Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie

Jaroslav Kurfürst

Hledání fysiologického partnera proteinu Ddi2 (DNA damage-inducible protein homolog 2)

Searching for a physiological partner of Ddi2 (DNA damage-inducible homolog 2) protein

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Klára Grantz Šašková, Ph.D.

Praha 2017

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky Mgr. Kláry Grantz Šaškové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval. Také prohlašuji, že jsem tuto práci nepoužil k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze _____

Jaroslav Kurfürst

Poděkování

Rád bych poděkoval svojí školitelce Kláře G. Šaškové za trpělivost, nadhled, pečlivost a podporu na mojí klopýtavé cestě k vypracování této práce. Dále bych rád poděkoval Michalovi Svobodovi a Monice Sivé za všechno, čemu mě naučili, doc. Konvalinkovi za možnost pracovat v jeho laboratoři, a všem v této laboratoři pracujícím za vytváření příjemného a inspirativního prostředí pro kohokoliv, kdo se chce učit a zlepšovat. I rodině, přítelkyni a přátelům patří velký dík za podporu.

Obsah

1. ÚVOD 11

1.1. UBIKVITIN 12

1.2. UBIKVITINACE A SYNTÉZA ŘETĚZCŮ 14

1.2.1. Enzymy E1, E2 14

1.2.2. E3 ligasy obsahující RING doménu 15

1.2.3. E3 Ligasy obsahující HECT doménu 16

1.2.4. U-Box doména a E4 enzymy 18

1.3. DEUBIKVITINAČNÍ ENZYMY 18

1.3.1. Ubikvitin specifické proteasy 19

1.3.2. Deubikvitinasy obsahující doménu OTU 20

1.3.3. Ubikvitin C-terminální hydrolasy 21

1.3.4. Deubikvitinasy obsahující doménu Josephin 22

1.3.5. Deubikvitinasy obsahující JAMM/MPN+ doménu 22

1.4. DDI1 PROTEIN 23

1.5. LIDSKÝ DDI2 PROTEIN 28

2. CÍLE 30

3. MATERIÁL A METODY 31

3.1. MATERIÁL 31

3.2. CHEMIKÁLIE 32

3.3. PŘÍSTROJE 33

3.4. TRANSFORMACE GENU PRO LINEÁRNÍ TETRAUBIKVITIN DO KOMPETENTNÍCH BUNĚK 34

3.5. SELEKCE BUNĚK S POŽADOVANÝM PLASMIDEM 34

3.6. IZOLACE DNA Z KOMPETENTNÍCH BUNĚK 34

3.7. RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ ENDONUKLEASAMI BAMHI A NDEI 35

3.8. ELEKTROFORESA V AGAROSOVÉM GELU 36

3.9. ISOLACE DNA Z AGAROSOVÉHO GELU 36

3.10. DEFOSFORYLACE KONCŮ DNA VEKTORU PET24A 37

3.11. LIGACE DNA FRAGMENTU NESOUCÍ GEN PRO LINEÁRNÍ TETRAUBIKVITIN DO VEKTORU PET24A. 37

3.12. EXPRESE TETRAUBIKVITINU V AUTOINDUKČNÍM RŮSTOVÉM MÉDIU 38

3.13. Lýza buněk s plaSmidem pro lineární tetraubikvitin 38
3.14. Purifikace precipitací kyselinou chloristou 39
3.15. Kationtově výměnná chromatografie 39
3.16. Elektroforéza proteinů v prostředí SDS a barvení stříbrem 40
3.17. Kultivace savčích buněk nesoucích gen pro lidský protein Ddi2 41
3.18. Lýza savčích buněk 42
3.19. Purifikace lidského Ddi2 proteinu pomocí FLAG afinitní kotvy 42
3.20. Elektropřenos s imunodetekcí 43
3.21. Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové 44
3.22. Testování aktivity proteinu Ddi2 44
3.23. bis Tris–MES SDS elektroforesa a barvení Coomassie Brilliant Blue 45

4. VÝSLEDKY 46

4.1. Klonování lineárního tetraubikvitinu 46
4.2. Exprese a purifikace lineárního tetraubikvitinu 47
4.3. Exprese a purifikace proteinu Ddi2 49
4.4. Testování deubikvitinační aktivity Ddi2 50

5. DISKUSE 52

6. ZÁVĚR 55

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 56

Seznam zkratek

UBL	z angl. Ubiquitin-like
UBA	z angl. Ubiquitin associated
Ddi	z angl. DNA damage-inducible protein
ATP	z angl. Adenosin Triphosphate
DUB	z angl. Deubiquitinating enzymes
E1	Enzym aktivující ubikvitin
E2	Enzym konjugující ubikvitin
E3	Ubikvitin ligasa
RING	z angl. Really Interesting New Gene 1
RBR	z angl. RING Between RING domains
DRIL	z angl. Double RING finger Linked
IBR	z angl. In Between RING Fingers
HECT	z angl. Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
Ufd2	z angl. Ubiquitin Fusion Degradation
Cdc48	z angl. Cell division cycle 48
UPS	z angl. Ubiquitin proteasomem system
UCHL1	z angl. Ubiquitin carboxy terminal hydrolase L1
NF-κB	z angl. Nuclear factor kappa Light chain enhancer of activated B-cells
USP	z angl. Ubiquitin specific proteases
UCH	z angl. Ubiquitin specific proteases
UCH	z angl. Ubiquitin C-terminal Hydrolases
OTU	z angl. Ovarian Tumour Proteases
JAMM	Jab1/Mov34/Mpr1/
ZnF-UBP	z angl. Zinc Finger Ubiquitin specific protease domain
UIM	z angl. Ubiquitin interacting motif
OTUB1	z angl. Otubain 1
OTULIN	z angl. OTU deubiquitinase with linear linkage specificity
RIP1	z angl. Receptor interacting protein
TRAF6	z angl. TNF Receptor Associated Factor

RNF168	z angl. Ring Finger domain 168
UBC13	z angl. Ubiquitin Conjugating protein 13
Rpn1	z angl. Regulatory Particle NonATPasae
BAP1	z angl. BCRA1 Associated Protein
COP9	z angl. Constitutive Photomorphogenesis 9
Rpn11	z angl. Regulatory Particlen nonATPase
Jab1	z angl. C-Jun Activation domain-Binding protein - 1
Dsk2	z angl. Dominant Suppressor of Kar l
Rad23	z angl. RADiation-sensitive 23
RVP	z angl. Retroviral Protease like domain
HIV	z angl. Human Immunodeficiency Virus
Nrf1	z angl. Nuclear Factor Erythroid Derived 2-related factor 1
Png1	z angl. Peptide N-Glycanase 1
Pds1	z angl. Precocious Dissociation of Sisters 1 (Securin)
Esp1	z angl. Extra Spindle Pole bodies
APC	z angl. Anaphase Promoting Complex
MAT	z angl. Mating Type Locus
Msn5	z angl. Multicopy Supressor of Sucrose NonFermenting
Ufo1	z angl. UV-F-Box-HOmothallic switching endonuclease
SNARE	z angl. SNAP (Soluable N-ethyl maleimide sensitive fusion protein Attachmenet Protein) REceptor
Vsm1	z angl. vSNARE master 1
Snc1	z angl. Supressor of the null allele of cyclase associated protein
Sec9	z angl. SECretory 9
Sso	z angl. Supressor of Sec9
HDD	z angl. Helical domain of DNA damage inducible protein
STAB1	Stabillin 1
RSC1A1	z angl. Regulator of Solute Carriers 1
LB	Luria Bertani
RPM	z angl. Revolutions Per Minute
TAE	Tris-Acetát-EDTA
EDTA	z angl. Ethylenediamintetraacetic Acid

DTT	Dithiotreitol
FPLC	z angl. Fast Protein Liquid Chromatography
SDS	z angl. Sodium Dodecylsulphate
APS	z angl. Ammonium persulphate
TEMED	Tetramethylethylenediamin
HBSS	z angl. Hank's Balanced Salt Solution
IMDM	z angl. Iscove's Modified Dulbecco's Media
PBS	z angl. Phosphate Buffered Saline
HEPES	z angl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IGEPAL	z angl. Octylphenoxy poly(ethyleneoxy)ethanol
TBS	z angl. Tris Buffered Saline
TWEEN	z angl. Polyoxyethylenesorbitanmonolauriate
MES	z angl. 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid
WB	z angl. Western Blot

Abstract

One of the most important cellular processes, essential not only for protein degradation, is the so called ubiquitin-proteasome system. A key player in this system is ubiquitin, a small protein with unique ability to form various chains. Cellular proteins marked for degradation via ubiquitin, are recruited to the proteasome either by a direct interaction with one of the intrinsic proteasomal receptors, or by adaptor proteins. These proteins typically possess ubiquitin-like domain and ubiquitin associated domain that predispose them for delivering ubiquinated proteins to the proteasome. Adaptor protein called Ddi2 differs from other members of this family by possessing additional domain called the retroviral protease like domain. This domain is structurally similar to HIV protease and its proteolytic function has been discovered only recently. Due to the presence of this proteolytic domain one could expect that Ddi2 might be a deubiquitinase. Here we therefore tested the possible cleavage of diubiquitin chains by recombinantly prepared Ddi2 protein. We can conclude that Ddi2 did not show any deubiquitinating activity in given conditions.

Abstrakt

Jedním z nejdůležitějších buněčných procesů, a to nejen pro degradaci proteinů, je takzvaný ubikvitin-proteasomový systém. V něm hraje klíčovou úlohu ubikvitin, malý protein s jedinečnou schopností řetězit se. Buněčné proteiny, označené daným ubikvitinovým řetězcem a tím předurčené k degradaci, se dále dostávají do proteasomu dvojím způsobem. Buď přímou interakcí polyubikvitinového řetězce značícího daný protein s jedním z receptorů proteasomu, nebo pomocí tzv. adaptorových proteinů. Tyto proteiny jsou charakteristické doménou, která je ubikvitinu podobná a doménou, která jej váže. Zejména pomocí těchto domén zprostředkovávají adaptorové proteiny doručování určitých substrátů do proteasomu. Adaptorový protein Ddi2 z této proteinové skupiny vyčnívá přítomností další domény, jež je strukturně podobná například protease viru HIV a jejíž proteolytická aktivita byla teprve nedávno objevena. Doménové uspořádání a zejména přítomnost proteolytické domény proteinu Ddi2 dává vzniknout hypotéze, že by Ddi2 mohl být deubikvitinačním enzymem. Tato hypotéza byla v předkládané práci ověřována sledováním možného štěpení diubikvitinových řetězců rekombinantně připraveným Ddi2 proteinem. Bylo zjištěno, že Ddi2 v daném uspořádání nemá deubikvitinační aktivitu.

1. Úvod

Živé buňky a organismy jimi tvořené se vyznačují jedinečnou schopností přizpůsobovat se změnám vnějšího prostředí. Toho dosahují obměňováním svých enzymových aparátů, pomocí kterých vykonávají všechny funkce nutné pro život. Pro zajištění správného fungování této dynamické odezvy je nutná souhra tří procesů. Za prvé musí dojít k přenosu signálu pro zahájení změn, za druhé k syntéze nových potřebných proteinů a za třetí, k degradaci proteinů nepotřebných. Ubikvitin-proteasomový systém je klíčovou součástí zejména dráhy degradační, hraje ale svou nezanedbatelnou roli v dalších dvou výše zmíněných procesech. Jeho klíčovou molekulou je pak v buňce všudypřítomný ubikvitin.

Ubikvitin je relativně malý protein (8,5 kDa) specificky se vázající na jiné buněčné proteiny, čímž přenáší určitý signál. To, co dělá ubikvitin široce využívanou signalizační molekulou, je jeho schopnost řetězit se a tím mnohonásobně rozšířit velikost přenášené informace. Jednotky ubikvitinu se na cílené proteiny váží v různě uspořádaných řetězcích o rozdílné délce, přičemž každý z těchto druhů řetězců přenáší jinou informaci a tím předurčují cílený protein k různým osudům.

Syntéza každého ubikvitinového řetězce je katalyzovaná trojicí enzymů E1, E2 a E3. Jejich počty v buňce se výrazně liší stejně jako jejich specifita pro syntézu různých řetězců. Pomocí E1 dochází k aktivaci ubikvitinové jednotky. Poté jeden z desítek E2 enzymů konjuguje ubikvitin na vznikající řetězec či cílený protein za pomoci jedné z mnoha stovek různých E3 ligas. Tento způsob spolupráce dává vzniknout různým řetězcům kódujícím rozličné signály. Jedna z nejprozkoumanějších ubikvitinových drah je dráha degradační, kde je signál přenášen řetězci spojenými přes K48 a která končí degradací ubikvitinem označeného proteinu v proteasomu.

Proteiny označené k degradaci jsou rozpoznávány proteasomem dvěma různými způsoby. První z nich je zprostředkován interakcí hydrofobního povrchu ubikvitinového řetězce s jedním z receptorů umístěných přímo na proteasomální regulační částici 19S. Hlavními receptory využívanými pro tento druh interakce jsou Rpn10 a Rpn13. Druhým způsobem je využití takzvaných adaptorových proteinů Rad23, Dsk2 a Ddi1[1–3]. Adaptorové proteiny nejsou, na rozdíl od proteasomových receptorů, přímými komponenty proteasomu, ale zprostředkovávají interakci mezi ubikvitinovaným

substrátem a proteasomovými receptory. Pomocí své N-koncové UBL (z angl. „Ubiquitin-like domain“) domény interagují s proteasomem a C-koncovou UBA (z angl. „Ubiquitin Associated Domain“) doménou váží ubikvitinovaný substrát[1,4].

Protein Ddi2 (z angl. „DNA Damage-Inducible protein, homolog 2“) je řazen do rodiny výše zmíněných adaptorů proteasomu. Liší se však od Rad23 a Dsk2 přítomností proteasové domény, jejíž fysiologický substrát byl objeven teprve nedávno[5,6]. O možné další funkci/funkcích tohoto proteinu, konkrétně hypotetické deubikvitinační aktivitě, pojednává tato práce.

1.1. Ubikvitin

Ubikvitin je evolučně velmi konzervovaný protein skládající se ze 76 aminokyselin[7]. Svůj název získal z anglického „ubiquitous“ tedy všudypřítomný, protože je exprimován ve většině tkání a buněčných typech, kde slouží jako základní signální molekula v ubikvitin-proteasomových drahách.

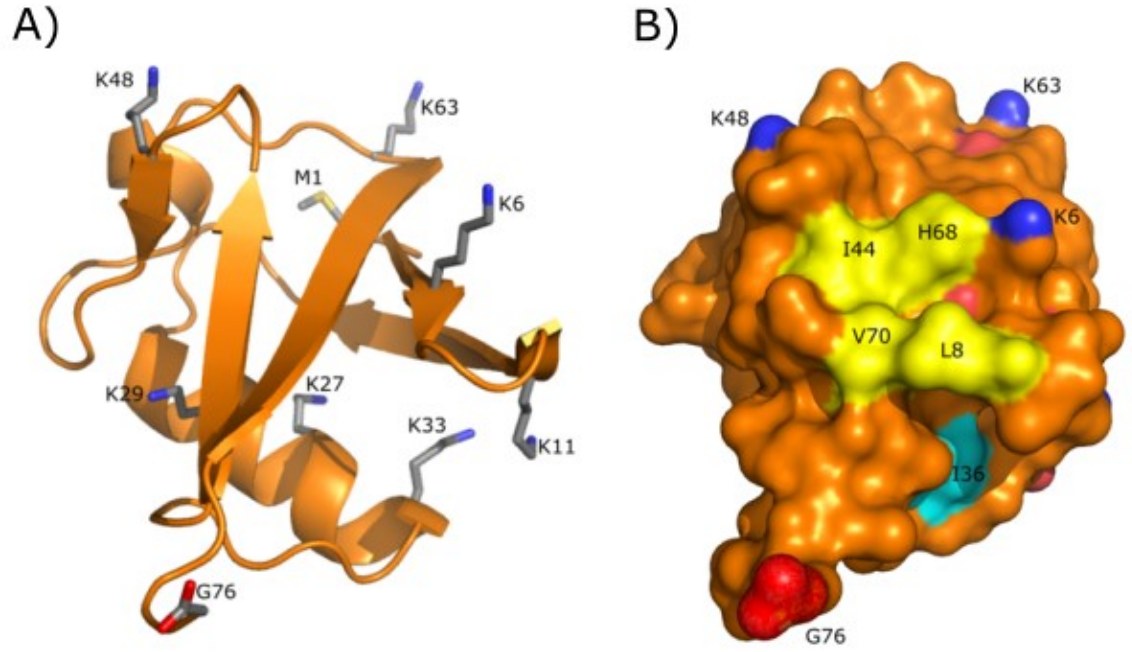
Ze struktury ubikvitinu vyplývá jeho nejdůležitější charakteristika, a to možnost různého připojování na cílové proteiny, ať už samostatně nebo v podobě ubikvitinových řetězců. Vazba je v obou případech isopeptidová a vzniká mezi C-koncovým glycinem ubikvitinu a ε-amino skupinou lysinu cílového proteinu nebo předchozího ubikvitinu v řetězci. Vznik vazby je v obou případech děj závislý na ATP[7]. Protože molekula ubikvitinu má na svém povrchu celkem sedm lysinových zbytků (v pozicích 6, 11, 27, 29, 33, 48 a 63), vzniká i sedm základních specifických ubikvitinových řetězců[8]. Tento výběr řetězců je navíc obohacen ještě o jeden typ, který vzniká spojením přes N-konec molekuly. Svojí přítomností nebo přítomností svých specifických řetězců tak ubikvitin určuje osud označeného proteinu v dalších buněčných procesech jako je degradace proteinů, regulace buněčného cyklu, oprava DNA a mnoho dalších.

Označení cílové molekuly neboli substrátu jednou molekulou ubikvitinu (monoubikvitinace) nebo různými ubikvitinovými řetězci implikuje tedy pro daný substrát různé důsledky[9]. V případě řetězců spojených přes lysinový zbytek 48 (dále jen K48 a podobně) se jedná hlavně o cílení těchto molekul k degradaci 26S proteasomem. Řetězce K63 hrají roli v opravách DNA, exocytose a často podmiňují skládání proteinových

komplexů v signálních drahách. Polyubikvitinace řetězcem K11 zase zahajuje degradaci regulátorů buněčného cyklu během mitosy[8].

Ubikvitin je u člověka kódován čtyřmi různými geny: *UBB* a *UBC* kódují lineární polyubikvitin o třech nebo devíti ubikvitinových jednotkách, které se po expresi dále štěpí specifickými proteasami zvanými deubikvitinasy[10,11] (DUBs) (více kapitola 1.3). Geny *UBA52* a *RPS27A* kódují ubikvitin vázaný na ribosomální proteiny, ze kterých se uvolní opět působením specifických deubikvitinas[12].

Pro 3D strukturu ubikvitinu (Obrázek 1.1, str. 14) je charakteristický β-skládaný list v kombinaci s α-helixem. Jedná se o strukturní motiv β2-α-β2, v anglické odborné literatuře označovaný jako β-grasp. C-konec tvoří flexibilní řetězec o šesti aminokyselinách, nápadně vystupující do prostoru, který isopeptidovou vazbou váže následující molekulu ubikvitinu. Dalším důležitým aspektem této molekuly jsou specifická povrchová hydrofobní místa. Jedno z nich tvoří L8, I44, H68 a V70 (Obrázek 1.1, str. 14 1B) a je prostředkem pro intramolekulární interakce v řetězcích spojených přes K48. Ty svojí konformací zaujímají globulární charakter a tvoří hlavně interakci s proteasomem nebo ubikvitin vázajícími doménami dalších proteinů[13]. Při interakci s E3 ubikvitin ligasami, důležitými hráči v procesu ubikvitinace (viz níže), je zase klíčový povrch kolem I36[14]. Polyubikvitinové řetězce spojené přes Met1 a K63 zaujímají spíše lineární, otevřenou konformaci a jsou od sebe rozlišitelné právě díky uspořádání hydrofobních míst[9,15].



Obrázek 1.1: **Dvě různá zobrazení molekuly ubikvitinu. A)** Molekula ubikvitinu se zobrazením sekundárních struktur. Všechny aminokyselinové zbytky podílející se na tvorbě polyubikvitinových řetězců jsou vyznačeny tyčinkovým zobrazením (atomy dusíku zobrazeny modře, kyslíku červeně a síry žlutě). **B)** Povrch molekuly ubikvitinu se zobrazenými interakčními hydrofobními povrchy. Interakční povrch obklopující I44 je zde zobrazen žlutě, povrch v okolí I36 pak tyrkysově. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL (PyMOL™)[16] s použitím struktury ubikvitinu (PDB kód 1UBQ[17]).

1.2. Ubikvitinace a syntéza řetězců

1.2.1. Enzymy E1, E2

Proces ubikvitinace a syntézu ubikvitinových řetězců je možné popsat třemi základními kroky. Prvním krokem je aktivace molekuly ubikvitinu enzymem E1 (ubikvitin aktivující enzym), ve druhém kroku se přenáší přes enzym E2 (ubikvitin konjugující enzym) na E3 (ubikvitin ligasa) a ve třetím kroku se pomocí E3 enzymu vytváří vazba mezi ubikvitinem a substrátem, kterým může být jak cílený protein, tak i poslední ubikvitinová jednotka v dosud nasyntetizovaném řetězci. Jak již bylo zmíněno, ubikvitinace je závislá na ATP, přesněji řečeno, je to aktivace ubikvitinu, kde se ATP spotřebovává. Během aktivace se váže ubikvitin (jeho G76) na E1 přes AMP (za hydrolýzy ATP) a z adenosinu se následně přenáší na SH skupinu cysteinu E1 enzymu

(do jeho aktivního místa). Vzniká tak thioesterová vazba mezi ubikvitinem a E1, ubikvitin se tím dostává na vyšší energetickou hladinu, na které se pohybuje při dalším přechodu na E2. Co se týká kinetiky procesu aktivace a konjugace ubikvitinu, obě reakce jsou relativně rychlé vůči těm, které v kaskádě následují[18]. Další reakční kroky, mezi E2, E3 a substrátem (poslední jednotka ubikvitinového řetězce) se liší v rámci různých E2 a E3. Na rozdíl od E1 jich totiž buňka obsahuje mnohem více.

Systém enzymů podílejících se na tvorbě řetězců ubikvitinu má hierarchickou strukturu. Ubikvitin aktivující enzymy E1, jsou na rozdíl od ostatních enzymů účastnících se ubikvitinace u člověka pouze dva[19], zatímco konjugujících enzymů jsou známy desítky a ligačních E3 u člověka stovky[20]. Protože druh ubikvitinace určuje osud mnohých buněčných proteinů, je v procesu ubikvitinace extrémně důležité dodržování specifity během syntézy řetězců. Hierarchické uspořádání ubikvitinačních enzymů tvoří systém schopný tuto specifitu poskytnout. Na rozdíl od monoubikvitinace, kde hlavním problémem týkající se specifity je to, že enzymy musejí rozeznat lysinové zbytky substrátu od lysinových zbytků ubikvitinu, je u tvorby řetězců esenciální rozlišování mezi všemi sedmi lysinovými zbytky a jejich správné propojování. V procesu navázání aktivované molekuly ubikvitinu na poslední jednotku již existujícího řetězce, rozhoduje specifická kombinace E2 a E3 účastnících se reakce o tom, zda dojde ke katalýze nebo ne.

1.2.2. E3 ligasy obsahující RING doménu

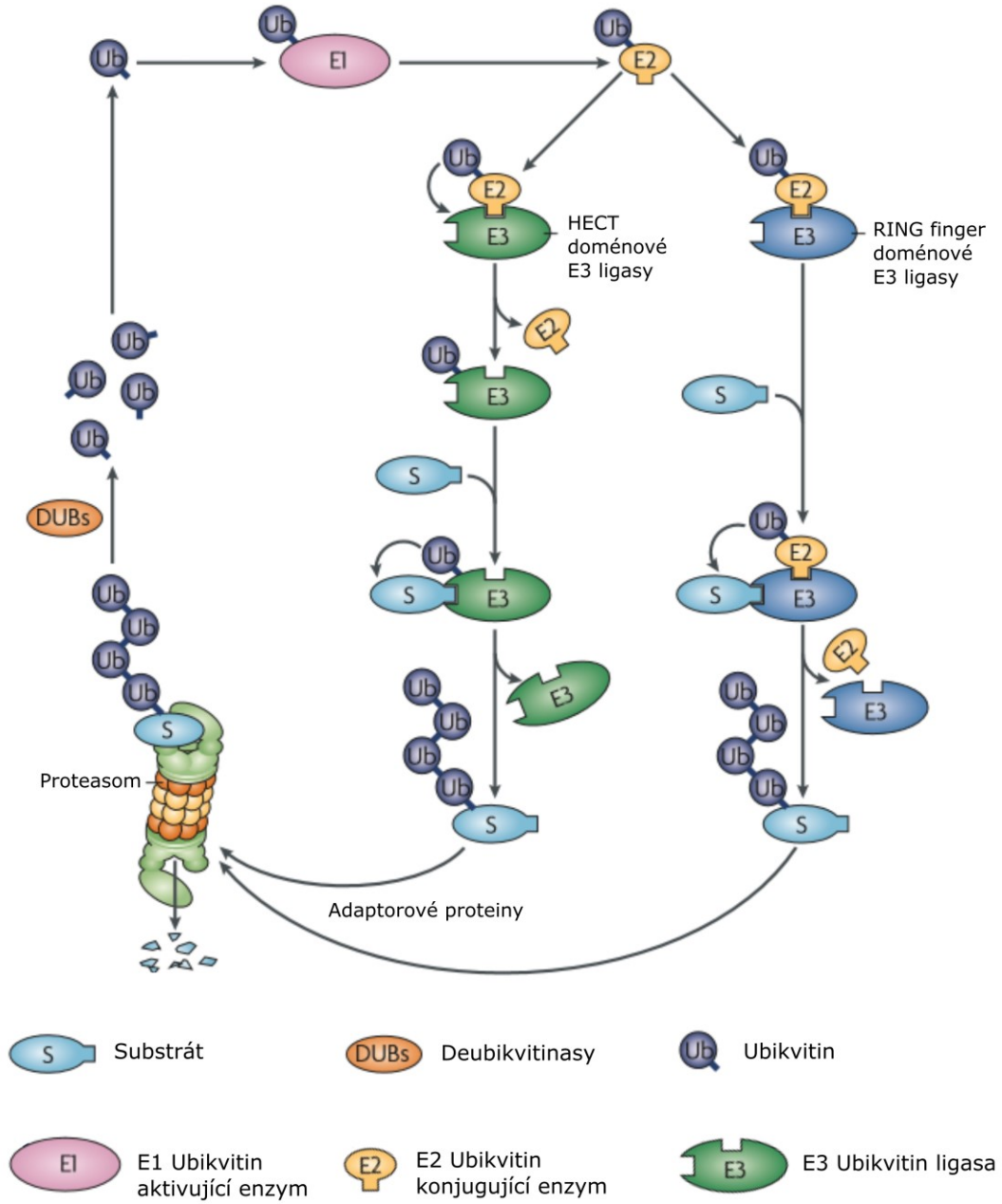
Enzymů ligujících ubikvitin jsou sice v lidském organismu stovky[19], můžeme je ale rozdělit do skupin podle druhu domény, kterou využívají pro vykonávání své funkce. První skupina jsou E3 využívající RING (z angl. Really Interesting New Gene 1) doménu, přímo vázající E2 i ubikvitin. RING doména je definovaná primární sekvencí, ve které se vyskytuje (mezi různě dlouhými sekvencemi různých aminokyselin) sedm konzervovaných cysteinů a jeden histidin. Tyto konzervované aminokyseliny koordinačně váží dva zinečnaté ionty[21]. E3 spadající do rodiny RING proteinů, jsou kódované až šesti stovkami genů a tvoří tak nejčetnější skupinu E3 ligačních enzymů v ubikvitinovém systému[22]. Mechanismus, kdy je ubikvitin přenesen z E2 na substrát, není ještě plně objasněn. Předpokládá se ale, že katalytická aktivita RING domény spočívá pouze ve zvyšování pravděpodobnosti střetu komplexu E2-ubikvitin se substrátem tím, že je přiblíží. Základem této hypotézy je fakt, že mezi aktivním místem (cystein, přes který je

vázán ubikvitin) komplexu E2-ubikvitin a substrátem je příliš velká vzdálenost na přímou katalýzu a případná aminoskupina lysinového zbytku substrátu by „nedosáhla“ na thioesterovou vazbu mezi E2 a ubikvitinem. Tento způsob katalýzy se označuje anglickým termínem „catalysis by proximity“ [19].

Jako samostatná rodina proteinů se také klasifikuje takzvaná „RING between RING fingers (RBR) [23]. Jedná se o početnou skupinu proteinů charakteristickou primární sekvencí tvořící shluk dvou domén typu RING finger, s doménami IBR (z angl. In Between RING finger domains) /DRIL (z angl Double RING finger Linked) mezi nimi [23–25]. Zde se obvykle nachází 8 cysteinů a histidinů vázajících ionty kovu. Jednotlivé RING Finger domény se liší od těch klasických strukturou hydrofobního jádra a od sebe navzájem se liší počtem iontů kovu, které jsou schopny vázat[24]. Jednotliví zástupci této rodiny mají rozmanité funkce. Jsou mezi nimi molekuly signalizační, molekuly regulující translaci, ale i E3 ligasy[26,27]. Těch bylo zatím identifikováno 15 a pro většinu z nich je katalyticky esenciální N-koncová RING finger doména[28].

1.2.3. E3 Ligasy obsahující HECT doménu

Další a méně početnější skupinou E3 enzymů jsou ligasy využívající takzvanou HECT doménu (z angl. Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus). Mezi E3 s RING doménou a HECT doménou je podstatný rozdíl v mechanismu katalýzy (Obrázek 1.2, str.17). Na rozdíl od RING domény totiž HECT naváže substrát a E2 nesoucí ubikvitin, načež přenese samotný ubikvitin na sebe, opět přes thioesterovou vazbu. Ubikvitin je tak přenesen na substrát přímo z E3. Ve stavu, kdy je na E3 navázán aktivní ubikvitin a substrát či prodlužovaný řetězec, katalytické zbytky cysteinu jsou od sebe tak daleko, že HECT E3 musí podstoupit rozsáhlou konformační změnu, aby mohlo dojít k reakci[29]. Tato flexibilita HECT E3 by mohla být odpovědí na otázku, jak se tak specifické enzymy jako E3 po navázání prvního ubikvitinu na substrát přeorientují na specificitu vůči navázanému ubikvitinu[29].



Obrázek 1.2: **Syntéza ubikvitinových řetězců pomocí RING doménových a HECT doménových E3 ligas.** Převzato z Weissman et. al, 2011, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* [20].

1.2.4. U-Box doména a E4 enzymy

Existuje ještě jedna skupina proteinů schopných vykonávat funkci podobnou té běžných E3 a tu představují U-Box doménové E4 enzymy. Vzorovým proteinem této skupiny je Ufd2 (z angl. Ubiquitin fusion degradation 2)[30]. V buňkách kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je asociován s Cdc48 (z angl. Cell Division Cycle 48) a podílí se na stresové odezvě a na ligaci ubikvitinových jednotek na již jinou ligasou vytvořených řetězcích. Doména, jejíž narušení znemožní funkci Ufd2 a dalších E4, byla pojmenována U-Box a svou 3D strukturou se do určité míry podobá RING doméně zmiňované v textu výše. Jedním z výrazných rozdílů těchto dvou domén je nepřítomnost části koordinačně vázající iont kovu, jenž je jednou z charakteristik RING domény[31]. E4 ligasy staví na položeném základě ubikvitinového řetězce, umožní jeho prodloužení a zrychlí tím proces degradace v proteasomu, protože substráty označené kratšími ubikvitinovými řetězci nejsou tak snadno uchopitelné proteasomovými podjednotkami a doba jejich degradace od chvíle označení je tím pádem delší[32,33].

1.3. Deubikvitinační enzymy

Jako další stupeň regulace popsaného ubikvitinačního enzymového aparátu, působí deubikvitinační enzymy. Odštěpují ubikvitinové jednotky z proteinů a napomáhají tak k udržení konstantního množství volného ubikvitinu v buňce. Deubikvitinas je v lidském genomu známo zatím 79, jejich katalytická aktivita spočívá ve štěpení isopeptidové vazby mezi C-koncem ubikvitinu a ε-amino skupinou lysinu (nebo N-konce), na který je ubikvitin konjugován.

Deubikvitinaci podléhají ubikvitinové řetězce v různých fázích UPS (z angl. „Ubiquitin Proteasome System“) dráhy. Například nascentně translatovaný ubikvitin v podobě fúzních proteinů (zmíněný v kapitole 1.1) musí být dále enzymaticky rozštěpen, aby vznikly samostatné funkční molekuly ubikvitinu. Za to je zodpovědná deubikvitinsasa UCHL1 (z angl. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1). Dále se DUBs uplatňují při odstraňování řetězců z proteinů určených k proteasomální degradaci, čímž regulují jejich odbourávání. Aktivita mnohých enzymů může být ovlivňována specifickou ubikvitinací, jako je tomu například v NF-κB (z angl. „Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B-cells“) signalizační dráze. Jedná se o program spuštěný skupinou

transkripčních faktorů mající protiapoptotický a prozánětlivý efekt na danou buňku. Protože při nesprávné regulaci aktivace této dráhy jedním směrem může dojít k imunodeficienci a druhým směrem k přílišné zánětlivé odpovědi, je tato dráha pečlivě regulovaná, a to právě i prostřednictvím ubikvitinace.

Deubikvitinasy můžeme rozdělit do pěti rodin: ubikvitin specifické proteasy USP (z angl. „Ubiquitin Specific Proteases“), ubikvitin C-terminální hydrolasy UCH (z angl. „Ubiquitin C-terminal Hydrolyses“), proteasy vaječníkových tumorů OTU (z angl. „Ovarian Tumour Proteases“), proteasy s doménou Machadovy-Josephovy nemoci (tzv. Josephiny), a proteasy s JAMM („Jab1/Mov34/Mpr1“) doménou, které jako jediné z těchto rodin mají metaloproteasovou aktivitu. Všechny ostatní, tzn. UCH, USP, OTU a Josephiny jsou cysteinové proteasy[9]. Deubikvitinasy obsahují mimo svou katalytickou doménu i další domény důležité např. pro nitrobuněčnou lokalizaci dané deubikvitinasy, nebo pro interakci s ubikvitinem. Hojně se vyskytující domény s touto funkcí jsou ZnF-UBP doména (z angl. Zinc Finger Ubiquitin-specific Protease domain), UIM (z angl. Ubiquitin Interacting Motif), UBA či UBL.

1.3.1. Ubikvitin specifické proteasy

Zdaleka nejpočetnější a nejrozmanitější rodinou deubikvitinas jsou ubikvitin specifické proteasy – USP. Deubikvitinasy spadající do této rodiny jsou charakteristické přítomností USP cysteinové katalytické domény. Tu je možné rozčlenit do šesti oblastí. První oblast obsahuje katalytický cystein, oblast označovaná číslem 5 pak katalytický histidin. Oblast 6 obsahuje variabilní katalytickou pozici, obsahující aminokyselinu polarizující histidin během katalýzy, kterou může být asparagin či kyselina asparagová. V každé z oblastí 3 a 4 můžeme najít motiv dvou cysteinů od sebe oddělených dvěma dalšími aminokyselinami. Tyto cysteiny vážou zinečnaté ionty a umožňují správné sbalení katalytického jádra. Bioinformatická identifikace USP domén je komplikovaným problémem, jejich sekvence totiž dovolují inserce i poměrně velkých domén neúčastnících se katalýzy, které slouží například k rozpoznávání ubikvitinu. Proto jsou anotovány aktivní místa o velikosti i 850 aminokyselin[34].

Strukturně se USP domény vyznačují podobností k pravé ruce, kde jednotlivé tři domény stericky představují dlaň, prsty a palec. Katalytické místo se nachází mezi palcem

a dlaní, přičemž třetí doména váže distální ubikvitin (ubikvitin v řetězci nejvzdálenější od substrátu) a udržuje tak vzájemnou orientaci ubikvitinu a deubikvitinasy vhodnou pro katalýzu[35].

Vazba ubikvitinu na USP způsobuje konformační změnu, při které neaktivní konformace přechází do konformace schopné katalýzy. Konformační změny jsou nutné i v případě, že je katalytické místo sice strukturně v aktivním stavu, je ale blokováno určitými částmi vlastního enzymu, což znemožňuje přístup ubikvitinu[36].

USP deubikvitinasy jsou různě specifické. Ačkoliv většina z nich není omezená na jeden druh řetězců (odlišují se tím od ostatních rodin, které jsou specifičtější), jsou mezi nimi i striktně specifické enzymy, vykazující aktivitu pouze vůči jednomu typu řetězce. Příkladem může být USP14, který je specifický pro K48 ubikvitinové řetězce, přičemž štěpí vazbu právě distálního konce řetězce[36]. Na rozdíl od ostatních rodin je většina USP schopna deubikvitinace i lineárních řetězců, tedy vázaných přes N-koncový methionin ubikvitinu.

Vzhledem k velkému počtu USP deubikvitinas a jejich diverzitě, jsou i jejich fysiologické funkce rozmanité. Jako příklad konkrétního biochemického procesu, kde hrají USP významnou roli, může sloužit funkce USP7 (také HAUSP) při regulaci hladiny (stabilizaci) p53 v buňce[37].

1.3.2. Deubikvitinasy obsahující doménu OTU

Méně početnou a rozmanitou rodinou deubikvitinačních enzymů jsou DUBs obsahující OTU doménu. Můžeme je rozdělit do tří podskupin. „Otubains“, kam spadá OTUB1 (z angl. Otubain1) a OTUB2. Dále OTU podobné A20, kde významným zástupcem je právě protein A20, jehož četné funkce můžeme sledovat u NF-κB signalizační dráhy. Třetí podskupinou jsou OTU samotné[9]. Velikost OTU se pohybuje od 230 do 1222 aminokyselin, ze kterých 150–200 tvoří katalytické domény. Ty mají charakter cysteinových proteas. S UPS systémem je dále spojují již zmíněné domény UIM, UBA, UBL a stejně jako USP deubikvitinasy, i OTU po navázání ubikvitinu často podléhají rozsáhlým konformačním změnám.

OTU deubikvitinasy jsou na rozdíl od USP mnohem specifičtější. Většina z nich štěpí jen jeden nebo dva druhy ubikvitinových řetězců. Například OTUB1 je specifická

pro K48[38], OTU7B/cezanne je specifická pro K11[39], Trabid preferenčně štěpí K63[40,41] a OTULIN (z angl. OTU deubiquitinase with linear linkage specificity) je specifická pro Met1 lineární řetězce[42].

Již zmíněný A20 je významným zástupcem OTU deubikvitinas. V NF-κB dráze má dvojí roli, jak E3 ligasovou tak deubikvitinasovou. Pomocí OTU domény na N-konci, nepostradatelné pro deubikvitinaci, ovlivňuje aktivitu proteinů RIP1 (z angl. Receptor Interacting Protein) a TRAF6 (z angl. TNF Receptor Associated Factor) tím, že odbourává ubikvitinové K63 řetězce. Stabilitu těchto proteinů reguluje podílením se na syntéze K48 řetězců. Tuto E3 ligasovou reakci je schopný katalyzovat díky „Zinc Finger" doméně na C-konci[43,44].

I při opravách DNA hrají OTU deubikvitinasy svou roli. Odezva na dvouvláknové zlomy DNA spočívá mimo jiné i ve fosforylaci a následné polyubikvitinaci chromatinu kolem tohoto zlomu. OTUB1 působí jako inhibitor syntézy polyubikvitinových řetězců katalyzované E3 ligasou RNF-168 (z angl. RING Finger Domain 168). Tuto polyubikvitinaci potlačuje poněkud zvláštním způsobem, neuplatňuje zde totiž svou katalytickou aktivitu, ale nasedá na E2 konjugační enzym UBC-13 (z angl. Ubiquitin Conjugating Protein 13), který přenáší ubikvitinové jednotky na E3 ligasu RNF-168[45]. Nastavuje tak nejspíš určitou horní hranici polyubikvitinace, a působí jako negativní regulátor tohoto procesu.

1.3.3. Ubikvitin C-terminální hydrolasy

V rodině deubikvitinas nazývané UCH, jsou prozatím čtyři enzymy. Velikost UCH DUBs se pohybuje kolem 200 aminokyselin a jejich charakteristickým strukturním prvkem je povrchová smyčka přímo nad katalytickým místem, tvořící se při vazbě na ubikvitin[46,47]. Tato smyčka omezuje sterický přístup do aktivního místa a proto se C-konec ubikvitinu musí pod smyčkou „protáhnout", aby se dostal do dostatečné blízkosti a mohlo dojít k hydrolýze. Substrátem UCH deubikvitinas jsou tedy ubikvitinové řetězce na nesbalených částech proteinů či ubikvitinové řetězce na malých peptidech, právě takových, které vznikají při degradaci proteinů proteasomem 26S[48].

Jako prokázaná „ubikvitin recyklační" deubikvitinasa je UCHL5 (UCH37). Pro tuto funkci je také důležitá přibližně 100 aminokyselin dlouhá doména, která specificky váže Rpn1 (z angl. Regulatory particle nonATPase 1) – podjednotku regulační částice

proteasomu[49]. Ostatní enzymy, řazené do UCH rodiny DUBs, jsou BAP1 (z angl. BCRA1 Associated Protein) mající tumor supresorovou funkci, a dále UCHL3 a UCHL1 DUBs.

1.3.4. Deubikvitinasy obsahující doménu Josephin

Další rodinou jsou enzymy obsahující tzv. Josephin doménu. Své jméno tato doména dostala podle svého nejvýznamnějšího zástupce, s Machado-Josepha chorobou spjatého ataxinu 3. Ataxin 3 má ve své aminokyselinové sekvenci poměrně nestabilní opakující se sekvenci CAG kódující glutamin. CAG repetic je v ataxinu 3 u zdravého jedince 13–36 a u jedince postiženého touto chorobou 61–87. Množení glutaminu v tomto rozsahu způsobí agregaci ataxinu 3 do formy inkluzních tělísek a znemožní tak jeho deubikvitinační funkci, což následně vede k hromadění polyubikvitinovaných proteinů[50]. Choroba Machado-Josepha, také známá jako spinocerebelární ataxie 3, je neurodegenerativní onemocnění projevující se ztrátou koordinace horních a dolních končetin.

Mimo výše zmíněného ataxinu 3 patří do této rodiny dále ataxinu 3 podobný protein ATXN3L, obsahující kromě Josephin katalytické domény na N-konci i UIM doménu na C-konci. Zbylými zástupci rodiny jsou Josephin 1 a Josephin 2, na nichž se žádná další doména kromě Josephin nevyskytuje[51]. Katalytická doména Josephin je přibližně 180 aminokyselin dlouhá a mechanismem se jedná o cysteinovou proteasu. Samostatně štěpí K63 i K48 řetězce, ale v přítomnosti UIM se její aktivita zúží pouze na K48, což poukazuje na UIM jako determinant specificity[52].

1.3.5. Deubikvitinasy obsahující JAMM/MPN+ doménu

Poslední rodinou deubikvitinas jsou enzymy jejichž nejvýznamnějším charakteristickým prvkem je katalytická JAMM/MPN+ doména. Ta se od ostatních deubikvitinačních domén liší mechanismem, jímž katalyzuje hydrolýzu peptidové vazby. Patří totiž mezi metaloproteasy a využívá ke katalýze dva koordinované zinečnaté ionty. JAMM/MPN+ se často nacházejí v komplexech s velkými proteinovými strukturami jako je 26S proteasom nebo COP9 (z angl. Constitutive Photomorphogenesis 9) signalosom. V případě proteasomálně vázané deubikvitinasy se jedná o Rpn11 (z angl. Regulatory particle nonATPase). Ta se vyznačuje přítomností dvou inzercí zprostředkovávajících

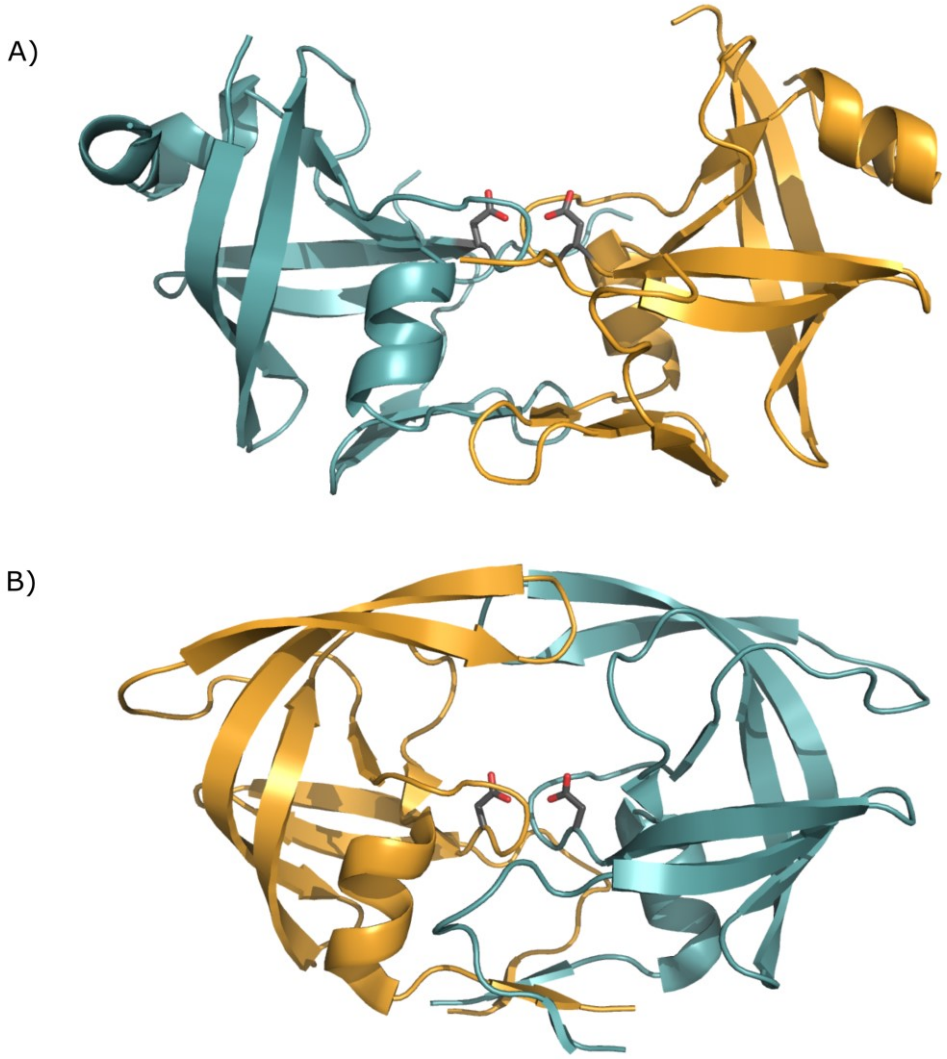
vazbu mezi Rpn11 a proteasomem (Ins2), a vazbu mezi Rpn11 a ubikvitinem (Ins1). Rpn11 má, na rozdíl od většiny JAMM/MPN+, malou specifitu s poměrně vysokou Michealisovu konstantou (K_m) vůči jednotlivým řetězcům a je také velmi pomalým enzymem[53]. Vysoká hodnota K_m ale neovlivňuje funkčnost tohoto enzymu díky jeho lokalizaci na 19S regulační částici proteasomu, kde se substrát tomuto enzymu v podstatě zakoncentrovává[54]. Jab1 (z angl. c-Jun activation domain-binding protein 1) je JAMM/MPN+ deubikvitinasa vázaná na COP9 signalosom. Jab1 hydrolyzuje molekuly podobné ubikvitinu, např. Nedd8 z cullinových podjednotek signalosomu COP9[55].

1.4. Ddi1 protein

Ddi1 se řadí do skupiny adaptorových proteinů zprostředkovávajících interakci mezi specifickým ubikvitinovaným substrátem a proteasomovými receptory např. Rpn1[56]. Další známé adaptorové proteiny jsou Dsk2 (z angl. Dis1-supressing protein kinase 2) a Rad23 (z angl. RADiation-sensitive 23). Pomocí své N-koncové UBL domény tyto adaptory interagují s proteasomem a skrz C-koncovou UBA doménu interagují s ubikvitinovým řetězcem[1,2,4].

Ze skupiny adaptorových proteinů do jisté míry vyčnívá právě Ddi1, a to zejména svojí RVP (z angl. Retroviral Protease) doménou, umístěnou mezi UBL a UBA. Ta obsahuje katalytické místo charakteristické pro aspartátové proteasy, skládající se z aminokyselinové triády aspartát, serin/threonin, glycin[57,58]. Strukturně je RVP velmi podobná retrovirovým proteasam, například HIV (z angl. Human Immunodeficiency Virus) protease (Obrázek 1.3, str. 24), kde dvě identické podjednotky tvoří symetrickou dimerní strukturu[1,59]. Každá z podjednotek tak obsahuje jeden z aspartátových zbytků, které v těsné blízkosti drží molekulu vody nutnou ke katalýze. Zachovalost aktivního místa a terciární struktury této domény ve všech eukaryotních Ddi1 ortolozích napovídá o důležitosti RVP domény pro případnou fysiologickou roli Ddi1. Jedna funkce Ddi1 byla objevena teprve nedávno, na organismu *Caenorhabditis elegans* a současně také u člověka a týká se zpětnovazebné smyčky v regulaci funkce proteasomu. Při inhibici proteasomu vzroste pomocí transkripčního faktoru Nrf1 (z angl. Nuclear Factor Erythroid Derived 2-related factor 1) transkripce genů proteasomálních podjednotek, čímž se zajistí dostatečné množství funkčních proteasomů v buňce potřebné k zachování homeostázy. Nrf1 je produkován v endoplasmatickém retikulu a kontinuálně translokován do

cytoplasmy, kde je za normálních podmínek označen ubikvitinem a degradován v proteasomu. Při inhibici proteasomů ale této degradaci unikne, je deglykosylován proteinem Png1 (z angl. Peptide N-Glycanase) a štěpen v aktivní formu právě pomocí Ddi1[5].



Obrázek 1.3: **Strukturní srovnání A) Ddi1 RVP domény a B) HIV proteasy.** Obě struktury jsou dimerní a jednotlivé monomery jsou odlišeny barvami. V tyčinkovém zobrazení jsou znázorněny katalytické aspartáty. Obrázek byl vytvořen pomocí programu PyMOL (PyMOL^{TM})[16] s použitím PDB kódů 4LL3[60] pro HIV proteasu a 4Z2Z[61] pro RVP doménu Ddi1.

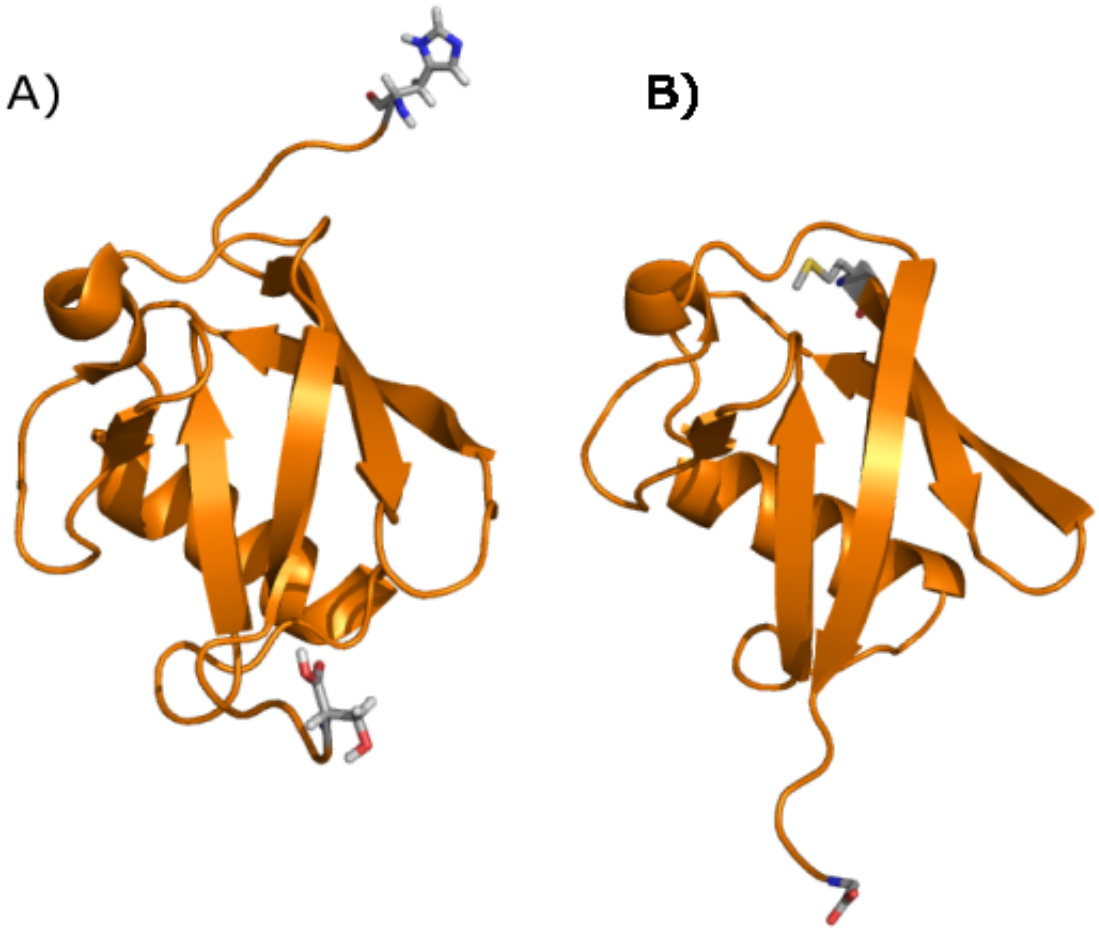
Z některých fenotypových charakteristik modelových organismů, kterým byl gen pro Ddi1 vypnut, je zřejmá důležitost tohoto proteinu pro jejich životaschopnost. První z nich byla pozorovaná v regulaci buněčného cyklu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Jedním z proteinů účastnících se kontrolního bodu pozdní S fáze je takzvaný Pds1 (z angl. Precocious Dissociation of Sisters 1). Ten vazbou na jiný protein Esp1 (z angl. Extra Spindle Pole bodies 1) inhibuje jeho aktivitu posouvající buňku do anafáze. V případě, že je buňka zralá pro další část mitózy, je Pds1 ubikvitinován pomocí APC (z angl Annaphase Promoting Complex) (E3 ligasy) a je degradován 26S proteasomem. Tímto způsobem vzniká volný Esp1, který může posouvat buňku do anafáze. Ve chvíli, kdy se začne dělit buňka obsahující mutovaný, teplotně citlivý gen pro Pds1 ve vyšší teplotě, dochází ke vzniku aneuploidií z důvodu nerovnoměrného rozdělování chromatid. Zvýšená exprese Ddi1 nebo Rad23 v tímto způsobem mutovaných buňkách vede k potlačení citlivosti fenotypu těchto buněk na zvýšenou teplotu[62]. Delece všech tří adaptorových proteinů v buňkách s nemutovaným Pds1 pak vede ke zpoždění přechodu mezi G_2 a M fázemi[57].

Ddi1 se také účastní degradace Ho endonukleasy. Ho je enzym zodpovědný za přepínání partnerského typu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Katalyzuje dvouvláknový štěp v lokusu DNA zvaném MAT (z angl. Mating Type locus), na kterém se vyskytuje informace o daném partnerském typu[63]. Opravou tohoto zlomu dojde k zařazení informace o opačném párovacím typu. Svou funkci vykonává Ho v jádře, degradován je ale v cytoplasmě, kam ho transportuje exportin Msn5 (z angl Multicopy suppresor of SNF). Zde dochází k jeho ubikvitinaci prostřednictvím E3 ligásového systému popsanému v kapitole (1.2). Jako F-box protein determinující Ho pro ubikvitinaci zde působí Ufo1 (z angl. UV-F-box-HO1)[64]. V kvasinkách s deletovaným genem pro Ddi1 bylo zaznamenáno kumulování Ho enzymu, což je projev nepozorovaný v buňkách s deletovaným Rad23 nebo Dsk2[63]. Také byla zaznamenaná interakce Ddi1 s Ho, která nebyla pozorovaná v nepřítomnosti UBA domény na Ddi1 a zároveň nebyla pozorovaná u Dsk2 ani u Rad23. Mechanismus, kterým Ddi1 přímo degraduje Ho, popsán nebyl. Vzhledem k tomu, že k interakci mezi Ddi1 a Ho nedochází v případě, že je znemožněná ubikvitinace Ho, se autoři domnívají, že jedinečnost Ddi1 v tomto experimentu spočívá ve specifické interakci mezi UBL doménou Ddi1 a motivů interagujících s ubikvitinem (UIM) na C-konci Ufo1[63].

Třetím buněčným dějem, kde Ddi1 prokazatelně hraje roli, je exocytosa zprostředkovaná systémem SNARE (z angl. SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor) proteinů umožňujících fúzi transportních váčků. SNARE jsou proteiny vytvářející rodinu o přibližně šedesáti zástupcích (v kvasinkových nebo lidských buňkách), z nichž všechny obsahují takzvaný SNARE motiv. Do membrány, jejíž fúzi zprostředkovávají, jsou často zakotveny C-koncovou transmembránovou doménou, ačkoliv několik SNARE proteinů využívá i palmitoylace. SNARE proteiny slouží ke zprostředkování interakce mezi váčkem a cílovou membránou (target), přičemž existují dva druhy SNARE, a to vSNARE (z angl. „vesicule“) a tSNARE (z angl. „target“). Tyto proteiny spolu tvoří takzvaný trans-SNARE komplex skládající se ze čtyř do sebe kompaktně sbalených helixů[65]. Po uskutečnění splynutí membrán a vylití transportovaného materiálu se z trans-SNARE vytváří cis-SNARE komplex, který je následně rozložený proteinem α-SNAP v reakci závislé na ATP[66]. Ddi1 bylo v kontextu této problematiky samostatně identifikováno jako Vsm1 (z angl. vSNARE master 1). Váže se zřejmě na Snc1 (z angl. Supressor of theNull allele of CAP) a s menší afinitou i na Snc2 SNARE proteiny, čímž se účastní vesikulárního transportu[67]. V kvasinkách nesoucích mutovaný gen pro Sec9 (z angl. SECretory) vede nadměrná exprese Ddi1 k inhibici růstu a kumulaci sekrečních váčků. Ddi1 totiž váže t-SNARE Sso1 (z angl. Supressor of Sec9), který je interakčním partnerem pro v-SNARE Sec9[68]. Znemožněním této interakce Ddi1 blokuje exocytosu a způsobuje zmíněnou akumulaci sekrečních váčků.

Doménové uspořádání Ddi1 proteinu ze *Saccharomyces cerevisiae* je znázorněno na Obrázku 1.4. na straně 26. Na N-konci je UBL doména o 81 aminokyselinách, zaujímající velmi podobné prostorové uspořádání jako ubikvitin (Obrázek 1.5, str. 27) i přes malou sekvenční identitu (14%)[58] a zároveň schopná ubikvitin vázat, i když s malou afinitou[69].

Obrázek 1.4: **Doménové uspořádání kvasinkového Ddi1.** Obrázek byl vytvořen pomocí internetové aplikace „My Domains“ (Expasy).



Obrázek 1.5: **Strukturní srovnání A) kvasinkové Ddi1 UBL a B) ubikvitinu.** Na obrázku je vidět velká strukturní podobnost mezi kvasinkovou Ddi1 UBL a ubikvitinem. Sekundární struktury obou molekul vykazují uspořádání nazývané v odborné literatuře jako „*β-grasp*“. Obrázek byl vytvořen pomocí programu Pymol™ s použitím PDB kódů 2N7E[61] pro kvasinkovou Ddi1 UBL doménu a 1UBQ[17] pro ubikvitin.

Doména nacházející se před RVP je takzvaná HDD (z angl. Helical Domain of Ddi1) doména[61]. Celkem obsahuje čtyři α-helixy, po dvou párech, kde každý pár tvoří samostatnou poddoménu označovanou podle konce, na kterém se nachází. Mezi jednotlivými páry helixů je oblast bez sekundární struktury o deseti aminokyselinách. N-terminání část HDD se vyznačuje výraznou podobností s některými DNA – vázajícími doménami transkripčních faktorů jako například CII transkripční faktor bakteriofága λ, POU – specifické OCT1 DNA – vázající doméně, nebo CUT doméně lidského STAB1 (Stabillin1)[61]. Na C-konci kvasinkového Ddi1 je potom ještě UBA doména vázající ubikvitin a K48 polyubikvitin[61].

1.5. Lidský Ddi2 protein

To, že je Ddi1 protein a jeho ortology obecně důležitý pro správné fungování buňky, je patrné nejen ze studií poukazujících na poruchy v řízení buněčného cyklu, buněčného dělení nebo embryogeneze při mutaci nebo deleci tohoto genu, ale i z faktu, že Ddi1 byl pod evolučním tlakem zachován napříč celou eukaryotní říší. Proteiny Ddi1 kvasinek a lidí samozřejmě nejsou totožné, ale zachovaly si vysokou sekvenční podobnost, díky čemuž můžeme říci, že se jedná o proteiny evolučně příbuzné[70].

Mezi Ddi1 proteiny ovšem existuje několik zásadních rozdílů, pokud se zaměříme na jednotlivé ortology. Ddi1 z jakéhokoliv obratlovce totiž postrádá C-koncovou UBA doménu přičemž celý gen je v genomu zároveň duplikován. Obratlovci mají tedy Ddi1 a Ddi2, které se od sebe liší strukturou genů a nacházejí se i na různých chromosomech. Ddi2 na chromosomu 1 a Ddi1 na chromosomu 11. Vysvětlení spočívá v evolučním vývoji. Mezi UBA a RVP doménu se pravděpodobně v evoluci raných obratlovců vložil jiný gen, nazývaný RSC1A1 (z angl. Regulator of Solute Carriers 1), který od sebe domény oddělil. UBA doménu, původně náležící Ddi1, RSC1A1 protein využívá ke svojí funkci týkající se lokalizace cukerných přenašečů. Gen pro Ddi1, byl následně duplikován a to pravděpodobně procesem retrotranspozice (transkribovaná RNA se místo translace přepíše zpět do DNA reverzní transkriptasou a ta je následně integrována na jiné místo genomu). Jelikož gen pro Ddi1 obratlovců neobsahuje introny, původním ze dvou genů je s vysokou pravděpodobností Ddi2. Toto tvrzení je podpořeno i tím, že evolučně původní kvasinkový Ddi1 je sekvenčně podobnější lidskému Ddi2 než lidskému Ddi1[70].

Současný lidský Ddi2 protein má na svém C-konci místo pozbylé UBA domény jiný motiv. Jedná se o UIM, slabě ale specificky vázající monoubikvitin[70]. Jestliže se evolucí na místě původní UBA domény vytvořil nový motiv s podobnou funkcí, naznačuje to tomu, že schopnost vázat ubikvitin je pro funkci Ddi2 důležitá nebo minimálně výhodná. V kombinaci se zachovalou proteasovou doménou se pro tento protein nabízí funkce deubikvitinace. Potvrdit nebo vyvrátit tuto hypotézu bylo cílem této práce.

Struktura UBL domény lidského Ddi2 odpovídá opět tzv. „β grasp“ uspořádání, jaké můžeme najít u molekuly ubikvitinu. Sestává se z 5 β-skládaných listů, jednoho α-helixu, a jednoho 3_{10} helixu. Sekvenční podobnost UBL domény kvasinkového Ddi1 a UBL domény lidského Ddi2 je 46%. I přes jejich vysokou strukturní podobnost je po

bližší analýze zřejmé, že UBL domény kvasinkového Ddi1 a lidského Ddi2 proteinu interagují s jinými molekulami. Rozdílné je totiž rozmístění nabitých skupin v okolí hydrofobního interakčního povrchu. Zatímco Ddi1 UBL doména kvasinkového Ddi1 má záporně nabitý interakční povrch (čímž je komplementární ke kladně nabitému povrchu ubikvitinu), ten samý povrch UBL domény liského Ddi2 nabitý není. Díky tomu, interaguje Ddi2 UBL s ubikvitinem jen velmi slabě[69,70].

Při srovnání RVP domén kvasinkového Ddi1 a lidského Ddi2 je patrné jejich vysoce konzervované prostorové uspořádání spolu s aktivním místem, skládajícím se z aminokyselin D-S-G-A. Podobně jako ostatní aspartátové proteasy má RVP doména Ddi2 (jeden monomer) jeden β-barrel o šesti vláknech, tři vlákna β-skládaného listu a dva α-helixy. Ve srovnání se strukturou HIV proteasy zaujímá dutina aktivního místa RVP domény Ddi2 proteinu otevřenější konformaci. Předpokládá se tedy, že by proto mohla štěpit objemnější substráty. První substrát byl nedávno objeven, je jím již zmíněný transkripční faktor Nrf1, regulující transkripci proteasomálních podjednotek při inhibici funkce proteasomu[6].

Podobně jako u jiných orthologů Ddi1, byla i u Ddi2 identifikována doména v sekvenci předcházející RVP, bohatá na helikální sekundární sturktury. Podle této charakteristiky byla pojmenována HDD (z angl. „Helical Domain of Ddi“). Skládá se z celkem čtyř α-helixů, vůči sobě uspořádaných do kompaktní globule, mající hydrofobní jádro bohaté na leucinové zbytky. Mezi dvěma z helixů se vytváří solný můstek mezi glutamátem 161 a lysinem 170, stabilizující kompaktní strukturu. Jak C- tak i N-konec HDD domény jsou nestrukturované a umožňují tak pohyb jednotlivých domén lidského Ddi2 vůči sobě.

2. Cíle

- Exprimovat v bakteriálním expresním systému lineární tetraubikvitin a následně jej purifikovat.
- V savčích buňkách exprimovat a následně purifikovat lidský Ddi2 protein.
- Otestovat možnou deubikvitinasovou aktivitu rekombinantně připraveného lidského Ddi2 na různých diubikvitinových řetězcích, a to v pH 4,5 a 7,4.

3. Materiál a Metody

3.1. Materiál

- Top10 chemicky kompetentní *E. Coli* (Invitrogen, USA)
- Syntetický gen pro lineární tetraubikvitin ve vektoru pUC57 (Genscript, USA)
- Plasmid pET24a (EMD Millipore USA)
- Plasmid pET16b (EMD Millipore, USA)
- LB medium (Sigma Aldrich, USA)
- Agarové plotny (ampicilin, kanamycin)
- Sada chemikálií „Zyppy Plasmid Miniprep Kit“ (Zymo Research, USA)
- Restrikční endonukleasy BamHI, NdeI (New England Biolabs, USA)
- Pufr pro restrikční štěpení CutSmart® (New England Biolabs USA)
- Standard molekulových hmotností GelPilot 1kb ladder (Quiagen, Německo)
- Reakční pufr pro Antarktickou fosfatasu (New England Biolabs USA)
- Antarktická fosfatasa (New England Biolabs, USA)
- T4 ligasa (New England Biolabs, USA)
- Pufr pro T4 ligasu (New England Biolabs, USA)
- Sada chemikálií „QIAquick gel extraction kit“ (QIAGEN, Německo)
- Bradfrord Protein Assay (BioRad, USA)
- Chemicky kompetentní buňky BL21(DE3)RIL (New England Biolabs, USA)
- Filtr 0,22µm (Millex – Sigma Aldrich, USA)
- Benzonasa (New England Biolabs, USA)
- Dialyzační membrána (práh molekulové hmotnosti 6–8 kDa) (Spectrumlabs, USA)
- Kolona pro kationtově výměnnou chromatografii Mono-S™ 10/100 GL (GE Healthcare Life Sciences)
- SDS-PAGE aparatura Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad, USA)
- Aparatura pro agarosovou elektroforesu Owl Easycast B1A (Thermo Scientific, USA)
- Aparatura pro elektropřenos Mini Trans-Blot® Cell (BioRad, USA)
- Trypsin/EDTA (Thermo Scientific, USA)
- Buňky HEK293T stabilně exprimující gen pro N-koncově značený Ddi2 (připravené v laboratoři Jana Konvalinky a Kláry Grantz Šaškové)
- Kultivační misky (Sarstedt, Německo)

- IMDM médium (Biosera, Francie)
- Injekční stříkačky (Chirana, Česká republika)
- Jehly 0,260 mm a 0,159 mm (Chirana, Česká republika)
- 3× FLAG eluční peptid (Sigma Aldrich, USA)
- „Anti-FLAG M2 magnetic beads“ resin (Sigma Aldrich, USA)
- Nitrocelulosová membrána (Thermo Scientific, USA)
- Chromatografický papír
- Kasein v PBS Blocker™ (Thermo Scientific, USA)
- Protilátka anti-Ddi2 (katalogové číslo: HPA043119, Sigma aldrich, USA)
- Sekundární protilátka (proti králičí primární) s konjugovanou křenovou peroxidasou (katalogové číslo: 31460, Thermo Scientific, USA)
- Substrát křenové peroxidasy „Super signal West Femto maximum sensitivity substrate“ (katalogové číslo: 34095, Thermo Scientific, USA)
- Dounceův homogenizátor (Sigma Aldrich, USA)
- UbiCREST Deubiquitinase Enzyme Kit (katalogové číslo: K-400) Boston Biochem, USA)
- Koktejl proteasových inhibitorů (Roche, Švýcarsko)
- Standard hovězího sérového albuminu (katalogové číslo: 23210,Thermo Scientific, USA)

3.2. Chemikálie

Biosynth (Švýcarsko)

IPTG

Biotika (Slovensko)

ampicilin

Biotinum (USA)

GelRed

ICN Biomedical (USA)

chlorid železitý

Lach-Ner (Česká republika)

kyselina octová, kyselina chlorovodíková, isopropanol, dihydrogen fosforečnan draselný, chlorid amonný, hydrogen fosforečnan sodný, sacharosa,

Penta (Česká republika)

chlorid sodný, D-Glukosa, D-α-laktosa, glycerol, síran zinečnatý, síran sodný, chloristan sodný, síran hořečnatý

Serva (Německo)

bromfenolová modř, agarosa

Sigma Aldrich (USA)

EDTA, SDS, HEPES, imidazol, trypton, kvasinkový extrakt, chlorid výápenatý, chlorid manganatý,chlorid kobaltnatý, chlorid měďnatý, kyselina boritá, PMSF

Fluka (USA)

kanamycin

3.3. Přístroje

- Inkubátor innova 44/44R (New Brunswick Scientific, USA)
- UV transiluminátor Quantum ST4 (Vilber Lourmat, Německo)
- Autokláv MLS-3020U (Sanyo, Japonsko)
- Centrifuga J 30-I (Beckman Coulter, USA)
- Centrifuga Allegra X-15R (Beckman Coulter,USA)
- Centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga 5424R (Eppendorf, Německo)
- Homogenizátor EmulsiFlex C-3 (Avestin, Kanada)
- FPLC chromatograf Akta Explorer (Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie)
- Spektrofotometr Specord 210 (Analytik Jena, Německo)
- Čtečka mikrotitračních destiček M1000 (TECAN, Rakousko)
- Termostat IPP 400 (Memmert, Německo)
- Mikroskop Eclipse TS-100 (Nikon, Japonsko)
- Válečkový rotátor SRT9D (Stuart, Velká Británie)
- Spektrofotometr Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA)
- ChemiDoc-It Imaging System (Analytik Jena, Německo)

3.4. Transformace genu pro lineární tetraubikvitin do kompetentních buněk

Syntetický Gen pro lineární tetraubikvitin ohraničený na 5‘ konci NdeI a na 3‘ konci BamHI restrikčními místy, ve vektoru pUC57 s rezistencí na ampicilin (Genscript, USA), byl methodou teplotního šoku zaveden do kompetentních bakterií kmene Top10. Do mikrozkumavky rozmražených kompetentních buněk byl přidán 1 µl DNA o koncentraci 161 ng/µl a směs byla chlazena na ledu. Po deseti minutách byla směs vystavena teplotě 42 °C po dobu 90 sekund. Následovala inkubace 2 min na ledu a dále byla buněčná suspenze 10× zředěna LB (z angl. „Luria–Bertani“) médiem. Inkubace probíhala při 37 °C, 45 minut.

3.5. Selekce buněk s požadovaným plasmidem

Po dokončení inkubace byla buněčná suspenze pro selekci buněk transformovaných plasmidem sterilně rozetřena po povrchu plotny obsahující antibiotikum ampicilin o koncentraci 100 µg/ml. Plotny s nátěrem buněčné suspenze byly inkubovány přes noc ve 37°. Jedna z narostlých kolonií byla vypíchnuta z misky a vnesena do 10 ml LB média. Nárůst bakterií probíhal za míchání 220 RPM (z angl. Revolutions Per Minute) v inkubátoru Innova 44/44R (New Brunswick Scientific, USA). Buněčná peleta byla oddělena centrifugací (5200 × g; 10 min; 10 °C; centrifuga Allegra X-15R; Beckman Coulter, USA).

3.6. Izolace DNA z kompetentních buněk

Plasmidová DNA byla z pelety bakterií izolována pomocí sady chemikálií (Zyppy Plasmid Miniprep Kit, Zymo Research, USA). Buněčná peleta byla resuspendována v 600 µl vody. Přídavkem 100 µl lyzačního pufru a jemným promícháním opakovaným převracením mikrozkumavky byly buňky lyzovány. Doba trvání tohoto kroku byla přibližně 2 minuty. Dále bylo do směsi přidáno 350 µl neutralizačního pufru a směs byla centrifugována (13 000 × g; 10 min; 20 °C). Supernatant byl nanesen na kolonku a zcentrifugován (13 000 × g; 1 min; 20 °C). Pro navázání DNA na kolonku byla doba inkubace před každou centrifugací 1 minuta. Kolonka byla promyta nejdříve 200 µl

promývacího pufru 1 a následně 400 µl promývacího pufru 2. Mezi kroky byla kolonka vždy centrifugována (13 000 × g; 1 minutu; 20 °C) a filtrát odstraněn. Promytá plasmidová DNA zachycená na kolonce byla eluována 100 µl sterilní vody a následnou centrifugací (13 000 × g; 1 minutu; 20 °C) do prázdné sterilní mikrozkumavky. Koncentrace a čistota DNA byla změřena na spekrofotometru nanodrop ND-1000 (Thermo scientific, USA). Pro všechny centrifugační kroky byla použita mikrocentrifuga 5415R (Eppendorf, Německo).

3.7. Restrikční štěpení endonukleasami BamHI a NdeI

Složení použitých roztoků:

Pufr pro restrikční štěpení CutSmart® (10×) (New England Biolabs, USA): 100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 10 mM $MgCl_2$; 100 µg/ml BSA; pH 7,9 (25 °C)

Pro rozštěpení expresního vektoru pET24a byly použity dvě restrikční endonukleasy, BamHI (New England Biolabs, USA) se štěpným místem v sekvenci 5‘ GGATCC-3‘ a NdeI (New England Biolabs, USA), se štěpným místem v sekvenci 5‘ CATATG-3‘. Stejné endonukleasy byly použity pro vyštěpení genu pro lineární tetraubikvitin z plasmidu pUC57. Reakční směs štěpení vektoru obsahovala 2,1 µg pET24a, 20 U každé z restrikčních endonukleas, a 5 µl 10 × koncentrátu pufru pro restrikční štěpení. Celkový objem reakce byl 50 µl. Reakční směs štěpení insertované DNA obsahovala 6,9 µg štěpené DNA, 20 U každého z použitých enzymů a 5 µl pufru pro restrikční štěpení. Celkový objem této reakce byl taktéž 50 µl. Obě reakce byly inkubovány přes noc při 37 °C. Stejným způsobem a při stejných reakčních podmínkách jako zde uvedené, bylo provedeno i jedno kontrolní štěpení. Pomocí enzymů XhoI a NdeI byl štěpen vektor pET24a obsahující gen pro lineární tetraubikvitin za účelem kontroly celého klonovacího postupu.

3.8. Elektroforesa v agarosovém gelu

Složení použitých roztoků:

TAE pufr: 40 mM Tris-acetát; 1 mM EDTA; pH 8,0

Vzorkový pufr: 40% (w/v) sacharosa; 0,1% (w/v) bromfenolová modř

DNA byla dělena na 1% agarosovém gelu, připraveném rozpuštěním 0,5 g agarosy ve 49,5 ml TAE (Tris-Acetát-EDTA (z angl. Ethylene diamine tetraacetic acid)) pufru. Směs byla zahřívaná v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarosy a doplněná na původní hmotnost destilovanou vodou. Do směsi byly přidány 4 µl barviva GelRed 10 000× (Biotium), gel byl přelit do formy s hřebenem a ponechán při laboratorní teplotě do ztuhnutí cca 20 minut. Vzorek, naředěný v poměru 5:1 6× koncentrátem vzorkového pufru byl aplikován do jamek, elektroforesa probíhala v TAE pufru po dobu 45 minut při napětí 120 V. Separovaná DNA byla na gelu detekována pomocí UV transluminátoru Quantum ST4 (Vilber Lourmat, Německo).

3.9. Isolace DNA z agarosového gelu

Složení použitých roztoků:

QG pufr: 5,5 M guanidin thiokyanát; 20 mM Tris-HCl; pH 6,6

Promývací pufr: 10 mM Tris-HCl; 80% ethanol; pH 7,5

Proužky požadované velikosti byly vyříznuty skalpelem z gelu. Isolace DNA z agarosového gelu byla provedena pomocí sady chemikálií QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Německo). Vyříznutý fragment gelu byl zvážen a v mikrozkumavce smísen s trojnásobkem jeho hmotnosti QG pufru. Tato směs byla inkubována při 50 °C po dobu 10 minut a při stálém promíchávání 500 RPM. Do mikrozkumavky byl přidán jeden objemový ekvivalent hmotnosti fragmentu isopropanolu a směs byla převedena do kolonky. Následovala centrifugace (13 000 × g; 1 min; 25 °C). Kolonka byla promyta 700 µl promývacího pufru a centrifugována (13 000 × g; 1 min; 25 °C). Kolonka byla převedena do mikrozkumavky a DNA byla eluována 40 µl sterilní vody. Pro všechny centrifugační kroky byla použita mikrocentrifuga 5415R (Eppendorf, Německo).

3.10. Defosforylace konců DNA vektoru pET24a

Složení použitých roztoků:

Reakční pufr pro Antarktickou fosfatasu (10×) (New England Biolabs, USA): 50 mM Bis-Tris Propan-HCl; 1 mM $MgCl_2$; 0,1 mM $ZnCl_2$; pH 6,0

Defosforylační reakce byla provedena pomocí enzymu Antarktická fosfatasa (New England Biolabs, USA). K roztoku DNA z předchozího kroku byl přidán 10× koncentrát reakčního pufru v poměru 1:9 a 1 µl (5 U) enzymu. Celkový objem reakce byl 30 µl a inkubace probíhala při 37 °C po dobu 30 minut. Po ukončení inkubační doby byl enzym inaktivován vystavením teplotě 70 °C po dobu 5 minut.

3.11. Ligace DNA fragmentu nesoucí gen pro lineární tetraubikvitin do vektoru pET24a.

Složení použitých roztoků:

T4 ligační pufr (10×): 50 mM Tris-HCl; 10 mM $MgCl_2$; 1 mM ATP; 10 mM DTT (dithiotreitol); pH 7,5 (25°)

Pro ligaci DNA nesoucí gen pro lineární tetraubikvitin a vektoru pET24a byl použit enzym T4 DNA ligasa (New England Biolabs, USA). Reakční směs obsahovala 52 ng DNA lineárního tetraubikvitinu, 74 ng DNA pET24a (molární poměr vektor-insert přibližně 1 : 3,5), 2 µl 10× koncentrátu T4 ligačního pufru, 1 U T4 DNA ligasy, a byla doplněna na objem 20 µl sterilní vodou. Ligační směs se inkubovala přes noc při 16 °C. Ligovaná DNA byla transformována do chemicky kompetentních buněk Top10 (*E.coli*) (viz kapitola 3.4).

Buňky byly naneseny na plotny obsahující antibiotikum kanamycin (viz kapitola 3.5). Jedna z vybraných kolonií byla přenesena do 8 ml LB media obsahující 40 mg/ml kanamycinu a kultura byla kultivována přes noc při 220 RPM ve 37 °C. Následovala centrifugace (5200 × g; 10 minut; 10 °C; centrifuga Allegra X-15R; Beckman Coulter, USA) a izolace plasmidové DNA (viz kapitola 3.6). Izolovaná DNA byla zkontrolovaná sekvenací.

3.12. Exprese tetraubikvitinu v autoindukčním růstovém médiu

Složení použitých roztoků

Roztok A: 1% (w/v) trypton; 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt

Roztok B (50×): 25% (w/v) glycerol; 0,14 M glukosa; 0,29 M α-laktosa

Roztok C (50×): 12,5 M Na_2HPO_4; 12,5 M KH_2PO_4; 2,5 M NH_4Cl; 0,25 M Na_2SO_4

Roztok D (1000×): 0,05 M $FeCl_3$; 0,02 M $CaCl_2$; 0,01 M $MnCl_2$; 0,01 M $ZnSO_4$; 2 mM $CoCl_2$; 0,2 mM $CuCl_2$; 0,2 mM H_3BO_3

Správně ligovaná DNA byla transformovaná do chemicky kompetentních buněk BL21(DE3)RIL. Transformovanými buňkami bylo zaočkováno 100 ml LB média a po inkubaci v 37 °C bylo 15 ml kultury přeneseno do 1 litru autoindukčního média (celkem byly zaočkovány 2 litry autoindukčního média). Autoindukční médium bylo připraveno smísením 1 l roztoku A sterilizovaného autoklávem (15 min 120 °C), 2 ml 1 M $MgSO_4$, 1 ml roztoku D, 20 ml roztoku B a 20 ml roztoku C. Roztoky B, C a D byly sterilizované filtrací skrz 0,22 μm filtr. 1 litr autoindukčního média byl zaočkován 15 ml kultury transformovaných kompetentních buněk. Zaočkované médium bylo inkubováno v inkubátoru Innova 44/44R (New Brunswick Scientific, USA) při stálém míchání 220 RPM, po dobu 48 hodin, při 37 °C. Peleta buněk byla oddělena centrifugací (6000 × g; 10 min; 10 °C; centrifuga J-30I; Beckman Coulter, USA).

3.13. Lýza buněk s plasmidem pro lineární tetraubikvitin

Složení použitých roztoků:

Lyzační pufr: 50 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 0,02% NP-40; 0,4 mg/ml lysozym; pH 7,6;
1 tableta Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Švýcarsko);
1 mM Fenylmethansulfonylchlorid

Peleta buněk byla resuspendována v 50 ml lyzačního pufru a po celou dobu lyzace byla suspenze držena na ledu. Suspenze byla nejprve homogenizovaná pomocí Dounceova homogenizátoru a buňky byly dále lyzovány pomocí přístroje EmulsiFlex C-3 (Avestin,

Kanada), při 4 °C. Produkt byl jímán do nádoby chlazené ledem, použitý disrupční tlak v přístroji byl 1100 bar. Suspenze byla lyzována ve třech cyklech, mezi prvním a druhým cyklem byl lyzát po dobu 30 min při 4 °C inkubován s enzymem benzonasou, štěpícím DNA a tím snižujícím viskozitu suspenze. Zbytky buněk byly z lyzátu odstraněny centrifugací (15 000 × g; 10 min; 4 °C; centrifuga Avanti J-30I; Beckman Coulter, USA).

3.14. Purifikace precipitací kyselinou chloristou

Složení použitých roztoků:

Dialyzační pufr: 50 mM CH_3COONH_4; 1 mM EDTA; pH 4,5

Protože na rozdíl od naprosté většiny buněčných proteinů, je ubikvitin odolný vůči působení kyseliny chloristé, bylo k 50 ml lyzátu buněk obsahujícímu ubikvitin za stálého míchání, při 4 °C přikapáno 0,35 ml 70% roztoku kyseliny chloristé (celkový obsah kyseliny byl 0,7%). Inkubace s chloristanem probíhala při 4 °C a trvala 10 minut. Vzniklá sraženina buněčných proteinů, byla z roztoku odstraněna pomocí centrifugace (10 000 × g; 12 min; 4 °C; centrifuga Allegra X-15R; Beckman Coulter, USA). Dále byl roztok dialyzován za účelem odstranění chloristé kyseliny a převedení ubikvitinu do pufru pro kationtově výměnnou chromatografii. Roztok ubikvitinu byl aplikován do dialyzační membrány s prahem molekulové hmotnosti 3,5 kDa a v ní vnořen do dialyzačního pufru o objemu 5 l. Dialýza probíhala za stálého míchání při 4 °C přes noc. Následovala centrifugace (30 000 × g; 15 min; 4 °C; centrifuga J 30-I, Beckman Coulter, USA) pro odstranění precipitátu, který mohl vzniknout během dialýzy, následoval poslední purifikační krok, kationtově výměnná chromatografie.

3.15. Kationtově výměnná chromatografie

Složení použitých roztoků

Ekvilibrační pufr: 50 mM CH_3COONH_4; pH 4,5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

Eluční pufr: 50 mM CH_3COONH_4; pH 4,5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT, 0,5 M NaCl

Pro purifikaci lineárního tetraubikvitinu byla použita kolona MonoS^{TM} 10/100 GL (GE Healthcare Life Sciences, UK) a FPLC chromatograf Akta Explorer (Amersham

Pharmacia Biotech, Velká Británie). Kolona byla ekvilibrována desetinásobkem objemu kolony ekvilibračního pufru. Vzorek lineárního tetraubikvitinu po dialýze byl aplikován na kolonu a promyt jedním objemem kolony ekvilibračního pufru. Eluce proteinu byla provedena při průtoku 2 ml/min použitím 300 ml lineárního gradientu 0 – 0,5 M NaCl. Frakce byly sbírány po 4 ml.

3.16. Elektroforéza proteinů v prostředí SDS a barvení stříbrem

Složení použitých roztoků:

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE (z angl. Polyakrylamid Gel Electrophoresis (6×): 0,35 M Tris; pH 6,8; 30% (v/v) glycerol; 0,36% (v/v) merkaptoethanol; 10% (w/v) SDS (z angl. Sodium Dodecyl Sulphate); 0,02% (w/v) bromfenolová modř

Elektrodový pufr: 25 mM Tris; 250 mM glycin; 0,1% SDS

Akrylamid mix: 42,8% akrylamid; 1,2% bis-akrylamid

Zaostřovací gel (6%): 250 mM Tris-HCl; pH 6,8; 6,6% (w/v) akrylamid mix; 0,1% (w/v) SDS; 0,2% (v/v) TEMED (z angl. tetramethylethylenediamin); 0,1% (w/v); APS (z angl. amonium persulfate);

Rozlišovací gel (14%): 375 mM Tris-HCl; pH 8,8; 14% (w/v) akrylamid mix; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% TEMED; 0,18% (w/v); 0,1% (w/v) APS

Fixační roztok: 12% (v/v) kys. octová; 50% (v/v) methanol; 0,02% (v/v) formaldehyd

Promývací roztok: 50% (v/v) methanol

Redukční roztok: 0,02% (w/v) thiosíran sodný

Impregnační roztok: 0,2% (w/v) dusičnan stříbrný; 0,02% (v/v) formaldehyd

Vyvolávací roztok: 560 mM uhličitan sodný; 16 μM thiosíran sodný; 0,02% (v/v) formaldehyd

Stopovací roztok: 12% kys. octová; 50% (v/v) methanol

Vzorky pro elektroforézu byly připraveny denaturací varem ve vzorkovém pufru po dobu 5 minut. Pro elektroforézu byla použita aparatura Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad, USA). Do aparatury byl nalit rozlišovací gel, po jeho polymerizaci gel zaostřovací. Vzorky jednotlivých kroků purifikace lineárního tetraubikvitinu a dalších experimentů byly aplikovány do jamek zaostřovacího gelu a aparatura byla naplněna elektrodovým pufrem. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 140 V po dobu 60 min. Detekce proteinů byla provedena barvením stříbrem dle následujícího postupu. V prvním kroku byly proteiny fixovány 30 minut fixačním roztokem. Gel byl promyt promývacím roztokem 3× 15 minut. V dalším kroku byly gely vystaveny redukčnímu prostředí v redukčním roztoku 1 minutu. Následovaly 3 promytí deionizovanou vodou 20 vteřin každé, dále impregnační roztok 20 minut a opět promytí deionizovanou vodou. Vyvolávacím roztokem byly pak proteiny vyvolávány do obarvení gelu. Gel byl následně promyt vodou a vyvolávání zastaveno stopovacím roztokem.

3.17. Kultivace savčích buněk nesoucích gen pro lidský protein Ddi2

Složení použitých roztoků:

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4; 1,8 mM KH_2PO_4; pH 7,4

Trypsin/EDTA: 0,25 % Trypsin; 2,21 mM EDTA v pufru HBSS (z angl. Hank's balanced salt solution)

Jeden alikvot buněk HEK293T (z angl. Human embryonal kidney) se stabilně integrovaným pTet-Off Advanced vektorem (Clontech, USA), stabilně exprimující Ddi2 gen nesoucí FLAG afinitní kotvu na N-konci (klon3+/8, připraven v laboratoři J. Konvalinky a K. Šaškové), byl kultivován v jedné 35 milimetrové jamce v rámci šesti jamkové kultivační destičky (Sarstedt, Německo) se 2 ml IMDM média (z angl. Iscove's Modified Dulbecco's Media) (Bio Sera, Francie). Médium bylo měněno po dvou až třech dnech, buňky byly pasážovány v přibližně 90% konfluenci (1 ml Trypsin/EDTA, 2 min, 37 °C) nejdříve na jednu 60 milimetrovou kultivační misku se 4 ml média. Buňky byly pozorovány pomocí mikroskopu Eclipse TS-100 (Nikon, Japonsko). Následně byly vždy po dosažení dostatečné konfluence pasážovány

(1,2 ml Trypsin/EDTA, 2 min, 37 °C) na 4× 100 milimetrové misky a poté na 20× 100 milimetrové misky. Na jednu 100 mm misku bylo použito vždy 8 ml média. Pasážování bylo provedeno odlitím média, propláchnutím kultivační misky nahřátým (37 °C) sterilním PBS (z angl. Phosphate buffered saline), krátkou trypsinizací sterilním roztokem Trypsin/EDTA a následným přenesením buněk do nových misek s čerstvým nahřátým (37°C) médiem. Buňky byly inkubovány při 37°C.

3.18. Lýza savčích buněk

Složení použitých roztoků:

Lyzační pufr: 50 mM HEPES (4- (2-hydroxyethyl)- 1-piperazineethane sulphonic acid); 150 mM NaCl; 0,4 % IGEPAL CA-630 (octylphenoxypoyethoxy ethanol); pH 7,8

Buněčná peleta byla na ledu resuspendována vychlazeným lyzačním pufrem, v objemovém ekvivalentu desetinásobku její váhy. Tento roztok byl třikrát zmrazen na suchém ledu a zase ponechán roztát ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Mezi prvním, druhým a třetím cyklem byla buněčná suspenze pomocí injekční stříkačky protažena jehlou o vnitřním průměru 0,260 mm. Po třetím cyklu byla použita jehla o vnitřním průměru 0,159. Byl odebrán vzorek pro SDS-PAGE. Suspenze byla centrifugována (20 000 × g; 15 min; 4 °C; centrifuga 5424R, Eppendorf, Německo). Supernatant byl filtrován pomocí injekční stříkačky skrz 0,22 µm filtr. Ze supernatantu i pelety byly odebrány vzorky na SDS-PAGE.

3.19. Purifikace lidského Ddi2 proteinu pomocí FLAG afinitní kotvy

Složení použitých roztoků:

TBS: 50 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,6

FLAG Eluční pufr: 100 mg/ml FLAG peptid v TBS pufru

K purifikaci bylo použito 200 µl suspenze „Anti-FLAG M2 Magnetic Beads“ resinu (Sigma Aldrich, USA), což odpovídá 100 µl kompaktního resinu. Tento resin byl

4× promyt 1 ml TBS (z angl. Tris Buffered Saline) pufru. K promytému resinu byl následně přidán zfiltrovaný supernatant buněčného lyzátu. Následovala inkubace 1 hodinu při teplotě 4 °C a míchání na válečkovém rotátoru. Po inkubaci byl resin magneticky sesbírán na stěnu a supernatant odebrán. Dále byl resin 3× promyt 2 ml TBS pufru. Eluován byl protein z resinu 500 µl FLAG elučního pufru. Z promývacích kroků a supernatantu lyzátu po inkubaci s resinem byly taktéž odebrány vzorky na SDS-PAGE.

3.20. Elektropřenos s imunodetekcí

Složení použitých roztoků:

Transferový pufr: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% methanol; pH 8,3

TBST: 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,005% TWEEN 20 (polyoxyethylen-sorbitanmonolaurát); pH 7,6

Po provedení elektroforesy v prostředí SDS, byl gel vyjmut z aparatury a vložen do aparatury pro mokrý elektropřenos, Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, USA), mezi nitrocelulosovou membránu (Thermo Scientific, USA) a chromatografický papír. Přenos probíhal v transferovém pufru 1 hodinu při 100 V, byl použit zdroj PowerPac (BioRad, USA). Po elektropřenosu byla membrána 3× promyta pufrem TBST, a dále blokována roztokem kaseinu Blocker™ (Thermo Scientific, USA), 5× ředěném v TBST pufru. Blokování probíhalo 1 hodinu v 4 °C. Do roztoku byla následně přidána primární protilátka proti Ddi2 (Sigma-Aldrich, USA), produkovaná v králíkovi, ředěná 1:1000. Membrána byla s primární protilátkou inkubována přes noc ve 4 °C. Dále byla membrána 3× promyta TBST a inkubována se sekundární, proti-králičí protilátkou, s konjugovanou křenovou peroxidasou. Inkubace trvala 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po dalším promytí TBST byla membrána vyvolána pomocí „SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate“ (Thermo Fisher scientific, USA) substrátu pro křenovou peroxidasu. Detekce signálu byla provedena v přístroji ChemiDoc-It imaging system (Analytik Jena, Německo).

3.21. Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové

Metoda stanovení koncentrace proteinu dle Bradfordové[71] byla použita pro stanovení koncentrace purifikovaných proteinů. Jako standardní vzorky pro vytvoření kalibrační křivky byl použit BSA standard (Thermo Scientific, USA). Do jednotlivých roztoků byl v poměru 1:4 přidán 5× koncentrát barviva Bradford Protein Assay (BioRad). Měření bylo provedeno v uspořádání na mikrotitrační destičce o 96 jamkách, na přístroji Infinite M1000 (TECAN, Švýcarsko). Absorbance byla měřena při vlnové délce 595 nm.

3.22. Testování aktivity proteinu Ddi2

Složení použitých roztoků:

Pufr A (2×): 200 mM HEPES; 600 mM NaCl; pH 7,4

Pufr B (2×): 200 mM CH_3COONa; 600 mM NaCl; pH 4,5

Pufr pro deubikvitinasy (10×): komerční, složení nedostupné (UbiCREST Deubiquitinase Enzyme Kit (katalogové číslo: K-400) Boston Biochem, USA)

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE (6×): 0,35 M Tris; pH 6,8; 30% (v/v) glycerol; 0,35 M SDS; 0,36% (v/v) merkaptoethanol; 10% (w/v) SDS; 0,02% (w/v) bromfenolová modř

Dále bylo provedeno testování deubikvitinační aktivity proteinu Ddi2 na celkem osmi diubikvitinových (diUB) řetězcích (M1, K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) s využitím UbiCREST Deubiquitinase Enzyme Kit (katalogové číslo: K-400) (Boston Biochem, USA). Reakce byly provedeny s Ddi2 s FLAG kotvou na C-konci (připraveném vlaboratoři J. Konvalinky a K. Šaškové) či na N-konci (exprimováno a purifikováno mnou), při pH 4,5 a 7,4. Jako negativní kontrola byla použita ještě třetí varianta Ddi2, a to s kotvou na N-konci a nesoucí mutaci D252A (také připraveno vlaboratoři J. Konvalinky a K. Šaškové). Všechny reakce byly provedeny dvakrát, jedna byla zastavena okamžitě, u druhé byla inkubační doba vždy 24 hodin. Jako pozitivní kontrola bylo provedeno štěpení příslušných diubikvitinových řetězců pomocí specifických deubikvitinas získaných také ze sady UbiCREST Deubiquitinase Enzyme Kit (katalogové číslo: K-400) (Boston Biochem,

USA). Zde byla opět jedna z reakcí zastavena okamžitě a inkubační doba druhé byla 30 minut. V reakcích pozitivní kontroly bylo pH optimum daných enzymů.

Reakční směsi byly o celkovém objemu 15 µl, každá obsahovala 1 µl diUB o koncentraci 500 ng/µl, 7,5 µl 2× koncentrátu příslušného pufru, 1,5 µl příslušného Ddi2 o koncentraci 350 ng/µl (pro N-FLAG Ddi2) a 5 µl vody. Koncentrace C-FLAG Ddi2 v deubikvitinačních reakcích byla podle Obrázku 4.7 přibližně 2/3 N-term. V případě inaktivního mutantu byla koncentrace v důsledku jeho nestability přibližně 1/4 N-term Ddi2. Reakce byly zastavovány přídavkem 3 µl 6× koncentrátu vzorkového pufru.

3.23. bis Tris–MES SDS elektroforesa a barvení Coomassie Brilliant Blue

Složení použitých roztoků:

Zaostřovací gel: 360 mM bis-Tris pufr (pH 6,5); 3,8% (w/v) akrylamid; 0,1% (w/v) bis-akrylamid; 0,4% (v/v) TEMED; 0,5% (v/v) APS

Rozlišovací gel: 0,36 M bis-Tris pufr (pH 6,5); 9,33% (w/v) akrylamid; 0,62% (w/v) bis-akrylamid; 0,4% (v/v) TEMED; 0,5% (v/v) APS

Roztok CBB R-250: 0,1% CBB; 40% methanol; 10% CH_3COOH

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE (z angl. Polyakrylamid Gel Electrophoresis (6×): 0,35 M Tris; pH 6,8; 30% (v/v) glycerol; 0,36% (v/v) merkaptoethanol; 10% (w/v) SDS; 0,02% (w/v) bromfenolová modř

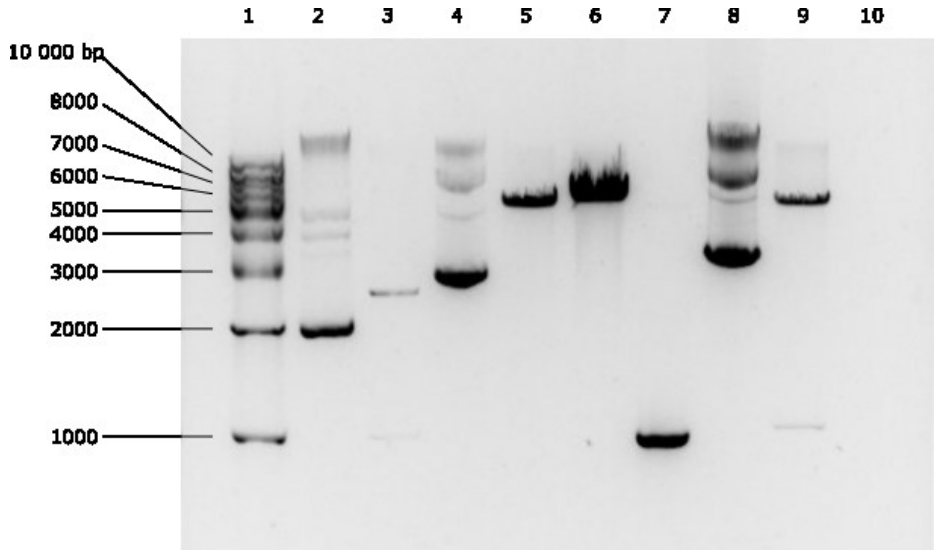
Elektrodový pufr pro Bis–tris–Mes elektroforézu: 50 mM MES (z angl 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid); 50 mM Tris; 1 mM EDTA; 0,1% SDS; 1 mM $NaHSO_4$

Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako pro Tris-glycin SDS-PAGE, varem 5 minut ve vzorkovém pufru. Rozlišovací gel byl nalit do aparatury Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad, USA) a po jeho polymerizaci i gel zaostřovací. Vzorky byly aplikovány do jamek zaostřovacího gelu a v napětí 120 voltů byly přibližně 1 hodinu rozdělovány. Barvení gelů bylo provedeno pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue R-250. Po skončení elektroforesy byly gely vloženy do roztoku CBB na 5 min a následně odbarvovány přes noc v 10% roztoku kyseliny octové.

4. Výsledky

4.1. Klonování lineárního tetraubikvitinu

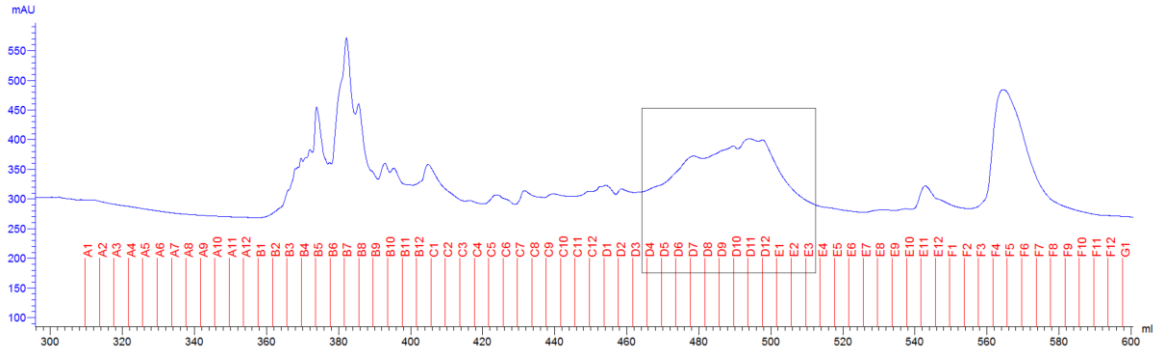
Syntetický gen pro lineární tetraubikvitin byl klonován z vektoru pUC57 do expresního vektoru pET24a pomocí štěpení restrikčními endonukleasami BamHI a NdeI. Průběh celého klonování, včetně kontrolních restrikčních štěpení, je shrnut na Obrázku 4.1. (str. 46) DNA vzniklá ligací vyštěpeného genu pro lineární tetraubikvitin a naštěpeného pET24a byla ověřena sekvenací a posléze namnožena a použita pro expresi. Celkový výtěžek byl 30 µl DNA o koncentraci 121 ng/µl.



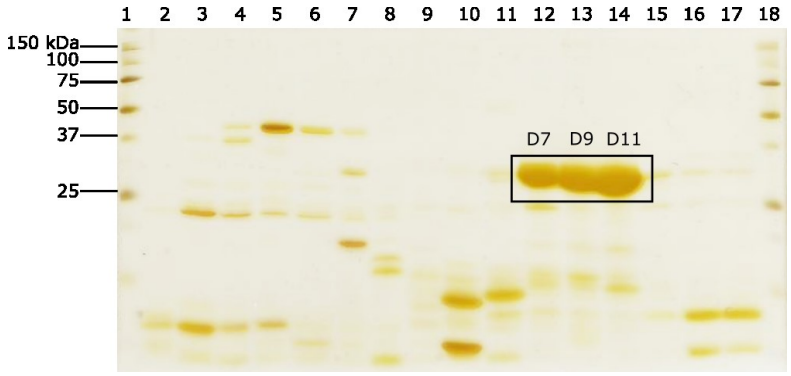
Obrázek 4.1: **Průběh klonování lineárního tetraubikvitinu. Dráha 1:** 6 µl 1 kb standard molekulových hmotností GelPilot 1kb ladder (Quiagen, Německo) **Dráha 2:** 200 ng lineární tetraubikvitin v původním vektoru pUC57. **Dráha 3:** 50 ng lineární tetraubikvitin štěpený z vektoru pUC57 enzymy BamHI, NdeI. **Dráha 4:** 400 ng prázdný, neštěpený vektor pET24a. **Dráha 5:** 400 ng prázdný vektor pET24a štěpený enzymy BamHI, NdeI. **Dráha 6:** 450 ng prázdný vektor pET24a štěpený enzymy BamHI, NdeI po isolaci z agarosového gelu. **Dráha 7:** 230 ng lineární tetraubikvitin isolovaný z agarosového gelu. **Dráha 8:** 450 ng lineární tetraubikvitin ve vektoru pET24a. **Dráha 9:** kontrolní štěpení, 100 ng lineární tetraubikvitin ve vektoru pET24a, štěpený endonukleasami XhoI a NdeI.

4.2. Exprese a purifikace lineárního tetraubikvitinu

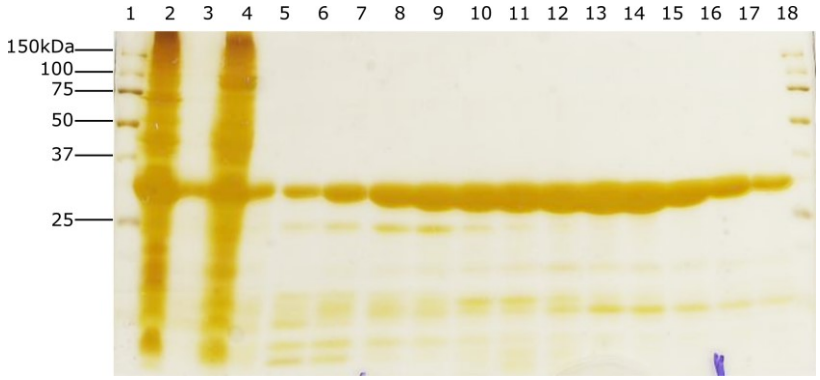
Lineární tetraubikvitin byl exprimován pomocí autoindukčního média (viz. kapitola 3.12). Exprese probíhala v chemicky kompetentních buňkách BL21(DE3)RIL transformovaných genem pro lineární tetraubikvitin ve vektoru pET24a (viz. kapitola 4.1.) Buněčná peleta vzniklá po expresi byla lyzována (viz. kapitola 3.13) a buněčné proteiny (mimo lineární tetraubikvitin) precipitovány kyselinou chloristou. Ze supernatantu byl lineární tetraubikvitin isolován pomocí iontově výměnné chromatografie (viz. Obrázek 4.2, str. 47). Reprezentativní frakce pokrývající jednotlivé vrcholy na chromatogramu byly poté analyzovány pomocí SDS-PAGE, jak je vidět na Obrázku 4.3 (str. 48). Z elektroforeogramu je zřejmé, že lineární tetraubikvitin se nacházel ve frakcích D4 až E3. Čistota proteinového preparátu právě v těchto frakcích byla dále znovu analyzována pomocí SDS-PAGE (viz. Obrázek 4.4, str. 48).



Obrázek 4.2: **Chromatogram iontově výměnné chromatografie.** Záznam absorbance při 280 nm. Frakce označené rámečkem, ve kterých byl gradient NaCl 0,26 – 0,34 M, obsahují lineární tetraubikvitin dále analyzovaný pomocí SDS-PAGE.



Obrázek 4.3: **SDS-PAGE analýza purifikace pomocí kationtově výměnné chromatografie.** Dráha 1 a 18: 1 µl standard molekulových hmotností (All Blue Marker); V dráhách 2 až 17 bylo naneseno 13 µl následujících frakcí: **dráha 2:** frakce B3; **dráha 3:** frakce B5; **dráha 4:** frakce B6; **dráha 5:** frakce B7; **dráha 6:** frakce B9; **dráha 7:** frakce B10; **dráha 8:** frakce B12; **dráha 9:** frakce C5; **dráha 10:** frakce C7; **dráha 11:** frakce D1; **dráha 12:** frakce D7; **dráha 13:** frakce D9; **dráha 14:** frakce D11; **dráha 15:** frakce E11; **dráha 16:** frakce F4; **dráha 17:** frakce F5. Lineární tetraubikvitin byl eluován ve frakcích D4–E3. Vzorky frakcí D7, D9, D11 jsou zde zvýrazněné v drahách 12, 13, 14.

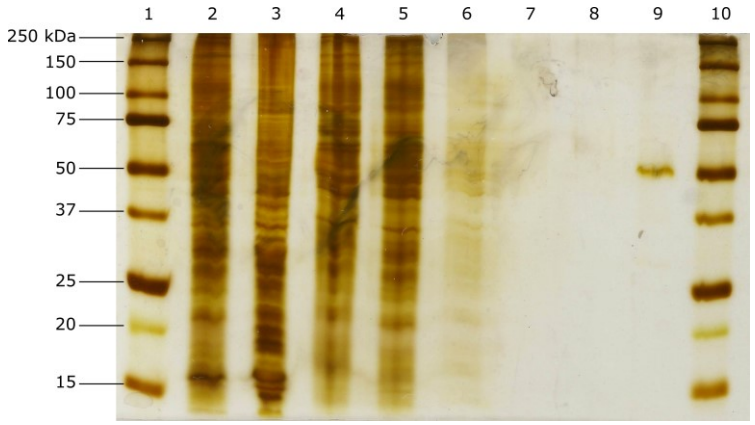


Obrázek 4.4: **SDS-PAGE analýza vybraných frakcí pro zhodnocení čistoty lineárního tetraubikvitinu v nich obsaženého. Dráha 1:** 0,7 µl standard molekulových hmotností (All Blue Marker). **Dráha 2:** 3 µl supernatantu buněčného lyzátu. **Dráha 3:** 5 µl chloristanem precipitovaného buněčného lyzátu–supernatant. **Dráha 4:** 3 µl pelety buněčných proteinů precipitovaných chloristanem sodným. **Dráha 5:** 5 µl standardu lineárního tetraubikvitinu. Dráhy **6–17:** 13 µl frakcí D4–E3 z iontově výměnné chromatografie (viz. Obrázek 4.2, str. 47).

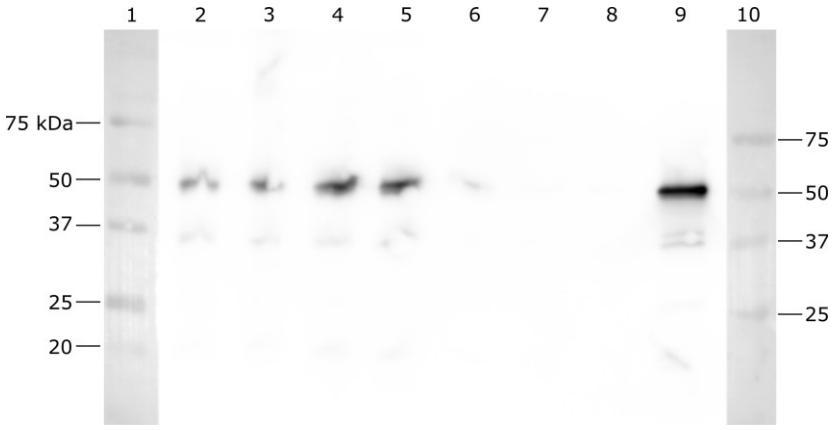
Na základě SDS-PAGE analýzy byly spojeny frakce D6–E1. Koncentrace spojených frakcí byla 0,47 mg/ml, produkt byl alikvotován po 1 mg a zmrazen. Celkový výtěžek byl 15 mg lineárního tetraubikvitinu, což činí 7,5 mg purifikovaného proteinu na 1 litr média.

4.3. Exprese a purifikace proteinu Ddi2

Kultivací bylo připraveno 20× 100 mm kultivačních misek savčích buněk HEK293 se stabilně integrovaným pTet-Off Advanced vektorem (Clontech, USA), které zároveň stabilně exprimují gen pro lidský protein Ddi2 s FLAG afinitní kotvou na N-konci. Sklizená peleta buněk vážila přibližně 1200 mg. Protein byl purifikován pomocí anti-FLAG M2 Magnetic Beads“ resinu (Sigma Aldrich, USA), průběh purifikace byl analyzován pomocí SDS-PAGE (viz Obrázek 4.5, str. 49) a elektropřenosu s následnou imunodetekcí (Obrázek 4.6, str. 50). Koncentrace výsledného eluátu byla změřena pomocí metody dle Bradfordové a byla 28 µg/ml. To činí celkový výtěžek 10,8 µg proteinu.



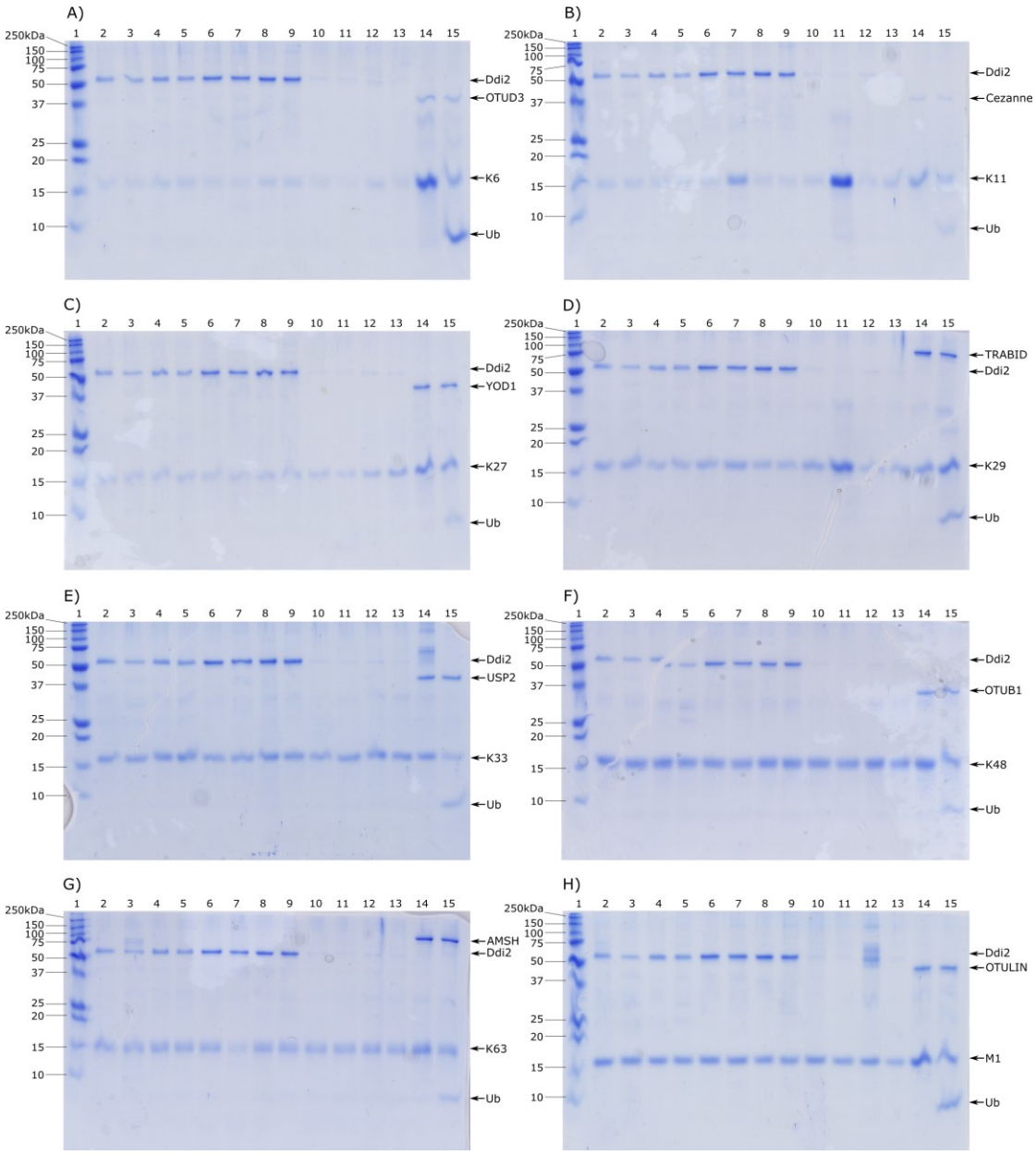
Obrázek 4.5: **SDS-PAGE analýza purifikace lidského Ddi2 proteinu přes FLAG afinitní kotvu. Dráha 1:** 2µl standard molekulových hmotností (All Blue Marker); **Dráha 2:** 2 µl buněčného lyzátu; **Dráha 3:** 2 µl supernatantu buněčného lyzátu; **Dráha 4:** 2 µl buněčná peleta po lýze buněk; **Dráha 5:** 2 µl frakce nenavázané na resin; **Dráha 6:** 4 µl promytí 1; **Dráha 7:** 4 µl promytí 2; **Dráha 8:** 4 µl promytí 3; **Dráha 9:** 4 µl Eluce; **Dráha 10:** 2 µl standard molekulových hmotností (All Blue Marker).



Obrázek 4.6: **Elektropřenos s následnou imunodetekcí purifikace lidského Ddi2 proteinu přes FLAG afinitní kotvu, vyvoláno protilátkou proti Ddi2. Dráha 1:** 2µl standard molekulových hmotností (All Blue Marker); **Dráha 2:** 2 µl buněčného lyzátu; **Dráha 3:** 2 µl supernatantu buněčného lyzátu; **Dráha 4:** 2 µl buněčná peleta po lýze buněk; **Dráha 5:** 2 µl frakce nenavázané na resin; **Dráha 6:** 4 µl promytí 1; **Dráha 7:** 4 µl promytí 2; **Dráha 8:** 4 µl promytí 3; **Dráha 9:** 4 µl Eluce; **Dráha 10:** 2 µl standard molekulových hmotností (All Blue Marker).

4.4. Testování deubikvitinační aktivity Ddi2

Reakcemi, jejichž výsledky jsou analyzovány pomocí SDS-PAGE na Obrázku 4.7 (str. 51), byla testována případná deubikvitinační aktivita Ddi2. Sada reakcí byla provedena pro každý z osmi možných diubikvitinových řetězců v pH 4,5 a 7,4. Ddi2 byl testován v podobě C a N-koncově značeného Ddi2 (C-koncově značený protein byl poskytnut laboratoří Kláry Grantz Šaškové a Jana Konvalinky). Jako negativní kontrola sloužila sada reakcí, kde „enzymem“ byl N-koncově značený Ddi2 s pozměněným katalytickým aspartátem v pozici 252 na alanin (Protein byl opět poskytnut laboratoří Kláry Grantz Šaškové a Jana konvalinky). Každá z reakcí byla provedena dvakrát, jedna byla inkubována 24 hodin, druhá zastavena okamžitě po zahájení. Jako pozitivní kontrola sloužila reakce, kde byl příslušný diubikvitin štěpen specifickou deubikvitinasou (opět provedeno v duplikátu, jednou inkubováno 30 minut, podruhé zastaveno okamžitě po zahájení). Poměr enzym-substrát byl pro N-FLAG Ddi2 reakce 1 : 1, pro C-FLAG přibližně 1 : 2/3 a pro inaktivní D252A přibližně 1 : 1/4. Tyto reakční směsi byly následně naneseny v objemu 7,5 µl, což odpovídá polovině reakční směsi, na bis Tris-MES SDS polyakrylamidový gel a analyzovány.



Obrázek 4.7: **SDS-PAGE analýza deubikvitinačních reakcí. A)** Deubikvitinační reakce pro K6 diUb. **Dráha 1:** 3 µl standard molekulových hmotností **Dráha 2:** 9 µl reakční směsi diUb, Ddi2 (C-FLAG), čas 0, pH 4,5. **Dráha 3:** diUb, Ddi2 (C-FLAG), čas 24, pH 4,5. **Dráha 4:** diUb, Ddi2 (C-FLAG), čas 0, pH 7,4. **Dráha 5:** diUb, Ddi2 (C-FLAG), čas 24, pH 7,4. **Dráha 6:** diUb, Ddi2 (N-FLAG), čas 0, pH 4,5. **Dráha 7:** diUb, Ddi2 (N-FLAG), čas 24, pH 4,5. **Dráha 8:** diUb, Ddi2 (N-FLAG), čas 0, pH 7,4. **Dráha 9:** diUb, Ddi2 (N-FLAG), čas 24, pH 7,4. **Dráha 10:** diUb, Ddi2 (D252A mutace), čas 0, pH 4,5. **Dráha 11:** diUb, Ddi2 (D252A mutace), čas 24, pH 4,5. **Dráha 12:** diUb, Ddi2 (D252A mutace), čas 0, pH 7,4. **Dráha 13:** K6 diUb, Ddi2 (D252A mutace), čas 24, pH 7,4. **Dráha 14:** OTUD3, čas 0, pH 8,0. **Dráha 15:** diUb, OTUD3, čas 30 min, pH 8,0.

B) Deubikvitinační reakce pro K11 diubikvitin, stejné uspořádání jako pro K6, použitá deubikvitinasa Cezanne. **C)** Deubikvitinační reakce pro K27 diubikvitin, stejné uspořádání jako pro K6, použitá deubikvitinasa YOD1. **D)** Deubikvitinační reakce pro K29 diubikvitin, stejné uspořádání jako pro K6, použitá deubikvitinasa Trabid. **E)** Deubikvitinační reakce pro K33 diubikvitin, stejné uspořádání jako pro K6, použitá deubikvitinasa USP2. **F)** Deubikvitinační reakce pro K48 diubikvitin, stejné uspořádání jako pro K6, použitá deubikvitinasa OTUB1. **G)** Deubikvitinační reakce pro K63 diubikvitin, stejné uspořádání jako pro K6, použitá deubikvitinasa AMSH. **H)** Deubikvitinační reakce pro M1 diubikvitin, stejné uspořádání jako pro K6, použitá deubikvitinasa OTULIN.

Jak je z Obrázku 4.7 zřejmé, Ddi2 s FLAG kotvou na C či N-konci nemá při daných reakčních podmínkách deubikvitinační aktivitu. Všechny deubikvitinační pozitivní kontroly jsou zde pozitivní.

5. Diskuse

Ubikvitinem řízená degradace buněčných proteinů a ubikvitinová signalizace obecně, se podílejí na řízení množství esenciálních buněčných procesů, jako je regulace buněčného cyklu, endocytosa, oprava DNA nebo intracelulární transport. Ubikvitin přenáší signál v podobě polyubikvitinových řetězců nebo monoubikvitinace cílených proteinů. Pro správnou funkci výše zmíněných buněčných procesů je proto důležitá nejen tvorba, ale i rozklad těchto řetězců, která se uskutečňuje pomocí enzymů zvaných deubikvitinasy. Deubikvitinasy jsou enzymy s proteasovou aktivitou, specificky štěpící ubikvitinové řetězce. Dělíme je do rodin podle charakteristických domén a mechanismu štěpení isopeptidové případně peptidové vazby. Známé jsou zatím deubikvitinasy cysteinové a metaloproteasy. Jako potenciální představitel zcela nové skupiny deubikvitinas se nabízí Ddi2 protein. Obsahuje sekvenčně zachovalou RVP doménu s nedávno popsanou katalytickou aktivitou, ubikvitinu podobnou doménu (UBL) a s ubikvitinem interagující doménu (UBA či UIM). Tato kombinace udává předpoklady k tomu, že protein z rodiny Ddi1 může být funkční deubikvitinasou. Ověření či vyvrácení této hypotézy bylo předmětem předkládané práce.

Prvním cílem bylo připravit DNA pro lineární tetraubikvitin v expresním vektoru, za účelem následné bakteriální exprese tohoto proteinu, přečištění, a dále případnému otestování, či je lineární tetraubikvitin substrátem lidského Ddi2 proteinu. Na Obrázku 4.1 (str. 46) je vidět úspěšné klonování genu pro lineární tetraubikvitin z vektoru pUC57 do expresního vektoru pET24a. Tři proužky a porovnání s dráhou 6 (prázdný štěpený vektor pET24a) dokazuje, že nejspíše došlo ke správné ligaci většiny molekul. Kontrolní štěpení v dráze 9 proběhlo také úspěšně, viditelné jsou dva proužky o velikostech odpovídajících pET24a a lineárního tetraubikvitinu. Z tohoto gelu se dá usoudit, že klonování proběhlo v pořádku a bylo tedy možné postoupit k následné rekombinantní expresi tohoto genu.

Dalším cílem bylo tedy exprimovat a purifikovat lineární tetraubikvitin v bakteriálním expresním systému. Pro tento účel byla zvolená buněčná linie BL21(DE3)RIL, v kombinaci s autoindukčním médiem jehož výhodou je jednoduchost použití, a hlavně vysoké výtěžky, které poskytuje. Protože ubikvitin je velmi stabilní a odolává až extrémním chemickým podmínkám, byl purifikován precipitováním většiny buněčných proteinů kyselinou chloristou, které ale sám odolává. Precipitované buněčné proteiny byly odděleny centrifugací a ubikvitin byl dále purifikován pomocí iontově výměnné chromatografie s gradientem NaCl. V záznamu iontově výměnné chromatografie (viz Obrázek 4.2, str. 47) není pík odpovídající lineárnímu tetraubikvitinu zvlášť výrazný ani ostrý. To je dáno jeho nízkou absorpcí světla o vlnové délce 280 nm, při které probíhala detekce. V celé molekule (76 aminokyselin) ubikvitinu jsou totiž pouhé tři aromatické aminokyseliny, 2 fenylalaniny a jeden tyrosin, což udává ubikvitinu velmi nízký extinkční koeficient. Lépe už o jednotlivých purifikačních krocích vypovídá SDS-PAGE analýza. Na Obrázku 4.3 (str. 48) je vidět, že kyselinou chloristou byla skutečně odstraněná většina proteinů a že ubikvitin proceduru vydržel. Vypovídají o tom hlavně dráhy 12, 13 a 14, kde jsou vidět poměrně výrazné proužky odpovídající tetraubikvitinu a v poměru k velkým nanáškám (13 µl) málo nečistot. Na detailnějším chromatogramu frakcí s detekovaným tetraubikvitinem (Obr. 4.4, str. 48) není nic překvapivého. Stejně jako v diskutovaných drahách na předchozím obrázku je zde silný signál tetraubikvitinu, a vzhledem k nanáškám, relativně málo nečistot. Výtěžek lineárního tetraubikvitinu byl 7,5 mg proteinu na jeden litr média, tedy více než dostačující pro následné aplikace.

Pro testování možné deubikvitinační aktivity lidského Ddi2, byl Ddi2 protein exprimován a purifikován v savčích buňkách, kdy jeho možné posttranslační modifikace

odpovídají reálné situaci v buňce. Konkrétně byla použita buněčná linie HEK293 s integrovaným pTet-Off Advance vektorem (umožňujícím případnou regulaci exprese), nesoucí stabilně integrovaný gen pro Ddi2 s FLAG afinitní kotvou na N-konci. Protein byl purifikován pomocí anti FLAG M2 magnetických kuliček s konjugovanou protilátku proti FLAG sekvenci (DYKDDDDK). Z dvaceti 100 milimetrových misek bylo sklizeno přibližně 1200 mg buněk. Průběh purifikace proteinu od lyzace buněk až po eluci z resinu můžeme pozorovat na SDS-PAGE vizualisaci na Obrázku 4.5. (str. 49) a na protilátkou vyvolávané membráně z elektropřenosu (dále jen WB z angl. Western Blot) na Obrázku 4.6 (str. 50). Na první pohled je zřejmé, že protein byl úspěšně purifikovaný. Vypovídá o tom dráha číslo 9 jak na SDS-PAGE, tak i na WB. Je zde vidět proužek velikostně odpovídající Ddi2 a dále několik velice slabých proužků menších velikostí, které jsou produkty degradace Ddi2 proteinu. Celkový výtěžek rekombinantní připraveného proteinu Ddi2 byl 10,8 µg, což je opět množství dostatečné pro následnou analýzu. Pro úplnost testování deubikvitinační aktivity lidského Ddi2, byly použity další dva rekombinantní připravené proteiny a to C-koncově značený Ddi2 s FLAG kotvou a „neaktivní“ Ddi2 s mutovaným aspartátovým zbytkem v pozici 252 v aktivním místě.

Hlavní náplní této práce bylo testování možné deubikvitinační aktivity lidského Ddi2. Za substráty byly pro jednoduchost zvoleny komerčně dostupné diubikvitinové řetězce zahrnující všech osm možných spojení molekul ubikvitinu vyskytujících se v buňce. Toto uspořádání je standardním výchozím experimentem při zjišťování možné deubikvitinasové aktivity příslušného proteinu. Výsledky tohoto experimentu, popsané v kapitole 4.4, ukazují jednoznačně, že testované formy Ddi2, tedy Ddi2 s N-koncovou a C-koncovou FLAG kotvou neštěpí v daných reakčních podmínkách (pH 7,4 a 4,5) žádný z celkem osmi diubikvitinů a tudíž nemají detekovatelnou deubikvitinační aktivitu. To je patrné z Obrázku 4.7 (str. 51), kdy na rozdíl od reakcí pozitivní kontroly (v dráze 15 na SDS-PAGE analýze na Obrázku 4.7), se v žádné z testovaných reakcí neobjevil proužek odpovídající velikosti monoubikvitinu (8,5 kDa).

I když je celkový výsledek našeho testování negativní, nemůžeme zcela vyvrátit možnost, že Ddi2 má deubikvitinační funkci. Pokud však Ddi2 tuto roli v buňce plní, je zřejmé, že celý proces má daleko komplikovanější charakter. Můžeme například spekulovat o přítomnosti jiného reakčního partnera, kterým by mohl být protein, či

nukleová kyselina. Toto však ponecháme dalšímu zkoumání a spokojíme se se závěrem, že Ddi2 protein nemá v základních testovaných podmínkách deubikvitinační aktivitu.

6. Závěr

Prvním cílem této práce bylo naklonovat, exprimovat a purifikovat lineární tetraubikvitin, který měl být původně použit jako možný substrát lidského Ddi2. V konečném testu byl však namísto něj pro zjednodušení použit komerčně dostupný lineární diubikvitin. Dalším cílem bylo exprimovat lidský protein Ddi2 v savčí tkáňové linii a dále jej vyčistit. Hlavním cílem předkládané práce bylo pak otestovat možnou deubikvitinační aktivitu lidského Ddi2.

Oba výše zmíněné proteiny byly exprimovány, lineární tetraubikvitin s výtěžkem 7,5 mg na litr média, Ddi2 s výtěžkem 88 µg na litr média. Tetraubikvitin byl purifikován precipitací buněčných proteinů a následně kationtově výměnnou chromatografií. Lidský Ddi2 protein byl vyčištěn pomocí afinitní chromatografie.

Deubikvitinační aktivita byla otestována sérií 120 reakcí, přičemž každá z nichž obsahovala různé varianty diubikvitinových řetězců ve dvou pH a různé varianty Ddi2. Výsledek reakcí byl negativní. Je tedy možné shrnout, Ddi2 nemá v daných podmínkách deubikvitinační aktivitu.

7. Seznam použité literatury

1. Bertolaet, B. L., Clarke, D. J., Wolff, M., Watson, M. H., Henze, M., Divtta, G., Reed, S. I. UBA domains mediate protein-protein interactions between two DNA damage-inducible proteins. *J. Mol. Biol.* **313,** 955–963 (2001).

2. Elsasser, S., Chandler-Mitilello, D., Müller, B., Hanna, J. & Finley, D. Rad23 and Rpn10 serve as alternate ubiquitin receptors for the proteasome. *J. Biol. Chem.* **279,** 26817–26822 (2004).

3. Gomez, T. A., Kolawa, N., Gee, M., Sweredoski, M. J. & Deshaies, R. J. Identification of a functional docking site in the Rpn1 LRR domain for the UBA-UBL domain protein Ddi1. *BMC Biol.* **9,** 33 (2011).

4. Chen, L., Shinde, U., Ortolan, T. G. & Madura, K. Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO Rep.* **2,** 933–938 (2001).

5. Lehrbach, N. J. & Ruvkun, G. Proteasome dysfunction triggers activation of SKN-1A/Nrf1 by the aspartic protease DDI-1. *Elife* **5,** 161–172 (2016).

6. Koizumi, S., Irie, T., Hirayama, S., Sakurai, Y., Yashiroda, H., Naguro, I., Ichijo, H., Hamazaki, J., Murata S. The aspartyl protease DDI2 activates Nrf1 to compensate for proteasome dysfunction. *Elife* **5,** 161–172 (2016).

7. Ciechanover, a, Heller, H., Elias, S., Haas, a L. & Hershko, a. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77,** 1365–1368 (1980).

8. Komander, D. & Rape, M. The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.* **81,** 203–229 (2012).

9. Komander, D., Clague, M. J. & Urbé, S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10,** 550–563 (2009).

10. Webb, G. C., Baker, R. T., Fagan, K. & Board, P. G. Localization of the Human UbB Polyubiquitin Gene to Chromosome Band 17p 1 . I-I 7pI 2. *Am J Hum Genet* 308–15 (1990).

11. Wiborg, O., Pedersen, M. S., Wind, A., Berglund, L. E., Marcker, K. A., Vuust, J. The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *EMBO J.* **4,** 755–9 (1985).

12. Kimura, Y. & Tanaka, K. Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J. Biochem.* **147,** 793–798 (2010).

13. Dikic, I., Wakatsuki, S. & Walters, K. J. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10,** 659–671 (2009).

14. Kamadurai, H. B., Souphron, J., Scott, D. C., Duda, D. M., Darcie, J., Stringer, D., Piper, R. C., Schulman, B. A. Insights into ubiquitin transfer cascades from a structure of a UbcH5B~Ubiquitin-HECTNEDD4L complex. **36,** 1095–1102 (2010).

15. Varadan, R., Assfalg M., Haririnia, A., Raasi, S., Pickart, C., Fushma, D. Solution Conformation of Lys63-linked Di-ubiquitin Chain Provides Clues to Functional Diversity of Polyubiquitin Signaling. *J. Biol. Chem.* **279,** 7055–7063 (2004).

16. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.

17. Weiss, M. S. & Schulz, G. E. Structure of porin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **227,** 493–509 (1992).

18. Haas, A. L., Bright, P. M. & Jackson, V. E. Functional diversity among putative E2 isozymes in the mechanism of ubiquitin-histone ligation. *J. Biol. Chem.* **263,** 13268–13275 (1988).

19. Pickart, C. M. & Eddins, M. J. Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1695,** 55–72 (2004).

20. Weissman, A. M., Shabek, N. & Ciechanover, A. The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12,** 605–20 (2011).

21. Borden, K. L. B. & Freemont, P. S. The RING finger domain: A recent example of a sequence-structure family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6,** 395–401 (1996).

22. Deshaies, R. J. & Joazeiro, C. A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78,** 399–434 (2009).

23. van der Reijden, B. A., Erpelinck-Verschueren, C. A., Löwenberg, B. & Jansen, J. H. TRIADs: a new class of proteins with a novel cysteine-rich signature. *Protein Sci.* **8,** 1557–61 (1999).

24. Capili, A. D., Edghill, E. L., Wu, K. & Borden, K. L. B. Structure of the C-terminal RING finger from a RING-IBR-RING/TRIAD motif reveals a novel zinc-binding domain distinct from a RING. *J. Mol. Biol.* **340,** 1117–1129 (2004).

25. Morett, E. & Bork, P. A novel transactivation domain in parkin. *Trends Biochem. Sci.* **24,** 229–231 (1999).

26. Imai, Y., Soda, M. & Takahashi, R. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J. Biol. Chem.* **275,** 35661–35664 (2000).

27. Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S. I., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* **25,** 302–305 (2000).

28. Eisenhaber, B., Chumak, N., Eisenhaber, F. & Hauser, M.-T. The ring between ring fingers (RBR) protein family. *Genome Biol.* **8,** 3 (2007).

29. Verdecia, M. A., Joazeiro, C. A. P., Wells, N. J., Ferrer, J., Bowman, M. E., Hunter, T., Noel, J. P. Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Mol. Cell* **11,** 249–259 (2003).

30. Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., Jentsch, S. A Novel Ubiquitination Factor, E4, Is Involved in Multiubiquitin Chain Assembly. *Cell* **96,** 635–644 (1999).

31. Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N. & Nakayama, K. I. U Box Proteins as a New Family of Ubiquitin-Protein Ligases. *J. Biol. Chem.* **276,** 33111–33120 (2001).

32. Jentsch, S. & Schlenker, S. Selective protein degradation: A journey's end within the proteasome. *Cell* **82,** 881–884 (1995).

33. Hochstrasser, M. Ubiquitin-Dependent Protein Degradation. *Annu. Rev. Genet.* **30,** 405–439 (1996).

34. Ye, Y., Scheel, H., Hofmann, K. & Komander, D. Dissection of USP catalytic domains reveals five common insertion points. *Mol. Biosyst.* **5,** 1797–1808 (2009).

35. Hu, M. *et al.* Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell* **111,** 1041–1054 (2002).

36. Hu, M., Li, P., Li, M., Li, W., Yao, T., Wu, J. W., Gu, W. Cohen, R. E., Shi, Y. Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J.* **24,** 3747–56 (2005).

37. Cummins, J. M. & Vogelstein, B. HAUSP is required for p53 destabilization. *Cell Cycle* **3,** 689–692 (2004).

38. Edelmann, M. J., Iphofer, A., Akutsu, M., Altun, M., diGleria, K., Kramer, H., Fiebiger, E., Dhe-Paganon, S., Kessler, B. M., Structural basis and specificity of human otubain 1-mediated deubiquitination. *Biochem. J.* **418,** 379–390 (2009).

39. Bremm, A., Freund, S. M. V & Komander, D. Lys11-linked ubiquitin chains adopt compact conformations and are preferentially hydrolyzed by the deubiquitinase Cezanne. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17,** 939–947 (2010).

40. Tran, H., Hamada, F., Schwarz-Romond, T. & Bienz, M. Trabid, a new positive regulator of Wnt-induced transcription with preference for binding and cleaving K63-linked ubiquitin chains. *Genes Dev.* **22,** 528–542 (2008).

41. Komander, D., Reyes-Turcu, F., Licchesi, J. D. F., Odenwaelder, P., Wilkinson, K. D., Barford, D. Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO Rep.* **10,** 466–73 (2009).

42. Keusekotten, K., Elliott, P. R., Glockner, L., Fiil, V. K., Damgaard, R. B., Kulathu, Y., Wauer, T., Hospenthal, M K., Gyrd-Hansen, M., Krappmann, D., Hofmenn, K., Komander, D. XOTULIN antagonizes LUBAC signaling by specifically hydrolyzing met1-linked polyubiquitin. *Cell* **153,** 1312–1326 (2013).

43. Wertz, I. E. O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D. L., Ma, A., Koonin, E. V., Dixit, V. M. Deubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kB signalling. *Nature* **430,** 694–699 (2004).

44. Evans, P. C. Ovaa, H., Hamon, M., Kikshaw, P. J., Hamm, S., Bauer, S., Ploegh, H. L. Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity. *Biochem. J.* **378,** 727–734 (2004).

45. Nakada, S., Tai, I., Panier, S., Al-Hakim, A., Iemura, S., Juang, Y., O'Donnell, L., Kumakubo, A., Munro, M., Sicheri, F., Gingras, A., Natsume, T., Suda, T., Durocher, D. Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. *Nature* **466,** 941–6 (2010).

46. Johnston, S. C., Riddle, S. M., Cohen, R. E. & Hill, C. P. Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases. *EMBO J.* **18,** 3877–3887 (1999).

47. Das, C., Hoang, Q. Q., Kreinbring, C., Luchansky, S. J., Meray, R. K., Ray, S. S., Lansbury, P. T., Ringe, D., Petsko, G. Structural basis for conformational plasticity of the Parkinson's disease-associated ubiquitin hydrolase UCH-L1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103,** 4675–80 (2006).

48. Komander, D. in *Conjugation and Deconjugation of Ubiquitin Family Modifiers* **54,** 69–87 (2010).

49. Yao, T., Song, L., Xu, W., DeMartino, G. N., Florens, L., Swanson, S. K., Washburn, M. P., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Cohen R. E. Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Adrm1. *Nat. Cell Biol.* **8,** 994–1002 (2006).

50. Schmitt, I., Linden, M, Khazneh, H., Evert, B. O., Breuer, P., Klockgether, T., Wuellner, U. Inactivation of the mouse Atxn3 (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362,** 734–739 (2007).

51. Berke, S. J. S., Chai, Y., Marrs, G. L., Wen, H. & Paulson, H. L. Defining the role of ubiquitin-interacting motifs in the polyglutamine disease protein, ataxin-3. *J. Biol. Chem.* **280,** 32026–32034 (2005).

52. Weeks, S. D., Grasty, K. C., Hernandez-Cuebas, L. & Loll, P. J. Crystal structure of a Josephin-ubiquitin complex: Evolutionary restraints on ataxin-3 deubiquitinating activity. *J. Biol. Chem.* **286,** 4555–4565 (2011).

53. Worden, E. J., Padovani, C. & Martin, A. Structure of the Rpn11-Rpn8 dimer reveals mechanisms of substrate deubiquitination during proteasomal degradation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21,** 220–7 (2014).

54. Lander, G. C., Martin, A. & Nogales, E. The proteasome under the microscope: The regulatory particle in focus. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23,** 243–251 (2013).

55. Shackleford, T. J. & Claret, F. X. JAB1/CSN5: a new player in cell cycle control and cancer. *Cell Div.* **5,** 26 (2010).

56. Rosenzweig, R., Bronner, V., Zhang, D., Fushman, D. & Glickman, M. H. Rpn1 and Rpn2 coordinate ubiquitin processing factors at proteasome. *J. Biol. Chem.* **287,** 14659–14671 (2012).

57. Gabriely, G., Kama, R., Gelin-Licht, R. & Gerst, J. E. Different domains of the UBL-UBA ubiquitin receptor, Ddi1/Vsm1, are involved in its multiple cellular roles. *Mol. Biol. Cell* **19,** 3625–37 (2008).

58. Krylov, D. M. & Koonin, E. V. Correspondence. *Curr. Biol.* **11,** R584–R587 (2001).

59. Sirkis, R., Gerst, J. E. & Fass, D. Ddi1, a Eukaryotic Protein With the Retroviral Protease Fold. *J. Mol. Biol.* **364,** 376–387 (2006).

60. Kožíšek, M. Lepšík, M., Grantz Šašková, K., Brynda, J., Konvalinka, J., Řezáčová, P. Thermodynamic and structural analysis of HIV protease resistance to darunavir - Analysis of heavily mutated patient-derived HIV-1 proteases. *FEBS J.* **281,** 1834–1847 (2014).

61. Trempe, J., Grantz Šašková, K., Sivá, M., Ratcliffe, C. D. H., Menade, M., Feng, X., Shenker, S., Svoboda, M., Kožíšek, M. Structural studies of yeast DNA damage-inducible protein (Ddi1) reveal domain architecture of the Ddi eukaryotic protein family. *Sci. Rep.* **6,** 33671 (2016).

62. Clarke, D. J. Mondesert, G., Segal, M., Bertolaet, B. L., Jensen, S., Wolff, M., Henze, M., Reed, S. I. Dosage suppressors of pds1 implicate ubiquitin-associated domains in checkpoint control. *Mol. Cell. Biol.* **21,** 1997–2007 (2001).

63. Kaplun, L., Tzirkin, R., Bakhrat, A., Shabek, N., Ivantsiv, Y., Raveh, D. The DNA damage-inducible UbL-UbA protein Ddi1 participates in Mec1-mediated degradation of Ho endonuclease. *Mol. Cell. Biol.* **25,** 5355–62 (2005).

64. Kaplun, L., Ivantsiv, Y., Bakhrat, A. & Raveh, D. DNA damage response-mediated degradation of Ho endonuclease via the ubiquitin system involves its nuclear export. *J. Biol. Chem.* **278,** 48727–48734 (2003).

65. Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. & Brunger, A. T. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 A resolution. *Nature* **395,** 347–353 (1998).

66. Shah, N., Colbert, K. N., Enos, M. D., Herschlag, D. & Weis, W. I. Three ??SNAP and 10 ATP molecules are used in SNARE complex disassembly by N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF). *J. Biol. Chem.* **290,** 2175–2188 (2015).

67. Lustgarten, V. & Gerst, J. E. Yeast VSM1 encodes a v-SNARE binding protein that may act as a negative regulator of constitutive exocytosis. *Mol. Cell. Biol.* **19,** 4480–4494 (1999).

68. Marash, M. & Gerst, J. E. Phosphorylation of the Autoinhibitory Domain of the Sso t-SNAREs Promotes Binding of the Vsm1 SNARE Regulator in Yeast. *Mol. Biol. Cell* **14,** 3114–3125 (2003).

69. Nowicka, U., Nowicka, U., Zhang, D., Walker, O., Krutauz, D., Castaneda, C. A., Chaturvedi, A., Chen, T. Y., Reis, N., Glickman, M. H., Fushman, D. DNA-damage-inducible 1 protein (Ddi1) contains an uncharacteristic ubiquitin-like domain that binds ubiquitin. *Structure* **23,** 542–557 (2015).

70. Sivá, M., Svoboda, M., Veverka, V., Trempe, J., Hofmann, K., Kožíšek, M., Hexnerová, R., Sedlák, F., Belza, J., Brynda, J., Šácha, P., Hubálek, M., Starková, J., Flaisigová, I., Konvalinka, J., Grantz Šašková, K. Human DNA-Damage-Inducible 2 Protein Is Structurally and Functionally Distinct from Its Yeast Ortholog. *Sci. Rep.* **6,** 30443 (2016).

71. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72,** 248–254 (1976).

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

Jméno a příjmení	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka