním C-konce s regulačním cysteinem. Po dalším štěpení (3) pak zůstává pouze kompaktní proteasová WLM doména, která se níž neváže na chromatin. Tento krok může sloužit k ochraně zbylých proteinů na DNA, nebo k ukončení činnosti Wss1p po odstranění DPC.

Aktivita Wss1p je dále regulována interakcí C-koncových domén SIM1 a SIM2 s kvasinkovým SUMO proteinem Smt3. Tento protein se účastní signalizace pro porušenou DNA a regulace opravných mechanismů v místech poškození. SUMOylovány jsou jak zachycené proteiny, kupř. Top1 (Mao *et al.* 2000), tak i opravné komplexy akumulující se v místech poškozené DNA (Psakhye and Jentsch 2012, Balakirev *et al.* 2015). Výsledky prvních studií naznačovaly, že vazba SUMO je nezbytná pro pozorovanou isopeptidasovou aktivitu na řetězcích SUMO proteinů (Mullen *et al.*, 2010). Tuto aktivitu vyvrací výsledky výzkumu Stingleho a kolegů, které současně ukazují, že vazba SUMO podporuje *in vivo* aktivitu Wss1p při odstraňování Top1p, ale není pro ní zcela nezbytná (Stingle *et al.* 2014). Autoři došli k závěru, že vazba SUMO proteinů skrze domény SIM1 a SIM2 podporuje nasměrování proteolytické aktivity Wss1p do míst poškozené DNA. Větší význam těmto doménám přiřkládá (Balakirev *et al.* 2015), a to že přítomnost SIM domén je nezbytná pro odstraňování sumoylovaných proteinů a auto-proteolysu Wss1p. Dále pak předpokládá, že SIM domény zajišťují SUMO-ligasovou aktivitu - Wss1p váže sumoylované proteiny, načež prodlužuje sumoylované řetězce a posléze sumoyluje sám sebe a přidružené buněčné proteiny. Tím indukuje vazbu dalších Wss1p a ostatních opravných komponent, auto-aktivaci a štěpení substrátů (Balakirev *et al.* 2015).

Dalším proteinem, se kterým Wss1p v buňce interaguje je segregasa Cdc48. O tomto proteinu je známo, že společně se svými kofaktory váže ubikvitin i SUMO proteiny a zajišťuje odstraňování značených proteinových komplexů z chromatinu, i jejich následnou proteasomální degradaci (Ramadan *et al.* 2017). Interakce s Cdc48 není zapotřebí pro proteolytickou aktivitu Wss1p *in vitro* (Stingle *et al.* 2014, Balakirev *et al.* 2015), avšak vazba s Cdc48p skrze SHP a VIM domény je vyžadována pro odstraňování kovalentně zachycených Top1p u kvasinek postrádající současně *TDP1* (Stingle *et al.* 2014, Balakirev *et al.* 2015). I při odstraňování DPC indukovaných působením formaldehydu Stingle a kolegové předkládají hypotézu, že Cdc48p skrze vazbu SUMO proteinů napomáhá cílení Wss1p do sumoylovaných míst s poškozenou DNA a svou segregasovou aktivitou pravděpodobně zajišťuje i odstranění peptidového zbytku, který vznikl po štěpení DPC Wss1p, z DNA a jeho přenesení do proteasomu nebo k jiné buněčné peptidase (Stingle *et al.* 2014). Tuto hypotézu podporují výsledky výzkumu (Balakirev *et al.* 2015), kde bylo prokázáno, že Wss1p tvoří komplex s Cdc48p a jeho kofaktorem Doa1p, jež váže ubikvitin (Mullally *et al.* 2006) a účastní se degradace ubikvitinovaných substrátů skrze UPS (Wu, *et al.* 2016) i regulace transportu ubikvitinovaných proteinů do vakuoly (Ren *et al.* 2008). Tyto informace společně s objevem, že působení genotoxických činidel indukuje akumulaci Wss1p ve vakuole, nasvědčuje, že komplex Wss1/Cdc48/Doa1

zprostředkovává degradaci sumoylovaných substrátů prostřednictvím specifického transportu do vakuoly (Balakirev *et al.* 2015).

Proteasová aktivita Wss1p je za normálních podmínek v buňce latentní a je aktivována až při působení genotoxických faktorů, kupř. formaldehydu, kamptothecinu nebo UV záření (O'Neill *et al.* 2004, Stingle *et al.* 2014, Balakirev *et al.* 2015). Činnost Wss1p pak souvisí s ostatními opravnými mechanismy buněčné odpovědi na DPC. Dosavadní výsledky studií naznačují, že DPC jsou v kvasinkové buňce opraveny pomocí NER. DPC, které nemohou být pomocí NER opraveny přetrvávají na DNA až do S- fáze buněčného cyklu, kdy jsou opraveny proteolytickým štěpením proteasou Wss1, nebo v případě její nefunkčnosti, pomocí HR (Stingle *et al.* 2014). Zanechaný peptidový zbytek po štěpení Wss1p je následně odstraněn pomocí NER (pravděpodobně) nebo se pokračuje v replikaci pomocí translesních polymeras s vyšší mírou chybovosti (Stingle *et al.* 2014). Výsledky (Mullen *et al.* 2010, Balakirev *et al.* 2015) n

značují, že další alternativou k proteolytické opravě pomocí Wss1p jsou SUMO-cílené ubikvitin-ligasy (STUbL) využívající komplex Cdc48/Ufd1/Npl4 k nasměrování proteinů určených k degradaci do proteasomu.

Ddi1p v Saccharomyces cerevisiae

Další proteasou, která se pravděpodobně přímo účastní opravných mechanismů na poškozené DNA, je aspartátová proteasa Ddi1 (z angl. DNA damage-inducible protein 1), která byla poprvé charakterizována v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* jako gen, jehož transkripce je aktivována v důsledku působení genotoxického stresu (Liu and Xiao 1997). Ortology kvasinkového proteinu Ddi1 lze nalézt u rostlin, hub, bezobratlých i člověka, s evolučně zachovanou strukturou (Krylov & Koonin 2001).

Struktura kvasinkového Ddi1p se sestává z N- koncové UBL (z angl. Ubiquitin-like) a C- koncové UBA (z angl. Ubiquitin-associated) domény, které jsou obě charakteristické pro UBL/UBA adaptorové proteiny ubiquitin-proteasomového systému, mezi které patří i proteiny Rad23 a Dsk2. Předpokládaná funkce Ddi1p, Rad23p a Dsk2p je regulace při rozpoznávání substrátu proteasomem, a to vazbou ubikvitinovaných substrátů pomocí UBA domény a jejich navedení do proteasomu skrze vazbu UBL domény s proteasomovou podjednotkou Rpn1 (Chen & Madura 2002, Saeki *et al.* 2002, Gomez *et al.* 2011). Na rozdíl od příslušných domén u Rad23p a Dsk2p má N- koncová UBL doména Ddi1p nižší sekvenční podobnost s ubiquitinem a neinteraguje s motivy vázající ubikvitin ani s UBA doménami, ale naopak sama váže ubiquitin (Nowicka *et al.* 2015, Trempe *et al.* 2016).

Ddi1p dále obsahuje aspartátovou proteasomovou doménu RVP (z ang. Retroviral Protease) obsahující charakteristický motiv aspartát-serin/threonin-glycin. Struktura této

domény i příslušný motiv vykazuje vysokou podobnost s aspartátovými proteasami retrovirů (Sirkis *et al.* 2006).

Mezi N-koncovou UBL a RVP doménou se nachází HDD doména (z angl. Helical Domain of Ddi1) bohatá na α -helixy. Struktura této domény je částečně podobná s rodinou Sti1-podobných domén, které zajišťují protein-proteinové interakce (Trempe *et al.* 2016). Tyto domény jsou přítomny i v Rad23p a Dsk2p. Rad23p se skrže Sti-podobnou doménu váže na DNA vazebný protein Rad4, který je součástí NER (Min & Pavletich 2007). Předpokládá se, že tato interakce zajišťuje ochranu Rad4p před proteasomální degradací (Ng *et al.* 2003). Dsk2 se prostřednictvím své Sti1-podobné domény váže protein Stch podobný chaperonu Hsp70 (Kaye *et al.* 2000). Nicméně, ještě výraznější podobnost HDD domény Ddi1 byla dále prokázána s DNA vazebnými doménami některých transkripčních regulátorů, a to transkripčního aktivátoru CII bakteriofága λ , proteinu Oct1p, nebo lidského SATB1, což naznačuje, že by HDD doména mohla interagovat s DNA (Trempe *et al.* 2016). Na základě těchto strukturních podobností HDD domény a vzhledem k poznatkům, že se Ddi1p podílí na buněčné odpovědi při poškození DNA a také kontrolních bodech buněčného cyklu (Zhu & Xiao 1998, Clarke *et al.* 2001) autoři článku předpokládají, že by se Ddi1 mohla vázat skrže HDD doménu do místa poškození DNA, kde regulace vyžaduje proteolysu závislou na ubikvitinu (Trempe *et al.* 2016).

Expresí genu *DDI1* je pod kontrolou obousměrného promotoru, který současně řídí expresi 3-methyladenin DNA glykosylasy (Meg1p), jenž působí v prvním kroku dráhy excizní opravy bází a chrání kvasinkové buňky před genotoxickým působením alkylačních činidel (Liu and Xiao 1997). Expresí těchto dvou genů je ovšem odlišně regulována různými drahami kontrolních bodů poškození DNA (Zhu and Xiao 1998, 2001).

Při studiu kvasinkových buněk s mutovanou variantou Pds1p (*pbs1-128*) bylo objeveno, že nadměrná exprese Ddi1p, stejně jako Rad23p, potlačuje zvýšenou citlivost mutovaných buněk na vysoké teploty a genotoxické působení hydroxymočoviny (Clarke *et al.* 2001). Protein Pds1p je součástí kontrolního bodu S-fáze buněčného cyklu, kde funguje jako inhibitor, jehož ubikvitinace a následná proteasomální degradace je nezbytná pro přechod buňky z metafáze do anafáze (Cohen-Fix *et al.* 1996). Na základě získaných výsledků autoři předkládají hypotézu, že je Ddi1p důležitou součástí kontrolních mechanismů S-fáze buněčného cyklu, kdy rozpoznává skrže svou UBA doménu ubikvitinovaný Pds1p a inhibuje jeho další ubikvitinaci a související proteasomální degradaci.

Při buněčné odpovědi na poškození DNA Ddi1p dále zajišťuje proteasomální degradaci Ho endonukleasy a F-box proteinu Ufo1 (Kaplun *et al.* 2005, Ivantsiv *et al.* 2006). Protein Ho je zodpovědný za štěpení vláken DNA při výměně alel v MAT lokusu

určující párovací typ kvasinek. Při aktivaci DDR je Ho endonukleasa fosforylována, což slouží jako signál pro její urychlenou degradaci. Fosforylovaný Ho protein je následně exportován z jádra do cytoplasmy, kde jej prostřednictvím receptorového proteinu Ufo1 váže SCF ubikvitin ligasový komplex, který Ho protein ubikvitinuje (Kaplun *et al.* 2003). Velmi zajímavé jsou výsledky výzkumu (Kottemann *et al.* 2018), kdy u lidských buněk postrádajících DDI1 a DDI2 (lidské homology kvasinkového Ddi1p), které byly současně vystaveny působení HU, bylo pozorováno hromadění proteinu RTF2 na zastavených replikačních vidličkách. Kumulace RTF2 dále vedla k tvorbě jednovláknové DNA, aktivaci drah signalizujících poškození DNA a nestabilitě chromosomů. Výsledky naznačují, že DDI1 a DDI2 slouží jako klíčové receptory, které rozpoznávají značené RTF2 a zajišťují jeho proteasomální degradaci.

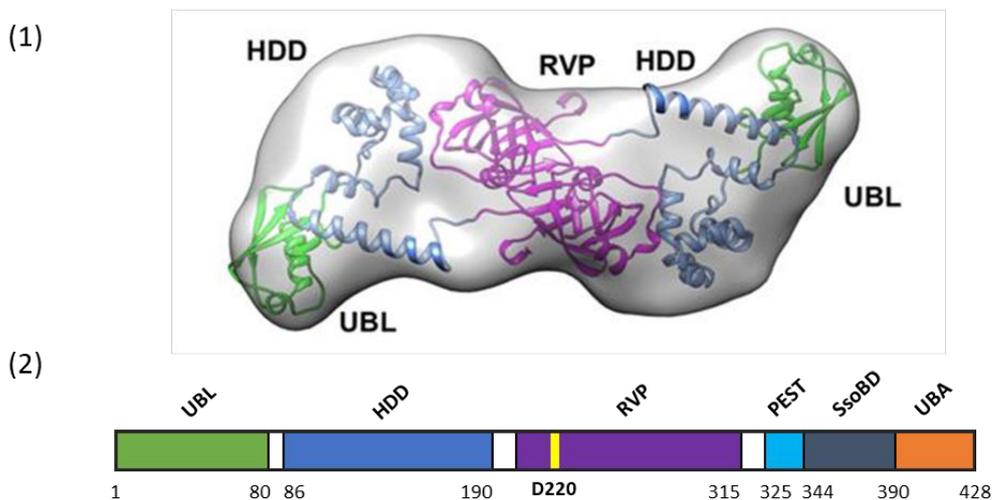
Vedle rozpoznávání substrátů v ubikvitin-proteasomální dráze slouží kvasinkový Ddi1p i jako negativní regulátor proteinové sekrece (Gabriely *et al.* 2008, White *et al.* 2011). Ddi1p interaguje s v-SNARE proteiny Snc1 a Snc2 (Lustgarten & Gerst 1999) i t-SNARE proteinem Sso1p (Gabriely *et al.* 2008). Vazbou Sso1p skrze oblast mezi doménami RVP a UBA brání Ddi1p interakci Sso1p s t-SNARE proteinem Sec9p (Gabriely *et al.* 2008). Je tak pravděpodobné, že negativní regulační funkce Ddi1p spočívá ve vyvazování SNARE proteinů a bránění jejich vzájemné interakci. Před úsekem vázající Sso1p byla dále objevena PEST doména (Gabriely *et al.* 2008), která je známa jako proteolytický signál určující proteiny k rychlé degradaci (Rechsteiner & Rogers 1996).

Nedávná studie (Kama *et al.* 2018) odhaluje, že se Ddi1p společně s komplexem Cdc48-Npl4-Ufd1 podílí na selektivním anterográdním transportu karboxypeptidasy S (Cps1p) do multivesikulárních tělísek a do kvasinkové vakuoly za účelem jeho proteolytické aktivace. Cps1p je vakuolární enzym exprimovaný při nedostatku dusíku, kdy zajišťuje využití některých peptidů jako jediného zdroje dusíku a umožňuje recyklaci aminokyselin pro syntézu proteinů (Spormann *et al.* 1991). Cps1p je syntetizován jako nerozpustný polypeptidový prekurzor, který je v sekreční dráze proteolyticky štěpen na aktivní rozpustnou formu, přičemž neštěpené Cps1p asociují s membránou. Na základě výsledků experimentů autoři předpokládají, že se Ddi1p váže svou UBA doménou na ubikvitinované oligomery Cps1p nacházející se na membráně multivesikulárních tělísek. Ddi1p následně skrze svou UBL doménu váže proteinový komplex Cdc48-Npl4-Ufd1, který zajišťuje rozpuštění oligomerů Cps1p na jednotlivé monomery, čímž je umožněno jejich následné přenesení do intralumenálních vesikulů a vakuoly (Kama *et al.* 2018).

Ačkoliv má kvasinkový Ddi1p RVP doménu retrovirových proteas, jeho proteolytická aktivita byla doposud prokázána pouze nepřímo. Katalytický aspartát D220 je nezbytný pro potlačení mutace *pds1-128* vykazující poruchy růstu (Gabriely *et al.* 2008)

i pro inhibici sekrece proteinů (White *et al.* 2011). Avšak, Ddi1p nevykazoval žádnou proteasovou aktivitu proti knihovně peptidů odvozených z kvasinkového proteomu (Trempe *et al.* 2016). Proteolytická aktivita tak byla doposud pozorována pouze u *Leishmania major*, jenž vykazuje proteolytickou aktivitu při kyselém pH (Perteguer *et al.* 2013) nebo lidského homologu DDI2, který na membráně ER zajišťuje štěpení a aktivaci transkripčního faktoru Nrf1, jenž je dále translokován do jádra kde aktivuje syntézu proteasomálních podjednotek (Koizumi *et al.* 2016). Stejná funkce byla pozorována i u homologu DD11 v *Caenorhabditis elegans* (Lehrbach & Ruvkun 2016).

Trempe a kolegové přichází s hypotézou, že proteolytická aktivita Ddi1p v *S. cerevisiae* může být spuštěna pouze za určitých podmínek, jako je kyselé vesikulární prostředí, nebo je aktivována pouze při interakci s jinými buněčnými komponentami, kdy by mohla hrát roli vazba HDD domény na DNA v oblasti poškození vláken (Trempe *et al.* 2016).



Obr. 6. | Struktura proteinu Ddi1.

- (1) Modelování dat z malouhlového rentgenového rozptylu komplexu UBL-HDD-RVP pomocí struktury UBL (zelené) a HDD (modré) domény (získána nukleární magnetickou rezonancí) a krystalové struktury dimerní RVP domény (fialová). Povrch představuje průměr všech generovaných modelů, tvarovaný na $1,1 \times$ objem částice. Obrázek představuje reprezentativní model souboru. Převzato z (Trempe *et al.* 2016).
- (2) Schématické znázornění uspořádání domén v proteinu Ddi1. (UBL) – doména podobná ubikvitinu; (HDD) – helikální doména Ddi1p; (RVP) – doména podobná retrovirovým proteasam; (D220) – katalytický aspartát D220 v aktivním místě proteinu; (PEST) – PEST doména; (SsoBD) – doména vázající t-SNARE protein Sso1 UBL; (UBA) – doména asociovaná s ubikvitinem

Vzájemný vztah WSS1 a DDI1 v buněčné odpovědi na poškození DNA

Interakce genů *WSS1* a *DDI1* byla poprvé odhalena při SGA (z ang. Synthetic Gene Array) analýze neletálních mutací v kvasinkových buňkách (Costanzo *et al.* 2016), kdy současná delece obou těchto genů způsobovala u kvasinek syntetickou poruchu růstu (výrazné snížení životaschopnosti). Během výzkumu této negativní genetické interakce v laboratoři školitelky bylo objeveno, že fenotyp současné ztráty *WSS1* a *DDI1* je umocněn při působení hydroxymočoviny (Svoboda *et al.* 2019, v recenzním řízení v DNA Repair). Tato sloučenina je známa jako inhibitor činnosti ribonukleotidreduktasy, klíčového enzymu katalyzující přeměnu ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy. Působení hydroxymočoviny tak zapříčiňuje nedostatek dNTP, kvůli čemuž dochází k zastavení syntézy DNA (Koç *et al.* 2004). Současně přítomnost HU způsobuje poškození DNA skrze tvorbu ROS a NOS (Sakano *et al.* 2001). Výsledky výzkumu laboratoře školitelky pak dále prokazují, že pozorovanou přecitlivělost na HU lze zachránit nadprodukcí Ddi1p, avšak jeho funkce je v tomto případě závislá na katalytickém aspartátu D220 nacházející se v RVP doméně a přítomnosti HDD domény (Svoboda *et al.* 2019). Dosavadní všeobecné znalosti o *WSS1/Wss1p* a *DDI1/Ddi1p*, jejich pozorované genetické interakce a podobnost v organizaci domén vedou k hypotéze, že se Ddi1p, stejně jako kvasinkový Wss1p, přímo podílí na buněčné odpovědi na poškození DNA, jež byla indukována genotoxickým působením HU, a to skrze proteolytické zpracování DCP či jiných pevně zachycených proteinů na zastavených replikačních vidličkách.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 MATERIÁL

4.1.1 DNA

- Syntetické oligonukleotidy (syntetizovány firmou Sigma-Aldrich)

Tab. 1. | Seznam použitých oligonukleotidů.

OZNAČENÍ	SEKVENCE (5'-3')
M13 F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13 R	CAG GAA ACA GCT ATG AC
GPDproF	CGG TAG GTA TTG ATT GTA ATT CTG
WSS1F	ATG AAG ACA GAA GGA ATA AAA AGC C
WSS1R	AGT GAG ATC AAT AAC TTC GAT AAG AG
E116Q_F	CAC CAT GCT GCA CCA ATT AAC TCA CAA TTT ATT C
E116Q_R	GAA TAA ATT GTG AGT TAA TTG GTG CAG CAT GGT G
attB1_KOZAK	AA AAA GCA GGC TCA AAA AAT GAA GAC AGA AGG AAT AAA AAG
attB2_STOP	AGA AAG CTG GGT ATT AAG TGA GAT CAA TAA CTT CGA TAA G
attB1_UNIadapter	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT
attB2_UNIadapter	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT
delDBD_F	GTG GAA GTG GTT CAA GAG AGT TGG CGG CTT TTG
delDBD_R	CTT GAA CCA CTT CCA CCG AGA CGT TGA C
delWLM_F	AAG CAG GCT AAA AAA TGT TGT ACG ACA CAT TTT TGG GGA AC
delWLM_R	CAT TTT TTA GCC TGC TTT TTT GTA C
PR_DWN	CAA GAA AGG TGG GTA TTA TGT GTC GTA CAA ACC TCT TTG
mutSHP_F	GCT TTG GCG AAC GCT CAA CGT CTC GGT GGA AG
mutSHP_R	AGC GTT CGC CAA AGC TGT GTC GTA CAA ACC TCT TTG
mutVIM_F	ATC ATC GAA CGG CGG TAT AGA GAT GAT CGC TGG TG
mutVIM_R	CCG CCG TTC GAT GAT AAA AGC CGC CAA CTC TC
mutSIM1_F	GCT GCA GCA GCT GAT GAT GAT GAC GAG GTA CTC C
mutSIM1_R	ATC AGC TGC TGC AGC TTC TAA GGA GCT GCT AAT ATT ATC AC
mutSIM2_F	GCT GCT GCC GCT TAA TAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA G
mutSIM2_R	TTA AGC GGC AGC AGC AAC TTC GAT AAG AGT ATC TCC CG
HA-tag_F	GAT GTT CCA GAT TAC GCT GGA TCC AAG ACA GAA GGA ATA AAA AGC CC
HA-tag_R	GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA CAT TTT TTA GCC TGC TTT TTT GTA

- DNA vektory
 - pCR®-Blunt s klonovaným genem *WSS1* poskytnut od Michala Svobody (laboratoř školitelky). Konstrukt byl připraven firmou GenScript (www.genscript.com).
 - Gateway™ pDONR™221 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, kat. d12536017)

- pAG416GAL-ccdB poskytnut od Susan Lindquist (Addgene plasmid # 14147)
- pAG416GPD-ccdB poskytnut od Susan Lindquist (Addgene plasmid # 14148)
- Standardy molekulových hmotností
 - GelPilot 100 bp Plus ladder (Qiagen, kat. č. 239025)
 - GelPilot 1 kb ladder (Qiagen, kat. č. 239085)
 - GelPilot 1 kb Plus ladder (Qiagen, kat. č. 239095)

4.1.2 Enzymy

- T5 exonukleasa (New England Biolabs, kat. č. M0363S)
- Taq DNA ligasa (New England Biolab, kat. č. M02082S)
- Pfu DNA polymerasa (Promega, kat. č. M7748)
- Dpn I endonukleasa (New England BioLabs, kat. č. R0176S)
- Phusion® High-Fidelity DNA polymerasa (New England BioLabs, kat. č. M0530L)
- PPP Master Mix – Taq polymerasa (Top-Bio, kat. č. P125)
- Gateway™ LR Clonase™ II enzymová směs (Invitrogen, kat. č. 11791020)
- Gateway™ BP Clonase™ II enzymová směs (Invitrogen, kat. č. 11799020)

4.1.3 Protilátky

- HA-Tag (C29F4) králičí monoklonální protilátka (Cell Signaling technology®, kat. č. 3724)
- IRDye® 800CW kozí polyklonální anti-králičí IgG (LI-COR, kat. č. 926-32211)
- PGK protilátka (Novex, kat. č. 459250)
- IRDye® 680RD kozí polyklonální anti-myší IgG (LI-COR, kat. č. 926-68070)

4.1.4 Roztoky a pufr

- CutSmart™ pufr (New England Biolabs, kat. č. B7204S)
- Pfu 10X reakční pufr w/20mM MgSO₄ (Promega, kat. č. M776A)
- Phusion® HF reakční pufr (New England Biolabs, kat. č. B0518S)
- Phusion® GC reakční pufr (New England Biolabs, kat. č. B0519S)

4.1.5 Komerční soupravy

- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, kat. č. 28706)
- ZYPHY™ plasmid miniprep kit (Zymo research, kat. č. D4020)

4.1.6 Chemikálie pro přípravu médií

- YPD bujón pro mikrobiologii (Sigma-Aldrich, kat. č. Y1375-1KG)
- YPD agar (Sigma-Aldrich, kat. č. Y1500-1KG)
- Bakteriologický agar (Sigma-Aldrich, kat. č. A5306-250G)
- Kvasničná dusíkatá báze bez aminokyselin (Sigma-Aldrich, kat. č. Y0626-250G)
- Hydroxymočovina (Sigma-Aldrich, kat. č. H8627)
- Ampicilin (Sigma-Aldrich, kat. č. A1000000)
- Kanamycin sulfát (Sigma-Aldrich, kat. č. K1377)
- L-Arginin, L-Asparagová kyselina, L-Glutamová kyselina, L-Lysin, L-Fenylalanin, L-Serin, L-Threonin, L-Tyrosin, L-Valin, Adenin, L-Leucin, L-Methionin, L-Tryptofan, Uracil (Sigma-Aldrich)

4.1.7 Ostatní činidla a chemikálie

- Mili-Q H₂O [připravena pomocí přístroje Milli-Q® Integral Water Purification System for Ultrapure Water by Merck (Millipore) a autoklávována]
- Barva nukleových kyselin GelRed®, (Biotium, kat. č. 41003)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, kat. č. A3553)
- Peroxodisíran amonný (APS) (Sigma-Aldrich, kat. č. A3678)
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) (Sigma-Aldrich, kat. č. T9281)
- Agarosa pro agarosovou elektroforézu (Serva, kat. č. 11404.05)
- 100% Dimethylsulfoxid (New England Biolabs, kat. č. B0515A)
- Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, kat. č. D0632-100G)
- Polyethylen-glykol 3350 (Affymetrix, kat. č. P4338-500G)
- Sada sodných solí dNTP (Sigma-Aldrich, kat. č. 11969064001)
- Sacharosa (Penta, kat. č. 24970-31000)
- Bromfenolová modř (Serva, kat. č. 15375.01)
- DNA z lososích varlat (Sigma-Aldrich, kat. č. D1626)
- Octan lithný dihydrát (Sigma-Aldrich, kat. č. L4158-250G)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Lach-Ner, kat. č. 30061-CP0)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, kat. č. 30016-CP0)
- Chlorid sodný (Penta, kat. č. 16590-00000)
- Chlorid draselný (Lach-Ner, kat. č. 30076-CP0)

4.1.8 Bakteriální a kvasinkové kultury

- Chemicky kompetentní *Escherichia coli* One Shot™ TOP10 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, kat. č. C404010)

- Kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* pro komplementační experimenty z laboratoře Charlese Boona (Boone Lab, Donnelly Centre, University of Toronto)

Tab. 2. | Seznam použitých kmenů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

OZNAČENÍ	GENOTYP
Řada a - kmeny s alelou párovacího lokusu MATa	
[a] <i>Δddi1</i>	<i>MATa, his3-Δ1 leu2-Δ0 ura3-Δ0 met15-Δ0 ddi1::KAN</i>
[a] <i>Δwss1</i>	<i>MATa, his3-Δ1 leu2-Δ0 ura3-Δ0 met15-Δ0 wss1::KAN</i>
[a] WT	<i>MATa, his3-Δ1 leu2-Δ0 ura3-Δ0 met15-Δ0 ura3Δ::KAN</i>
Řada α - kmeny s alelou párovacího lokusu MATα	
[α] <i>Δddi1</i>	<i>MATα, can1-Δ0::STE2pr-Sp_HIS5 lys1-Δ0 his3-Δ1 leu2-Δ0 ura3-Δ0 met15-Δ0 LYS2 ddi1::NAT</i>
[α] <i>Δwss1</i>	<i>MATα, can1-Δ0::STE2pr-Sp_HIS5 lys1-Δ0 his3-Δ1 leu2-Δ0 ura3-Δ0 met15-Δ0 LYS2 wss1::NAT</i>
[α] WT	<i>MATα, can1-Δ0::STE2pr-Sp_HIS5 lys1-Δ0 his3-Δ1 leu2-Δ0 ura3-Δ0 met15-Δ0 LYS2 his3Δ::NAT</i>
Křížené kmeny	
<i>Δddi1Δwss1</i>	<i>MATα/MATa can1Δ0::STE2pr-Sp_HIS5 lys1-Δ0/lys1-Δ0 his3-Δ1/his3-Δ1 leu2-Δ0/leu2-Δ0 ura3-Δ0/ura3-Δ0 met15-Δ0/met15-Δ0 LYS2 ddi1::KAN wss1::NAT</i>
<i>Δwss1Δddi1</i>	<i>MATα/MATa can1Δ0::STE2pr-Sp_HIS5 lys1-Δ0/lys1-Δ0 his3-Δ1/his3-Δ1 leu2-Δ0/leu2-Δ0 ura3-Δ0/ura3-Δ0 met15-Δ0/met15-Δ0 LYS2 wss1::KAN ddi1::NAT</i>

4.2 METODY

4.2.1 Příprava pufrů a gelů

- Tris-EDTA pufr (pH 8): 10 mM Tris; 1 mM EDTA
- TAE pufr (pH 8): 5,71 % (v/v) 99% CH₃COOH; 10 % (v/v) 0,5M EDTA, 24,2 % (w/v) Tris-HCl; ddH₂O
- PBS pufr (pH 7.4): 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, ddH₂O
- Vzorkový pufr pro agarosové gely: 10 % (w/v) sacharóza; 0.1 % (w/v) bromfenolová modř; ddH₂O
- Vzorkový pufr pro polyakrylamidové gely: 0,06 M Tris-HCl (pH 6,8); 4 % (v/v) β-merkaptóetanol; 5 % (v/v) glycerol; 2 % (w/v) SDS; 0,0025 % (w/v) bromfenolová modř
- Elektrodový pufr (pH 6,8): 25 mM Tris; 250 mM glycin; 0,1 % (v/v) SDS
- Přenosový pufr: 192 mM glycin; 25 mM Tris/HCl; 10 % (v/v) metanol, ddH₂O

- PBS/Tween pufr: 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4); 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, 0,05 % Tween
- 0,8% agarosový gel: 0,8 % (w/v) agarosa; 99,2 % (v/v) TAE pufr; barvivo GelRed® o ředění 1:15 000
- 1% agarosový gel: 1 % (w/v) agarosa; 99 % (v/v) TAE pufr; barvivo GelRed® o ředění 1:15 000
- 7% zaostřovací gel: 25 % (v/v) 1,5M Tris (pH 8,8); 40 % (v/v) 44% akrylamid; 0,1 % (v/v) 10% SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,01 % (v/v) TEMED, ddH₂O
- 16% rozdělovací gel: 25 % (v/v) 1,5M Tris (pH 8,8); 40 % (v/v) 44% akrylamid; 0,1 % (v/v) 10% SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,01 % (v/v) TEMED, ddH₂O

4.2.2 Příprava médií

- LB médium: 1 % (w/v) trypton; 0,5 % (w/v) kvasnicový extrakt; 1 % (w/v) NaC, ddH₂O
- YPD médium: 5 % (w/v) YPD bujón pro mikrobiologii, ddH₂O
- YPD agar: 6,5 % (w/v) YPD agar, ddH₂O
- Standardní minimální médium bez Uracilu (SC URA-):

Kvasničná dusíkatá báze bez aminokyselin	0,67 % (w/v)
H ₂ O	86,5 % (v/v)
Bakteriologický agar *	1,5 % (w/v)

Směs autoklávována a ochlazená na teplotu <70 °C	
20 % glukóza	10 % (v/v)
Směs aminokyselin **	1,00 % (v/v)
Adenin (NaOH) **	4×10 ⁻³ % (w/v)
L-Histidin **	2×10 ⁻³ % (w/v)
L-Leucin **	6×10 ⁻³ % (w/v)
L-Methionin **	2×10 ⁻³ % (w/v)
L-Tryptofan **	4×10 ⁻³ % (w/v)

* při přípravě pevného média, při přípravě tekutého média nahrazeno ddH₂O

** sterilizováno filtrací (0,2 μm filtr)

(NaOH) pomocí NaOH upraveno na pH ≈ 10

Směs aminokyselin (w/v):

L-Arginin (0,2 %), L-Asparagová kyselina (1 %), L-Glutamová kyselina (1 %), L-Lysin (0,3 %), L-Fenylalanin (0,5 %), L-Serin (4 %), L-Threonin (2 %), L-Tyrosin (0,3 %), L-Valin (1,5 %)

4.2.3 Příprava genu *wss1^{E116Q}* kódující katalyticky neaktivní variantu Wss1p

Pro přípravu katalyticky neaktivní varianty Wss1p byla, na základě článku (Stingele *et al.* 2014) do genu *WSS1* vnesena bodová mutace způsobující záměnu negativně nabitého glutamátu (E116) v aktivním místě enzymu za neutrální glutamin (Q).

Mutace byla vytvořena metodou QuikChange® Site-Directed Mutagenesis podle protokolu pro soupravu QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies). Nejprve byla provedena PCR amplifikace vektoru pCR™-Blunt s genem *WSS1* pomocí oligonukleotidových primerů E116Q_F a E116Q_R obsahující požadovanou mutaci v termocyklu Biometra TRIO 46 (Analytik Jena). Složení reakčních směsí a podmínky reakce jsou uvedeny v tab. 3 a 4. Produkty reakce byly dále inkubovány 1 h při 37 °C s endonukleasou Dpn I štěpící templátovou metylovanou DNA. Výsledné produkty byly následně analyzovány pomocí agarosové elektroforézy.

Tab. 3. | Složení směsí pro QuikChange Site-Directed Mutagenesis PCR

	VZOREK	KONTROLA
10× Pfu reakční pufr	5 µl	5 µl
Templátová DNA (20 ng/µl)	1 µl	1 µl
E116Q_F (20 mM)	1,25 µl	1,25 µl
E116Q_R (20 mM)	1,25 µl	1,25 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl	1 µl
Mili-Q H ₂ O	31 µl	32 µl
Pfu polymerasa	1 µl	-

Tab. 4. | Reakční podmínky QuikChange Site-Directed Mutagenesis PCR

	TEPLOTA	ČAS	
1.	95 °C	30 s	18 cyklů
2.	95 °C	30 s	
3.	55 °C	1 min	
4.	68 °C	2 min	
5.	68 °C	5 min	

4.2.4 Agarosová elektroforéza PCR produktů

Produkty PCR reakcí byly analyzovány pomocí horizontální agarosové elektroforézy. Připravený 0,8% agarosový gel byl nalit do aparatury Owl™ EasyCast™ B1A Mini Gel Electrophoresis Systems (Thermo Scientific™). Po zatuhnutí gelu byly reakční směsi po PCR smíchány s vzorkovým pufrům pro agarosové gely (v poměru 5:1) a naneseny do jamek. Jako standard molekulových hmotností byl použit 1 kbp ladder (Gel

Pilot). Po zapojení zdroje napětí EV242 (Consort) probíhala elektroforéza po dobu 30 min při 130 V. Následně byl gel vyfocen pod UV zářením pomocí fotoaparátu Quantum ST4.

4.2.5 Transformace bakterií

Produkty reakcí byly transformovány teplotním šokem do bakterií *E. coli* One Shot™ TOP10. Suspenze buněk, skladované při -20 °C, byly nejprve rozmrazeny na ledě. Následně bylo k 50 µl suspenze přidáno 5 µl DNA. Směsi byly inkubovány 25 min na ledě, 30 s při 42 °C v zahřívacím boxu Thermocell Mixing Block MB10 (BIOER Technology) a 2 min na ledě. Dále byly směsi obohaceny o 250 µl LB média, třepány 1 h při 37 °C (New Brunswick™ Inova® 44, Eppendorf) a vysety na agarové misky s příslušným selekčním antibiotikem. Po výsevu byly misky inkubovány dnem vzhůru přes noc při 37 °C v inkubátoru IPP 400 (Mettler).

4.2.6 PCR bakteriálních kolonií

V některých případech bylo pro ověření přítomnosti a stavu klonovaných vektorů v transformovaných buňkách provedeno PCR narostlých bakteriálních kolonií. Z agarové misky bylo vybráno 7 kolonií, které byly odděleně resuspendovány v 10 µl Mili-Q H₂O. Z každé buněčné suspenze byl poté zaočkován 1 µl do 7 ml LB média s příslušným antibiotikem. Výchozí suspenze byly povařeny 1 min v mikrovlnné troubě nastavené na maximální výkon, načež z nich byl odebrán 1 µl, jenž byl smíchán s 9 µl předpřipravené směsi pro PCR kolonií (složení směsi rozepsáno v tab. 5). Takto připravené vzorky byly následně podrobeny PCR v termocykleru Biometra TRIO 46 (Analytik Jena) podle podmínek uvedených v tab. 5. Produkty reakcí byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy (viz kap. 4.2.4; 1% agarosový gel; standard molekulových hmotností 100 bp plus ladder [Gel Pilot], nastavení zdroje: 120 V po dobu 45 min). Na základě výsledků elektroforézy byly vybrány suspenze transformovaných buněk pro minipreparaci plasmidů.

Tab. 5. | PCR bakteriálních kolonií: složení výchozí směsi a podmínky reakce.

	TEPLOTA	ČAS		SLOŽENÍ VÝCHOZÍ SMĚSI	
1.	94 °C	5 m	18 cyklů	Wss1_F (10 mM)	3 µl
2.	94 °C	15 s		M13_R (10 mM)	3 µl
3.	55 °C	15 s		PPP Master Mix	45 µl
4.	72 °C	1 m 30 s		Mili-Q H ₂ O	27 µl
5.	68 °C	5 m			

4.2.7 Minipreparace plasmidů

Tři čerstvě narostlé kolonie z každé transformační reakce byly pomocí sterilních pipetových špiček přeneseny z agarové misky a samostatně resuspendovány v 7 ml LB média s příslušným selekčním antibiotikem. Takto připravené kultury byly třepány rychlostí 220 ot./min při teplotě 37 °C přes noc (New Brunswick™ Inova® 44, Eppendorf). Následující den byly kultury centrifugovány (5 000 g, 10 min, 10 °C; Alegria®X-15R, Beckman Coulter). Po odstranění supernatantu byly buňky samostatně resuspendovány v 550 µl Mili-Q H₂O. Plasmidová DNA byla z buněk získána pomocí sady ZYPPEY™ plasmid miniprep kit (Zymoresearch) podle protokolu výrobce. Z buněčných suspenzí bylo odebráno 600 µl vzorku do čistých 1,5 ml centrifugačních mikrozkuvek. Následně bylo do každé mikrozkuvky přidáno 100 µl lyzačního pufru. Po 2 min inkubace při 25 °C byly roztoky neutralizovány přidáním 300 µl ledového neutralizačního pufru a řádným promícháním. Vzorky byly centrifugovány (10 min, 13 000 g; 5424 R Eppendorf). Supernatant byl přenesen do kolonek Zymo-Spin INN+, které byly umístěny v 1,5 ml plastových mikrozkuvkách. Po centrifugaci (15 s, 13 000 g) bylo na membránu kolonek přidáno 200 µl Endo-Wash pufru a centrifugováno (30 s, 13 000 g). Následně bylo na membránu přidáno 400 µl Zyppey-Wash pufru a centrifugováno (1 min, 13 000 g). Kolonky byly přesunuty do nových centrifugačních mikrozkuvek, načež bylo pro uvolnění DNA přidáno na střed každé membrány 30 µl Mili-Q H₂O. Po 2min inkubaci při pokojové teplotě byly kolonky centrifugovány. Koncentrace izolované DNA byla měřena pomocí přístroje NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific). Vzorky DNA se sekvenčními oligonukleotidovými primery M13_F a M13_R byly následně odeslány na sekvenaci firmě GATC Biotech (<http://gatc-biotech.com/>). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu ApE - A plasmid Editor (v. 2.0.49.0; <http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/apE>)

4.2.8 Klonování DNA konstruktů pro komplementační experimenty technologií

GATEWAY®

Pro přípravu plasmidových konstruktů pro komplementační experimenty byla použita klonovací technologie Gateway® využívající rekombinační reakce mezi specifickými sekvencemi *att* pro orientované vkládání zkoumaných genů do transkripčně neaktivních dárcovských vektorů, ze kterých mohou být zkoumané geny dále libovolně rekombinačně přenášeny do různých cílových vektorů obsahujících sekvence zajišťující expresi genů v požadovaném cílovém organismu.

Klonování rekombinačních sekvencí attB

Na 5' a 3' konce genů *WSS1* a *wss1*^{E116Q} byly přidány rekombinační sekvence *attB1* a *attB2* umožňující místně specifickou rekombinaci do dárcovského vektoru pDONR221™

nesoucí sekvence attP1 a attP2. V prvním kroku byla provedena PCR amplifikace genů *WSS1* a *wss1^{E116Q}* pomocí genově specifických primerů attB1_KOZAK a attB2_STOP obsahující 12-ti nukleotidovou část *attB* sekvence. Produkty reakcí byly poté amplifikovány pomocí univerzálních adaptérových primerů atttB1_UNIadapter a atttB2_UNIadapter. Oba páry primerů byly navrženy podle protokolu pro dvou-krokové GATEWAY® PCR

(https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/cloning_methods/gateway/2step/).

Jednotlivé kroky byly provedeny v přístroji Biometra TRIO 46 (Analytik Jena) podle podmínek uvedených v tab. 6. Produkty PCR byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy (viz kapitola 4.2.4) (1% agarosový gel; standard molekulových hmotností 100 bp plus ladder [Gel Pilot], nastavení zdroje: 120 V po dobu 45 min.)

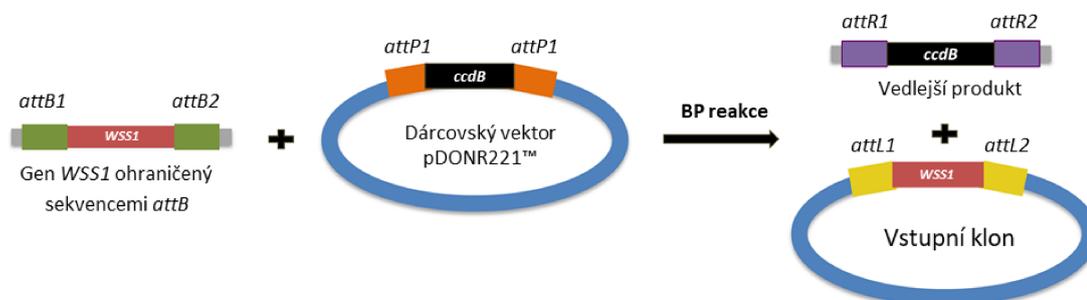
Tab. 6. | Gateway® PCR: Složení reakčních směsí a podmínky reakcí.

KROK 1					
	Teplota	Čas		Složení reakční směsi	
1.	95 °C	2 m	18 cyklů	Pfu reakční pufr (10 mM)	5 µl
2.	95 °C	30 s		Templátová DNA (20 ng)	1 µl
3.	58 °C	1 m		attB1_KOZAK (20 mM)	1 µl
4.	68 °C	2 m		attB2_STOP (20 mM)	1 µl
5.	68 °C	5 m		dNTP mix (10 mM)	1,25 µl
				Mili-Q H ₂ O	40,75 µl
				Pfu polymerasa	1 µl
KROK 2					
	Teplota	Čas		Složení reakční směsi	
1.	95 °C	2 m	7 cyklů	Pfu reakční pufr (10 mM)	5 µl
2.	94 °C	30 s		PCR produkt kroku č. 1	1 µl
3.	45 °C	30 s		atttB1_UNIadapter (20 mM)	1 µl
4.	68 °C	2 m	5 cyklů	atttB2_UNIadapter (20 mM)	1 µl
5.	94 °C	45 s		dNTP mix (10 mM)	1,25 µl
6.	55 °C	30 s		Mili-Q H ₂ O	40,75 µl
7.	68 °C	2 m		Pfu polymerasa	1 µl
8.	68 °C	5 m			

Produkty 2. kroku GATEWAY® PCR byly po analýze přečištěny pomocí komerční soupravy QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). K produktům bylo přidáno 150 µl QG pufru a 50 µl isopropanolu. Směsi byly poté důsledně promíchány, přeneseny do QIAquick® spin kolonek a centrifugovány (Centrifuga 5415 R, Eppendorf; 1 min, 13 000 g, 25 °C) dále byly vzorky zpracovány stejným způsobem, jako je uveden v kapitole 4.2.9.

Rekombinační příprava vstupních klonů – BP reakce

Geny *WSS1* a *wss1^{E116Q}* ohraničené *attB* sekvencemi byly přeneseny do dárcovského vektorů pDONR221™ pomocí směsi enzymů Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen™) (viz obr. 7). Postupováno bylo podle protokolu výrobce. Složení reakčních směsí je uvedeno v tab. 7.



Obr. 7. | Schématické znázornění Gateway® BP reakce: BP reakce proběhla mezi sekvencemi *attB* ohraničující geny *WSS1* a *wss1^{E116Q}* a *attP* místy v dárcovském vektoru pDONR221™, jež postrádá sekvenční sekvence pro transkripci vložených genů, kóduje rezistenci na Kanamycin (pozitivní kontrola) a obsahuje sekvenci kódující pro *E. coli* toxický *ccdB* protein, která je při správné rekombinační reakci vyměněna za požadovaný gen (negativní kontrola). Rekombinační reakce byla katalyzována enzymatickou směsí Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix, při níž vznikly vstupní klony obsahující požadovaný gen ohraničený sekvencemi *attL*. Upraveno podle (Soriano 2017).

Tab. 7. | Gateway® BP reakce: Složení reakčních směsí. Hvězdičkou jsou označeny složky směsi, které byly ředěny na požadovanou koncentraci pomocí TE pufru.

	WT	E116Q	KONTROLA
<i>WSS1</i> (37 ng/μl) *	1 μl	-	-
<i>wss1^{E116Q}</i> (37 ng/μl) *	-	1 μl	-
pDONR221™ (37 ng/μl) *	1 μl	1 μl	1 μl
Gateway® BP Clonase™ II Mix	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl
TE pufr	-	-	1 μl
Roztok proteiny K (4X ředěný) *	1 μl	1 μl	1 μl

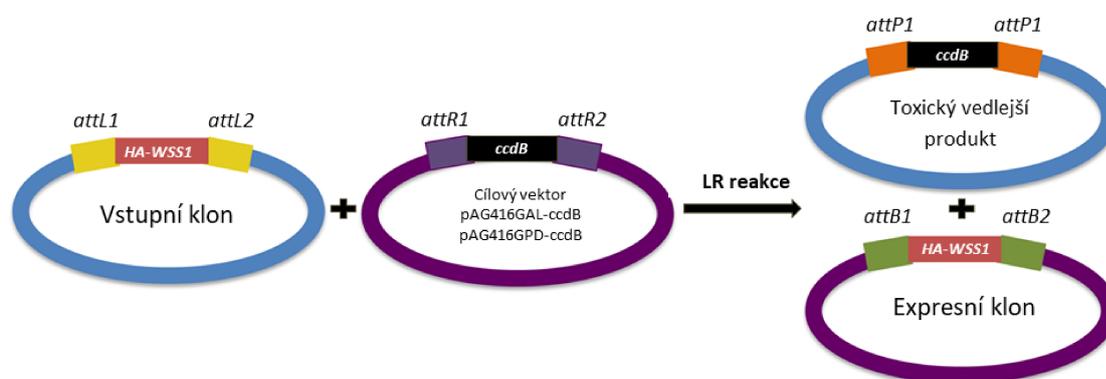
Produkty reakce byly transformovány do bakterií *E. coli* One Shot™ TOP10 stejným způsobem, jako je uveden v kapitole 4.2.5., načež byla provedena PCR narostlých kolonií (viz 4.2.6) a minipreparace plasmidů (viz 4.2.7). Při sekvenaci byly použity oligonukleotidové primery M13_F a M13_R. Výsledné produkty byly ověřeny sekvenací u firmy GATC (<http://gatc-biotech.com/>) a následně vyhodnoceny pomocí programu Ape - A plasmid Editor (v. 2.0.49.0; <http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape>)

Tab. 8. | PCR bakteriálních kolonií: Podmínky PCR reakce.

	TEPLOTA	ČAS	
1.	94 °C	5 m	18 cyklů
2.	94 °C	15 s	
3.	55 °C	15 s	
4.	72 °C	1 m 30 s	
5.	68 °C	5 m	

Rekombinační příprava expresních vektorů – LR reakce

Připravené geny ve vstupních klonech pDONR221™ byly přeneseny místně specifickou rekombinací do cílových vektorů pAG416GAL-ccdB (indukční GalI promotor) a pAG416GPD-ccdB (konstitutivní GAP promotor) pomocí směsi enzymů Invitrogen™ Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme Mix (viz obr. 8). Postupováno bylo podle protokolu výrobce. Složení reakčních směsí uvedeno v tab. 9.



Obr. 8. | Schématické znázornění Gateway® LR reakce: LR reakce proběhla mezi sekvencemi *attL* ohraničující připravené geny ve vstupních klonech a *attR* místy v cílových vektorech pAG416GAL-ccdB (indukční GalI promotor) a pAG416GPD-ccdB. Oba tyto cílové vektory obsahují sekvence nezbytné pro transkripci vložených genů v kvasinkových buňkách, rezistenci na ampicilin (pozitivní kontrola) a sekvenci kódující toxický ccdB protein (negativní kontrola). Rekombinační reakce byla katalyzována směsí enzymů Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix, při níž vznikly finální expresní klony obsahující požadovaný gen ohraničený sekvencemi *attB* a toxické vedlejší produkty s *ccdB*. Upraveno podle (Soriano 2017).

Tab. 9. | Gateway® LR reakce: Hvězdičkou jsou označeny složky směsi, které byly ředěny na požadovanou koncentraci pomocí TE pufru.

SLOŽENÍ REAKČNÍCH SMĚSÍ	
Vstupní klon (38 ng/μl) *	1 μl
Destinační vektor (38 ng/μl) *	1 μl
Gateway® LR Clonase™ II Mix	0,5 μl
Roztok proteinasy K (4X ředěný) *	1 μl

Produkty LR reakce byly dále transformovány teplotním šokem do bakterií *E. coli* One Shot™ TOP10 (viz 4.2.5). Transformované buňky byly vysety na agarové misky s Ampicilinem (100 µg/ul) a inkubovány přes noc ve 37 °C (inkubátor IPP 400, Memmert). Buňky transformované expresními klony s geny *WSS1* a *wss1^{E116Q}* byly před minipreparací ověřeny PCR kolonií (viz 4.2.6) Podmínky PCR reakce jsou uvedeny v tab. 10.

Tab. 10. | PCR kolonií 2: Podmínky PCR reakce.

	Teplota	Čas	
1.	94 °C	5 m	30 cyklů
2.	94 °C	15 s	
3.	55 °C	15 s	
4.	72 °C	1 m 30 s	
5.	72 °C	7 m	
6.	10 °C	∞	

Expresní klony byly z buněk izolovány minipreparací (viz 4.2.7), při které byly buňky zaočkovány do 7 ml LB média s ampicilinem (100 µg/ml). Pro sekvenační reakce byly použity primery M13 F a GPDproF (vektory pAG416GPD-ccdB) nebo GAL F (vektory pAG416GAL-ccdB). Výsledné produkty byly ověřeny sekvenací u firmy GATC (<http://gatc-biotech.com/>) a následně vyhodnoceny pomocí programu ApE - A plasmid Editor (v. 2.0.49.0; <http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape>).

4.2.9 Izolace DNA z agarosového gelu

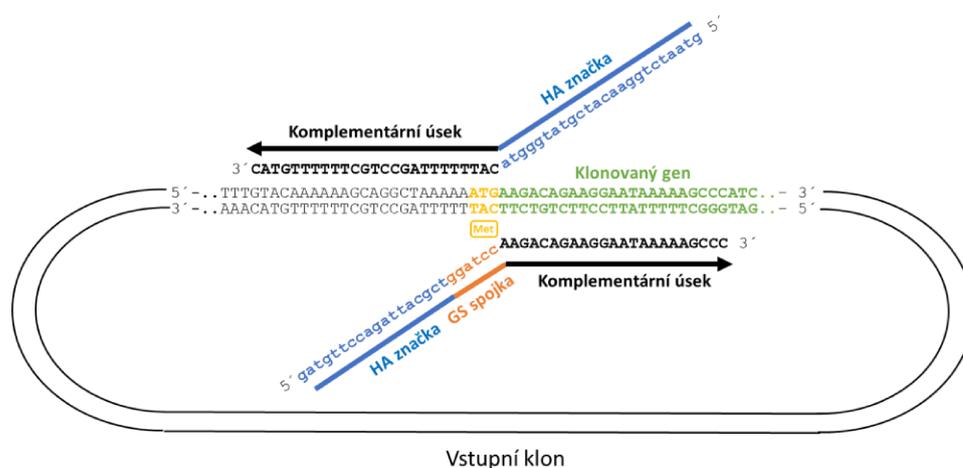
Požadované produkty PCR byly v agarosovém gelu nalezeny pod UV lampou podle polohy odpovídající dané molekulové hmotnosti. Sterilní žiletkou byla vyříznuta část gelu s požadovanou DNA a přenesena do zvážené mikrocentrifugační zkumavky. Po zvážení gelu byla DNA izolována pomocí sady QIAquick Gel Extraction Kit podle přiloženého protokolu výrobce. Do mikrocentrifugačních zkumavek byl přidán přehřátý (na 50 °C) QG pufr o objemu rovnající se trojnásobku hmotnosti přítomného gelu. Zkumavky byly inkubovány 3 min při 56 °C (Thermocell Mixing Block MB102, BIOER Technology). Po rozpuštění obsahu bylo do zkumavek přidáno 250 µl isopropanolu. Směsi byly poté přeneseny do separačních kolonek v nových mikrocentrifugačních zkumavkách a centrifugovány (centrifuga 5415 R, Eppendorf; 13 000 g, 1 min, 25 °C). Po odstranění eluátu bylo na kolonky přidáno 750 µl PE pufru. Po 5 min inkubaci, opětovné centrifugaci (centrifuga 5415 R, Eppendorf; 13 000 g, 1 min, 25 °C) a odstranění eluátu byly kolonky přeneseny do nových mikrocentrifugačních zkumavek a do každé bylo přidáno 30 µl Mili-Q H₂O přehřáté na 37 °C. Zkumavky byly inkubovány 5 min a následně centrifugovány (centrifuga 5415 R, Eppendorf; 13 000 g, 1 min, 25 °C). Eluát byl následně znovu nanesen na kolonku, inkubován 5 min a opětovně centrifugován. Izolovaná DNA byla analyzována

pomocí agarosové elektroforézy (0,8% agarosový gel, GelRed®, TAE pufr, 100V/60 min, Gel Pilot 1 kbp ladder plus). Koncentrace izolované DNA byla měřena pomocí přístroje NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific).

4.2.10 Úpravy vstupních klonů technologií Gibson Assembly®

Klonování N-koncové afinitní HA značky

Na N- konec genů *WSS1* a *wss1^{E116Q}* ve vektoru pDONR221™ byla klonována HA afinitní značka umožňující detekovat následnou expresi proteinů pomocí Western-blot analýzy. Klonování bylo realizováno metodu Gibson assembly® (Gibson *et al.* 2009). Nejprve byla provedena PCR amplifikace vstupních klonů pomocí primerů HA-tag_F a HA-tag_R, jejichž struktura je znázorněna na obr. 9:



Obr. 9. | Struktura primerů HA-tag_F a HA-tag_R. Struktura obou primerů byla tvořena ze 2 částí: 1) 3' komplementárním úsekem nasedajícím v oblasti začátku genu *WSS1* (nebo *wss1^{E116Q}*); 2) 5' přesahem z navzájem se vázajících částí sekvence pro HA- afinitní značku. U HA-tag_F byl přesah doplněn ještě o sekvenci pro pružnou GS- spojku.

Amplifikační reakce byla provedena v gradientovém termocykleru T-gradient (Biometra®). Složení reakčních směsí a podmínky PCR jsou uvedeny v tab. 11:

Tab. 11. | Gibson Assembly PCR – HA tag, 1: Složení reakčních směsí a podmínky amplifikačních reakcí. Teploty T_m byly nastaveny v rozmezí od 60,1 do 65 °C (*).

TEPLOTA	ČAS		SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI	
1.	98 °C	30 s	Phusion® HF reakční pufr	4 µl
2.	98 °C	10 s	Templátová DNA (50 ng/µl)	1 µl
3.	60,1-65 °C	30 s	HA-tag_F (10 mM)	1 µl
4.	72 °C	1 m 45 s		
5.	72 °C	10 m	NTP mix (10 mM)	0,4 µl
6.	4 °C	∞	Mili-Q H ₂ O	11,8 µl
			DMSO	0,6 µl
			Phusion® High-Fidelity DNA polymerasa	0,2 µl

Produkty PCR byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy (viz 4.2.4) (standard molekulových hmotností 1 kbp ladder, Gel Pilot; nastavení zdroje: 100 V po dobu 40 min). Vzorčky, které byly amplifikovány při $T_m = 64,5$ °C a 65 °C byly dále použity jako templátová DNA do 2. PCR, která probíhala za stejných podmínek s $T_m = 64,5$ °C a 65 °C. Produkty reakcí, s různou T_m , byly smíchány, analyzovány pomocí agarosové elektroforézy (viz 4.2.4) (nastavení zdroje 100V/60 min; standard molekulových hmotností 1 kbp ladder, Gel Pilot) a následně izolovány z gelu (viz 4.2.9). Izolované produkty byly, z důvodu nízkých naměřených koncentrací, dále zkontrolovány pomocí agarosové elektroforézy (viz 4.2.4) (nastavení zdroje: 100 V po dobu 45 min; standard molekulových hmotností 1 kbp ladder, Gel Pilot). Po ověření byly izolované produkty ošetřeny endonukleázou DpnI, načež bylo vždy 5 μ l produktu smícháno s 15 μ l předpřipravené směsi Gibson Assembly Master Mix, jejíž složení je uvedeno v tab. 12. Takto připravené reakční směsi byly inkubovány 15 min při 50 °C, přeneseny na led a naředěny 15 μ l Mili-Q H₂O. Následně bylo 5 μ l produktu každé reakce transformováno do bakterií *E. coli* One Shot™ TOP10 (viz 4.2.5). Upravené vektory byly z buněk izolovány minipreparací (viz 4.2.7). Výsledné produkty byly ověřeny sekvenací u firmy GATC (<http://gatc-biotech.com/>) a následně vyhodnoceny pomocí programu ApE - A plasmid Editor (v. 2.0.49.0; <http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape>).

Tab. 12. | Gibson Assembly Master Mix. Výchozí směs připravena podle (Gibson *et al.* 2009). Izotermální reakční pufr byl připraven Jakubem Staníčkem (UOChB).

SLOŽENÍ VÝCHOZÍ SMĚSI	
5× izotermální reakční pufr	320 μ l
T5 exonukleasa	20 μ l
Taq ligasa	160 μ l
Mili-Q H ₂ O	700 μ l

Mutace a delece interakčních domén

Pro objasnění, zda jsou jednotlivé interakční domény důležité pro funkci Wss1p *in vivo*, byly připraveny konstrukty nesoucí různé varianty HA- označených genů *WSS1* a *wss1^{E116Q}* se specificky inaktivovanými či deletovanými interakčními motivy SHP, VIM, SIM1, SIM2, WLM, DBD, popřípadě jejich kombinacemi. Nahrazení klíčových aminokyselin v příslušných motivech i delece celých motivů byly provedeny metodou Gibson Assembly® pomocí primerů uvedených v tabulce č. 13.:

Tab. 13. | Primery pro mutaci a delecí interakčních domén. (*WSS1*) – sekvence příslušného interakčního motivu *WSS1* v orientaci 5'-3' s oranžově zvýrazněnými klíčovými aminokyselinami; sekvence primerů s označením „F“ uvedena v orientaci 5'-3'; sekvence primerů s označením „R“ uvedena v orientaci 3'-5'; modré zvýraznění – vzájemně se párující úseky dvojice primerů; červené zvýraznění – mutagenní páry bází a výsledné změny v cílové sekvenci. Sekvence primerů pro inaktivaci domén SHP, VIM, SIM1, SIM2 byly vytvořeny na základě článku (Stingle *et al.* 2014).

PRIMERY		SEKVENCE
mutace SHP	<i>WSS1</i>	F L G N G Q R L G TTT TTG GGG AAC GGT CAA CGT CTC GGT
	mutSHP_F	A A A gcT TTG GcG AAC GcT CAA CGT CTC GGT GGAAG
	mutSHP_R	GTTTCTCCAACATGCTGTGT cgA AAC CgC TTG CgA
mutace VIM	<i>WSS1</i>	R E L A A F A A E R R AGA GAG TTG GCG GCT TTT GCT GCC GAA AGG AGA
	mutVIM_F	L L R atc atc GAA cGg cGg TATAGAGATGATCGCTGGTG
	mutVIM_R	CT CTC AAC CGC CGA AAA tag tag CTT gCc gCc
mutace SIM1	<i>WSS1</i>	V V I L D D D D GTT GTA ATC CTT GAT GAT GAT GAC
	mutSIM1_F	A A A A GcT GcA gca gcT GAT GAT GAT GAC GAGGTACTCC
	mutSIM1_R	CCACTATTATAATCGTCGAGGAATCTT CgA CgT cgt cgA CTA
mutace SIM2	<i>WSS1</i>	I D L T ATT GAT CTC ACT
	mutSIM2_F	A A A A gcT GcT gcC gcT TAA TACCCAGCTTTCTGTACAAAG
	mutSIM2_R	GCCCTCTATGAGAATAGCTTCAA cgA CgA cgG cgA ATT
delece DBD	delDBD_F	GTGGAAGTGGTTCAAGAGAGTTGGCGGCTTTTG
	delDBD_R	CAGTTGCAGAGCCACCTTCACCAAGTTC
delece WLM	delWLM_F	AAGCAGGCTAAAAATGTTGTACGACACATTTTGGGGAAC
	delWLM_R	CATGTTTTTTCGTCCGATTTTTTAC

Obecné složení reakčních směsí a podmínky PCR jsou uvedeny v tab. 14_. Amplifikační reakce byly provedeny v gradientovém termocykleru T-gradient (Biometra®). Produkty reakcí byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy (viz 4.2.4) (nastavení zdroje: 100 V po dobu 60 min, standard molekulových hmotností 1 kbp ladder [Gel Pilot]).

Tab. 14. | Gibson Assembly PCR – mutace a delece interakčních domén:
Obecné složení reakčních směsí (vpravo) a podmínky amplifikačních reakcí (vlevo).

	TEPLOTA	ČAS		SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI	
1.	98 °C	1 min	30 cyklů	Phusion® HF reakční pufr	4 µl
2.	98 °C	10 s		Templátová DNA (1 ng/µl)	1 µl
3.	64 °C	30 s		Forward primer (10 mM)	1 µl
4.	72 °C	1 m 55 s		Reverse primer (10 mM)	1 µl
5.	72 °C	10 m		dNTP mix (10 mM)	0,4 µl
6.	4 °C	∞		Mili-Q H ₂ O	12,4 µl
				Phusion® High-Fidelity DNA polymerasa	0,2 µl

Po ověření byly izolované produkty ošetřeny endonukleasou DpnI a dále zpracovány stejným způsobem jako v podkapitole 4.2.10 - *Klonování N-koncové afinitní HA značky*. Pořadí přípravy konstruktů je schematicky znázorněno na obr. 11. Takto upravené varianty HA-značených genů *WSS1* a *wss1^{E116Q}* byly dále rekombinovány Gateway LR reakcí do cílových vektorů pAG416GAL-ccdB a pAG416GPD-ccdB (viz kapitola 4.2.8). Výsledné produkty byly ověřeny sekvenací u firmy GATC (<http://gatc-biotech.com/>) a následně vyhodnoceny pomocí programu ApE - A plasmid Editor (v. 2.0.49.0; <http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/apE>)

4.2.11 Transformace kvasinkových buněk

Kvasinkové kmeny byly transformovány připravenými expresními klony, kódující *HA-WSS1*, *HA-wss1^{E116Q}* nebo jejich upravené varianty, podle protokolů High Efficiency Transformation Protocol (Gietz & Woods 2002).

Ze zásobních kultur kvasinkových kmenů (viz tab. 2), které byly uchovávány v 15% glycerolovém roztoku při - 80 °C, bylo asepticky odebráno malé množství buněk, jež byly vysety na YPD agarové misky a inkubovány 72 h ve 30 °C (chlazený inkubátor IPP 400, Memmert). Čerstvě narostlé kvasinkové kolonie na LB agarových miskách byly poté sterilně zaočkovány do 10 ml YPD média a třepány při rychlosti 200 ot./min a teplotě 30 °C přes noc (New Brunswick™ Inova® 44, Eppendorf). Následující den byla změřena optická hustota třepaných kultur při 600 nm (BioSpectrometer® kinetic, Eppendorf). Na základě získaných hodnot byla podle vztahu ($OD_{600} = 0,1 \sim 1 \times 10^6$ kvasinkových buněk) spočítána přibližná koncentrace buněk v třepaných kulturách, načež z nich bylo sterilně inokulováno 50 ml YPD média, předehřátého na 37 °C, na výslednou koncentraci 5×10^6 buněk/ml a třepáno při rychlosti 200 o/min a teplotě 30 °C (New Brunswick™ Inova® 44, Eppendorf). Po dosažení optické hustoty $OD_{600} = 1$, byly třepané kultury centrifugovány (3 000 g, 5 min, 10 °C; Alegro®X-15R, Beckman Coulter), opláchnuty v 25 ml Mili-Q H₂O a znovu centrifugovány (5 000 g, 5 min, 10 °C; Alegro®X-15R, Beckman Coulter). Po

odstranění supernatantu byly buňky resuspendovány v 1 ml Mili-Q H₂O a přeneseny do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky. Vzorky byly dále centrifugovány (3 000 g, 30 s; Centrifuge 5424 R, Eppendorf) a po odstranění supernatantu byla k buňkám doplněna Mili-Q tak, aby výsledná koncentrace odpovídala 2×10⁷ buněk/ml. Buněčné suspenze byly poté řádně promíchány a přeneseny po 100 µl do označených 1,5ml mikrocentrifugačních zkumavek (jedna pro každou transformační reakci). Rozdělené suspenze byly následně centrifugovány (13 000 g, 30 s; Centrifuge 5424 R, Eppendorf). Po odstranění supernatantu bylo k buňkám přidáno 326 µl transformační směsi (240 µl 50% PEG 3500, 36 µl 10 mM LiAc, 50 µl DNA z lososích varlat) a 1 µg příslušné plasmidové DNA o celkovém objemu 34 µl. Reakce sloužící jako negativní kontrola obsahovala namísto plasmidové DNA 34 µl TE pufru. Reakční směsi byla řádně promíchány a inkubovány 40 min ve 42 °C (Thermocell Mixing Block MB102, BIOER Technology). Po centrifugaci (13 000 g, 30 s; Centrifuge 5424 R, Eppendorf) byla šetrně odstraněna transformační směs a do každé reakce byl přidán 1 ml sterilní Mili-Q H₂O. Pomocí pipetovací špičky byly buněčné pelety šetrně rozmíchány. Transformované buňky byly vysety na SC URA-agarové misky a inkubovány 4 dny při 30 °C (inkubátor IPP 400, Memmert).

4.2.12 Analýza komplementačních experimentů pomocí bodového testu

Kvasinkové buňky komplementované připravenými expresními klony byly testovány na citlivost vůči působení genotoxického stresu v podobě hydroxymočoviny pomocí bodového testu.

Čerstvě narostlé kolonie buněk na agarosových miskách (transformované = SC URA- agarové misky; netransformované = YPD agar) byly zaočkovány do 5 ml odpovídajícího média (transformované = SC URA-, netransformované = SC URA+) a třepány při rychlosti 200 ot./min a teplotě 30 °C přes noc (New Brunswick™ Inova® 44, Eppendorf). Následující den byla zjištěna přibližná hustota buněk v třepaných kulturách a zaočkovány nové 5 ml kultury odpovídajícího média obdobně jako je popsáno v kapitole 4.2.11. Po dosažení optické hustoty OD₆₀₀ = 1 byly kultury buněk šestinásobně sériově zředěny v PBS (1×, 6×, 36×, 216×, 1296×) a bodově nanoseny na SC URA- a SC URA+ agarové misky s 0,05 M hydroxymočoviny. Po 72 h inkubaci při 30 °C (chlazený inkubátor IPP 400, Memmert) byly misky vyfoceny.

4.2.13 Extrakce proteinů z kvasinkových buněk

Extrakty buněčný proteinů z transformovaných kvasinek byly připraveny podle upraveného protokolu: *Rychlá a spolehlivá extrakce bílkovin z kvasinek* (Kushnirov & Vitaly 2000). Transformované kmeny kvasinek byly sterilně inokulovány do SC URA- média a třepány (New Brunswick™ Inova® 44, Eppendorf) při rychlosti 200 o./min a teplotě 37 °C

přes noc. Následující den byly buňky sterilně přeočkovány do čerstvého SC URA- média na výslednou koncentraci OD_{600} 0,25/ml a dále třepány za stejných podmínek. Po dosažení koncentrace $OD_{600} \sim 1$ /ml byly ekvivalenty 6 jednotek OD_{600} 1 sklizeny centrifugací (5 000 g, 5 min, 10 °C; Alegra®X-15R, Beckman Coulter). Po odstranění supernatantu byly buněčné pelety resuspendovány v 1 ml ledově chladné Mili-Q H₂O a znovu centrifugovány (5 000 g, 5 min, 10 °C; Alegra®X-15R, Beckman Coulter). Po odstranění supernatantu byly buňky resuspendovány ve 200 μ l Mili-Q H₂O a přeneseny do sterilních 1,5ml mikrocentrifugačních zkumavek. K suspenzím bylo přidáno 200 μ l 0,2M NaOH. Směsi byly inkubovány 10 min při RT a poté centrifugovány (13 000 g, 30 s; Centrifuge 5424 R, Eppendorf). Po odstranění supernatantu bylo k buňkám přidáno 100 μ l SDS-PAGE vzorkového pufru (0,06 M Tris-Hcl pH 6,8; 4 % β -merkaptotanol; 5 % glycerol; 2 % SDS; 0,0025 % bromfenolová modř). Připravené směsi byly třepány 3 min v 95 °C při 450 rpm (Thermocell Mixing Block MB102, BIOER Technology) a centrifugovány (13 000 g, 30 s; Centrifuge 5424 R, Eppendorf). Supernatant byl opatrně přenesen do čistých 1,5ml mikrocentrifugačních zkumavek a skladován při -20 °C

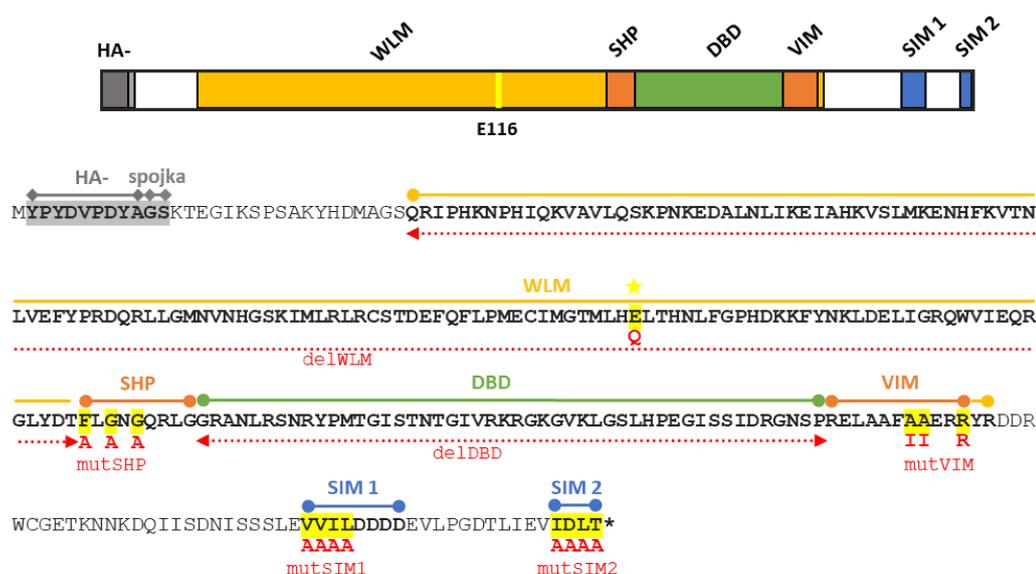
4.2.14 Analýza exprese proteinů pomocí imunodetekce proteinů po přenosu na membránu (Western blot)

Expresa zkoumaných genů v transformovaných kvasinkových buňkách byla ověřena pomocí Western-blot analýzy extraktů buněčných proteinů. Extrakty byly nejprve zahřáty po dobu 1 min na 30 °C (Thermocell Mixing Block MB102, BIOER Technology) a následně podrobeny vertikální elektroforóze v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad; 7% zaostřovací gel; 16% rozdělovací gel) při konstantním napětí 160 V po dobu 90 min. Gely s proteiny, nitrocelulózoové membrány, filtrační papíry i umělé pěnové čtverce byly promyty v přenosovém pufru a složeny do systémů Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad). Přenos proteinů na membrány probíhal při konstantním napětí 100 V po dobu 60 min (PowerPac™ Basic Power Supply, Bio-Rad). Nitrocelulózoové membrány byly poté blokovány v 10 ml 0,5% roztoku kaseinu v PBS pufru. Do roztoku bylo dále přidáno 0,1 % (v/v) 20% Tween, králičí monoklonální protilátka proti HA-značce (výsledné ředění 1:1000) a myší monoklonální protilátka proti fosfoglycerát kináze (Pgk) (výsledné ředění 1:1000), která sloužila jako kontrola nanášených objemů. Membrána byla inkubována v roztoku 5 h při 25 °C, poté promyta 3×5 min v PBS pufru s 0,1 % (v/v) 20% Tween a inkubována v novém roztoku kaseinu obsahující IRDye® 800CW kozí polyklonální anti-králičí IgG protilátku (HA- značka, výsledné ředění 1:15 000), nebo IRDye® 680RD kozí polyklonální anti-myší IgG protilátku (Pgk, výsledné ředění 1:5000) po dobu 2 h při 25 °C ve tmě. Membrána byla poté opět

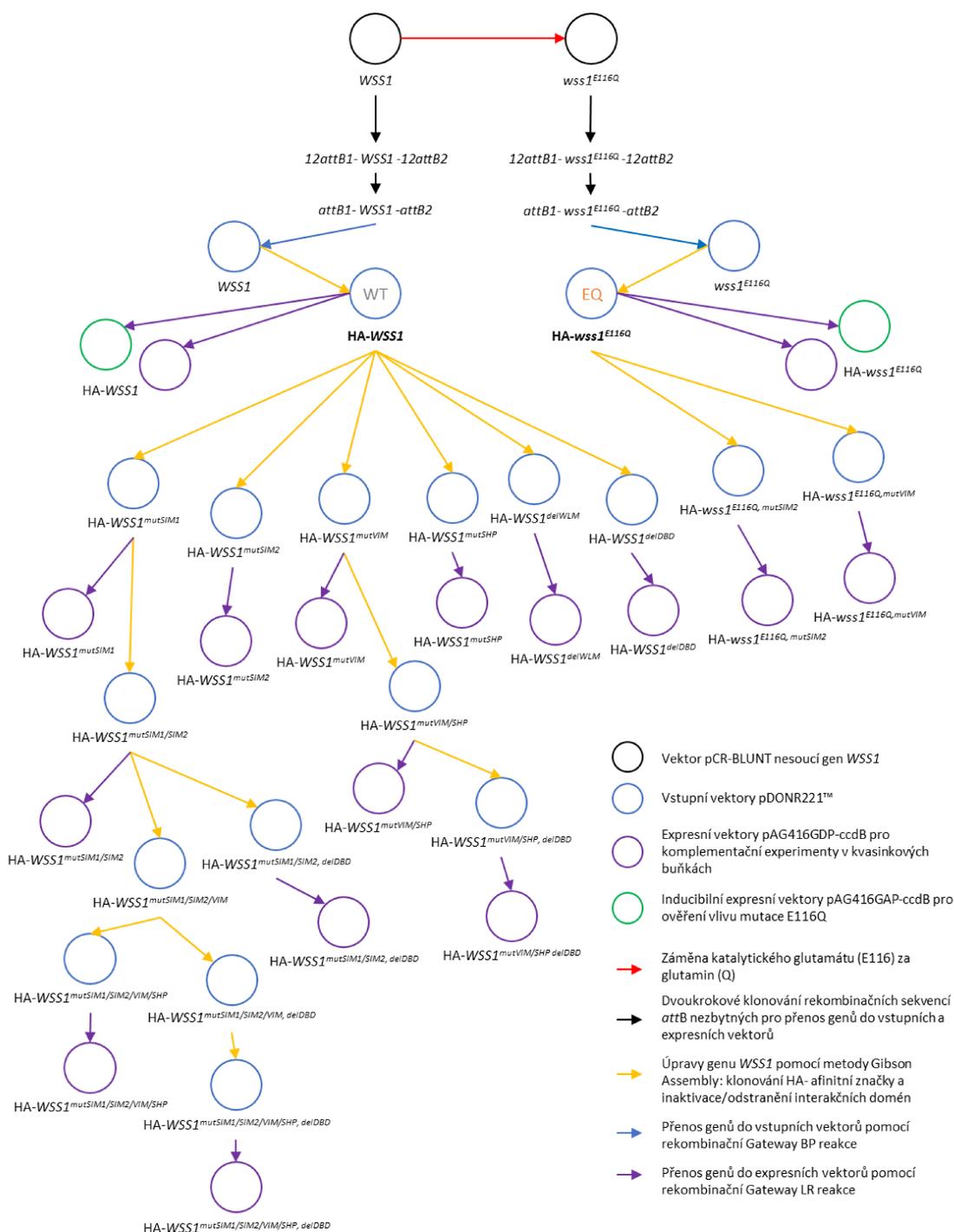
promyta 3×5 min v PBS pufru s 0,1 % (v/v) 20% Tween a 1x5 min v čistém PBS pufru. Po vysušení byly navázané protilátky na membráně zobrazeny pomocí přístroje Odyssey® CLx Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

5 VÝSLEDKY

Wss1 z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* je multidoménový protein, o němž je známo, že se účastní odstraňování kovalentně zachycených proteinů na DNA. Pro objasnění významu Wss1p a jeho jednotlivých domén v buněčné odpovědi na genotoxické působení HU byla na základě informací získaných v publikacích (Stingele *et al.* 2014, Yang *et al.* 2017) a webové platformě UniProt (<https://www.uniprot.org/>) navržena a posléze připravena sada plazmidových konstruktů, nesoucí varianty genu *WSS1* s různou kombinací inaktivovaných či deletovaných interakčních domén WLM, SHP, DBD, VIM, SIM1 a SIM2 a aktivního místa E116Q. Následně byly tyto konstrukty použity při komplementačních experimentech. Jednotlivé úpravy a postup přípravy jsou znázorněny na přehledových obr. 10 a 11. Konkrétní výsledky jednotlivých kroků přípravy a provedených komplementačních experimentů jsou uvedeny v následujících kapitolách.



Obr. 10. | Schématické znázornění struktury proteinu Wss1 s vyznačenými interakčními doménami a provedenými úpravami. Sekvence HA- afinitní značky a GS spojky pro detekci proteinu pomocí protilátek byly vloženy za počáteční metionin – na obrázku vyznačeny šedě. Proteolytická (WLM) a interakční domény (SHP, DBD, VIM, SIM1, SIM2) vyznačeny barevně. Katalytický glutamát E116 zodpovědný za proteolytickou aktivitu vyznačen žlutou barvou, v sekvenci žlutou hvězdičkou. Klíčové aminokyseliny příslušných domén vyznačeny v sekvenci žlutým podbarvením. Inaktivace domén záměnou klíčových AMK (mut) a odstranění domén (del) vyznačeny červeně.

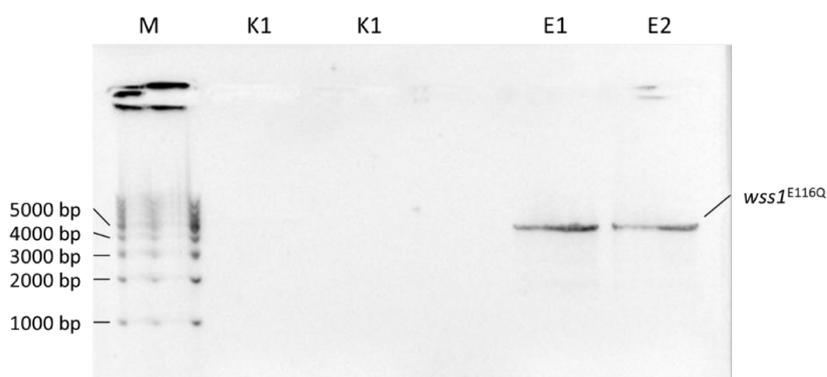


Obr. 11. | Schématické znázornění postupu přípravy plasmidových konstruktů nesoucích požadované varianty genu *WSS1*. (E116Q) – bodová mutace způsobující inaktivaci aktivního centra enzymu nahrazením katalytického glutamátu E116 za glutamin; (delWLM) – odstraněná oblast kódující proteasovou doménu WLM; (mutVIM, mutSHP) – inaktivace domén VIM a SHP, které interagují s Cdc48; (mutSIM1, mutSIM2) – inaktivace domén SIM1 a SIM2, které interagují se Smt3p.

5.1 KLONOVÁNÍ KATALYTICKY INAKTIVNÍ VARIANTY Wss1p

Aby bylo možné ověřit roli Wss1 v buněčné odpovědi na genotoxický stres, a zvláště pak vliv aktivity katalytického místa proteinu na tuto funkci, bylo zapotřebí připravit pro komplementační experimenty katalyticky neaktivní variantu Wss1.

Pomocí PCR s využitím oligonukleotidových primerů E116Q_F a E116Q_R byla do sekvence genu *WSS1* ve vektoru pCR™-Blunt vnesena bodová mutace způsobující nahrazení katalytického glutamátu (E116) za glutamin (E116Q). Po odstranění templátové DNA endonukleasou DpnI byly reakční směsi analyzovány pomocí agarosové elektroforézy (viz obr. 12). Produkty odpovídající velikosti 4 300 bp byly transformovány teplotním šokem do bakterií *E. coli* One Shot™ TOP10. Z kolonií transformovaných buněk byly následně připraveny suspenzní kultury, z nichž byla plasmidová DNA získána minipreparací. Vnesení mutace bylo následně potvrzeno sekvenací izolované DNA (viz obr. 13).



Obr. 12. | Analýza produktů PCR pomocí agarosové elektroforézy: (M) - standard molekulových hmotností GelPilot 1 kbp; (K1) - kontrolní reakce před přidáním endonukleasy DpnI; (K2) - kontrolní reakce po štěpení endonukleasou DpnI; (V1) - mutagenní reakce před přidáním DpnI; (V2) - mutagenní reakce po štěpení endonukleasou DpnI; (*wss1^{E116Q}*) produkty odpovídající očekávané velikosti 4 300 bp.

```

                Glu                                WSS1
331>GGCACCATGCTGCACGAATTAACCTACAATTTATTCGGTCCACACGACAAAAAGTTCACAATAAGCTAGATGAGTTGATTGGAAGGCAATGGGTTATTG>430
331>GGCACCATGCTGCACCAATTAACCTACAATTTATTCGGTCCACACGACAAAAAGTTCACAATAAGCTAGATGAGTTGATTGGAAGGCAATGGGTTATTG>430
                Gln                                wss1E116Q
```

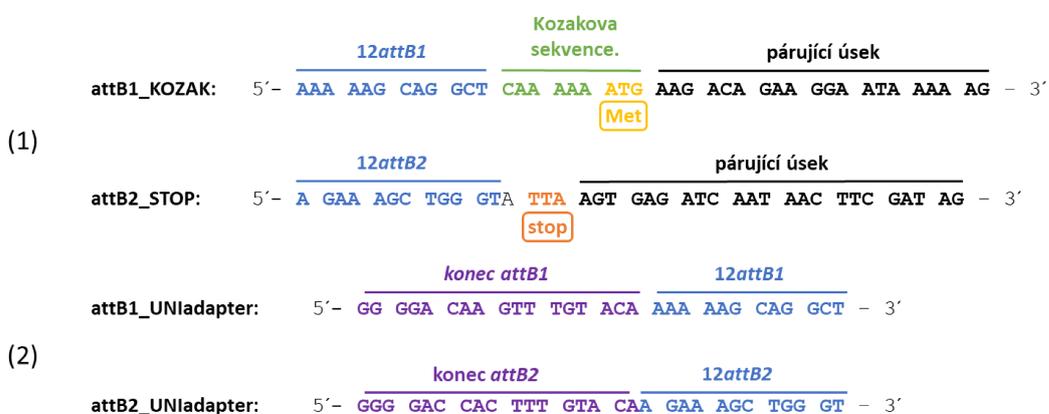
Obr. 13. | Výsledek sekvenace *wss1^{E116Q}*. Horní řádek – část sekvence genu *WSS1* s vyznačenou trojicí bází kódující glutamát v pozici 116. Dolní řádek – stejná část sekvence genu *wss1^{E116Q}* s cytosinovou bází způsobující záměnu katalytického glutamátu (E116) za glutamin (E116Q).

5.2 KLONOVÁNÍ REKOMBINAČNÍCH SEKVENCÍ *attB1*, *attB2*

Pro přípravu plasmidových vektorů pro komplementační experimenty v kvasinkových buňkách byl použit klonovací systém Gateway®. Aby bylo možné přenášet

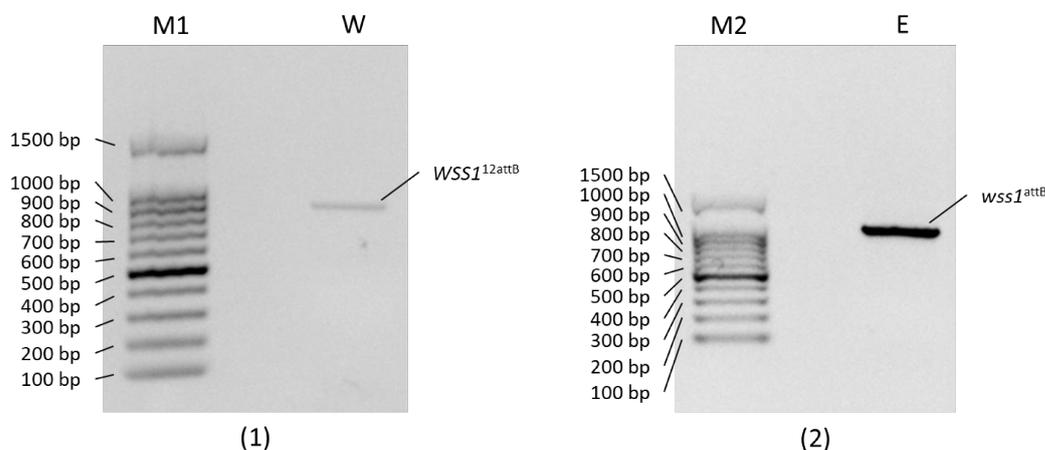
geny *WSS1* a *wss1^{E116Q}* pomocí této metody, byly na jejich 5' a 3' konce klonovány ve dvou krocích *attB* sekvence umožňující místně specifickou rekombinaci.

Geny *WSS1* a *wss1^{E116Q}* byly nejprve amplifikovány z vektorů pCR™-Blunt pomocí navržených primerů *attB1_KOZAK* a *attB2_STOP*, jejichž sekvence je znázorněna na obr.14-1. Po ověření agarosovou elektroforézou (viz obr. 15-1) byly produkty s koncovými 12 bp dlouhými úseky *attB* dále amplifikovány pomocí universálních adaptérových primerů *attB1_UNIadapter* a *attB2_UNIadapter* obsahujících zbylou část rekombinačních sekvencí (viz obr. 14-2). Po ověření agarosovou elektroforézou (viz obr. 15-2) byly výsledné produkty odpovídající požadované velikosti 839 bp přečištěny pomocí komerční soupravy.



Obr. 14. | Sekvence primerů pro klonování *attB1* a *attB2* sekvencí na konce genů *WSS1* a *wss1^{E116Q}*.

- (1) Primery *attB1_KOZAK* a *attB2_STOP* tvořené 12 párů bází dlouhými částmi sekvencí *attB1* a *attB2*, trojicí bází kódující methionin nebo stop kodon a úsekem párujícím se s koncovými sekvencemi templátové DNA.
- (2) Primery *attB1_UNIadapter* a *attB2_UNIadapter* tvořené adaptérovými oblastmi 12attB1 a 12attB2 a zbylými částmi sekvencí *attB1* a *attB2*.



Obr. 15. | Agarosová elektroforéza PCR produktů klonování rekombinačních sekvencí.

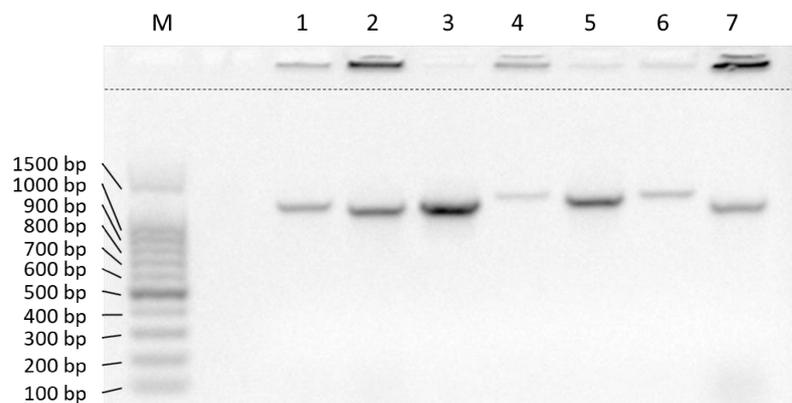
- (1) Amplifikace genu *WSS1* pomocí primerů attB1_KOZAK a attB2_STOP
- (2) Amplifikace genu *wss1^{E116Q}* s koncovými 12 bp dlouhými úseky *attB* sekvencí pomocí adaptérových primerů attB1_UNIadapter a attB2_UNIadapter

(M1, M2) – standardy molekulových hmotností GelPilot 100 bp plus Ladder; (E) – produkty reakce; (W) – produkty reakce.

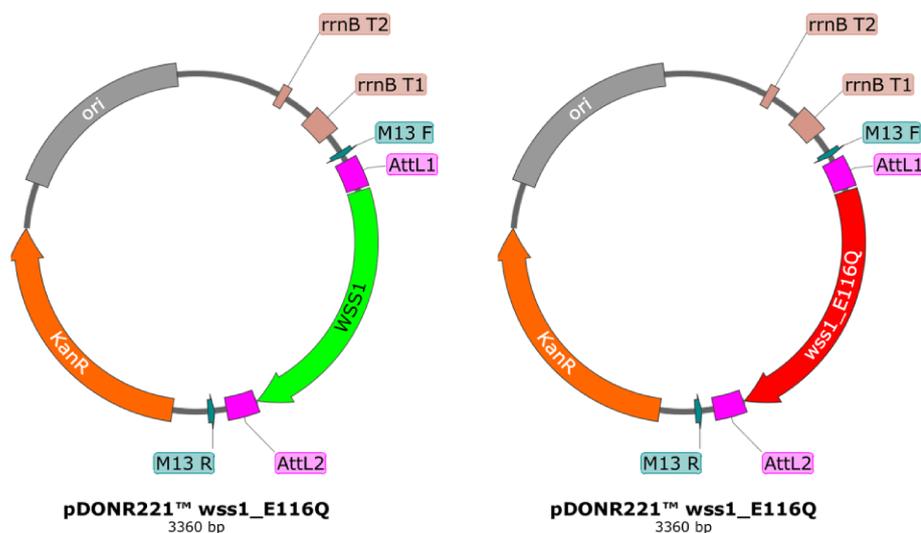
5.3 PŘÍPRAVA VSTUPNÍCH KLONŮ

Dalším krokem při tvorbě konstruktů pro komplementační experimenty byla příprava transkripčně tichých vstupních klonů, ve kterých budou geny dále upraveny a následně rekombinací přeneseny do cílových vektorů umožňující expresi v kvasinkových buňkách.

Geny *WSS1* a *wss1^{E116Q}* opatřené koncovými sekvencemi *attB1* a *attB2* byly rekombinací se sekvencemi *attP1* a *attP2* přeneseny do dárcovského vektoru pDONR221™. Produkty reakcí byly transformovány teplotním šokem do bakterií *E. coli* One Shot™ TOP10. Přítomnost vstupních klonů s genem *wss1^{E116Q}* v narostlých koloniích byla ověřena pomocí PCR bakteriálních kolonií (viz obr. 16). Ze 7 testovaných kolonií byly vybrány 3 vzorky s nejmenší kontaminací a největším signálem v požadované oblasti odpovídající velikosti 968 bp (vzorky č. 2, 4 a 6), ze kterých byly vstupní klony izolovány minipreparací a ověřeny sekvenací. V případě genu *WSS1* bylo ověření pomocí PCR bakteriálních kolonií vynecháno a pro zpracování byly náhodně vybrány 3 bakteriální kolonie. Získané vstupní klony s geny *WSS1* a *wss1^{E116Q}* jsou vyobrazeny na obr. 17.



Obr. 16. | Ověření přítomnosti *wss1^{E116Q}* v koloniích transformovaných buněk. Agarosová elektroforéza produktů PCR analýzy narostlých bakteriálních kolonií po transformaci vstupním klonem pDONR221™ s vloženým genem *wss1^{E116Q}*. (M) - standard molekulových hmotností GelPilot 100 bp plus Ladder; (1-8) – testované bakteriální kolonie.



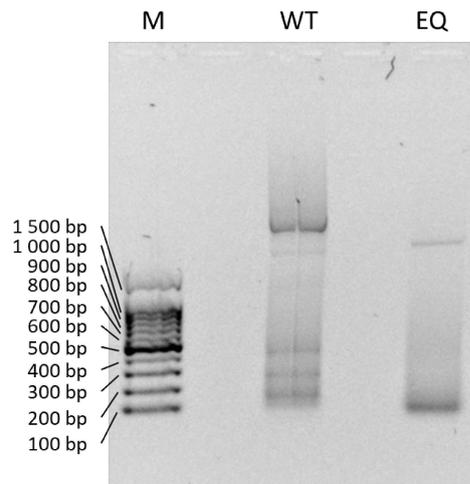
Obr. 17. | Vstupní klony pDONR221 s vloženými geny *WSS1* a *wss1^{E116Q}*: Schématické mapy připravených vstupních klonů. Překládané sekvence jsou vyznačeny šipkou. (*WSS1*, *wss1^{E116Q}*) – geny *WSS1* a *wss1^{E116Q}* vložené rekombinační BP reakcí; (*attL1*, *attL2*) – sekvence vzniklé rekombinací *attB* sekvencí na koncích zkoumaných genů s *attL* sekvencemi na plasmidu; (*Kan*) – rezistence na kanamycin; (*M13 F*, *M13 R*) – párovací oblasti sekvenačních primerů *M13 F* a *M13 R*; (*ori*) – replikační počátek; (*rrnB T1*, *T2*) – transkripční terminátory.

5.4 KLONOVÁNÍ HA- AFINITNÍ ZNAČKY

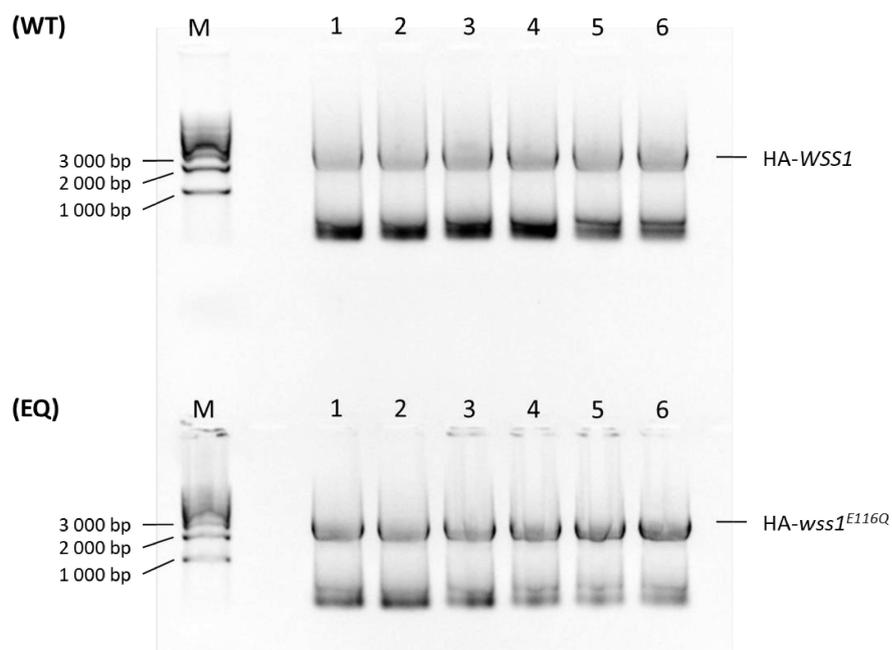
Aby bylo možné ověřit expresi zkoumaných genů v kvasinkových buňkách, byla na 5' konce genů *WSS1* a *wss1^{E116Q}* v připravených vstupních klonech pDONR221™ klonována HA- afinitní značka umožňující detekovat vzniklé proteiny pomocí značených protilátek.

PCR reakcí s navrženými primery HA-tag_F a HA-tag_R (jejichž struktura je znázorněna na obr. 9) byly zmíněné vstupní vektory amplifikovány za současného přidání koncových sekvencí tvořených částmi HA- afinitní značky. Produkty reakcí byly ověřeny agarosovou elektroforézou (viz obr. 18). Na výsledném gelu bylo vedle nevhodně zvolené velikosti standardů molekulových hmotností viditelné i značné množství nespecifických produktů. Kvůli podezření na špatně zvolenou T_m pro nasedání primerů byly reakce opakovány v gradientovém termocykleru v několika provedeních s vyššími hodnotami T_m . Ačkoliv bylo ve všech reakcích dosaženo většího zastoupení produktů požadované velikosti ~3450 bp (viz obr. 19), byly kvůli přítomnosti nespecifických produktů vybrány z každé sady dvě reakční směsi s nejvyššími použitými hodnotami T_m , (reakce č. 5 a 6), které byly následně použity jako templátová DNA při opětovné PCR reakci za stejných reakčních podmínek. Při ověření produktů reakcí pomocí agarosové elektroforézy (viz obr. 19) byly pozorovány produkty o požadované velikosti (~3450 bp), přičemž zastoupení nespecifických produktů bylo pouze minimální. Pro oddělení zbylých nežádoucích produktů bylo přistoupeno k izolaci z gelu – pro získání dostatečného

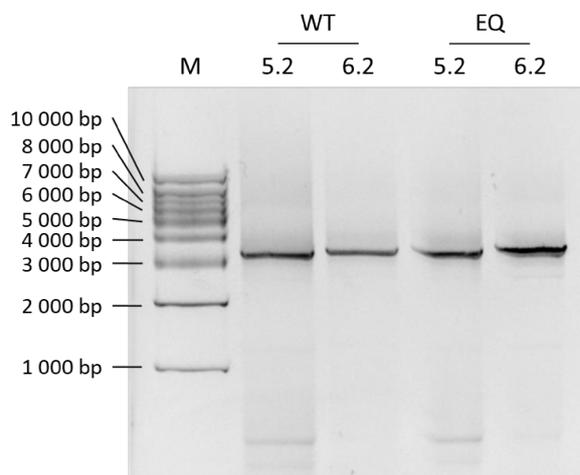
množství DNA byly reakční směsi příslušných sad nejprve smíchány a společně podrobeny agarosové elektroforéze. Požadované produkty byly poté vyříznuty a izolovány z gelu. Po odstranění templátové DNA endonukleasou DpnI byly izolované produkty ověřeny agarosovou elektroforézou, kdy byla pozorována pouze DNA o požadované velikosti (viz obr. 20). Po změření koncentrace byly produkty podrobeny Gibson Assembly® reakci, během které byly konce linearizovaných konstruktů spojeny za vzniku vstupních vektorů s kompletní sekvencí HA afinitní značky na 5' konci zkoumaných genů. Takto připravené vektory byly pomnoženy v bakteriích *E. coli* One Shot™ TOP10, izolovány minipreparací a ověřeny sekvenací.



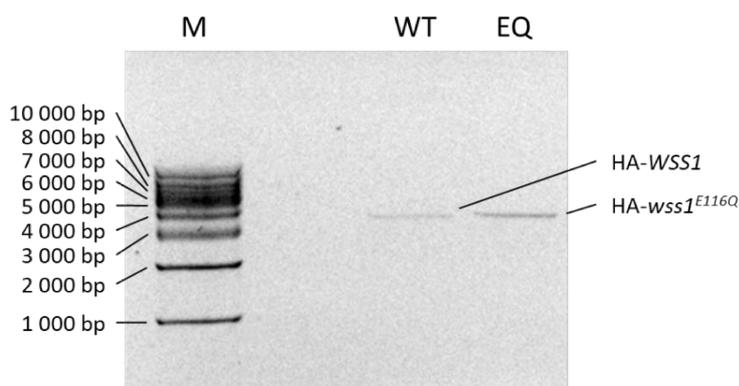
Obr. 18. | Ověření PCR produktů. Agarosová elektroforéza produktů po amplifikaci vstupních vektorů s *WSS1* nebo *wss1^{E116Q}* pomocí primerů HA-tag_F a HA-tag_R. (M) - standard molekulových hmotností GelPilot 100 bp plus Ladder; (WT) - produkty amplifikace vstupního klonu pDONR221™ *WSS1*; (EQ) - produkty amplifikace vstupního klonu pDONR221™ *wss1^{E116Q}*.



Obr. 19. | Ověření produktů pomocí gradientové PCR. Agarosová elektroforéza produktů po gradientové PCR vstupních vektorů s *WSS1* nebo *wss1^{E116Q}* pomocí primerů HA-tag_F a HA-tag_R. (WT) – produkty amplifikace vstupního klonu pDONR221™ *WSS1*; (EQ) – produkty amplifikace vstupního klonu pDONR221™ *wss1^{E116Q}*; (*HA-WSS1*; *HA-wss1^{E116Q}*) – předpokládané oblasti výskytu požadovaných produktů; (1-6) – sady reakcí s postupně se zvyšující teplotou pro nasedání primerů; (M) - standard molekulových hmotností GelPilot 1 kbp Ladder,



Obr. 20. | Ověření produktů opakované PCR. Agarosová elektroforéza produktů po amplifikaci reakčních směsí 5 a 6 z 1. gradientové PCR. (WT) – produkty amplifikace vstupního klonu pDONR221™ *WSS1*; (EQ) – produkty amplifikace vstupního klonu pDONR221™ *wss1^{E116Q}*; (5.2, 6.2) – produkty opakovaných PCR reakcí (M) - standard molekulových hmotností GelPilot 1 kbp Ladder



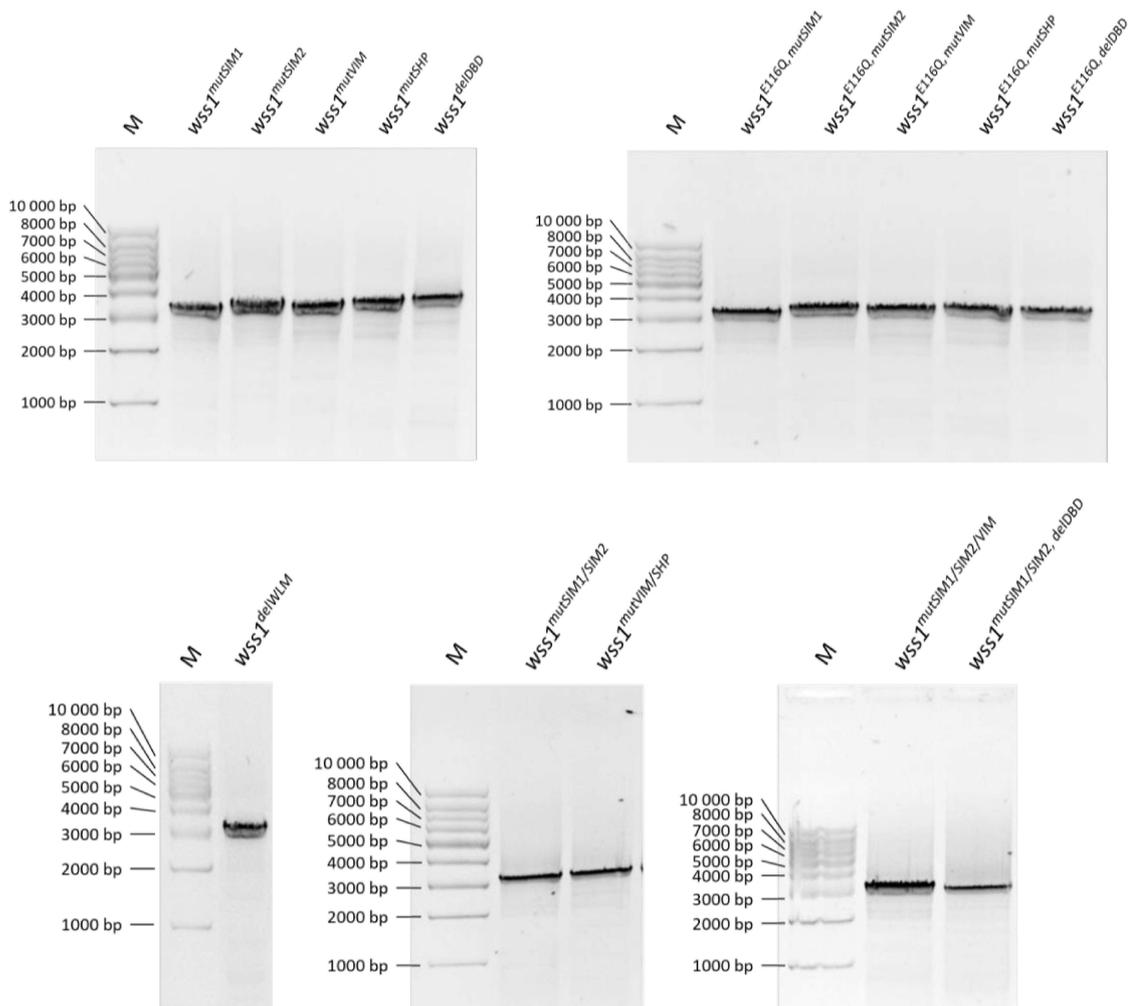
Obr. 21. | Ověření izolovaných produktů. (M) - standard molekulových hmotností GelPilot 1 kbp Ladder; (WT) – izolované produkty amplifikace vstupního klonu pDONR221™ *WSS1*; (EQ) – izolované produkty amplifikace vstupního klonu pDONR221™ *wss1^{E116Q}*.

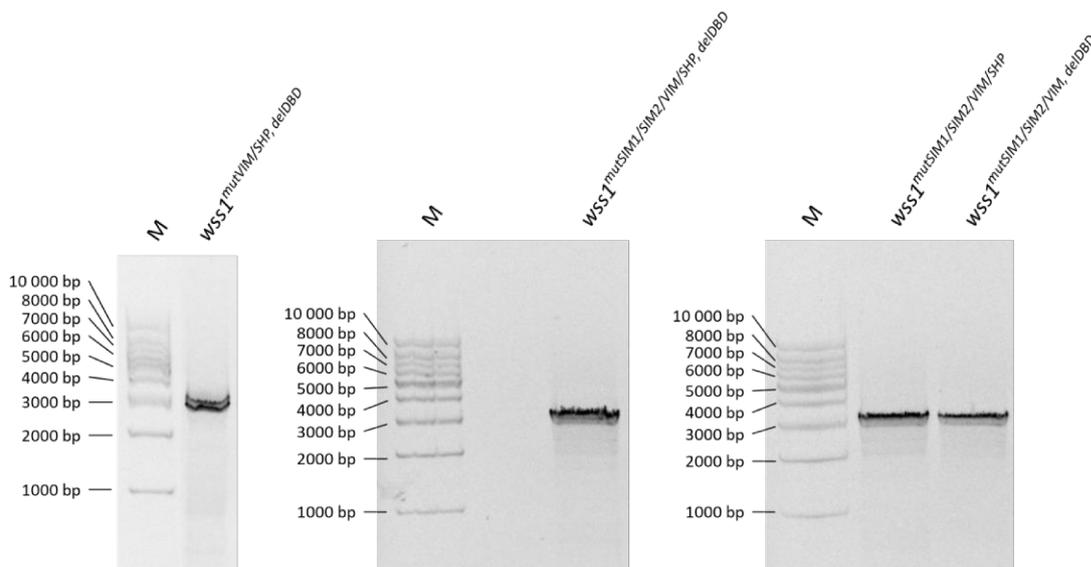
5.5 PŘÍPRAVA VSTUPNÍCH KLONŮ S UPRAVENÝMI INTERAKČNÍMI DOMÉNAMI

Pro objasnění vlivu jednotlivých interakčních motivů proteinu Wss1 na jeho funkci v buněčné odpovědi na působení hydroxymočoviny, byly připraveny vstupní klony nesoucí varianty genů *HA-WSS1* a *HA-wss1^{E116Q}* s inaktivovanými nebo deletovanými

domény SHP, VIM, SIM1, SIM2, WLM, DBD. Průběh přípravy těchto konstruktů je znázorněn na obr. 11.

Pomocí navržených primerů pro místně specifickou mutagenézi (viz tab. 13) byly amplifikovány vstupní klony pDONR221™ s *HA-WSS1* a *HA-wss1^{E116Q}*. Produkty těchto reakcí byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy (viz obr. 22). Velikost produktů rámcově odpovídala předpokládané velikosti: *wss1^{mutSIM1}*, *wss1^{mutSIM2}*, *wss1^{mutVIM}*, *wss1^{mutSHP}*, *wss1^{E116Q, mutSIM1}*, *wss1^{E116Q, mutSIM2}*, *wss1^{E116Q, mutVIM}*, *wss1^{E116Q, mutSHP}* = 3 408 pb | *wss1^{delWLM}* = 3024 pb | *wss1^{delDBD}*, *wss1^{E116Q, delDBD}* = 3 277 pb. Množství produktů odlišné velikosti bylo zcela zanedbatelné. Z výsledných reakčních směsí byla odstraněna templátová DNA endonukleasou DpnI, načež byly produkty podrobeny Gibson Assembly® reakci. Vzniklé vstupní klony byly pomnoženy minipreparací a finálně ověřeny sekvenací. Vybrané vstupní klony s požadovanými variantami genu *WSS1* a *wss1^{E116Q}* byly dále použity jako výchozí DNA při přípravě dalších variant s větším počtem mutovaných domén (viz obr. 22). Veškeré připravené varianty byly finálně ověřeny sekvenací.





Obr. 22. | Příprava vstupních klonů nesoucí varianty *WSS1* s upravenými interakčními doménami. Agarosová elektroforéza produktů mutagenních PCR. (M) - standard molekulových hmotností GelPilot 1 kbp Ladder.

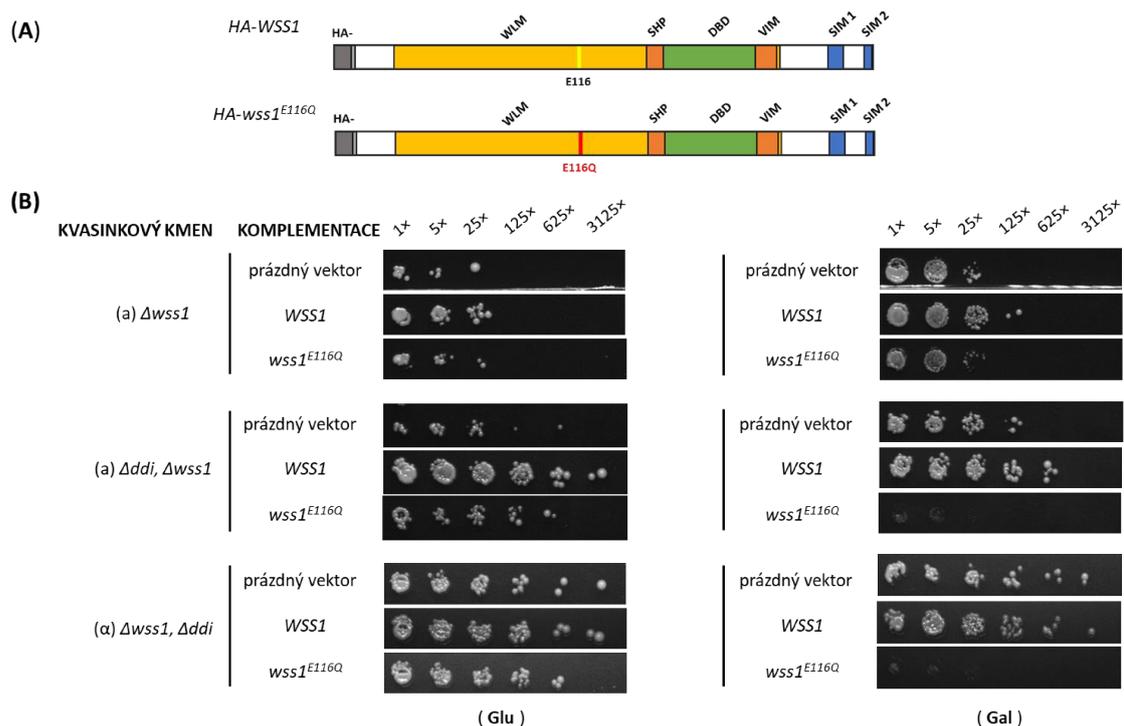
5.6 REKOMBINAČNÍ PŘÍPRAVA EXPRESNÍCH KLONŮ

Připravené geny *HA-WSS1*, *HA-wss1^{E116Q}* a jejich vybrané varianty byly ze vstupních klonů pDONR221™ přeneseny pomocí rekombinační Gateway® LR reakce do cílového vektoru pAG416GPD-ccdB obsahující konstitutivní promotor GDP a další sekvence nezbytné pro následnou expresi vložených genů v kvasinkových buňkách (viz obr. 11). Reakční produkty byly transformovány teplotním šokem do bakterií *E. coli* One Shot™ TOP10, z nichž byly po pomnožení izolovány minipreparací a finálně ověřeny sekvenací.

Ověřené expresní klony byly dále transformovány do kvasinkových kmenů postrádající *WSS1* ([α] $\Delta wss1$, [α] $\Delta wss1$) a kmenů postrádající *WSS1* i *DDI1* (*Add1* $\Delta wss1$, $\Delta wss1$ *Add1*). V případě expresního klonu pAG416GPD s *HA-wss1^{E116Q}* bylo po jeho transformaci do kvasinkových buněk postrádající *WSS1* i *DDI1* pozorováno výrazné zhoršení životaschopnosti blížíící se letálnímu stavu, kvůli kterému nebylo možné tyto buňky kultivovat v dostatečném množství pro využití v následujících experimentech (není zdokumentováno). Geny *HA-WSS1*, *HA-wss1^{E116Q}* byly proto přeneseny i do cílového vektoru pAG416GAL-ccdB pod indukční GAL1 promotor. U expresních klonů nesoucí varianty *HA-wss1^{E116Q}* se současně inaktivovanou doménou VIM (*HA-wss1^{E116Q}, mutVIM*) nebo SIM2 (*HA-wss1^{E116Q}, mutSIM2*), bylo po jejich transformaci do buněk bez *WSS1* i *DDI1* též pozorováno snížení životaschopnosti. Tyto buňky bylo ale stále možné s různou mírou úspěšnosti dále kultivovat.

5.7 ANALÝZA VLIVU INAKTIVOVANÉHO KATALYTICKÉHO MÍSTA NA AKTIVITU PROTEINU Wss1

Pro porovnání vlivu exprese genu *WSS1* a jeho katalyticky inaktivní varianty *wss1^{E116Q}* na životaschopnost kvasinkových buněk byl proveden bodový test, při němž byly kultury kvasinkových kmenů [a] $\Delta wss1$, [a] $\Delta ddi1\Delta wss1$ a [α] $\Delta wss1\Delta ddi1$, které byly komplementovány inducibilními expresními klony pAG416GAL s *HA-WSS1* nebo *HA-wss1^{E116Q}*, 5 \times sériově zředěny a bodově naneseny na dvě SC URA(-) agarosová média: 1. s glukosou a 2. s galaktosou indukující expresi vložených genů. Výsledky experimentu naznačují, že nadprodukce katalyticky neaktivní varianty *Wss1^{E116Q}* v kvasinkových buňkách postrádajících nativní *WSS1* ([a] $\Delta wss1$) neměla zásadní vliv na jejich životaschopnost. Jiná situace ale nastala v případě kvasinkových buněk postrádajících kromě *WSS1* i *DDI1* ([a] $\Delta ddi1\Delta wss1$ a [α] $\Delta wss1\Delta ddi1$), ve kterých měla nadprodukce katalyticky inaktivní varianty silně negativní (tzv. „dominant negative“) vliv na životaschopnost způsobující extrémně pomalý růst buněk.



Obr. 23. | Vliv inaktivace katalytického místa Wss1p na její aktivitu

(A) Schématické znázornění struktury transformovaných genů *WSS1* a *wss1^{E116Q}*; (E116Q) – bodová mutace způsobující inaktivaci aktivního centra nahrazením katalytického glutamátu za glutamin. (WLM) – oblast kódující WLM doménu *Wss1p*; (VIM, SHP) – oblasti kódující domény VIM a SHP, které interagují s *Cdc48*; (DBD) – oblast kódující doménu vázající DNA; (SIM1, SIM2) – oblasti kódující domény SIM1 a SIM2, které interagují se *Stm3p*.

(B) Analýza komplementačních experimentů bodovým testem pro porovnání vlivu transformovaných genů *WSS1* a *wss1^{E116Q}* na životaschopnost

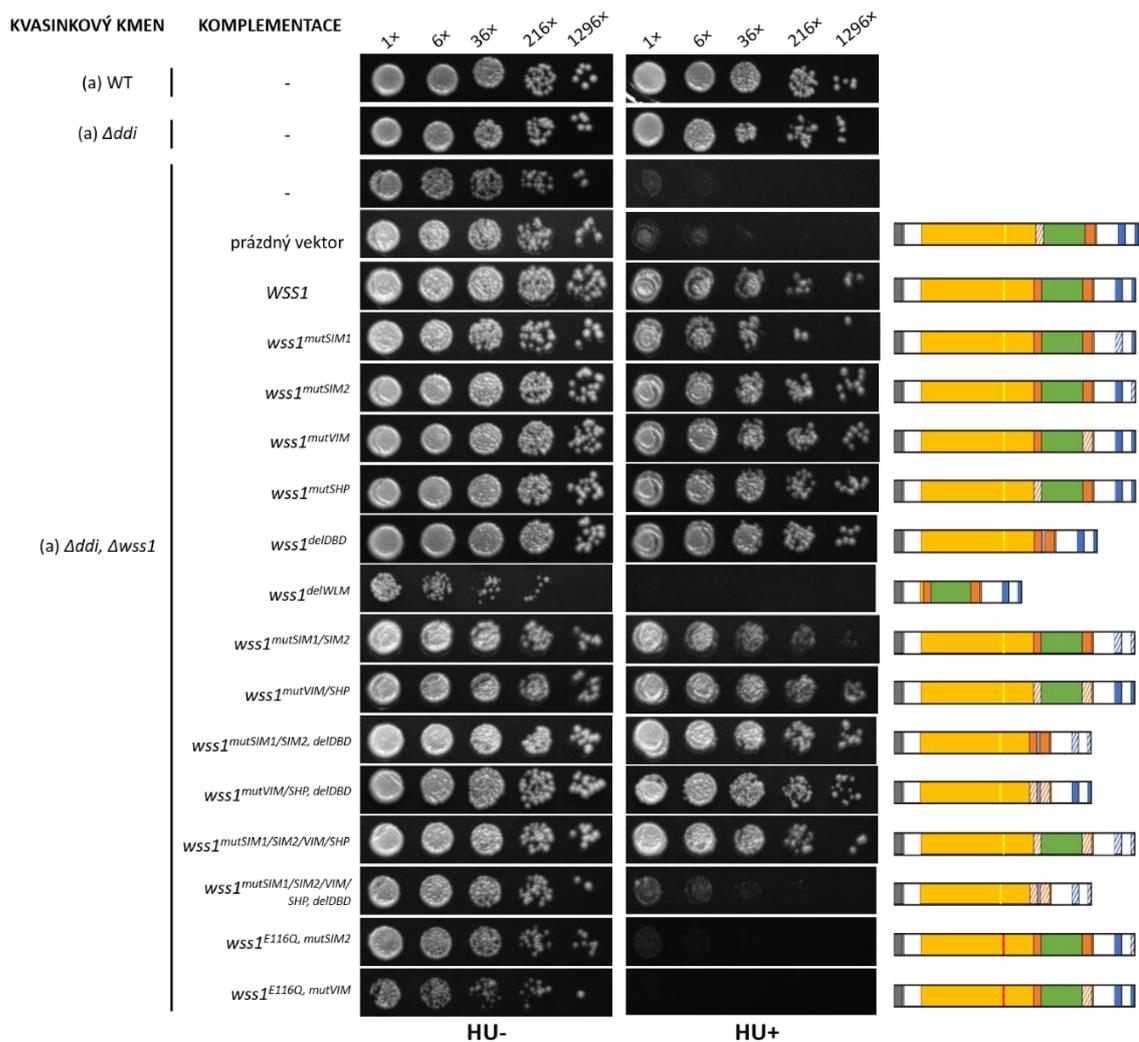
kvasinkových buněk na selekčním SC URA(-) agarosovém médiu. Kvasinkové kmeny [a] $\Delta wss1$, [a] $\Delta ddi1\Delta wss1$ a [α] $\Delta wss1\Delta ddi1$ byly komplementovány prázdným vektorem pAG416GAL a expresními klony pAG416GAL s *HA-WSS1* nebo *HA-wss1^{E116Q}* pod kontrolou indukčního Gal1 promotoru. Všechny transformované konstrukty kódovali geny pro syntézu uracilu. Exponenciálně narostlé kultury kvasinkových buněk byly nanášeny v 5× sériové řadě na SC URA(-) agarosové médium s glukózou (Glu) a galaktózou (Gal) a inkubovány 72 hodin při 30 °C.

5.8 ANALÝZA ROLE *wss1p* V BUNĚČNÉ ODPOVĚDI NA GENOTOXICKÉ PŮSOBNÍ HYDROXYMOČOVINY

Pro charakterizaci role *Wss1p* v buněčné odpovědi na působení HU a vlivu jednotlivých domén na tuto funkci byla provedena analýza pomocí bodového testu, při které byla porovnávána citlivost několika kmenů na působení HU. Konkrétně kvasinkových kmenů s nativními geny *WSS1* a *DDI1* ([a] WT, [α] WT), kmenů postrádajících *DDI1* ([a] $\Delta ddi1$, [α] $\Delta ddi1$) a kmenů bez *WSS1* i *DDI1* ([a] $\Delta ddi1\Delta wss1$, [α] $\Delta wss1\Delta ddi1$), které byly navíc komplementovány expresními klony pAG416GAL s *HA-WSS1*, nebo jeho mutantními variantami, včetně variant *wss1^{E116Q, mutSIM2}* a *wss1^{E116Q, mutVIM}*.

Výsledky experimentů ukazují (viz obr. 24), že současná delece genů *WSS1* a *DDI1* byla za přítomnosti genotoxické HU synteticky letální. Tento fenotyp byl komplementován WT variantou *WSS1*, nikoliv však variantou bez WLM domény (*wss1^{delWLM}*). Oproti tomu, inaktivace domén zodpovědných za interakci s Cdc48p (*wss1^{mutVIM}*, *wss1^{mutSHP}*, *wss1^{mutVIM/SHP}*), se Smt3p (*wss1^{mutSIM1}*, *wss1^{mutSIM2}*, *wss1^{mutSIM1/SIM2}*) ani samotná delece domény vázající DNA (*wss1^{delDBD}*) neměly na funkci proteinu žádný pozorovatelný vliv. Obdobně na funkci neměly vliv ani úpravy, při kterých zůstaly kromě WLM aktivní pouze domény zodpovědné za interakci s Cdc48p (*wss1^{mutSIM1/SIM2, delDBD}*), se Smt3p (*wss1^{mutVIM/SHP, delDBD}*) nebo s DNA (*wss1^{mutSIM1/SIM2/VIM/SHP}*). Až kombinované vyloučení všech těchto domén (*wss1^{mutSIM1/SIM2/VIM/SHP, delDBD}*) vedlo k podobnému fenotypu jako při komplementaci prázdným vektorem.

Dále lze dle výsledků bodového testu konstatovat, že ačkoliv inaktivace domény VIM nebo SIM2 částečně zvrátily silně negativní důsledek mutace E116Q (viz kapitola 5.7), žádná z těchto variant přesto nekomplementovala fenotyp současné ztráty *WSS1* a *DDI1*.



Obr. 24. | Role proteasy Wss1p v buněčné odpovědi na genotoxické působení HU a vliv interakčních domén na její funkci.

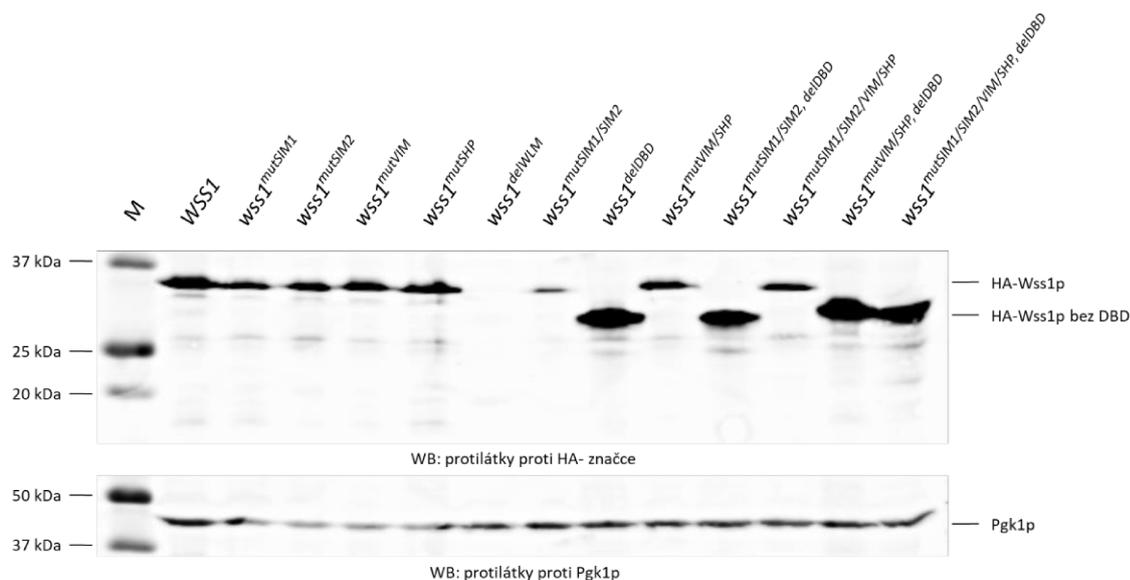
Kvasinkové kmeny [a] $\Delta ddi1\Delta wss1$ a [α] $\Delta wss1\Delta ddi1$ byly komplementovány prázdným vektorem pAG416GPD-ccdB a sadou expresních klonů nesoucí HA-označený *WSS1* nebo jeho varianty, a testovány na citlivost vůči působení HU. Všechny geny klonované v expresních vektorech byly pod kontrolou konstitutivního GPD promotoru. Kvasinkové buňky byly naneseny v 5× sériové řadě na YPD agarosová média bez a s 0,5M koncentrací HU a inkubovány 72 hodin při 30 °C. V pravé části obrázku jsou schematicky znázorněny struktury komplementovaných genů v transformovaných expresních klonech. (E116Q) – bodová mutace způsobující inaktivaci aktivního centra enzymu nahrazením katalytického glutamátu za glutamin. (WLM) – oblast kódující WLM proteázovou část Wss1p; (VIM, SHP) – oblasti kódující domény VIM a SHP, které interagují s Cdc48; (SIM1, SIM2) – oblasti kódující domény SIM1 a SIM2, které interagují se Stm3p.

5.9 OVĚŘENÍ EXPRESE ZKOUMANÝCH GENŮ V KVASINKOVÝCH BUŇKÁCH

Pro ověření exprese zkoumaných genů byly z komplementovaných kvasinkových buněk připraveny exponenciálně rostoucí kultury v SC URA(-) selekčním médiu, z nichž byly posléze izolovány denaturované buněčné proteiny. Tyto proteiny byly podrobeny elektroforéze v polyakrylamidovém gelu obsahujícím SDS, a poté přeneseny na

membránu. Přítomnost rekombinantních HA- značených proteinů byla detekována pomocí králičí monoklonální protilátky specifické proti HA- značce a IRDye® 800CW kozí polyklonální anti-králičí IgG protilátky. Jako kontrola nanášky byl vybrán nativní protein 3-phosphoglycerát kinasa (Pgk1p), který byly detekován kombinací myší monoklonální primární protilátky specifické proti Pgk1p a sekundární IRDye® 680RD kozí polyklonální anti-myší IgG protilátky.

Z výsledků dokumentovaných na obr. 25 je patrné, že velikost pozorovaných proteinů Wss1 odpovídala předpokládané velikosti 31,8 kDa, u variant s odstraněnou doménou DBD pak velikosti 27 kDa. U vzorku s *wss1^{delWLM}* ovšem nebyly přítomny žádné proteiny Wss1. U všech vzorků kromě *wss1^{delWLM}*, je dále patrná přítomnost menších proteinů o různé velikosti, které pravděpodobně představují degradační produkty zkoumaných proteinů. Souhrnně tyto výsledky prokazují, že kromě *wss1^{delWLM}* byly všechny transformované geny v kvasinkových buňkách úspěšně produkovány. Kontrolní protein Pgk1p byl přítomen ve všech testovaných vzorcích. Z jeho množství je ale patrné, že u vzorků *wss1^{mutSIM1}*, *wss1^{mutSIM2}*, *wss1^{mutVIM}*, *wss1^{mutSHP}* bylo oproti ostatním vzorkům naneseno menší množství izolovaných proteinů.



Obr. 25. |Ověření produkce rekombinantního HA-Wss1p a jeho upravených variant v kvasinkových buňkách.

Vzorky denaturovaných proteinů z exponenciálně rostoucích kultur kvasinkových buněk ([a] Δ *ddi1* Δ *wss1*), které byly komplementovány připravenými expresními klony pAG416GPD nesoucí HA- značený *WSS1* nebo jeho upravené varianty, byly podrobeny SDS-PAGE a následné imunodetekci pomocí kombinace primárních protilátek proti HA- značce a Pgk1, a sekundárních fluorescenčně značených protilátek. Množství Pgk1 sloužilo jako kontrola nanášky. (M) – All blue standard molekulových hmotností.

6 DISKUZE

Metaloproteasa Wss1 z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* je zástupce nedávno objevené opravné dráhy označované jako proteolytická oprava DNA. Společně s dalšími mechanismy zajišťuje tato dráha buněčnou odpověď na přítomnost proteinů kovalentně zachycených na DNA, které brání postupu replikačních vidliček.

Role proteasy Wss1 spočívá v degradaci proteinové části DPC, načež zůstává na DNA navázán pouze malý peptidový zbytek, jehož odstranění je dále zajištěno ostatními opravnými mechanismy, popřípadě je jeho přítomnost tolerována translesními polymerasami. Aktivita Wss1p je ovlivněna vazbou na DNA i interakcemi s proteiny Cdc48 a SUMO proteinem Smt3. Dosavadní výsledky studií ovšem naznačují, že nezbytnost interakcí s těmito proteiny se liší v závislosti na daných podmínkách (Stingele *et al.* 2014, Balakirev *et al.* 2015).

Další kvasinkovou proteasou, která se účastní buněčné odpovědi na poškození DNA a kontroly buněčného cyklu je aspartátová proteasa Ddi1 (Díaz-Martínez *et al.* 2006), jejíž homology najdeme ve všech eukaryotických organismech. Exprese Ddi1p je indukována drahami signalizujícími poškození DNA (Zhu & Xiao 1998), přičemž Ddi1p se účastní ubiquitin-proteasomální degradace jako receptor zajišťující vazbu ubiquitinovaného substrátu a 19S podjednotky proteasomu (Saeki *et al.* 2002). Společně s Rad23p stabilizují mitotický kontrolní protein Pds1p, čímž zabraňují jeho degradaci, jenž je jinak zapotřebí pro postup v buněčném cyklu (Clarke *et al.* 2001, Gabriely *et al.* 2008). Ddi1p dále zajišťuje proteasomální degradaci HO endonukleasy (Kaplun *et al.* 2005) a proteinu Ufo1 (Ivantsiv *et al.* 2006, Gomez *et al.* 2011). Ddi1p též funguje jako negativní regulátor exocytózy skrze vyvazování SNARE proteinů (Marash & Gerst 2003, Gabriely *et al.* 2008). Proteolytická aktivita Ddi1p byla doposud prokázána pouze nepřímo (Gabriely *et al.* 2008, White *et al.* 2011). Bylo ovšem objeveno, že homology Ddi1p v lidských buňkách a v buňkách *C. elegans*, zajišťují štěpení a aktivaci transkripčního faktoru NRF1, který je dále přenesen do jádra, kde aktivuje syntézu proteasomálních podjednotek (Koizumi *et al.* 2016, Lehrbach & Ruvkun 2016). Současná ztráta obou genů *WSS1* a *DDI1* vykazuje v kvasinkových buňkách syntetickou interakci snižující životaschopnost (Costanzo *et al.* 2016). Výsledky získané v laboratoři školitelky dále prokazují, že se tento efekt ještě výrazně zesiluje působením genotoxické hydroxymočoviny (Svoboda *et al.* 2019, výsledky v recenzním řízení). Je známo, že HU inhibuje činnost ribonukleotid-reduktasy, což způsobuje nedostatek dNTP, kvůli čemuž dochází k zastavení replikačního aparátu. V konečném důsledku tak HU zastavuje buňky v S-fázi buněčného cyklu.

Výsledky experimentů z laboratoře školitelky dále prokazují, že pozorovaný fenotyp současné ztráty genů *WSS1* a *DDI1* lze zachránit nadprodukcí proteinu Ddi1, avšak jeho funkce je závislá na proteolytické aktivitě RVP domény a přítomnosti HDD domény (Svoboda *et al.* 2019, výsledky v recenzním řízení). Vystává tak otázka, jakou úlohu má za těchto podmínek protein Wss1, zda lze jeho nadprodukcí zachránit pozorovaný fenotyp, a které domény Wss1p jsou pro jeho funkci v dané situaci nezbytné.

V první fázi tohoto projektu byly proto připraveny plasmidové konstrukty s vloženým genem *WSS1* nebo jeho vhodně upravenými variantami s inaktivovanými či deletovanými interakčními doménami. Pro ověření vlivu proteolytické aktivity na funkci Wss1p byla nejprve připravena proteolyticky neaktivní varianta *wss1^{E116Q}*. Na konce genů *WSS1* a *wss1^{E116Q}* byly poté ve dvou krocích klonovány specifické rekombinační sekvence *attB*, díky kterým bylo možné využít technologii Gateway® pro přípravu plasmidových konstruktů. Geny *WSS1* a *wss1^{E116Q}* byly pomocí místně specifické rekombinační reakce nejprve přeneseny do pomocných vektorů pDONR221. Pro pozdější ověření exprese v kvasinkových buňkách byla na konce přenesených *WSS1* a *wss1^{E116Q}* klonována sekvence pro HA-afinitní značku. Komplikace při klonování této sekvence v podobě řady nespecifických produktů byla pravděpodobně zapříčiněna délkou a strukturou připravených mutačních primerů, kvůli čemuž nespecificky nasedaly na více míst templátové DNA.

Z konstruktů nesoucích *HA-WSS1* a *HA-wss1^{E116Q}* byly postupně v několika krocích připraveny další varianty, jež měly jednotlivě, či v různých kombinacích, inaktivovány a deletovány interakční domény WLM, DBD, VIM, SHP, SIM1 a SIM2. Následně byly požadované varianty rekombinačně přeneseny z vektorů pDONR221 do finálních vektorů pAG416GPD-ccdB umožňující jejich produkci v kvasinkových buňkách.

Během transformace kvasinkových kmenů připravenými konstrukty bylo pozorováno, že buňky postrádající současně geny *WSS1* i *DDI1* (kmen č. 7 a 8) vykazovaly po komplementaci katalyticky inaktivní variantou *wss1^{E116Q}* letální fenotyp. Vystala tak otázka, zda je tento pozorovaný fenotyp důsledkem nezamýšlené mutace, inaktivující selekční gen *URA3*, či špatně provedené transformace. Obě tyto možnosti byly ale vyloučeny vícenásobným opakováním přípravy daného konstruktů a opětovnou transformací, kdy byl pozorován stále stejný výsledek. Pro ověření, zda je pozorovaný fenotyp zapříčiněn produkcí proteinu Wss1^{E116Q}, byly geny *WSS1* a *wss1^{E116Q}* přeneseny do vektoru pAG416GAL-ccdB pod indukční promotor GAL1. Výsledky komplementačních testů pak ukazují, že v případě, kdy exprese *wss1^{E116Q}* nebyla indukována, vykazovaly mutantní buňky bez *WSS1* i *DDI1* normální růst. Indukce exprese *wss1^{E116Q}* ovšem opět způsobovala již pozorovaný letální fenotyp. Je tedy patrné, že na rozdíl od situace, kdy

Wss1p není vůbec produkován, způsobuje nadprodukce katalyticky inaktivní varianty Wss1^{E116Qp} v kvasinkových buňkách postrádajících *WSS1* a *DDI1* výrazné snížení životaschopnosti, aniž by byly tyto buňky vystaveny genotoxickému působení HU. Podobné výsledky byly pozorovány i ve studii (Balakirev *et al.* 2015). Nadprodukce katalyticky inaktivní varianty Wss1p, která byla v tomto případě ale tvořena mutacemi H115N a E116K, umocňovala u buněk *S. cerevisiae* fenotyp současné ztráty *WSS1* a *TDP1*, který se projevoval poruchami v růstu, hromaděním sumoylovaných Top1p a dalších sumoylovaných proteinů navázaných na DNA. Pozorovaný dopad nadprodukce proteinu Wss1^{H115N, E116K} na životaschopnost mutantních buněk bez *WSS1* a *TDP1* ovšem nebyl tak výrazný, jako v případě nadprodukce Wss1^{E116Qp} v mutantních buňkách bez *WSS1* a *DDI1*. Navíc, buňky postrádající pouze *WSS1* nevykazovaly po komplementaci *wss1^{E116Q}* žádné problémy s vitalitou, což naznačuje, že pozorovaný letální fenotyp není důsledkem prosté nadprodukce Wss1^{E116Qp}, ale že je zde klíčová i současná absence *DDI1*. Tyto výsledky tak poukazují na přímý nebo nepřímý vliv mezi *DDI1* a *WSS1*, kdy je Ddi1p schopen potlačit efekt nadprodukce Wss1^{E116Qp}.

K objasnění vzájemného vztahu proteinu *DDI1* a *WSS1* by bylo vhodné provést experiment, při kterém by byly kvasinkové buňky postrádající *DDI1* a *WSS1* souběžně transformovány dvěma inducibilními vektory: první by nesl gen *HA-wss1^{E116Q}*, druhý pak katalyticky aktivní nebo neaktivní variantu *DDI1*, opatřenou jinou značkou. Po úvodním nárůstu kvasinkových buněk by byla nejprve indukována exprese *HA-wss1^{E116Q}* vyvolávající snížení životaschopnosti. Po vhodně dlouhém časovém odstupu nezbytném pro produkci významného množství Wss1^{E116Qp} by byla indukována exprese vybrané varianty *DDI1* z druhého plasmidu. Pakliže by k záchraně letálního fenotypu způsobeného nadprodukcí Wss1^{E116Qp} stačila inaktivní varianta *DDI1*, znamenalo by to, že Ddi1p nevyžaduje pro svou funkci v dané situaci katalytickou aktivitu. Současně by bylo vhodné sledovat, zda v těchto buňkách dochází k postupnému odstraňování produkováných Wss1^{E116Qp}.

Je známo, že v přítomnosti DNA Wss1p proteolyticky štěpí sám sebe *in-trans* a inaktivace katalytické aktivity způsobuje hromaděním Wss1p v kvasinkových buňkách (Stingle *et al.* 2014, Balakirev *et al.* 2015). Balakirev *et al.* ve své studii dále prokazují, že neaktivovaný Wss1p vykazuje SUMO-ligasovou aktivitu, kdy sumoyluje sám sebe a okolní proteiny, načež se po aktivaci vazbou DNA štěpí a degraduje i ostatní proteiny. Možným vysvětlením pozorovaného fenotypu po indukci exprese Wss1^{E116Qp} tak může být, že se katalyticky neaktivní Wss1^{E116Qp} váže do míst zastavených replikačních vidliček, kde sumoyluje sebe i ostatní proteiny, čímž indukuje vazbu dalších Wss1^{E116Qp} a interakčních partnerů (kupř. Cdc48p/Doa1p). Jelikož ale není Wss1^{E116Qp} schopen štěpit ani substrát,

ani sám sebe, dochází k jeho hromadění v místě poškození DNA. Hromadí se Wss1^{E116Qp} dále sumoyluje sebe o okolní proteiny, zvyšuje signalizaci buněčné odpovědi a indukuje asociaci dalších buněčných proteinů účastnících se opravy DNA. Postupné hromadění sumoylovaných a ubikvitinovaných proteinů asociovaných s DNA vyúsťuje v selhání signalizačních drah, poškození vláken DNA a spuštění buněčné apoptózy. Tuto teorii podporují výsledky následujícího experimentu, které ukazují, že pokud byla vedle mutace E116Q inaktivována ještě doména VIM (menší míra vazby interakčních partnerů) nebo SIM2 (menší míra vazby interakčních partnerů/ukončení sumoylace), došlo ke zlepšení životaschopnosti komplementovaných buněk v normálních podmínkách.

Z výsledků bodových testů pro analýzu role Wss1p v buněčné odpovědi na genotoxické působení HU a vlivu jednotlivých domén na tuto funkci je patrné, že ztráta genu *WSS1* nebo *DDI1* nemá na životaschopnost kvasinkových buněk v testovaných podmínkách žádný vliv. Současná delece obou těchto genů ovšem zapříčiňuje patologickou přecitlivělost na působení HU, což potvrzuje dosavadní výsledky laboratoře školitelky (výsledky v recenzním řízení). Obdobně jako tomu bylo v případě Ddi1p lze pozorovaný fenotyp ztráty *DDI1* s *WSS1* komplementovat nadprodukcí WT varianty Wss1p. Je tak patrné, že pro překonání důsledku působení HU je nezbytná přítomnost alespoň jednoho z výše zmíněných proteinů. Na základě těchto výsledků se dá tedy předpokládat, že Wss1p a Ddi1p působí paralelně a představují zástupné cesty buněčné odpovědi na působení HU.

Z výsledků je dále patrné, že za normálních podmínek (bez přítomnosti HU) způsobuje nadprodukce Wss1^{delWLMp} v kvasinkách postrádajících současně *DDI1* částečné snížení životaschopnosti. Pozorovaný rozdíl mezi letálním fenotypem při nadprodukcí Wss1^{E116Qp}, a pouze částečným snížením životaschopnosti při nadprodukcí Wss1^{delWLMp} za normálních podmínek bez HU, může být vysvětlen na základě předpokládaného mechanismu SUMO-ligasové aktivity Wss1p a role cysteinu C226 (Balakirev *et al.* 2015). Předpokládá se, že tvorba intramolekulární disulfidové vazby mezi C-koncovými cysteiny C226 a cysteiny C96 a C108, nacházejícími v oblasti WLM domény, podporuje oligomerizaci Wss1p, která se následně projevuje nárůstem SUMO-ligasové aktivity. Oproti mutantní variantě Wss1^{E116Qp} postrádá Wss1^{delWLMp} cysteiny C96 a C108, díky čemuž může být omezena oligomerizace Wss1^{delWLMp} a s tím související SUMO-ligasová aktivita, která by jinak mohla být zodpovědná za letální fenotyp. Alternativně, odebrání velké části WLM domény může oproti mutaci E116Q výrazně měnit finální konformaci Wss1p, čímž se z něj stává zcela nefunkční odpadní protein, jehož nadprodukce a následná degradace buňku silně zatěžuje. Pro ověření této hypotézy by bylo vhodné provést experiment, při kterém by byl v kvasinkových buňkách bez *DDI1* a *WSS1* nadprodukován

Wss1^{E116Qp}, jež by měl současně nahrazen cystein C226 za jinou vhodnou aminokyselinu. V ideálním případě by pak tyto buňky měly vykazovat výrazně lepší životaschopnost než buňky nadprodukcující Wss1^{E116Qp}.

Výsledky bodových testů dále naznačují, že pro odvrácení patologické přecitlivělosti na HU pomocí nadprodukce Wss1p je vyžadována proteolytická aktivita WLM domény. V kontrastu s nepostradatelností aktivního místa WLM domény nebyla funkce Wss1p v buněčné odpovědi na působení HU ovlivněna inaktivací domén zodpovědných za vazbu s Cdc48 (VIM, SHP, SHP/VIM), domén interagujících se SUMO proteinem Smt3 (SIM1, SIM2, SIM1/SIM2), ani delecí domény vázající DNA (DBD). Ztráta schopnosti komplementovat fenotyp současné ztráty *WSS1* s *DDI1* byla pozorována až při současném vyloučení všech těchto interakčních domén. Z výsledků je tak patrné, že pro správnou funkci Wss1p v buněčné odpovědi na HU je zapotřebí vedle proteolytické aktivity ještě schopnost interagovat s alespoň jedním partnerem z trojice Cdc48p, Smt3p a DNA.

Správná funkce konstruktů postrádající DBD doménu je ale v rozporu s výsledky studie (Stingele *et al.* 2014) dokazující závislost proteolytické aktivity Wss1 na vazbě DNA. Vysvětlením pozorovaného fenotypu může být situace, kdy delece DBD domény způsobuje změnu výsledné konformace proteinu, jejímž důsledkem je narušení inhibice aktivního místa koncovým cysteinem C226 (mechanismus cysteinového přepínače), díky čemuž dojde k uvolnění proteolytické aktivity (Balakirev *et al.* 2015).

Nezbytnost interakce Wss1p s Cdc48p *in vivo* byla prokázána v souvislosti s opravou kovalentně zachycené Top1p a DPC indukovaných formaldehydem (Stingele *et al.* 2014, Balakirev *et al.* 2015). Výsledky komplementace konstrukty postrádajícími domény VIM a SHP ale ukazují, že interakce s Cdc48p v tomto případě není klíčové. Genotoxické působení HU tak zřejmě představuje jiné podmínky pro vyvolání buněčné odpovědi na poškození DNA, s odlišným mechanismem působení Wss1p. U varianty Wss1p, mající pouze proteolytickou aktivitu a aktivní vazbu Cdc48p, mohla ztráta cysteinové inhibice skrze delecí DBD domény způsobit, že je Wss1p naveden interakcí s Cdc48 na místo poškození DNA, kde i bez vazby DNA štěpí cílový substrát. Alternativně může docházet k tvorbě komplexu Wss1p/Cdc48p/Doa1p, který specificky navádí substrát do vakuoly, kde je degradován (Balakirev *et al.* 2015).

Aktivita Wss1p při současné ztrátě schopnosti vázat protein Smt3p byla zdokumentována již dříve (Stingele *et al.* 2014, Balakirev *et al.* 2015). Oproti předchozím studiím je ale aktivita Wss1p pozorována i v případě, že je proteinu ponechána pouze doména WLM společně se SIM1 a SIM2. Obdobně jako v případě interakce s Cdc48p tak odlišné podmínky při působení HU zřejmě přikládají vazbě SUMO proteinů větší roli, než

bylo doposud pozorováno při opravě zachyceného Top1p a DPCs indukovaných formaldehydem. Tento efekt může být výsledkem uvolnění mechanismu cysteinového prepínače (ztráta DBD) a postradatelného vlivu vazby s Cdc48p (viz předchozí odstavec). Alternativně může v buněčné odpovědi na působení HU hrát Wss1p významnou roli při metabolismu SUMO proteinů v oblasti poškozené DNA (Balakirev *et al.* 2015). Získané výsledky společně s výsledky dřívějších studií souhrnně naznačují, že se Wss1p souběžně účastní více mechanismů buněčné odpovědi na poškození DNA.

Na závěr byla ověřena exprese transformovaných genů v kvasinkových buňkách pomocí imunodetekce. Výsledky potvrzují úspěšnou produkci všech proteinových variant kromě proteinu Wss1^{delWLM}. Absence Wss1^{delWLM}p může být vysvětlena již zmiňovanou chybnou strukturou, která zapříčiňuje jeho okamžitou degradaci. V průběhu příprav a z výsledků bodových testů je ale patrný fenotyp produkce Wss1^{delWLM} v kvasinkových buňkách.

7 SOUHRN

- Pomocí kombinace několika molekulárních technik byla úspěšně připravena sada 20 pomocných a 18 expresních plasmidových konstruktů nesoucí gen *WSS1*, nebo jeho upravené varianty s různými kombinacemi inaktivovaných či deletovaných interakčních domén VIM, SHP, SIM1, SIM2, DBD, WLM a aktivního místa E116.
- Všechny varianty genu *WSS1* byly po transformaci do testovaných kmenů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* exprimovány.
- Současná ztráta genů *DDI* a *WSS1* vyvolává přecitlivělost kvasinkových buněk na genotoxické působení HU. Pozorovaný fenotyp lze zvrátit nadprodukcí WT *Wss1p*. Proteiny *Ddi1* a *Wss1* tedy zřejmě působí paralelně a představují zástupné cesty buněčné odpovědi na působení HU.
- Pro správnou funkci *Wss1p* v buněčné odpovědi na působení HU je nezbytná její proteolytická aktivita a schopnost interagovat s alespoň jedním partnerem z trojice *Cdc48*, *Smt3* a DNA.
- Mutace E116Q v aktivním místě *Wss1p* způsobuje prokazatelný pokles životaschopnosti buněk postrádajících *DDI1* a *WSS1*. *Ddi1p* je schopen potlačit efekt nadprodukce *Wss1^{E116Qp}*, což naznačuje jejich vzájemný přímý či nepřímý vliv.

8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Abbott, P.J., Saffhill, R., 1979. DNA synthesis with methylated poly(dC-dG) templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O6-methylguanine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 562, 51–61.
- Aguilar, F., Hussain, S.P., Cerutti, P., 1993. Aflatoxin B1 induces the transversion of G->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90, 8586–8590.
- Aparicio, T., Baer, R., Gottesman, M., Gautier, J., 2016. MRN, CtIP, and BRCA1 mediate repair of topoisomerase II-DNA adducts. *Journal of Cell Biology* 212, 399–408.
- Balakirev, M.Y., Mullally, J.E., Favier, A., Assard, N., Sulpice, E., Lindsey, D.F., Rulina, A.V., Gidrol, X., Wilkinson, K.D., 2015. Wss1 metalloprotease partners with Cdc48/Doa1 in processing genotoxic SUMO conjugates. *eLife* 4, e06763.
- Barker, S., Weinfeld, M., Murray, D., 2005. DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 589, 111–135.
- Benzer, S., Freese, E., 1958. Induction of Specific Mutations with 5-Bromouracil. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 44, 112–119.
- Bernstein, H., Payne, C.M., Bernstein, C., Garewal, H., Dvorak, K., 2008. Cancer and aging as consequences of un-repaired DNA damage. *New Research on DNA Damages* 1–47.
- Bernstein, C., Prasad, A.R., Nfonam, V., Bernstein, H., 2013. DNA Damage, DNA Repair and Cancer. In *New Research Directions in DNA Repair*.
- Best, B.P., 2009. Nuclear DNA Damage as a Direct Cause of Aging. *Rejuvenation Research* 12, 199–208.
- Bhatti, P., Mirick, D.K., Randolph, T.W., Gong, J., Buchanan, D.T., Zhang, J. (Jim), Davis, S., 2017. Oxidative DNA damage during night shift work. *Occupational and Environmental Medicine* 74, 680–683.
- Blackford, A.N., Jackson, S.P., 2017. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell* 66, 801–817.
- Boiteux, S., Guillet, M., 2004. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 3, 1–12.
- Branzei, D., Foiani, M., 2008. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 297–308.
- Brovarets', O.O., Pérez-Sánchez, H., 2017. Whether 2-aminopurine induces incorporation errors at the DNA replication? A quantum-mechanical answer on the actual biological issue. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 35, 3398–3411.
- De Carvalho, N.C., Neves, S.P., Dias, R.B., Valverde, L.d.F., Sales, C.B.S., Rocha, C.A.G., Soares, M.B.P., *et al.* 2018. A novel ruthenium complex with xanthoxylin induces S-phase arrest and causes ERK1/2-mediated apoptosis in HepG2 cells through a p53-independent pathway article. *Cell Death and Disease* 9, 1–24

- Centore, R.C., Yazinski, S.A., Tse, A., Zou, L., 2012. Spartan/C1orf124, a Reader of PCNA Ubiquitylation and a Regulator of UV-Induced DNA Damage Response. *Molecular Cell* 46, 625–635.
- Ciccia, A., Elledge, S.J., 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40, 179–204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>
- Cimino, G.D., Gamper, H.B., Isaacs, S.T., Hearst, J.E., 1985. Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry. *Annual Review of Biochemistry* 54, 1151–1193.
- Clarke, D.J., Mondesert, G., Segal, M., Bertolaet, B.L., Jensen, S., Wolff, M., Henze, M., Reed, S.I., 2001. Dosage Suppressors of pds1 Implicate Ubiquitin-Associated Domains in Checkpoint Control. *Molecular and Cellular Biology* 21, 1997–2007.
- Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W., Koshland, D., 1996. Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes & Development* 10, 3081–3093.
- Connelly, J.C., de Leau, E.S., Leach, D.R.F., 2003. Nucleolytic processing of a protein-bound DNA end by the *E. coli* SbcCD (MR) complex. *DNA Repair* 2, 795–807.
- Costanzo, M., VanderSluis, B., Koch, E.N., Baryshnikova, A., Pons, C., Tan, G., Wang, W., Usaj, M., Hanchard, J., Lee S.D., *et al.*, 2016. A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. *Science* 353, aaf1420-1–aaf1420-14
- Cotta-Ramusino, C., Fachinetti, D., Lucca, C., Doksan, Y., Lopes, M., Sogo, J., Foiani, M., 2005. Exo1 Processes Stalled Replication Forks and Counteracts Fork Reversal in Checkpoint-Defective Cells. *Molecular Cell* 17, 153–159.
- Covey, J.M., Jaxel, C., Kohn, K.W., Pommier, Y., 1989. Protein-linked DNA Strand Breaks Induced in Mammalian Cells by Camptothecin, an Inhibitor of Topoisomerase I. *Cancer Research* 49, 5016–5022.
- Das, B.B., Huang, S.N., Murai, J., Rehman, I., Amé, J.C., Sengupta, S., Das, S.K., Majumdar, P., Zhang, H., Biard, D., *et al.*, 2014. PARP1-TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage. *Nucleic Acids Research*.
- Dasari, S., Bernard Tchounwou, P., 2014. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* 740, 364–378.
- De Graaf, B., Clore, A., McCullough, A.K., 2009. Cellular pathways for DNA repair and damage tolerance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks. *DNA Repair* 8, 1207–1214.
- Delaney, J.C., Essigmann, J.M., 2004. Mutagenesis, genotoxicity, and repair of 1-methyladenine, 3-alkylcytosines, 1-methylguanine, and 3-methylthymine in alkB *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 14051–14056.
- DeMott, M.S., Beyret, E., Wong, D., Bales, B.C., Hwang, J.-T., Greenberg, M.M., Demple, B., 2002. Covalent Trapping of Human DNA Polymerase β by the Oxidative DNA Lesion 2-Deoxyribonolactone. *Journal of Biological Chemistry* 277, 7637–7640.
- Deshpande, R.A., Lee, J.-H., Arora, S., Paull, T.T., 2016. Nbs1 Converts the Human Mre11/Rad50

- Nuclease Complex into an Endo/Exonuclease Machine Specific for Protein-DNA Adducts. *Molecular Cell* 64, 593–606.
- Díaz-Martínez, L.A., Kang, Y., Walters, K.J., Clarke, D.J., 2006. Yeast UBL-UBA proteins have partially redundant functions in cell cycle control. *Cell Division* 1, 28.
- Dizdaroglu, M., 1992. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutation Research/DNAging* 275, 331–342.
- Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbø, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Peña-Díaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., Krokan, H.E., 2004. Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair* 3, 1389–1407.
- Duxin, J.P., Dewar, J.M., Yardimci, H., Walter, J.C., 2014. Repair of a DNA-Protein Crosslink by Replication-Coupled Proteolysis. *Cell* 159, 346–357.
- El-Khamisy, S.F., 2011. To live or to die: a matter of processing damaged DNA termini in neurons. *EMBO Molecular Medicine* 3, 78–88.
- Engels, W.R., Johnson-Schlitz, D.M., Flores, C., White, L., Preston, C., 2007. A Third Link connecting Aging with Double Strand Break Repair. *Cell Cycle* 6, 131–135.
- Fleming, A.M., Ding, Y., Burrows, C.J., 2017. Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:
- Freitas, A.A., de Magalhães, J.P., 2011. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 728, 12–22.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., Ellenberger, T., 2006. *DNA Repair and Mutagenesis*, Second Edition. American Society of Microbiology.
- Fu, Y.V., Hasan Y., David T. L., Vinh, H., Guainazzi, A., Bermudez, V.P., Hurwitz, J., Van Oijen, A., Schärer, O.D., Walter, J.C. 2011. Selective bypass of a lagging strand roadblock by the eukaryotic replicative DNA helicase. *Cell* 146: 931–41.
- Gabriely, G., Kama, R., Gelin-Licht, R., Gerst, J.E., 2008. Different Domains of the UBL-UBA Ubiquitin Receptor, Ddi1/Vsm1, Are Involved in Its Multiple Cellular Roles. *Molecular Biology of the Cell* 19, 3625–3637.
- Garaycochea, J.I., Crossan, G.P., Langevin, F., Daly, M., Arends, M.J., Patel, K.J., 2012. Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. *Nature* 489, 571–575. <https://doi.org/10.1038/nature11368>
- Ghosal, G., Leung, J.W.-C., Nair, B.C., Fong, K.-W., Chen, J., 2012. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)-binding Protein C1orf124 Is a Regulator of Translesion Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 287, 34225–34233. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400135>
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison III, C.A., Smith, H.O., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* 6, 343–345.
- Gietz, R.D., Woods, R.A., 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method, *In: Guthrie, C., Fink, G.R. (Eds.), Methods in Enzymology, Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology - Part B*. Academic Press, pp. 87–96.

- Gomez, T.A., Kolawa, N., Gee, M., Sweredoski, M.J., Deshaies, R.J., 2011. Identification of a functional docking site in the Rpn1 LRR domain for the UBA-UBL domain protein Ddi1. *BMC Biology* 9,
- Gómez-Herreros, F., Romero-Granados, R., Zeng, Z., Álvarez-Quilón, A., Quintero, C., Ju, L., Umans, L., Vermeire, L., Huylebroeck, D., Caldecott, K.W., Cortés-Ledesma, F., 2013. TDP2-Dependent Non-Homologous End-Joining Protects against Topoisomerase II-Induced DNA Breaks and Genome Instability in Cells and In Vivo. *PLOS Genetics* 9, 1-15.
- Gorbunova, V., Seluanov, A., Mao, Z., Hine, C., 2007. Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Res* 35, 7466-7474.
- Hamilton, M.L., Remmen, H.V., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A., Richardson, A., 2001. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 10469-10474.
- Hartsuiker, E., Neale, M.J., Carr, A.M., 2009. Distinct Requirements for the Rad32Mre11 Nuclease and Ctp1CtIP in the Removal of Covalently Bound Topoisomerase I and II from DNA. *Molecular Cell* 33, 117-123.
- Hecht, S.S., 1999. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424, 127-142.
- Hoa, N.N., Shimizu, T., Zhou, Z.W., Wang, Z.-Q., Deshpande, R.A., Paull, T.T., Akter, S., Tsuda, M., Furuta, R., Tsutsui, K., Takeda, S., Sasanuma, H., 2016. Mre11 Is Essential for the Removal of Lethal Topoisomerase 2 Covalent Cleavage Complexes. *Molecular Cell* 64, 580-592.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G., Jentsch, S., 2002. RAD6 -dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135.
- Hudson, J.J.R., Chiang, S.Ch., Wells, O.S., Rookyard, C., El-Khamisy, S.F., 2012. SUMO modification of the neuroprotective protein TDP1 facilitates chromosomal single-strand break repair. *Nature Communications* 3,1-12.
- Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., Liu, L.F., 1985. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *Journal of Biological Chemistry* 260, 14873-14878.
- Hustedt, N., Durocher, D., 2017. The control of DNA repair by the cell cycle. *Nature Cell Biology* 19, 1-9.
- Chen, L., Madura, K., 2002. Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Molecular and Cellular Biology* 22, 4902-4913.
- Chválová, K., Brabec, V., Kašpárková, J., 2007. Mechanism of the formation of DNA-protein cross-links by antitumor cisplatin. *Nucleic Acids Research* 35, 1812-1821.
- Chowdhury, S., Carter, J., Rollins, M.C.F, Golden, S.M., Jackson, R.N., Hoffmann, C., Nosaka, A. *et al.* 2017. „Structure Reveals Mechanisms of Viral Suppressors that Intercept a CRISPR RNA-Guided Surveillance Complex". *Cell* 167, 47-57.
- Ide, H., Shoulkamy, M.I., Nakano, T., Miyamoto-Matsubara, M., Salem, A.M.H., 2011. Repair and biochemical effects of DNA-protein crosslinks. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, From chemistry of DNA damage to repair and*

- biological significance. *Comprehending the future* 711, 113–122.
- Inoue, S., Kawanishi, S., 1995. Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Letters*. 371, 86–88.
- Interthal, H., Champoux, J.J., 2011. Effects of DNA and protein size on substrate cleavage by human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1). *Biochemical Journal* 436, 559–566.
- Ivantsiv, Y., Kaplun, L., Tzirkin-Goldin, R., Shabek, N., Raveh, D., 2006. Unique Role for the UbL-UbA Protein Ddi1 in Turnover of SCFUfo1 Complexes. *Molecular and Cellular Biology* 26, 1579–1588.
- Iyer, L.M., Koonin, E.V., Aravind, L., 2004. Novel Predicted Peptidases with a Potential Role in the Ubiquitin Signaling Pathway. *Cell Cycle* 3, 1440–1450.
- Jackson, S.P., Bartek, J., 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.
- Jessica M. Y. Ng, Vermeulen, W., van der Horst, G.T.J., Bergink, S., Sugasawa, K., Vrieling, H., Hoeijmakers, J.H.J., 2003. A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes & Development* 17, 1630–1645.
- Kama, R., Gabriely, G., Kanneganti, V., Gerst, J.E., 2018. Cdc48 and ubiquilins confer selective anterograde protein sorting and entry into the multivesicular body in yeast. *Molecular Biology of the Cell* 29, 948–963.
- Kant, M., Akış, M., Çalan, M., Arkan, T., Bayraktar, F., Dizdaroglu, M., İşlekel, H., 2016. Elevated urinary levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines, and 8-iso-prostaglandin F2 α as potential biomarkers of oxidative stress in patients with prediabetes. *DNA Repair* 48, 1–7.
- Kaplun, L., Ivantsiv, Y., Bakhrat, A., Raveh, D., 2003. DNA Damage Response-mediated Degradation of Ho Endonuclease via the Ubiquitin System Involves Its Nuclear Export. *Journal of Biological Chemistry* 278, 48727–48734.
- Kaplun, L., Tzirkin, R., Bakhrat, A., Shabek, N., Ivantsiv, Y., Raveh, D., 2005. The DNA Damage-Inducible UbL-UbA Protein Ddi1 Participates in Mec1-Mediated Degradation of Ho Endonuclease. *Molecular and Cellular Biology* 25, 5355–5362.
- Kaye, F.J., Modi, S., Ivanovska, I., Koonin, E.V., Thress, K., Kubo, A., Kornbluth, S., Rose, M.D., 2000. A family of ubiquitin-like proteins binds the ATPase domain of Hsp70-like Stch. *FEBS Letters* 467, 348–355.
- Kirchner, J.J., Sigurdsson, S.T., Hopkins, P.B., 1992. Interstrand cross-linking of duplex DNA by nitrous acid: covalent structure of the dG-to-dG cross-link at the sequence 5'-CG. *Journal of the American Chemical Society* 114, 4021–4027.
- Koç, A., Wheeler, L.J., Mathews, C.K., Merrill, G.F., 2004. Hydroxyurea Arrests DNA Replication by a Mechanism That Preserves Basal dNTP Pools. *Journal of Biological Chemistry* 279, 223–230.
- Koizumi, S., Irie, T., Hirayama, S., Sakurai, Y., Yashiroda, H., Naguro, I., Ichijo, H., Hamazaki, J., Murata, S., 2016. The aspartyl protease DD12 activates Nrf1 to compensate for proteasome

dysfunction. *eLife* 5, 1–10

- Kottemann, M.C., Conti, B.A., Lach, F.P., Smogorzewska, A., 2018. Removal of RTF2 from Stalled Replisomes Promotes Maintenance of Genome Integrity. *Molecular Cell* 69, 24-35.
- Krylov, D.M., Koonin, E.V., 2001. A novel family of predicted retroviral-like aspartyl proteases with a possible key role in eukaryotic cell cycle control. *Current Biology* 11, R584–R587.
- Kushnirov, V.V., 2000. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* 16, 857–860.
- La, D.K., Swenberg, J.A., 1996. DNA adducts: biological markers of exposure and potential applications to risk assessment. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 365, 129–146.
- Lee, K.C., Padget, K., Curtis, H., Cowell, I.G., Moiani, D., Sondka, Z., Morris, N.J., Jackson, G.H., Cockell, S.J., Tainer, J.A., Austin, C.A., 2012. MRE11 facilitates the removal of human topoisomerase II complexes from genomic DNA. *Biology Open* 1, 863–873.
- Lakshminarayan, M. L., Koonin, E.V., Aravind, L., 2004. Novel Predicted Peptidases with a Potential Role in the Ubiquitin Signaling Pathway. *Cell Cycle* 3, 1440–50.
- Lehrbach, N.J., Ruvkun, G., 2016. Proteasome dysfunction triggers activation of SKN-1A/Nrf1 by the aspartic protease DDI-1. *eLife* 5, 1-19.
- Lin, C.-P., Ban, Y., Lyu, Y.L., Desai, S.D., Liu, L.F., 2008. A Ubiquitin-Proteasome Pathway for the Repair of Topoisomerase I-DNA Covalent Complexes. *Journal of Biological Chemistry* 283, 21074–21083.
- Fernholm, Ann, a The Royal Swedish Academy of Sciences. 2015. „THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2015 DNA repair – providing chemical stability for life The structure of DNA". Nobel Prize.
- Liu, Y., Xiao, W., 1997. Bidirectional regulation of two DNA-damage-inducible genes, MAG1 and DDI1, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 23, 777–789.
- Lopez-Mosqueda, J., Maddi, K., Prgomet, S., Kalayil, S., Marinovic-Terzic, I., Terzic, J., Dikic, I., 2016. SPRTN is a mammalian DNA-binding metalloprotease that resolves DNA-protein crosslinks. *eLife* 5, 1–19
- Lustgarten, V., Gerst, J.E., 2008. Yeast VSM1 Encodes a v-SNARE Binding Protein That May Act as a Negative Regulator of Constitutive Exocytosis. *Molecular and Cellular Biology* 28, 7534–7534.
- Mao, Y., Sun, M., Desai, S.D., Liu, L.F., 2000. SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 4046–4051.
- Marash, M., Gerst, J. E., 2003. Phosphorylation of the Autoinhibitory Domain of the Sso t-SNAREs Promotes Binding of the Vsm1 SNARE Regulator in Yeast. *Molecular Biology of the Cell* 14: 3114–25.
- Maslov, A.Y., Lee, M., Gundry, M., Gravina, S., Stroganova, N., Tazearslan, C., Bendebury, A., Suh, Y., Vijg, J., 2012. 5-aza-2'-deoxycytidine-induced genome rearrangements are mediated by DNMT1. *Oncogene* 31, 5172–5179.

- Min, J.-H., Pavletich, N.P., 2007. Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. *Nature* 449, 570–575.
- Minko, I.G., Zou, Y., Lloyd, R.S., 2002. Incision of DNA–protein crosslinks by UvrABC nuclease suggests a potential repair pathway involving nucleotide excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 1905–1909.
- Mullally, J.E., Chernova, T., Wilkinson, K.D., 2006. Doa1 Is a Cdc48 Adapter That Possesses a Novel Ubiquitin Binding Domain. *Molecular and Cellular Biology* 26, 822–30.
- Mullen, J.R., Chen, C.-F., Brill, S.J., 2010. Wss1 Is a SUMO-Dependent Isopeptidase That Interacts Genetically with the Slx5-Slx8 SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase. *Molecular and Cellular Biology* 30, 3737–3748.
- Murai, J., Huang, S.N., Das, B.B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J.H., Ji, J., Takeda, S., Pommier, Y., 2012. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Research* 72, 5588–5599.
- Nakano, T., Katafuchi, A., Matsubara, M., Terato, H., Tsuboi, T., Masuda, T., Tatsumoto, T., Pack, S.P., Makino, K., Croteau, D.L., van Houten, B., Iijima, K., Tauchi, H., Ide, H., 2009. Homologous Recombination but Not Nucleotide Excision Repair Plays a Pivotal Role in Tolerance of DNA-Protein Cross-links in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 284, 27065–27076.
- Nakano, T., Morishita, S., Katafuchi, A., Matsubara, M., Horikawa, Y., Terato, H., Salem, A.M.H., Izumi, S., Pack, S.P., Makino, K., Ide, H., 2007. Nucleotide Excision Repair and Homologous Recombination Systems Commit Differentially to the Repair of DNA-Protein Crosslinks. *Molecular Cell* 28, 147–158.
- Nakano, T., Ouchi, R., Kawazoe, J., Pack, S.P., Makino, K., Ide, H., 2012. T7 RNA Polymerases Backed up by Covalently Trapped Proteins Catalyze Highly Error Prone Transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 6562–6572.
- Neale, M.J., Pan, J., Keeney, S., 2005. Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* 436, 1053.
- Niedernhofer, L.J., Daniels, J.S., Rouzer, C.A., Greene, R.E., Marnett, L.J., 2003. Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278, 31426–31433.
- Nishida, N., Arizumi, T., Takita, M., Kitai, S., Yada, N., Hagiwara, S., Inoue, T., Minami, Y., Ueshima, K., Sakurai, T., Kudo, M., 2013. Reactive Oxygen Species Induce Epigenetic Instability through the Formation of 8-Hydroxydeoxyguanosine in Human Hepatocarcinogenesis. *Digestive Diseases* 31, 459–466.
- Noonan, E.M., Shah, D., Yaffe, M.B., Lauffenburger, D.A., Samson, L.D., 2012. O6-Methylguanine DNA lesions induce an intra-S-phase arrest from which cells exit into apoptosis governed by early and late multi-pathway signaling network activation. *Integrative Biology* 4, 1237–1255.
- Nowicka, U., Zhang, D., Walker, O., Krutauz, D., Castañeda, C.A., Chaturvedi, A., Chen, T.Y., Reis, N., Glickman, M.H., Fushman, D., 2015. DNA-Damage-Inducible 1 Protein (Ddi1) Contains an Uncharacteristic Ubiquitin-like Domain that Binds Ubiquitin. *Structure* 23, 542–557.
- O’Hagan, H.M., Mohammad, H.P., Baylin, S.B., 2008. Double Strand Breaks Can Initiate Gene

- Silencing and SIRT1-Dependent Onset of DNA Methylation in an Exogenous Promoter CpG Island. *PLOS Genetics* 4, e1000155.
- O'Neill, B.M., Hanway, D., Winzeler, E.A., Romesberg, F.E., 2004. Coordinated functions of WSS1 , PSY2 and TOF1 in the DNA damage response. *Nucleic Acids Research* 32, 6519–6530.
- Onizuka, K., Usami, A., Yamaoki, Y., Kobayashi, T., Hazemi, M.E., Chikuni, T., Sato, N., Sasaki, K., Katahira, M., Nagatsugi, F., 2018. Selective alkylation of T–T mismatched DNA using vinyldiaminotriazine–acridine conjugate. *Nucleic Acids Research* 46, 1059–1068.
- Orta, M.L., Calderón-Montaño, J.M., Domínguez, I., Pastor, N., Burgos-Morón, E., López-Lázaro, M., Cortés, F., Mateos, S., Helleday, T., 2013. 5-Aza-2'-deoxycytidine causes replication lesions that require Fanconi anemia-dependent homologous recombination for repair. *Nucleic Acids Research* 41, 5827–5836.
- Parrish, J.A., Fitzpatrick, T.B., Tanenbaum, L., Pathak, M.A., 1974. Photochemotherapy of Psoriasis with Oral Methoxsalen and Longwave Ultraviolet Light. *New England Journal of Medicine* 291, 1207–1211.
- Perteguer, M.J., Gómez-Puertas, P., Cañavate, C., Dagger, F., Gárate, T., Valdivieso, E., 2013. Ddi1-like protein from *Leishmania major* is an active aspartyl proteinase. *Cell Stress and Chaperones* 18, 171–181.
- Pommier, Y., 2009. DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology, and Interfacial Inhibition. *Chemical Reviews* 109, 2894–2902.
- Pommier, Y., Huang, S.N., Gao, R., Das, B.B., Murai, J., Marchand, C., 2014. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). *DNA Repair, Cutting-edge Perspectives in Genomic Maintenance* 19, 114–129.
- Protić-Sabljić, M., Tuteja, N., Munson, P.J., Hauser, J., Kraemer, K.H., Dixon, K., 1986. UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers are mutagenic in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* 6, 3349–3356.
- Psakhye, I., Jentsch, S., 2012. Protein Group Modification and Synergy in the SUMO Pathway as Exemplified in DNA Repair. *Cell* 151, 807–820.
- Ramadan, K., Halder, S., Wiseman, K., Vaz, B., 2017. Strategic role of the ubiquitin-dependent segregase p97 (VCP or Cdc48) in DNA replication. *Chromosoma* 126, 17–32.
- Rao, T., Gao, R., Takada, S., Al Abo, M., Chen, X., Walters, K.J., Pommier, Y., Aihara, H., 2016. Novel TDP2-ubiquitin interactions and their importance for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *Nucleic Acids Research* 44, 10201–10215.
- Reardon, J.T., Sancar, A., 2006. Repair of DNA–polypeptide crosslinks by human excision nuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 4056–4061.
- Rechsteiner, M., Rogers, S.W., 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* 21, 267–271.
- Ren, J., Pashkova, N., Winistorfer, S., Piper, R.C., 2008. DOA1/UFD3 Plays a Role in Sorting Ubiquitinated Membrane Proteins into Multivesicular Bodies. *Journal of Biological Chemistry* 283, 21599–21611.

- Richardson, K.K., Richardson, F.C., Crosby, R.M., Swenberg, J.A., Skopek, T.R., 1987. DNA base changes and alkylation following in vivo exposure of *Escherichia coli* to N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 344–348.
- Rudd, G.N., Hartley, J.A., Souhami, R.L., 1995. Persistence of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinking in peripheral blood mononuclear cells from elderly and young individuals. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 35, 323–326.
- Saeki, Y., Sone, T., Toh-e, A., Yokosawa, H., 2002. Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296, 813–819.
- Sakano, K., Oikawa, S., Hasegawa, K., Kawanishi, S., 2001. Hydroxyurea Induces Site-specific DNA Damage via Formation of Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide. *Japanese Journal of Cancer Research* 92, 1166–1174.
- Sampath, D., Rao, V.A., Plunkett, W., 2003. Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene* 22, 9063–9074.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., Jackson, S.P., 2007. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450, 509–514.
- Sassa, A., Kanemaru, Y., Kamoshita, N., Honma, M., Yasui, M., 2016. Mutagenic consequences of cytosine alterations site-specifically embedded in the human genome. *Genes and Environment* 38, 17.
- Sczepanski, J.T., Zhou, C., Greenberg, M.M., 2013. Nucleosome core particle catalyzed strand scission at abasic sites. *Biochemistry* 52.
- Sharma, S., 2007. Age-related nonhomologous end joining activity in rat neurons. *Brain Research Bulletin* 73, 48–54.
- Shibutani, S., Takeshita, M., Grollman, A.P., 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349, 431.
- Sirkis, R., Gerst, J.E., Fass, D., 2006. Ddi1, a Eukaryotic Protein With the Retroviral Protease Fold. *Journal of Molecular Biology* 364, 376–387.
- Spormann, D.O., Heim, J., Wolf, D.H., 1991. Carboxypeptidase yscS: gene structure and function of the vacuolar enzyme. *European Journal of Biochemistry* 197, 399–405.
- Stapf, C., Cartwright, E., Bycroft, M., Hofmann, K., Buchberger, A., 2011. The General Definition of the p97/Valosin-containing Protein (VCP)-interacting Motif (VIM) Delineates a New Family of p97 Cofactors. *Journal of Biological Chemistry* 286, 38670–38678.
- Steenken, S., Jovanovic, S.V., 1997. How Easily Oxidizable Is DNA? One-Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society* 119, 617–618.
- Stingele, J., Bellelli, R., Alte, F., Hewitt, G., Sarek, G., Maslen, S.L., Tsutakawa, S.E., Borg, A., Kjær, S., Tainer, J.A., Skehel, J.M., Groll, M., Boulton, S.J., 2016. Mechanism and Regulation of DNA-Protein Crosslink Repair by the DNA-Dependent Metalloprotease SPRTN. *Molecular Cell* 64,

688–703.

- Stingele, J., Schwarz, M.S., Bloemeke, N., Wolf, P.G., Jentsch, S., 2014. A DNA-Dependent Protease Involved in DNA-Protein Crosslink Repair. *Cell* 158, 327–338.
- Sulli, G. Raffaella D.M., d'Adda di Fagagna F., 2012. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nature Reviews Cancer* 12, 709–720
- Sutherland, B.M., Bennett, P.V., Sidorkina, O., Laval, J., 2000. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 103–108.
- Svoboda, M., Konvalinka, J., Trempe, J.F., Grantz Saskova, K., 2019. The yeast proteases Ddi1 and Wss1 are both involved in the DNA replication stress response. *bioRxiv*,
- Trempe, J.-F., Šašková, K.G., Sivá, M., Ratcliffe, C.D.H., Veverka, V., Hoegl, A., Ménade, M., Feng, X., Shenker, S., Svoboda, M., Kožíšek, M., Konvalinka, J., Gehring, K., 2016. Structural studies of the yeast DNA damage-inducible protein Ddi1 reveal domain architecture of this eukaryotic protein family. *Scientific Reports* 6, 33671.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., Loridas, S., 2013. Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, 3886–3907.
- Vaz, B., Popovic, M., Newman, J.A., Fielden, J., Aitkenhead, H., Halder, S., Singh, A.N., Vendrell, I., Fischer, R., Torrecilla, I., Drobnitzky, N., Freire, R., Amor, D.J., Lockhart, P.J., Kessler, B.M., McKenna, G.W., Gileadi, O., Ramadan, K., 2016. Metalloprotease SPRTN/DVC1 Orchestrates Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair. *Molecular Cell* 64, 704–719.
- Volk, D.E., Thiviyanathan, V., Rice, J.S., Luxon, B.A., Shah, J.H., Yagi, H., Sayer, J.M., Yeh, H.J.C., Jerina, D.M., Gorenstein, D.G., 2003. Solution Structure of a Cis-Opened (10R)-N6-Deoxyadenosine Adduct of (9S,10R)-9,10-Epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in a DNA Duplex. *Biochemistry* 42, 1410–1420.
- Wheate, N.J., Brodie, C.R.; Collins, J.G., Kemp, S., Wright, J.R.A., 2007. DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 7,627–48.
- White, R.E., Dickinson, J.R., Semple, C.A.M., Powell, D.J., Berry, C., 2011. The retroviral proteinase active site and the N-terminus of Ddi1 are required for repression of protein secretion. *FEBS Letters* 585, 139–142.
- Wolf, F.I., Fasanella, S., Tedesco, B., Cavallini, G., Donati, A., Bergamini, E., Cittadini, A., 2005. Peripheral lymphocyte 8-OHdG levels correlate with age-associated increase of tissue oxidative DNA damage in Sprague–Dawley rats. Protective effects of caloric restriction. *Experimental Gerontology* 40, 181–188.
- Wu, X., Li, L., Jiang, H., 2016. Doa1 targets ubiquitinated substrates for mitochondria-associated degradation. *Journal of Cell Biology* 213, 49–63.
- Xiao, W., Samson, L., 1993. In vivo evidence for endogenous DNA alkylation damage as a source of spontaneous mutation in eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

90, 2117–2121.

- Yang, X., Li, Y., Gao, Z., Li, Z., Xu, J., Wang, W., Dong, Y., 2017. Structural analysis of Wss1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports* 7, 8270.
- Yasui, M., Kanemaru, Y., Kamoshita, N., Suzuki, T., Arakawa, T., Honma, M., 2014. Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. *DNA Repair* 15, 11–20.
- Yeo, J.E., Wickramaratne, S., Khatwani, S., Wang, Y.-C., Vervacke, J., Distefano, M.D., Tretyakova, N.Y., 2014. Synthesis of Site-Specific DNA–Protein Conjugates and Their Effects on DNA Replication. *ACS Chemical Biology* 9, 1860–1868.
- You, Y.-H., Lee, D.-H., Yoon, J.-H., Nakajima, S., Yasui, A., Pfeifer, G.P., 2001. Cyclobutane Pyrimidine Dimers Are Responsible for the Vast Majority of Mutations Induced by UVB Irradiation in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 276, 44688–44694.
- Yu, Y., Cui, Y., Niedernhofer, L.J., Wang, Y., 2016. Occurrence, Biological Consequences, and Human Health Relevance of Oxidative Stress-Induced DNA Damage. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 2008–2039.
- Zhang, L., Zhang, K., Prändl, R., Schöffl, F., 2004. Detecting DNA-binding of proteins in vivo by UV-crosslinking and immunoprecipitation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322, 705–711.
- Zhu, Y., Xiao, W., 2001. Two alternative cell cycle checkpoint pathways differentially control DNA damage-dependent induction of MAG1 and DDI1 expression in yeast. *Mol Gen Genomics* 266, 436–444.
- Zhu, Y., Xiao, W., 1998. Differential regulation of two closely clustered yeast genes, MAG1 and DDI1, by cell-cycle checkpoints. *Nucleic Acids Research* 26, 5402–5408.