

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Biofyzikální chemie



**Strukturní studie mechanismu opravy poškozené DNA Nei
glykosylasou**

**Structural and molecular mechanisms of DNA repair by Nei
glycosylase**

Bc. Barbora Landová

Diplomová práce

Vedoucí práce

RNDr. Jan Šilhán, Ph. D.

Praha, 2019

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

V Praze dne 3. května 2019

podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Šilhánovi, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady, čas a ochotu, se kterou se mi věnoval v průběhu plnění i sepisování celé práce. Dále děkuji vedoucímu laboratoře Mgr. et Mgr. Evženu Bouřovi, Ph. D. a všem členům laboratoře za vytvoření příjemné pracovní atmosféry a ochotu vždy pomoci.

Abstrakt

Abazické místo (Ap z angl. Apurinic/apyrimidinic) je jedno z nejrozšířenějších poškození DNA vznikající spontánní hydrolyzou nebo v průběhu DNA opravných procesů. Jedna z forem Ap je otevřený aldehyd s elektrofilní funkční skupinou schopnou vytvářet kovalentní spojení s nukleofilní skupinou komplementárního řetězce DNA. Kovalentní spojení protilehlých řetězců (ICL z angl. Interstrand cross-link) vycházející z Ap je poškození, kde je nepřírozená N-glykosidová vazba tvořena spontánně mezi otevřeným aldehydem a aminovou skupinou adeninu na komplementárním řetězci dvouřetězcové DNA. ICL blokuje replikaci a transkripci, což vede ke genomové nestabilitě, rakovině nebo smrti buňky. Proces vzniku ICL je relativně dlouhý, trvající několik hodin, kde vznik otevřeného aldehydu Ap je limitujícím krokem. Dosud byly popsány dva druhy Ap-ICL v závislosti na bázi, se kterou Ap tvoří kovalentní spojení, ale o sekvenční závislosti v okolí ICL víme jen málo. Cílem této práce je prozkoumat pravděpodobnost vzniku Ap-ICL v závislosti na lokální sekvenci a biochemická charakterizace mechanismů vedoucí k jeho opravě.

Bylo ukázáno, že kovalentní spojení Ap-ICL je štěpeno endonukleasou 8-like III (NEIL3) v eukaryotech a jeho blízký ortholog v bakteriích je formamidopyrimidin-DNA glykosylasa (Fpg), DNA opravný enzym s N-glykosidovou aktivitou schopný vyštěpit oxidované báze a Ap lyasovou aktivitou, schopný štěpit 3'- a 5'-phosphodiesterovou vazbu Ap místa.

Klíčová slova: Abazické místo, NEIL3, Fpg, DNA poškození

Abstract

Abasic sites (Ap site, from apurinic/apyrimidinic) are one of the most common lesions generated in DNA by spontaneous base loss or DNA repair processes. There are two equilibrating forms of an Ap site – ring-open aldehyde and cyclic hemiacetal. Ring-opened aldehydes are reactive electrophilic groups capable of formation covalent adduct with nucleophilic sites in DNA. DNA interstrand cross-link (ICL) resulting from the Ap sites is formed spontaneously as a covalent bond between ring-open aldehyde and amin group of adenin residue in the opposite strand of double stranded DNA. ICLs block

DNA replication and transcription. The formation of Ap site derived ICL is relatively long process taking several hours. We assume that the ring-opening of an abasic site is the rate-limiting step in the formation of the thermodynamic ICL. However, formation, stability and DNA repair of Ap-ICL are still poorly understood processes. Here, I have set up mechanistic *in vitro* experiments to reveal and calculate the probability of Ap-ICL formation *in vivo*. In more detail, I study the rates of formation of Ap-ICLs in the sequence context of neighbouring nucleotides of freshly formed covalent bond of ICL. I focus on sequence preference, the influence of AT/ GC rich regions and the length of oligonucleotides. I have discovered that the rates and the yields of the Ap-ICL formation are highly dependent on local sequence.

In conjecture to this, I study the Ap-ICL repair mechanisms.

Recently, it has been shown that N-glycosidic bond forming ICL is cleaved by NEIL3 glycosylase. Close orthologue of NEIL3 is Formamidopyrimidine DNA glycosylase (fpg), a DNA base excision repair enzyme with N-glycosylase activity. Fpg removes a wide range of oxidatively damaged bases with a subsequent and strand alone Ap lyase activity where it cleaves both 3'- and 5'-phosphodiester bonds surrounding damage. The aim of this part of the project was the preparation of Ap-ICL and Fpg or NEIL3 for crystallographic studies in order to reveal the molecular mechanisms of Ap-ICL repair.

Key words: Abasic site, DNA interstrand cross-link, NEIL3, Fpg, DNA damage

(In Czech)

Obsah

1.	Teoretický úvod	8
1.1.	Poškození DNA	8
1.2.	Intermolekulární kovalentní prokřížení DNA	9
1.3.	Oprava intermolekulárního kovalentního prokřížení DNA	11
1.4.	Fpg/Nei glykosylasová rodina	14
1.5.	NEIL3 - Endonukleasa VIII-like III	14
1.6.	Formamidopyrimidin-DNA glykosylasa	18
2.	Cíle práce	19
3.	Materiály a přístroje	20
3.1.	Použité sekvence	25
4.	Metody	26
4.1.	Příprava vektoru pro bakteriální expresi xNEIL3	26
4.1.1.	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	26
4.1.2.	Horizontální agarosová elektroforesa	27
4.1.3.	Izolace PCR produktu	27
4.1.4.	Štěpení plasmidu a produktu PCR restrikčními enzymy	27
4.1.5.	Ligace	28
4.1.6.	Transformace bakterií <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) DH5 α	28
4.1.7.	PCR z kolonií	28
4.1.8.	Sekvenování plasmidové DNA	29
4.2.	Bakteriální exprese	29
4.2.1.	Exprese rekombinantních proteinů v buňkách <i>E. coli</i> BL21 Star	29
4.3.	Izolace proteinu	30
4.3.1.	Centrifugace	30
4.3.2.	Lyse buněk	30
4.3.3.	Chromatografie na iontoměničích	30
4.3.4.	Diskontinuální elektroforesa v denaturačním prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)	31
4.3.5.	Koncentrování proteinu	31
4.3.6.	Afinitní chromatografie	32
4.3.7.	Gelová permeační chromatografie	32
4.4.	Tvorba a izolace ICL	32

4.4.1.	Hybridizace oligonukleotidů na krystalizaci/ sekvenční studie	32
4.4.2.	Diskontinuální elektroforesa v nativním prostředí.....	33
4.4.3.	Izolace ICL na vazebné studie	33
4.4.4.	Tvorba ICL – optimalizace inkubační doby, sekvence oligonukleotidů 34	
4.4.5.	Interakce ICL na konstrukty xNEIL3 a Fpg	34
4.5.	Proteinová krystalografie	34
4.5.1.	Příprava krystalů	34
4.5.2.	Měření difrakce	35
4.5.3.	Vytvoření modelu.....	35
5.	Výsledky	35
5.1.	Příprava vektoru pro bakteriální expresi xNEIL3 K60A 264 stop	35
5.2.	Expres a izolace enzymů xNEIL3 K60A 264 stop, xNEIL3 WT FL, xNEIL3 K60A FL a Fpg	37
5.2.1.	Expres	37
5.2.2.	Izolace čistého proteinu xNEIL3 K60A 264st, Fpg.....	37
5.2.3.	Izolace čistého proteinu xNEIL3 WT FL, xNEIL3 K60A FL	39
5.3.	Příprava ICL	42
5.4.	Izolace substrátu – ICL.....	42
5.5.	Optimalizace doby inkubace pro maximální výtěžek tvorby Ap-ICL a charakterizace funkční kinetiky vzniku a rozpadu Ap-ICL	43
5.6.	Interakce xNEIL3 K60A 264 stop a Fpg s ICL, dsDNA, ssDNA	46
5.7.	Enzymové reakce opravy Ap-ICL.....	46
5.8.	Krystalizace a krystalografie	47
5.8.1.	Fpg.....	47
5.8.2.	Krystalizace Ap-ICL DNA	49
6.	Diskuse.....	50
7.	Závěr	53
8.	Reference	54

Seznam zkratek

Ap	abazické místo (z angl. Apurinic/apyrimidinic)
BER	opravná dráha pro opravu bází (z angl. base excision repair)
CBBR250	Coomassie Brilliant Blue R 25
dA	2'-deoxyadenosin
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
dsDNA	dvouřetězcová DNA (z angl. double-stranded DNA)
EDTA	Ethylendiamin tetraoctová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FA	Fanconiho anémie
FL	délka celého řetězce (z angl. Full length)
Fpg	formamidopyrimidin DNA glykosylasa
HEX	Hexachlorofluorescein
HR	homologní rekombinace
ICL	příčné spojení protilehlých řetězců DNA (z angl. interstrand cross-link)
Nei	endonukleasa VIII
NEIL1	endonukleasa VIII-like I
NEIL2	endonukleasa VIII-like II
NEIL3	endonukleasa VIII-like III
Nth	endonukleasa III
NER	opravná dráha pro opravu nukleotidů (z angl. nucleotid excision repair)
UV	ultrafialové (z angl. ultraviolet)
WT	Přirozený typ (z angl. wild type)
SDS	Dodecylsírán sodný
ssDNA	jednořetězcová DNA (z angl. single-stranded DNA)
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	Tetramethylethylendiamin

1. Teoretický úvod

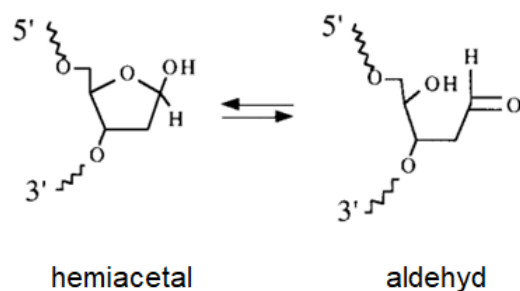
1.1. Poškození DNA

DNA je nestabilní molekula, ve které neustále dochází ke vzniku různých chyb a poškození vlivem působení chemických faktorů, chybami při replikaci a běžným působením celulárního metabolismu. Je důležité je odstranit a zachovat originální genetickou informaci, protože nedokonalosti při opravě mohou vést ke genomové nestabilitě, rakovině nebo smrti buňky¹.

Eukaryotická DNA polymerasa, jejíž chybovost katalytické podjednotky delta je 1 chyba na 10^7 syntetizovaných bází, je schopna sama sebe kontrolovat a odstraňovat chyby vzniklé při replikaci z 99%².

Za výzkum spontánních jevů deaminace a depurinace se zasloužil laureát Nobelovy ceny z roku 2015 prof. T. R. Lindahl. Z jeho práce vyplývá, že spontánní odstranění purinových bází za fyziologických podmínek *in vivo* nezávisí na sekvenci DNA. Rychlostní konstanta spontánní depurinace se pohybuje v řádech $4 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ a výsledkem tohoto procesu je abazické místo (Ap z angl. Apurinic/apyrimidinic site)^{3, 4}. V molekule DNA dochází ke spontánní deaminaci cytosinu vedoucí k záměně báze za uracyl, který je potencionálně mutagenní, jelikož při replikaci je tento původně G:C pár nahrazen U:T párem a není zachována originální genetická informace. Reakcemi s hydroxylovými radikály a intercelulárním působením metabolitů či koenzymů mohou vznikat další rozmanitá poškození DNA jako např. intramolekulární kovalentní prokřížení DNA (ICL z angl. Interstrand cross-link)^{5, 6}.

Existuje spousta druhů poškození DNA, jejich oprava je nezbytná pro zachování integrity DNA. Oprava poškozené DNA v případě poškozené báze (BER z angl. Base excision repair) probíhá ve třech krocích. V prvním kroku je rozpoznáno poškození a rozštěpena glykosidová vazba pomocí specifické glykosidasy v závislosti na typu poškození, za vzniku mezery nazývajících se Ap vyskytujících se ve dvou možných konformacích, viz obr. 1.1. Ve druhém kroku je Ap odstraněno buď lyasovou aktivitou nebo Ap endonukleasou jako např. Apex1. Následně je řetězec spojen pomocí DNA polymerasy a DNA ligasy^{7, 8}.

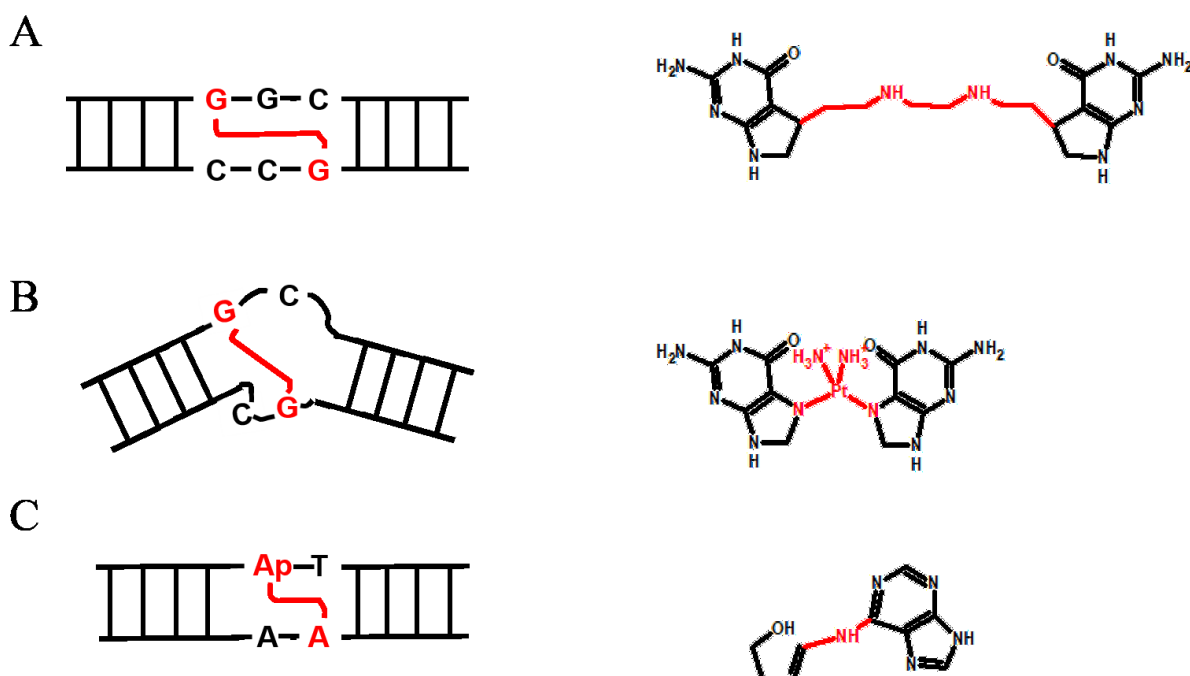


Obrázek 1.1. Dvě ekvivalentní formy abazického místa, hemiacetal a aldehyd s otevřeným kruhem.

1.2. Intermolekulární kovalentní prokřížení DNA

ICL je vysoce cytotoxické poškození DNA vznikající působením různých exogenních činidel jako např. dusíkatý hořčičný plyn yperit, cisplatina, mitomycin C a psolaren^{9, 10}. Některé z uvedených poškození jsou schematicky znázorněny, viz obr. 1.2. Chemická struktura substrátu je pravděpodobně důležitá pro volbu opravné dráhy.

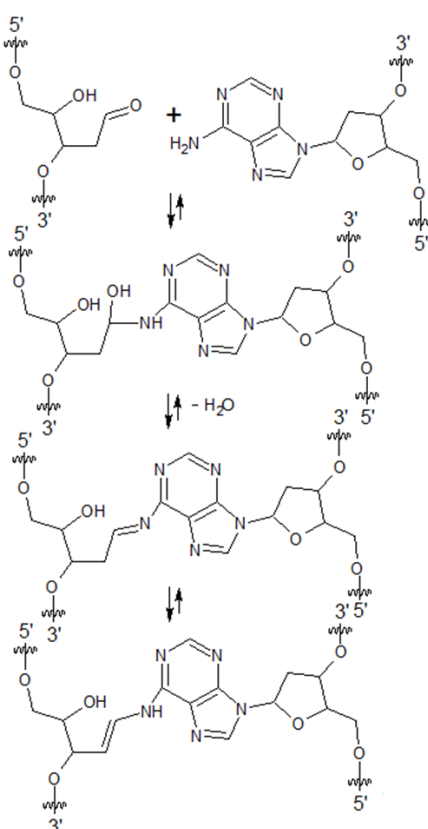
ICL také vzniká vlivem endogenních činidel zahrnující např. formaldehyd, acetaldehyd a malondialdehyd¹¹.



Obrázek 1.2. Schematická ukázka různých kovalentních prokřížení řetězců DNA. A) ICL způsobené hořčičným plynem. B) ICL způsobené působením Cis-platiny. C) Ap-ICL vznikající spontánně.

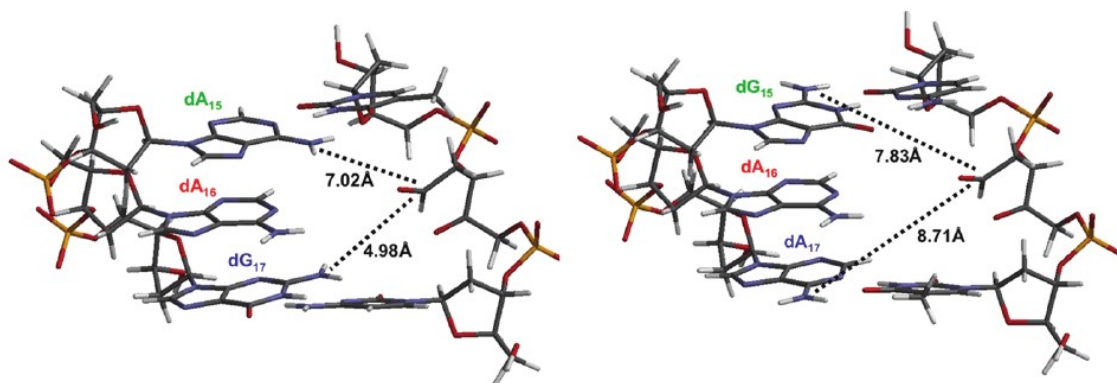
Působením uvedených činidel na buňky se pravděpodobně zvyšuje četnost vzniku ICL, což by vedlo zvyšujícímu se počtu buněk podstupujících apoptózu¹². IC₅₀ pro cis-platinu (Cis-Pt) je dosaženo po 4 hodinové inkubaci s nerezistentními ovariálními buňkami vůči Cis-Pt. Koncentrace potřebná k usmrcení 50% takových buněk je 2,5 pg/ 1 μg buněčné DNA¹³. Tohoto faktu je využíváno při chemoterapii, kdy Cis-Pt působí na buňky a způsobuje jejich odumírání¹⁴.

Apurinace/apyrimidinace je jedno z nejčastějších endogenních poškození buněčné DNA. Mohou vznikat spontánním odstraněním purinových a pyrimidinových bází, ale také jako důsledek opravné dráhy BER. Báze jsou z důvodu svého poškození působením oxidace mutagenů, toxinů a protirakovinných látek odstaněny¹⁵. Odhaduje se, že v každé buňce v ustáleném stavu vzniká okolo 10 000 Ap denně¹⁶. Nedávno byla objevena nová forma ICL tvořící se spontánně mezi C4'-oxidovaným Ap a bází na protilehlém řetězci (obr. 1.3)¹⁷.



Obrázek 1.3. Strukturní znázornění vzniku Ap-ICL s intermediáty ukázané reakce. Mezi Ap ve formě otevřeného kruhu aldehydu a adeninem na komplementárním řetězci dsDNA. Dochází k tvorbě nepřírodní N-glykosidické vazby.

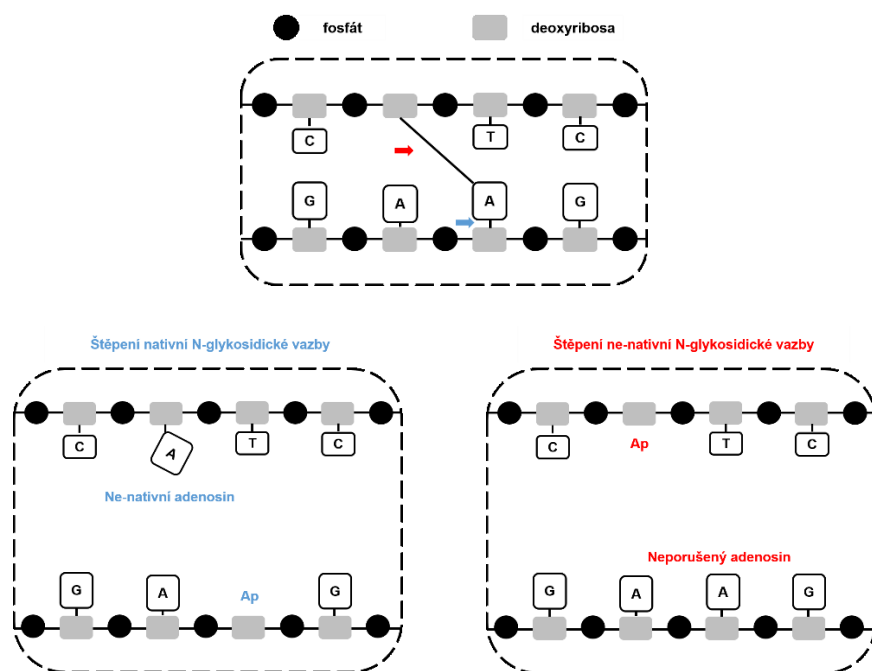
Existují dva rozdílné typy tohoto Ap-ICL, a to mezi Ap a adeninem nebo i guaninem na opačném řetězci. Stericky výhodnější z těchto dvou Ap-ICL je mezi Ap a adeninem (obr. 1.4). Nedávné studie ukázaly, že β -eliminace z C4-Ap je limitujícím krokem reakce^{18, 19}. K přípravě Ap *in vitro* se používají enzymy z BER, konkrétně Uracil-DNA glykosylasa.



Obrázek 1.4. Porovnání délky potenciálních nepřírodných N-glykosidových vazeb (ICL) v závislosti na pozici k Apod. Obrázek vlevo na protilehlém řetězci Ap v uspořádání 5'-dA, 3'-dG. Obrázek vpravo v uspořádání 5'-dG, 3'-dA, tato sekvence je preferovanější, převzato¹⁸.

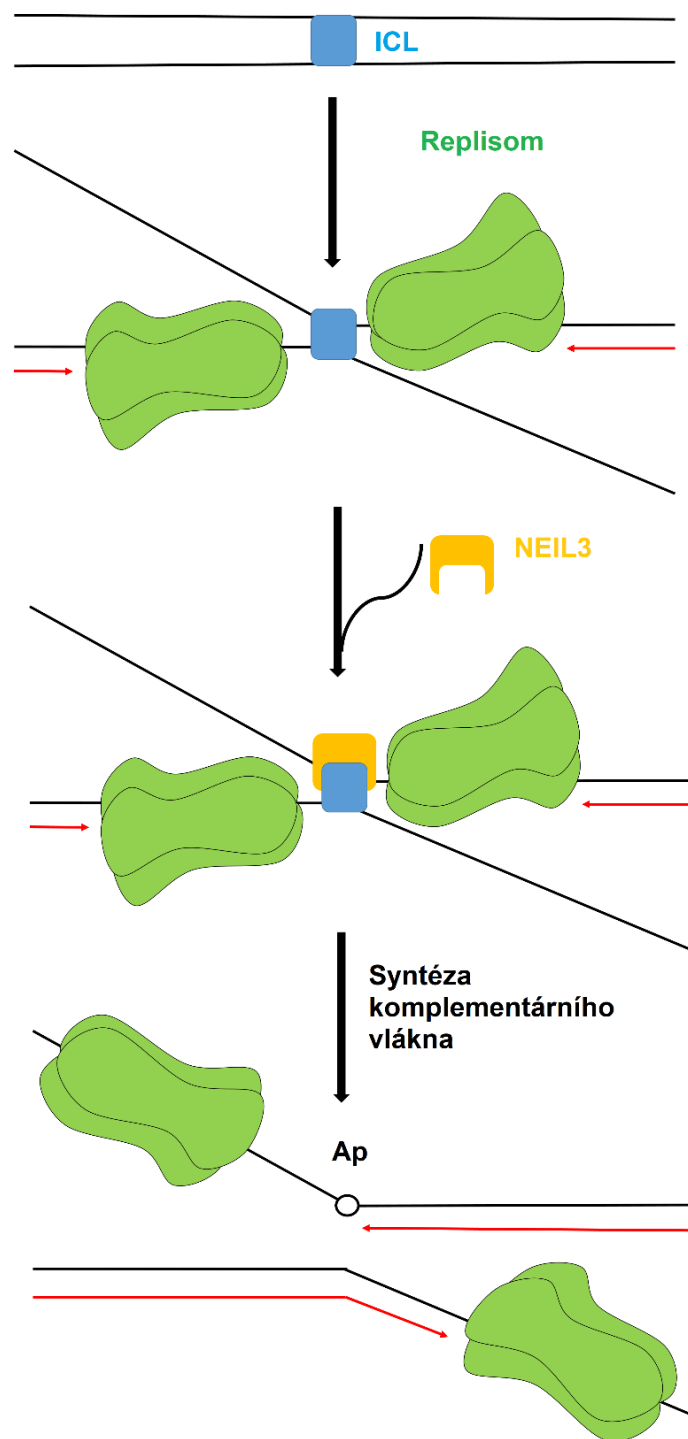
1.3. Oprava intermolekulárního kovalentního prokřížení DNA

Oprava Ap-ICL probíhá v S fázi buněčného cyklu^{20, 21}. Za rozštěpení N-glykosidové vazby Ap-ICL je zodpovědná DNA endonukleasa VIII like-3 (NEIL3, více viz kap. 1.5). Přesný mechanismus opravy pomocí NEIL3 je neznámý²². Předpokládá se, že existují dvě nezávislé možnosti této opravy. První je rozštěpení nativní N-glykosidové vazby adenosinu za vzniku abazického místa. Uvolněný adenin zůstává vázán nepřírodnou N-glykosidovou vazbou na původní Ap místo. Druhá možnost opravy je rozštěpení N-glykosidové vazby ICL za vzniku nepoškozeného původního adenosinu i původního Ap místa. Ap místo je opravováno pomocí specifických enzymů, které je vyštěpí a poté homologní rekombinací dochází ke spojení řetězce^{23, 24}. Schematické znázornění obou možných oprav je uvedeno na obr. 1.5.



Obrázek 1.5. Schématické znázornění dvou možných způsobů rozštěpení Ap-ICL. A) Ap-ICL, kde červená šipka ukazuje na ne-nativní N-glykosidickou vazbu a modrá na nativní N-glykosidickou vazbu. B) Ukázka rozštěpené nativní N-glykosidické vazby, kde adenosin je vázán na komplementární řetězec, než odkud pochází, ne-nativní vazbou. C) Ukázka rozštěpené ne-nativní vazby tvořící Ap-ICL za vzniku jednoho neporušeného řetězce a Ap na svém původním místě.

Donedávna se předpokládalo, že za opravu Ap-ICL je zodpovědná opravná dráha Fanconiho anemie (FA), avšak bylo ukázáno, že oprava Ap-ICL probíhá pomocí NEIL3 opravné dráhy, kde na opravě navíc spolupracuje TRAIP E3 ubikvitin ligasa, známá spoluprací s FA²⁵. Když se replisomy přiblíží k ICL, TRAIP polyubikvituluje DNA helikasu CMG (komplex skládající se z CDC45, MCM2-7 a GINS). V závislosti na délce řetězce ubikvitinů a nám neznámého charakteru dráhy se aktivuje opravná dráha NEIL3 nebo FA. Krátký řetězec ubikvitinů přivede NEIL3 skrz svou vazbu na DNA helikasu (obr. 1.6). Dlouhý řetězec ubikvitinů slouží k odpoutání vazby na DNA helikasu, což slouží jako aktivace FA opravné cesty. Tudíž TRAIP je považován za rozhodující faktor při výběru opravné dráhy ICL spjaté s replikační vidličkou a regulátor odvázaní CMG²⁶⁻²⁸.



Obrázek 1.6. Model opravy Ap-ICL/psoralen ICL pomocí NEIL3 glykosylasy. Replisomy se přiblíží k poškození, díky kterému nemohou pokračovat v replikaci. NEIL3 glykosylasa je rekrutována a váže se na poškození, které rozštěpí za vzniku adenosinu a abazického místa (Ap). Replisom na opraveném vlákně může pokračovat v replikaci, druhý vyčká na opravu Ap či potenciálně vzniká mutace.

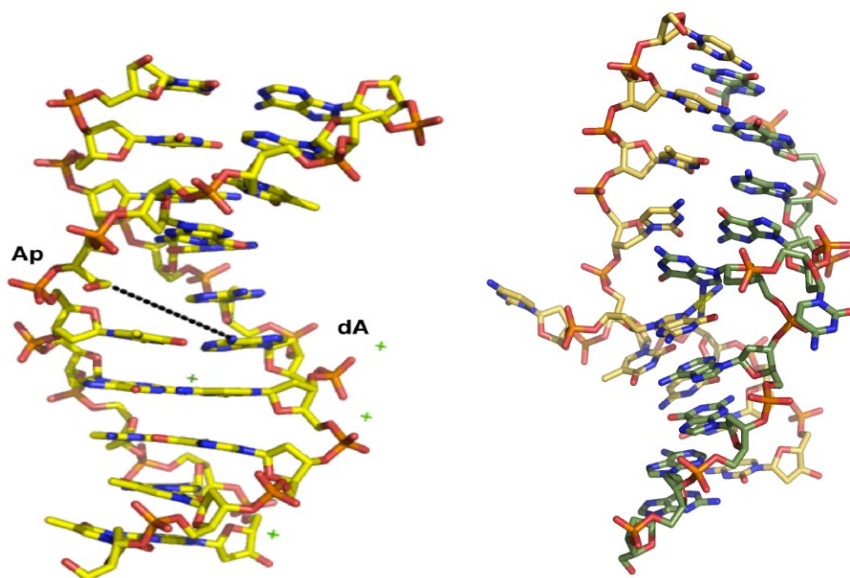
1.4 Fpg/Nei glykosylasová rodina

Fpg a Nei-like (z angl. Endonuclease VIII (nei)-like enzymes) enzymy z rodiny Fpg/Nei jsou charakteristické schopností štěpit N-glykosidovou vazbu DNA poškození často způsobeného oxidačními procesy²⁹. Řadí se mezi enzymy opravující poškozené báze – BER opravná dráha. Molekulární mechanismus těchto proteinů zahrnuje vyklonění poškozené báze nebo Ap do aktivního místa tvořící kapsu. Výsledkem enzymatické opravy je ssDNA zlom na straně poškozené či chybějící báze^{30, 31}.

1.5 NEIL3 - Endonukleasa VIII-like III

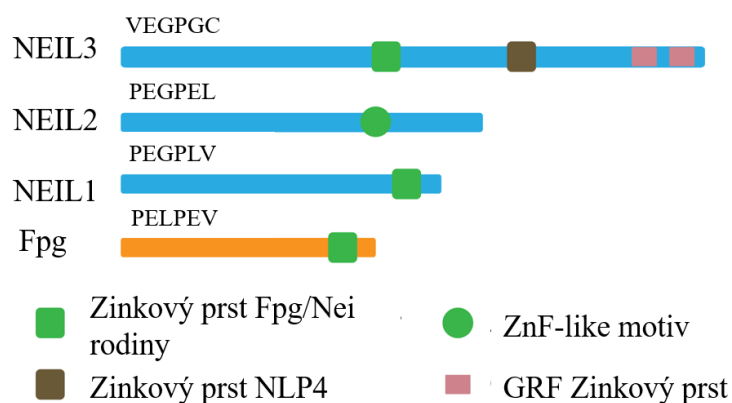
Existují tři lidské enzymy z rodiny Nei-like proteinů, jejichž Fpg/Nei doména vykazuje vysokou homologii s bakteriálním Fpg a Nei proteiny. Bylo ukázáno, že NEIL1 a NEIL3 jsou spřažené s replikací²³.

Relativní molekulová hmotnost NEIL3 (Endonukleasa VIII-like III) je 68 kDa. Gen pro lidský NEIL3 se skládá z 605 aminokyselin. NEIL3 se vyskytuje především v jádru buněk²³. Je zodpovědná za opravu Ap-ICL a také kovalentního prokřížení způsobené psoralenem^{32, 33}. Mimo Ap-ICL aktivity také byla prokázána slabá Ap lyasová aktivita na ssDNA substrátech³⁴. Přestože NEIL3 je schopen rozpoznat poškozené nukleotidy v DNA, k jejich opravě za pomoci Ap lyasové aktivity přistupuje neochotně³⁵. Porovnání dvou modelů zobrazující dvě poškození, z kterých jedno je opravované pomocí NEIL3 a druhé nikoli, je zobrazeno na obr. 1.7³⁶.



Obrázek 1.7. Porovnání modelů ICL. A) Model struktury Ap-ICL s vyznačenými residui, mezi kterými se tvoří ne-nativní N-glykosidová vazba ICL, model z programu PyMol, PDB předloha 3BSE³⁷. Vyznačené je abazické místo (Ap) a adenin (dA) přímo se podílející na kovalentním prokřížení. Převzato¹⁵. B) Model struktury Cis-platinového ICL vytvořený v programu PyMol, PDB 1A2E³⁸.

NEIL3 obsahuje tři domény zinkových prstů, celkově čtyři zinkové prsty, které se často vyskytují u DNA vazebných proteinů¹⁶. Schematické znázornění sekvencí Fpg/Nei rodiny viz obr. 1.8. První zinkový prst je typický pro Fpg/Nei rodinu glykosylas nachází se N-terminálním konci, jako součást specifické glykosylasové domény. Zde je zinečnatý kation ukotven čtyřmi cysteinovými zbytky.

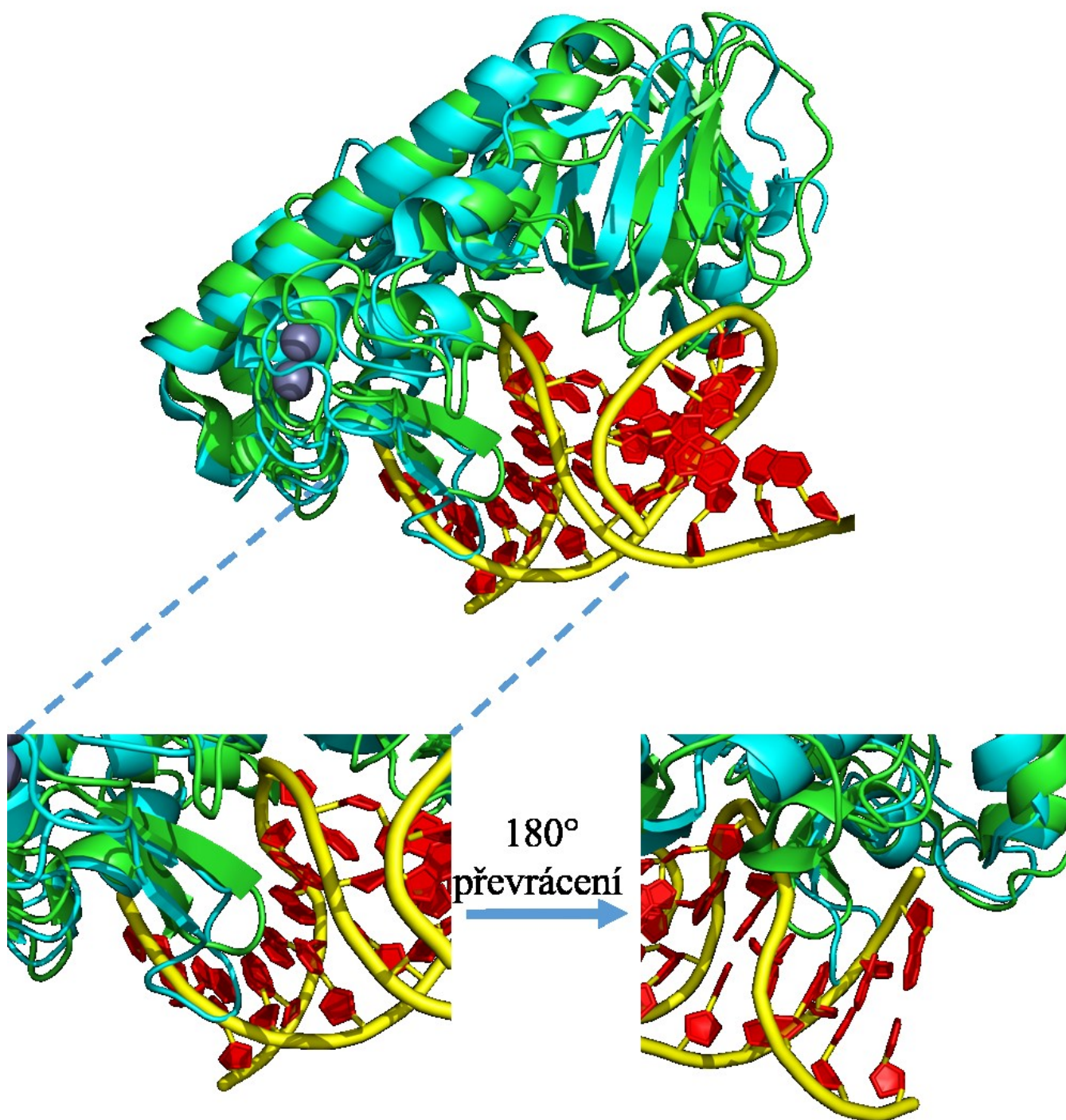


Obrázek 1.8. Schematické znázornění sekvencí jednotlivých členů Fpg-Nei rodiny enzymů s vyznačenými zinkovými prsty, typickou sekvencí na N-terminálním konci a glykosylasovou doménou.

Další doména obsahuje NPL4-like zinkový prst obsahuje NZF motiv. V extraktech z žabích vajíček (*Xenopus laevis*) bylo ukázáno, že tato doména je nezbytná pro opravu Ap-ICL. V dalších proteinech obsahující NZF motiv byly ukázány rozličné vazby ubikvitinů, který je zodpovědný za spojení mezi NEIL3 a TRAIP E3 ligasou, přivolávající NEIL3 k DNA poškození³⁹⁻⁴¹. Na druhou stranu bylo ukázáno, že pro opravu Ap-ICL *in vitro* není esenciální. NZF doména je nezbytná pro správné přivolání NEIL3 k poškození za pomoci TRAIP a to vazbu na ubikvitiny na helikase CMG. Navíc samotná NZF doména však není nezbytná pro rozštěpení DNA poškození⁴². Podle dosud publikovaných dat lze předpokládat, že krátký řetězec ubikvitinů je zodpovědný za aktivaci NEIL3 opravné dráhy.

Poslední doména obsahuje dva GRF zinkové prsty, u kterých byla prokázána asociace s chromatinu. Tyto motivy jsou obdobné motivům v enzymu APE2, kde byla prokázána vlastnost vazby ssDNA⁴³. S tímto předpokladem bylo následně ukázáno, že tyto motivy NEIL3 preferenčně vážou ssDNA. Pravděpodobně hrají důležitou roli při opravě ICL, ale mimo prokázané preferenční vazby na ssDNA hlubší porozumění molekulárního mechanismu chybí⁴².

Na N-terminálním konci proteinu NEIL3 se v pozici 2 nachází valinový zbytek na místo prolinového, který je typický pro ostatní členy Fpg/Nei rodiny. Tento aminokyselinový zbytek se podílí na tvorbě Shiffovi báze v komplexu s DNA. Model známé struktury myšského NEIL3 ve strukturním srovnání s *E. coli* Fpg je vyobrazen na obr. 1.9⁴⁴.

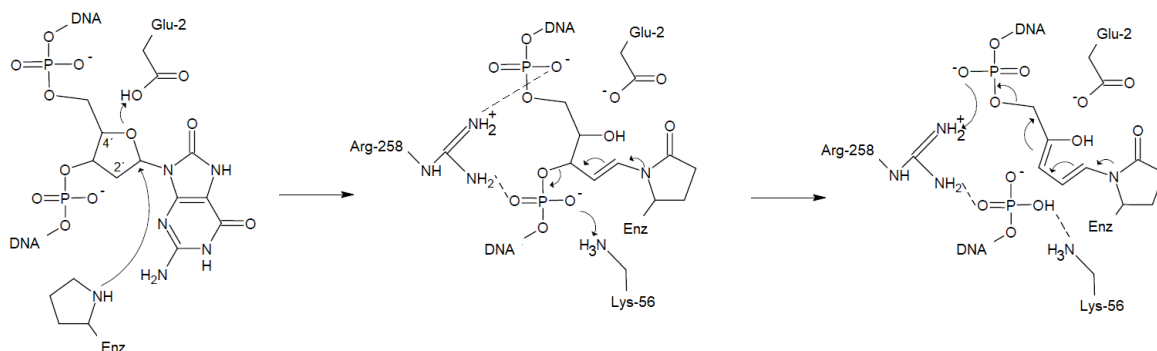


Obrázek 1.9. Model strukturního srovnání vytvořený v PyMol zkrácené varianty NEIL3 glykosylasy z myši (modře) k Fpg z *E. coli* (zeleně). PDB kód pro NEIL3 je 3w0f a pro Fpg 1k82. Zvětšeně je ukázáno místo překryvu DNA a myšího NEIL3.

1.6 Formamidopyrimidin-DNA glykosylasa

Formamidopyrimidin-DNA glykosylasa EC 3.2.2.23 je součástí BER dráhy opravující poškozené báze DNA zejména oxidací anebo působením mutagenních činidel. Fpg je široce zastoupena v bakteriálních kmenech a také v některých rostlinách či plísních. Fpg má glykosylasovou aktivitu, k odstranění poškozené báze, a také spřaženou AP lyasovou aktivitu, která štěpí DNA pomocí β eliminace. Oprava vede ke vzniku zlomu v ssDNA v řetězci s opravovanou bází a tvorbě 3'- a 5'-fosfátů. Účinně odstraňuje 4,6-diamino-5-formamidopyrimidin (FapyA), 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FapyG) a další oxidační produkty 8-oxoguaninu (8-oxoG) jako například guanidinohydantoin.

Prolin se nachází ve středu aktivního místa na pozici dvě, kde v prvním kroku reakce vytváří Schiffovu bázi s ribosou, což odstraní poškozenou bázi. Glutamát na třetí pozici sloužící jako donor protonu napomáhá stabilizovat intermediáty (obr. 1.10).



Obrázek 1.10. Schématické znázornění aktivního místa Fpg (*E. coli*) při katalyzaci opravy oxidativního poškození DNA s vyznačenými aminokyselinovými zbytky účastnicími se katalýzy. Nukleofilní napadení C1' a protonace O4' vede k otevření cukru. Je vytvořena Schiffova báze za účasti Pro-2 a stabilizována vodíkovou vazbou s Glu-3. Lys-53 protonuje 3' fosfát, což vede k β -eliminaci. Na deprotonaci C4' navazuje protonaci 5' fosfátu Arg-258 a druhou β -eliminací.

2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo izolovat čisté Fpg (*Nesscheria meningitidis*) a konstrukty xNEIL3 (*Xenopus leavis*), získat strukturu Fpg a DNA poškození Ap-ICL. Dalším cílem byla charakterizace poškození ICL z hlediska sekvenční závislosti tvorby ICL a *in vitro* experimenty s konstrukty proteinu xNEIL3 a Fpg. Těchto cílů bylo dosaženo následujícími kroky.

- Příprava expresního vektoru pro NEIL3 glykosylasu
- Bakteriální exprese konstruktů NEIL3 a Fpg
- Purifikace proteinů a biochemická charakterizace NEIL3 a Fpg
- Příprava a izolace Ap-ICL, stanovení rychlosti jeho tvorby v závislosti na lokální sekvenci
- Vazebné *in vitro* experimenty Ap-ICL s konstrukty xNEIL3 a Fpg
- Krystalizace Fpg a DNA
- Difrakční experiment a vytvoření strukturního modelu proteinu

3. Materiály a přístroje

Tabulka 3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy	Adventurer Pro, Ohaus
Aparatura a zdroj pro horizontální elektroforesu	EV 231, Consort
Aparatura pro vertikální elektroforesu	Mini-PROTEIN Tetra System, Bio-Rad
Bloková lázeň	SBH130D, Stuart
Centrifugy	Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-1, Eppendorf centrifuge 5418 Allegra X-15 R Centrifuge, rotor SX47910A, Beckmann Coulter Sorval Evolution RC, rotor SLC-6000, Thermo Scientific Avanti Centrifuge J30I, rotor JLA-16.250, Beckmann Coulter
Sonikátor	Bandelin sonopro
Fotoaparát	E-620, Olympus
FPLC	AKTA purifier, GE Healthcare Life Sciences
Homogenizátor podle Dounceho	PYREX
Inkubátor	Memmert IPP 400
Kolona pro gelovou chromatografii	HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 pg, GE Healthcare Life Sciences; HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 pg, GE Healthcare Life Sciences
Kolony pro iontovou chromatografii	Ohp Shp; monoS, GE Healthcare Ohp Shp; monoQ, GE Healthcare

Koncentrátor	Amicon® Ultra 30 kDa, Millipore Ireland Ltd. Amicon®Ultra 3K, centrifuge filters, Millipore Ireland Ltd.
Krystalizační robot	CrystalGryphon, Art Robbins Instruments Oryx8, Douglas Instruments
Magnetická míchačka	ARE, VELP
Mikroskop	SZX10, Olympus
Mikrospektrofotometr	Spectrophotometer ND-1000, Nanodrop
pH metr	HI 3220 pH / ORP Meter, HANNA instrument
Předvážky	EMB 500-1, Kern
Rotační inkubátor	Innova 44, New Brunswick
Rotátor	Multi RS-60, Biosan
Fluorescenční skener	TYPHOON FLA 9500
Termocykler	Professional TRIO Thermocycler, Biometra Product Line Block heater, SBH130D, P-Lab
Nílonové smyčky	MiTeGen
Vodní lázeň	JB Aqua 2 Plus, Grant
Vortex	Gene 2, Scientific Industries
Zdroj pro vertikální elektroforesu	PowerPac Basic, Bio-Rad

Tabulka 3.2 Komerčně dostupné chemikálie

Agarosa	Agarosa SERVA pro DNA elektroforesu, SERVA
Akrylamid, Bisakrylamid	Rotiphorese gel 30 (37,5:1), Carl Roth
Ampicilin	Carl Roth

B-merkapt ethanol	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G 250	Sigma-Aldrich
EDTA (ethylendiamin tetraoctová kyselina)	Carl Roth
Ethidium bromid	Carl Roth
HCl	PENTA
Kyselina mravenčí	Carl Roth
Ni-NTA agarosa	Protino
Peroxodisíran amonný	Carl Roth
SDS	Carl Roth
Standard pro DNA elektroforesu	Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific
Standard pro proteinovou elektroforesu	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa, Thermo Scientific
TCEP	Thermo Scientific
TEMED	Carl Roth
Tris-Cl	Carl Roth

Tabulka 3.3 Pufry, roztoky, média

CBB barvicí roztok	3 mM Coomassie Brilliant Blue R250, 1,5 M CH ₃ COOH, 50% (v/v) methanol
Eluční pufr pro xNEIL3254st, Fpg (B)	1 M NaCl; 20 mM Tris pH 8,0; 10% Glycerol; 0,5 mM TCEP
Eluční pufr pro afinitní chromatografii	300 mM Imidazol; 300 mM NaCl; 20 mM Tris pH 8,0; 10% Glycerol; 3mM β-merkapt ethanol
Ligační pufr	5 x Rapid Ligation pufr, Thermo Scientific
LB agar podle Lennox	P-Lab

LB medium podle Lennox	P-Lab
Vzorkový pufr pro DNA elektroforesu v přítomnosti ethidium bromidu	6x DNA Loading Dye, Thermo Scientific
Vzorkový pufr pro DNA elektroforesu v nativním prostředí	20% Glycerol; 20 mM Tris pH 8,0
Vzorkový pufr pro SDS elektroforesu	4x Roti Load®1, Carl Roth
Promývací pufr pro xNEIL 264st, Fpg (A)	50 mM NaCl; 20 mM Tris pH 8,0; 10% Glycerol; 0,5 mM TCEP
Promývací pufr pro afinitní chromatografii	20 mM Imidazol; 300 mM NaCl; 20 mM Tris pH 8,0; 10% Glycerol; 3mM β -merkaptoethanol
Pufr pro gelovou chromatografii	20 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl; 10% Glycerol; 0,5 mM TCEP
Pufr pro SDS elektroforesu (Tris-glycinový pufr)	25 mM Tris NaCl, 0,25 M glycin, 0,1 % (w/w) SDS, pH 8,8
Sady krystalizačních roztoků	HELIX; NATRIX; ProPlex; Morpheus; JCSG I; JCSG II; JCSG III; JCSG IV
Sady pro purifikaci DNA	QIAquick PCR Purification kit ,Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit ,Qiagen
TAE pufr	40 mM Tris, 20 mM CH ₃ COOH, 1mM EDTA, pH 8,0
TE pufr	20 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA
TBE pufr	89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA, pH 8,3
Reakční pufr pro vazebné experimenty	20 mM Tris pH 7,4; 75 mM NaCl; 5% Glycerol; 0,5 mM TCEP
Restrikční pufr	10x Fast Digest Green pufr, Thermo Scientific
ZY médium	1 % (w/v) trypton; 0,5% (w/v) kvasničný extrakt; 2,8 mM glukosa; 6 mM laktosa; 0,5% (v/v) glycerol; 1 mM

	MgCl ₂ ; 25 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 50 mM KH ₂ PO ₄ ; 50 mM Na ₂ HPO ₄
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tabulka 3.4 Složení gelů na DNA

Denaturující	1x TBE 7 M Močovina 15% (v/v) Akrylamid / Bisakrylamid (37,5 : 1)
Nativní	1x TBE bez EDTA 15% (v/v) Akrylamid / Bisakrylamid (37,5 : 1)

Tabulka 3.5 Složení gelů na SDS-PAGE

Zaostřovací	125 mM Tris-Cl pH 6,8 4 % (v/v) Akrylamid / Bisakrylamid (37,5 : 1) 0,1 % (w/v) SDS 0,005 % (v/v) TEMED 0,05 % (w/v) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
Dělicí	375 mM Tris-Cl pH 8,8 15 % (w/v) Akrylamid / Bisakrylamid (37,5 : 1) 0,1 % (w/v) SDS 0,001 % (v/v) TEMED 0,05 % (w/v) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈

3. 1. Použité sekvence

Tabulka 3.6 Sekvence primerů

Primer dle směru replikace	Sekvence (5'-3')
NEIL3 Ndel forwardní	GAGATATACATATGGTGGAGGGTCCGGGC
NEIL3 HindIII reverzní	GCGGCCGCAAGCTTCTACTTTTGGCACTTGGG AC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

Tabulka 3.7 Sekvence oligonukleotidů použitých pro přípravu neznačené ICL pro krystalizaci

Název	Sekvence (5'-3')
Neznačené	CGGATGAAGUTAGACAGA
Neznačené komp.	CGTCTGTCTAACTTCATC

Tabulka 3.8 Sekvence oligonukleotidů použitých pro strukturní studie tvorby ICL

Název	Sekvence (5'-3')
T4T	[HEX]AGATCAAUTAAACAGA
T4T komplementární	TCTGTTTAATTTGATCT
T4C	[HEX]AGATCAAGUTAAACAGA
T4C komplementární	TCTGTTTAACTTGATCT
G4T	[HEX]AGATCGGAUTCCACAGA
G4T komplementární	TCTGTGGAATCCGATCT
G4C	[HEX]AGATCGGGUTCCACAGA
G4C komplementární	TCTGTGGAACCCGATCT
5GATC univerzální	[HEX]GGATGAAAUTAGACAGA
5G komplementární	CTCTGTCTAGTTTCATC
5A komplementární	CTCTGTCTAATTTTCATC
5T/4T komplementární	CTCTGTCTATTTTCATC
5C komplementární	CTCTGTCTACTTTTCATC
4G	[HEX]GGATGAACUTAGACAGA
4G komplementární	CTCTGTCTAACTTCATC
4A	[HEX]GGATGAATUTAGACAGA

4A komplementární	CTCTGTCTAAATTCATC
4C	[HEX]GGATGAAGUTAGACAGA
4C komplementární	CTCTGTCTAAGTTCATC

4. Metody

4.1. Příprava vektoru pro bakteriální expresi xNEIL3

4.1.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Reakční směs pro amplifikaci DNA byla připravena podle tab. 4.1. Celkový objem reakce byl 20 μ l a reakce proběhla podle postupu prezentovaném v tab. 4.2 v automatizovaném přístroji Professional TRIO Termocycler (tab. 3.1 str. 20).

Tabulka 4.1 Složení reakční směsi PCR

Komponenty	Množství
Templátová DNA	1 ng
10 μ M forwardní primer	1 μ l
10 μ M reverstní primer	1 μ l
2x Master Mix Phusion Flash	10 μ l
HPLC H ₂ O	7 μ l

Nukleotidové sekvence primerů jsou uvedeny v tab. 3.6 str. 23.

Tabulka 4.2 Průběh PCR reakce

Počet cyklů	Teplota / °C	Čas
1	98	1 min
30	98	10 s
	62	20 s
	72	15 s
1	72	5 min

4.1.2. Horizontální agarosová elektroforesa

Na gel složený z 1% agarosy a 0,02% ethidium bromidu bylo nanášeno 1,5 µl standardu a 2 µl vzorku smíchaného se vzorkovým pufrům (5x DNA Loading Dye). Elektroforesa proběhla v horizontálním uspořádání 15 minut při napětí 300V v TAE pufru. Výsledný gel byl vizualizován pomocí UV fotoaparátu QUANTUM ST4-1100 (tab. 3.1 str. 19).

4.1.3. Izolace PCR produktu

PCR produkt byl naředěn trojnásobným množstvím PB pufru a adsorbován na silikagelovou mikrokolonku (QIAquick PCR Purification Kit⁴⁵). Promytím PE pufrům za pomoci centrifugace byly odstraněny nečistoty a DNA byla následně eluována TE pufrům.

4.1.4. Štěpení plasmidu a produktu PCR restričními enzymy

Plasmid pET-21a(+), i PCR produkt byly štěpeny stejnými restričními endonukleasami v celkovém objemu 20 µl 60 min při 37 °C. Složení reakčních směsí je zaznamenáno v tab. 4.3. V případě plasmidu byl po 30 min přidán 1 µl telecí alkalické fosfatasy (CIAP z angl. Calf intestinal alkaline phosphatase).

Tabulka 4.3 Složení reakčních směsí pro restriční štěpení DNA

Komponenty	Plasmid	PCR produkt
DNA	3 µg	14 µl
Endonukleasa NdeI	0,5 µl	1 µl
Endonukleasa Hind III	0,5 µl	1 µl
10x Fast dig Green	1 µl	2 µl
CIAP	1 µl	-
HPLC H ₂ O	6 µl	2 µl

4.1.5. Ligace

Ligací DNA neboli vložení insertní DNA (PCR produkt) do vektoru (např. plasmid). Insertní DNA i vektor štěpené stejnými restrikčními enzymy byly ligovány v reakční směsi podle tab. 4.4. Ligace probíhala při teplotě 37 °C 1 hod. Při přípravě ligační směsi bylo postupováno podle protokolu k T4 DNA ligase⁴⁶.

Tabulka 4.4 Složení ligační směsi

Komponenty	V/ μ l
Vektor	10
Insert	10
5x ligační pufr	6
T4 DNA ligasa	1
HPLC H ₂ O	3

4.1.6. Transformace bakterií *Escherichie coli* (*E. coli*) DH5 α

Na ledu (4°C) byly přidány 2 μ l ligační směsi z kapitoly 4.1.5 str. 26 k 20 μ l buněčné suspenze chemicky kompetentních *E. coli* DH5 α a ponechán inkubovat na ledu 5 min. Následně byly buňky podrobeny teplotnímu šoku 42 °C po dobu 45 s a poté inkubovány na ledu 5 min. Po inkubaci bylo k buňkám přidáno 0,5 ml LB média a buňky byly kultivovány při 37 °C v kabinetovém inkubátoru po dobu 1 hodiny. Za aseptických podmínek byla suspenze rozetřena na Petriho misku s LB agarem a antibiotikem (finální koncentrace Ampicilinu 100 μ g/ml). Následná inkubace trvala přibližně 12 hodin při 37 °C.

4.1.7. PCR z kolonií

Byla připravena reakce podle tab. 4. 5. Do směsi byla pomocí špičky automatické pipety přidána resuspendovaná část biomasy testovaných kolonií (viz kap. 4.1.6). Reakce proběhly za použití stejného programu uvedeného v tab. 4.2 str. 25 v automatizovaném

přístroji Professional TRIO Termocycler (tab. 3.1 str. 16). Produkty reakcí byly separovány pomocí horizontální agarosové elektroforesy za přítomnosti ethidium bromidu a vizualizovány pomocí UV-fotoaparátu (kap. 4.1.2. str. 25). Plasmidová DNA byla izolována pomocí soupravy QIAprep SpinMiniprep Kit⁴⁷.

Tabulka 4.5 Složení PCR reakcí pro bakteriální kolonie

Komponenty	V/ μ l
Biomasa	-
Forwardní primer T7	0,5
2x Dream Tag Green Master Mix, Thermo Scientific	5
HPLC H ₂ O	4

4.1.8. Sekvenování plasmidové DNA

V mikrozkuhavce byla připravena reakční směs s komponenty viz tab. 4.6. Sekvence byla provedena Sangerovou metodou firmou GATC Biotech.

Tabulka 4.6 Složení sekvenační reakční směsi

Komponenty	V/ μ l
Plasmidová DNA	2,5
10 μ M primer	2,5
HPLC H ₂ O	5

Příprava sekvenační směsi byla provedena podle doporučení GATC Biotech.

4.2. Bakteriální exprese

4.2.1. Exprese rekombinantních proteinů v buňkách *E. coli* BL21 Star

Chemicky kompetentní buňky bakteriálního kmene *E. coli* BL21(DE3) Star byly transformovány metodou teplotního šoku připravenými expresními vektory. Při transformaci bylo postupováno analogicky jako v kap. 4.1.6 str. 26. Buňky z jedné

kolonie narostlé na LB agaru s antibiotikem (kap. 4.1.6 str. 26) byly inkubovány ve 2 ml LB média s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml při 37°C a otáčkách 220 RPM přibližně 12 hod. Takto připravenou bakteriální kulturou byl zaočkován 1 l ZY autoindukčního média s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml. Kultura byla inkubována 5 hodin při 37°C a otáčkách 220 RPM, poté byla teplota snížena na 24 °C a buňky byly kultivovány dalších 14 hodin.

4.3. Izolace proteinu

4.3.1. Centrifugace

Bakteriální kultura, jejíž příprava byla popsána v kap. 4.2.1 str. 28, byla odstředěna v litrových kyvetách v centrifuze Sorval Evolution RC (9 min; 4°C; 4000 RPM – rotor SLC 6000). Supernatant byl odstraněn a peleta zamražena na -80 °C.

4.3.2. Lyse buněk

Rozmražená peleta byla resuspendována ve vychlazeném promývacím pufru na 4°C (tab. 3.3 str. 21) a homogenizována na ledu pomocí homogenizátoru podle Dounceho. Lyse buněk probíhala pomocí sonikátoru Bandelin sonopro (3 x 20 s; na ledu). Následně byl bakteriální lysát centrifugován (17 000 RPM; 2 x 15 min).

4.3.3. Chromatografie na iontoměničích

Bakteriální lysát byl za pomoci nanášecího mechanismu Superloop 30 ml nanesen na systém equalibrovaných kolon Q sepharosa a SP sepharosa zapojených za sebou na purifikačním systému ÄKTA purifier 10. Po optimalizaci byl standardně použit postup nanesení vzorku na kolony za konstantního průtoku mobilní fáze 1 ml min⁻¹. Po navázání vzorku na kolony byla odpojena mQ kolona a nastaven kombinovaný lineární gradient pufrů (tab. 3.3 str. 21) tak, aby z počátečního 100% přítoku pufru o nižší koncentraci NaCl (promývací pufr) dosáhl pufr o vyšší koncentraci NaCl (eluční pufr) 35% přítoku během 100ml. Poté byl gradient nastaven tak, aby během 10 ml dosáhl přítok elučního

pufu 100%. Kolona byla propojena se sběračem frakcí dělicí eluční objem do jamek 96-ti jamkové destičky (angl. 96 deep well plate) po 1 ml eluátu. Průběh chromatografie byl sledován pomocí absorbančí 280 a 254 nm.

Tabulka 4.7 Podmínky chromatografie na iontoměničích

Protein	pI	Kolona	Mw
xNEIL3 K60A 264stop	9,02	mS mQ	29,58
xNEIL3 FL	9,17	Ni-NTA	64,33
Fpg	8,68	mS mQ	30,29

4.3.4. Diskontinuální elektroforesa v denaturačním prostředí dodecylsíraru sodného (SDS-PAGE)

Vybrané frakce vykazující absorbančí a nastříknutý bakteriální lysát byly 1:5 smíchány s 3 μ l 2x koncentrovaného vzorkového pufu. Takto připravené vzorky a 2 μ l standardu byly naneseny na akrylamidový gel připravený z 4% zaostřovacího a 15% separačního gelu (složení viz tab. 3.5 str. 23). Elektroforesa probíhala 60 min při napětí 220V ve vertikálním uspořádání. Jako elektroforetický puf byl použit Tris-glycinový puf obsahující 0,1% SDS. Separované frakce proteinů byly vizualizovány obarvením Coomassie Brilliant Blue a následným odbarvením v destilované vodě.

4.3.5. Koncentrování proteinu

Roztok proteinu byl koncentrován v koncentrátoru Amicon Ultra s celulosovou membránou propouštějící molekuly o velikosti do 30 kDa na centrifuze Allegra X – 15 R Centrifuge; Beckmann Coulter (2000 g) při 3300 RPM do konečného objemu přibližně 3 ml.

4.3.6. Afinitní chromatografie

Bakteriální lysát byl smíchán s Ni-NTA resinem, který byl nejprve 3 x promyt equalibračním pufrům pro afinitní chromatografii (tab. 3.3 str. 21) pro equalibraci a odstředěn pomocí samovyvažovací centrifugy Allegra X-15 R na 1000 g po dobu 1 min, kde byl následně supernatant vždy odstraněn. Směs lysátu a resinu byla inkubována po dobu 1 hodiny při 4°C za stálého míchání na rotátoru Multi RS – 60 BIOSAN. Následně byla směs odstředěna na 1000 g po dobu 1 min a supernatant byl zachován. Resin s navázanými proteiny byl v 5 cyklech centrifugace (centrifuga Allegra X-15 R, 1 min, 1000g) promyt equalibračním pufrům pro afinitní chromatografii, kde vždy následovalo odstředění dle výše uvedených parametrů. Promytý resin byl nanesen na kolonku a proteiny byly eluovány elučním pufrům pro afinitní chromatografii (tab. 3.3 str. 21). Eluát byl sbírán a následně separován na pomoci SDS-PAGE (viz kap. 4.3.4. str. 29).

4.3.7. Gelová permeační chromatografie

Proteiny Fpg a xNEIL3 K60A 264 st byly nanesený na equalibrovanou kolonu Superdex 75 16/600 GL, proteiny xNEIL3 WT FL a xNEIL3 K60A FL byly nanesený na equalibrovanou kolonu Superdex 200 16/600 GL a pomoci gelové permeační chromatografie, kde se rozdělují molekuly podle velikosti, přečištěny na purifikačním systému ÄKTA purifier 10.

4.4. Tvorba a izolace ICL

4.4.1. Hybridizace oligonukleotidů na krystalizaci/ sekvenční studie

Mikrozkumavky se sušinou oligonukleotidů byly odstředěny (30 s; 16 000 RPM; laboratorní teplota - Eppendorf centrifuge 5418) a resuspendovány v TE pufru na koncentraci 100 μM podle technického data listu poskytovaného společností Sigma Aldrich. Komplementární oligonukleotidy (sekvence viz tab. 3.8 str. 24) byly smíchány 1:1 a bylo přidáno NaCl na konečnou koncentraci 50 mM – 1 M. Směs byla hybridizována zahřátím na teplotu 95 °C pomoci blokového ohříváče a ponechána pomalu k ochlazení na laboratorní teplotu. Následně byla přidána Uracyl-DNA

glykosylasa (UDG) a směs ponechána inkubovat při 37°C. Po různých časových intervalech byly odebírány 2µl reakce, které byly smíchány s 95% formamidem a 5mM EDTA, čímž byla reakce zastavena, a zamraženy na -20°C.

Tabulka 4.8 Složení reakční směsi pro tvorbu ICL

Komponenty	Konečná koncentrace
Oligonukleotid A	50 µM
Oligonukleotid B	50 µM
NaCl	50 mM – 1M
UDG	1 U/ml

4.4.2. Diskontinuální elektroforesa v nativním prostředí

Směs pro separaci na diskontinuální elektroforese byla vytvořena smícháním 4 µl vzorkového pufru (složení viz tab. 3.3 str. 21) a 1 µl reakční směsi pro tvorbu ICL značené hexachlorofluoresceinem [HEX] v případě elektroforézy v nativním prostředí. V případě elektroforézy v denaturujícím prostředí za přítomnosti 7 M močoviny byla směs nanášena na gel vytvořena smícháním 4 µl formamidu a 1 µl reakční směsi pro tvorbu ICL značené [HEX]. Reakční směs se vzorkovým pufrem či formamidem byla nanášena na gel a separována 25 min při 300 V ve vertikálním uspořádání. Jako elektroforetický pufr byl použit TBE (složení viz tab. 3.3, str. 21). Výsledný gel byl vizualizován na fluorimetru Typhoon FLA-9500.

4.4.3. Izolace ICL na vazebné studii

Značená DNA fluorescenční značkou [HEX] byla po týdenní inkubaci v 37 °C separována na 15% denaturujícím gelu, viz kap. 4.3.4 str. 29. Nejvýše umístěný separovaný vzorek představující ICL byl vyříznut a ponechán při 4 °C cca 24 hodin k extrakci do 1,5 ml TE pufru. Následně byl extrakt zakoncentrován pomocí Amicon®Ultra 3K (13000 RPM; 4°C - Eppendorf centrifuge 5418) .

4.4.4. Tvorba ICL – optimalizace inkubační doby, sekvence oligonukleotidů

Pro zjištění optimální doby inkubace pro maximální výtěžek tvorby ICL byly po dobu 24 dní každý den odebírány 2 μl roztoku, kde probíhala reakce s UDG. Byly použity nukleotidy kovalentně značené [HEX] pro lepší kvantifikaci, rozlišení a kontrast při vizualizaci (sekvence viz tab. 3.8 str. 23). Odebrané vzorky byly smíchány s formamidem pro zastavení reakce a zamraženy na -20°C . Následně byly jednotlivé vzorky elektroforeticky rozděleny na 15% denaturujícím polyakrylamidovém gelu obsahujícím 7M močvinu (30 min; 300 V). Výsledné rozdělení na gelu bylo vizualizováno pomocí fluorimetru Typhoon FLA-9500.

4.4.5. Interakce ICL na konstrukty xNEIL3 a Fpg

Komplexy byly vytvořeny smícháním proteinů v různých koncentracích s 2 μM ICL značené [HEX] v reakčním pufru (viz tab. 3.3 str. 22). Vzorky byly elektroforeticky analyzovány na 15% akrylamidovém nativním gelu (25 min; 300 V). Výsledné rozdělení navázané DNA bylo vizualizováno pomocí fluorimetru Typhoon FLA-9500.

4.5. Proteinová krystalografie

4.5.1. Příprava krystalů

Protein o koncentraci 300 μM byl pomocí krystalizačních robotů Oryx a CrystalGryphon nanesen na 96 jamkovou destičku Intelli-plate s komerčními roztoky na krystalizaci do uspořádání sedící kapky metody difuze par a ponechán k růstu krystalů při 18°C . Sedící kapky byly získány smícháním 0,4 μl roztoku koncentrovaného proteinu a 0,4 μl roztoku komerčního krystalizačního roztoku. Difúze probíhala proti 70 μl krystalizačního roztoku v rezervoáru, úniku par bylo zabráněno průhlednou lepicí fólií. Nárůst krystalů byl pozorován pomocí světelného mikroskopu Olympus SZX10. S pomocí tohoto mikroskopu došlo k vylovení narostlých krystalů a jejich zamražení a uchování na cestu na synchrotron v tekutém dusíku.

4.5.2. Měření difrakce

Difrakce krystalů byla měřena na synchrotronu BESSY. Vlnová délka záření pro měření krystalů byla 0,9184Å. Pro snížení radiačního poškození bylo při měření využito chlazení tekutým dusíkem na teplotu 100K.

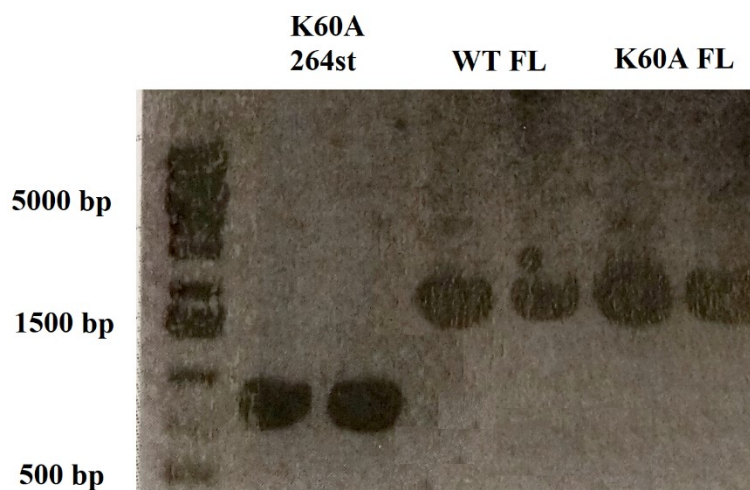
4.5.3. Vytvoření modelu

Získaná data byla integrována v programu XDS⁴⁸. Fázový problém byl řešen metodou molekulárního nahrazení za použití programu Phaser. Jako model byla využita struktura s pdb kódem 2F5Q. Stavba modelu a proces tzv. „refinementu“ probíhal za využití programu Phenix⁴⁹. Manuální „refinement“ byl prováděn v programu Coot⁵⁰. Následné grafické zpracování proběhlo v programu PyMOL⁵¹.

5. Výsledky

5.1. Příprava vektoru pro bakteriální expresi xNEIL3 K60A 264 stop

Geny xNEIL3 s mutací K60A FL i WT FL byly zaslány od Dr. J. C. Waltera z laboratoře Harvard Medical School v Bostonu. Zkrácený konstrukt s mutací K60A a stop kodonem na pozici 264 (264stop) byl navržen podle bakteriálních homologů. PCR reakcí byly do sekvencí vloženy restriční místa pro endonukleasy Hind III a Nde I. Podmínky a složení reakční směsi jsou uvedeny v kapitole 4.1.1 str. 24. Při PCR reakci byla templátová DNA amplifikována popř. zkrácena. Pohyblivost na horizontální elektroforese odpovídala velikosti požadovaných konstruktů (viz obrázek 5.1). Produkty reakce byly přečištěny na silikagelové mikrokolonce.



Obrázek 5.1 1% agarosová elektroforesa v přítomnosti ethidium bromidu produktu PCR s vyznačeným žebříčkem velikostí a označenými jednotlivými separovanými produkty.

Konstrukty a vektor pET-21a(+) byly následně štěpeny restrikními endonukleasami Hind III a NdeI (kap. 4.1.4 str. 25), produkty opětovně přečištěny a byla provedena ligace plasmidové a templátové DNA (kap. 4.1.5 str. 26).

Tento vektor obsahuje kódující sekvenci β -laktamasu zajišťující ampicilinovou rezistenci, s inserty (xNEIL3 K60A 264st, xNEIL3 WT FL, xNEIL3 K60A FL, Fpg) byly transformovány do kompetentních buněk *E.coli* DH5 α (kap. 4.1.6 str. 26), které byly kultivovány na LB agaru s přídavkem ampicilinu (100 μ g/ml). Z narostlých kolonií byla provedena PCR reakce (kap. 4.1.7 str. 27) pro ověření přítomnosti insertní DNA. Při PCR reakcích byly jednou použity T7 primery. Produkty PCR reakce byly analyzovány pomocí agarosové elektroforesy (kap. 4.1.2 str. 25). Buňky z kolonií identifikovaných jako pozitivní byly kultivovány v LB mediu přibližně 12 hod. Následně byla plasmidová DNA izolována (kap. 4.1.7 str. 27) a její správnost byla ověřena sekvenací (kap. 4.1.8 str. 27).

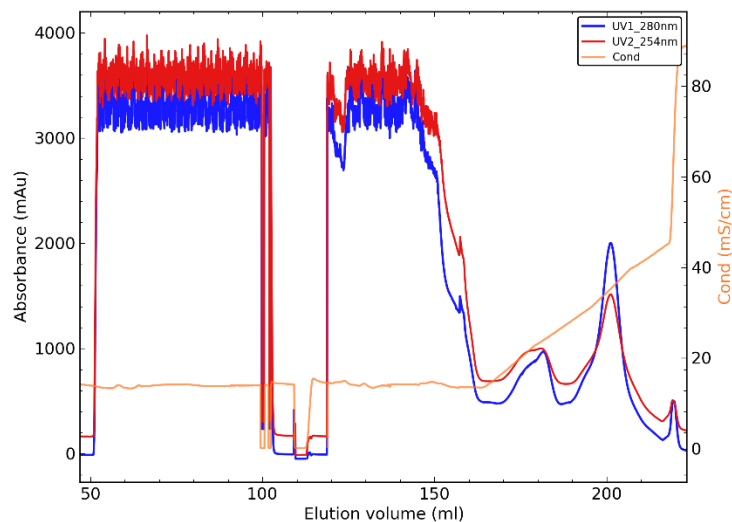
5.2. Expres a izolace enzymů xNEIL3 K60A 264 stop, xNEIL3 WT FL, xNEIL3 K60A FL a Fpg

5.2.1. Expres

Vektory s inserty byly transformovány do kompetentních buněk *E.coli* BL21(DE3) Star (kap. 4.2.1 str. 28) Následně byly bakteriální kultury použity k zaočkování autoindukčních médií ZY a buňky dále kultivovány (kap. 4.2.1 str. 28).

5.2.2. Izolace čistého proteinu xNEIL3 K60A 264st, Fpg

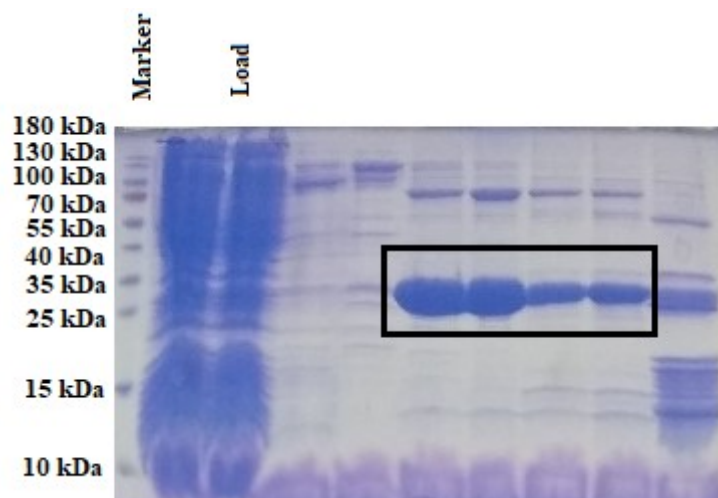
Vzniklé kultury byly odstředěny pro oddělení expresního média (kap. 4.3.1 str. 28) a buňky následně homogenizovány homogenizátorem podle Dunceho a lysovány ultrazvukovými pulzy pomocí Bandelin sonopro (kap. 4.3.2 str. 28). Vzniklý bakteriální lysát byl nanesen na iontové kolony v zapojení aniontový a poté kationtový iontoměnič Q sepharosa – SP sepharosa. Po navázání se bakteriálního lysátu na kolony byl anex odpojen a izolace proteinů pokračovala z katexu viz kap. 4.3.3 str. 29. Chromatogram z uvedené izolace je znázorněn na obr. 5.2.



Obrázek 5.2 Závislost absorbance na elučním objemu při iontové výměnné chromatografii na Q sepharosa a SP sepharosa tandemově zapojených kolonách za gradientové eluce 50 mM NaCl až 1 M NaCl na kolonách equalibrovaných pufrem pro chromatografii na iontoměničích (tab. 3.3 str. 21) typická pro izolaci Fpg a xNEIL3 K60A 264st.

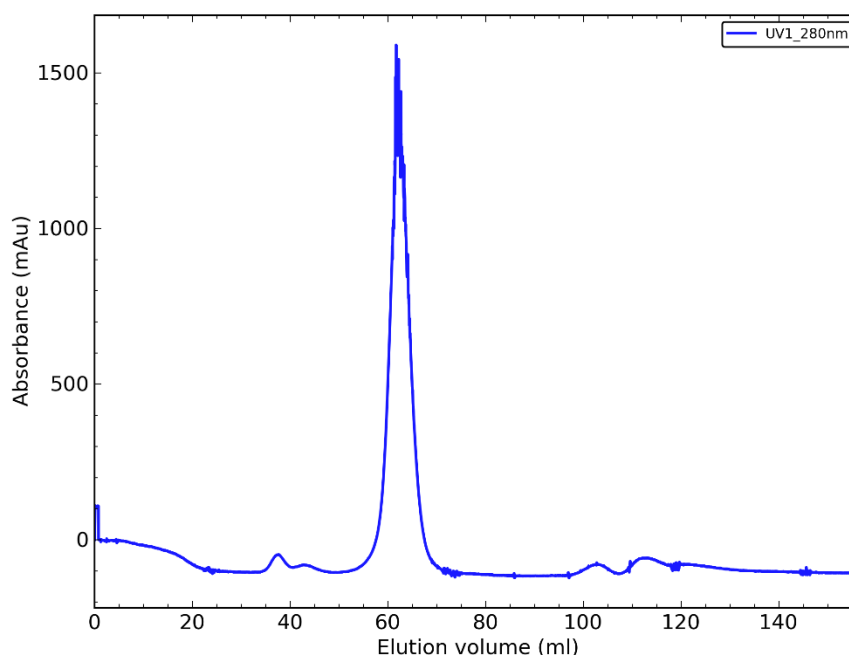
Modře je znázorněna absorbance při 280 nm červeně absorbance při 254 nm a, oranžově konduktivita.

Frakce vykazující absorbanční při 280 nm byly analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE, viz obr. 5.3 str. 36.

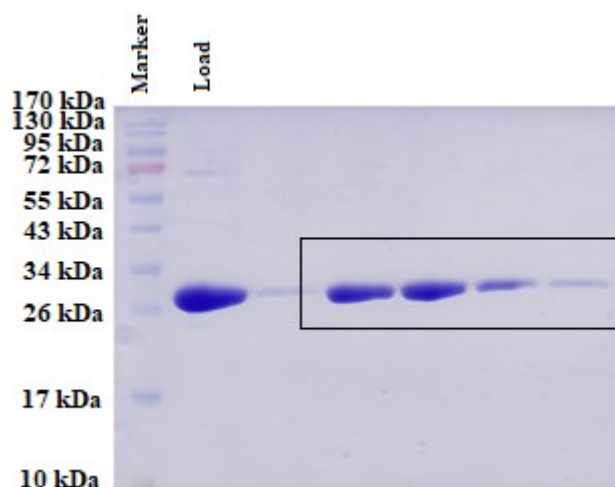


Obrázek 5.3 Elektroforetická pohyblivost frakcí vykazujících absorbanční při 280 nm při gradientové eluci na SP sepharosové koloně (obr. 5.2, str. 35). Frakce v rámečku vyznačují vzorky obsahující proteinové frakce dále přečišťované pomocí gelové permeační chromatografie. Za použití SDS-PAGE 15% akrylamidového gelu a barvení CBBR250.

Frakce obsahující protein byly spojeny, „zakoncentrovány“ (kap. 4.3.5 str. 30) na objem přibližně 3 ml a přečištěny pomocí gelové permeační chromatografie za použití kolony Superdex 75 16/600. Chromatogram z gelové permeační chromatografie je znázorněn na obr. 5.4 str. 37. Frakce vykazující absorbanční při 280 nm byly analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE, viz obr. 5.5 str. 37.



Obrázek 5.4 Závislost absorbance na elučním objemu při iontové permeační chromatografii za použití kolony Superdex 75 16/600 typická pro Fpg a xNEIL3 K60A 264st. Modře je znázorněna absorbance při 280 nm.

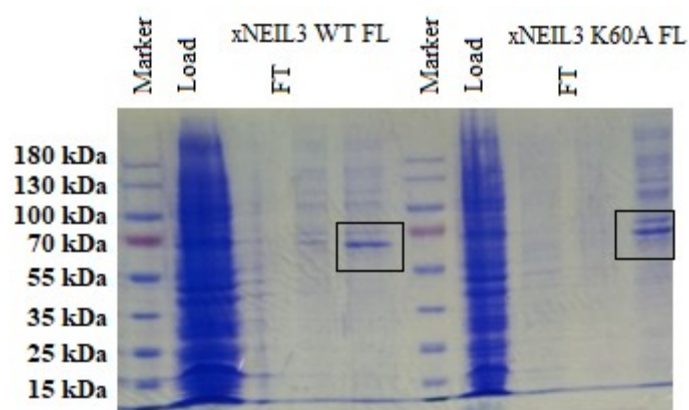


Obrázek 5.5 Elektroforetická pohyblivost frakcí vykazujících vyšší absorbanci při 280 nm při iontové permeační chromatografii za použití kolony Superdex 75 16/600 GL (obr. 5.4, str. 37). 15% SDS-PAGE je barven CBBR250. Frakce v rámečku vyznačují vzorky obsahující čistý protein.

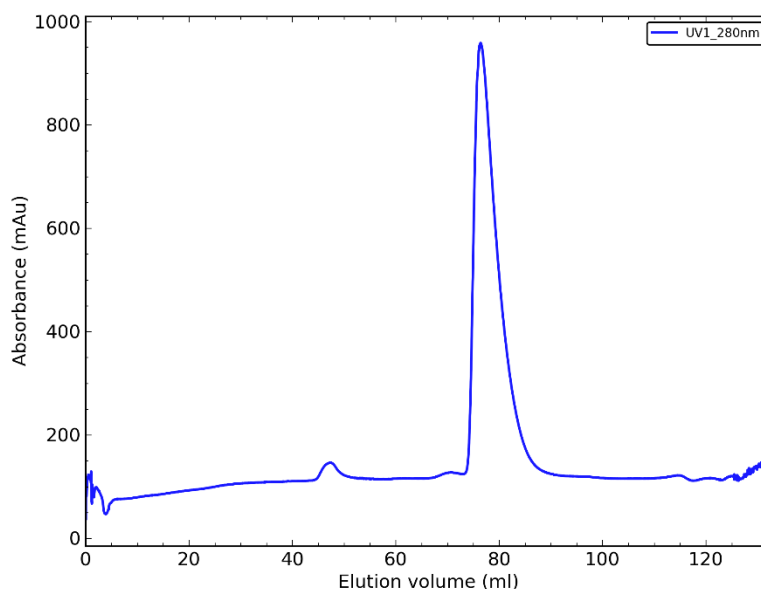
5.2.3. Izolace čistého proteinu xNEIL3 WT FL, xNEIL3 K60A FL

Vzniklé kultury byly odstředěny pro oddělení expresního média (kap. 4.3.1 str. 28) a buňky následně homogenizovány homogenizátorem podle Duncého a lymovány ultrazvukovými pulzy pomocí Bandelin sonopro (kap. 4.3.2 str. 28). Vzniklý bakteriální

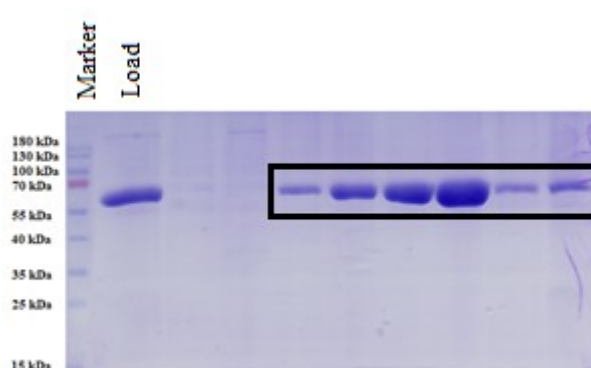
lysát byl smíchán s promytým a equalibrovaným Ni-NTA resinem a inkubován při 4°C za stálého míchání na rotátoru 1 hodinu. Po navázání proteinů byl resin promyt a následně eluován ekvivalentním množstvím promývacího pufru (složení viz tab. 3.3 str. 21). Eluát byl analyzován na 15% SDS-PAGE viz obr. 5.6. Pro dočištění frakcí obsahující protein bylo využito gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 16/600 viz obr. 5.7 a pomocí 15% SDS-PAGE ověřena elektroforetická pohyblivost frakcí izolovaného proteinu viz obr. 5.8.



Obrázek 5.6 Elektroforetická pohyblivost frakcí z afinitní chromatografie pro jednotlivé proteiny – mutantní a WT variantu xNEIL3. Frakce v rámečku označují přečištěný protein následně přečištěný gelovou chromatografií (obr. 5.7, str. 38).

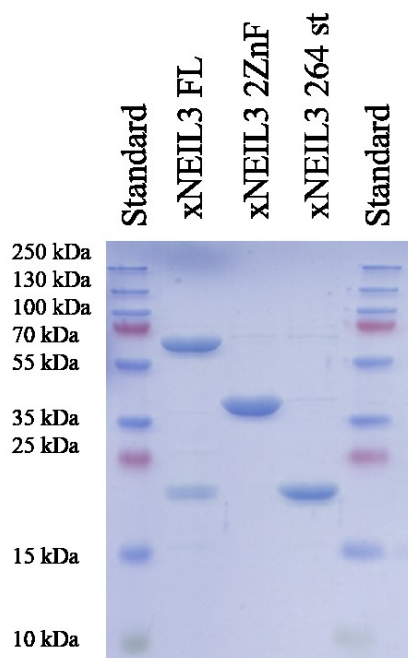


Obrázek 5.7 Závislost absorpance na elučním objemu při iontové permeační chromatografii za použití kolony Superdex 200 16/600 typická pro xNEIL3 FL. Modře je znázorněna absorpance při 280 nm.



Obrázek 5.8 Elektroforetická pohyblivost frakcí vykazujících vyšší absorbanci při 280 nm při iontové permeační chromatografii za použití kolony Superdex 200 16/600 GL (obr. 5.7, str. 38). 15% SDS-PAGE je barven CBBR250. Frakce v rámečku vyznačují vzorky obsahující čistý protein.

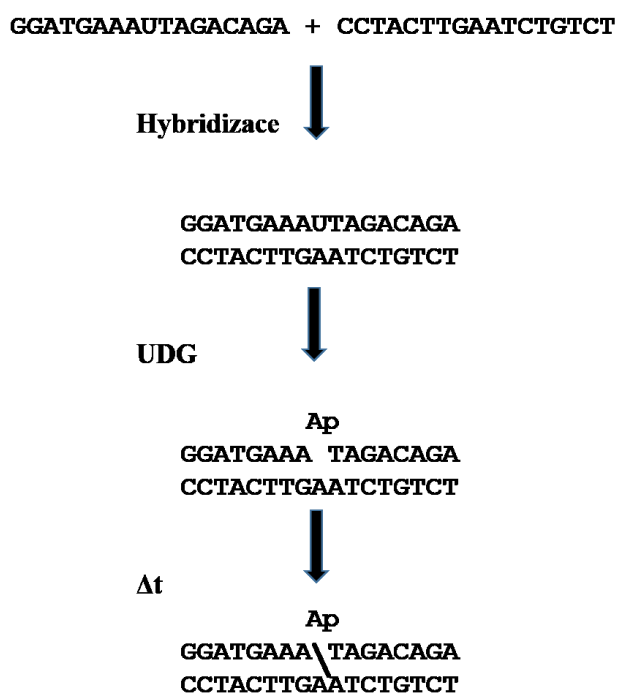
Správnost všech proteinů byla ověřena pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektroskopie provedené servisní skupinou UOCHB AV ČR. Komparativní gel na obr. 5.9 porovnává Mw konstruktů xNEIL3 FL a xNEIL3 264 stop. Navíc je zde separován zkrácený konstrukt se dvěma zinkovými prsty, se kterým je pracováno v příbuzném projektu nad rámec této diplomové práce.



Obrázek 5.9 Komparativní elektroforetická pohyblivost xNEIL3 WT FL, xNEIL3 zkráceného konstruktů obsahujícího 2 ZnF a xNEIL3 K60A 264st na 15% SDS-PAGE obarvena CBBR250.

5.3. Příprava ICL

Oligonukleotidy (sekvence viz tab. 3.8 str. 23) obdržené od firmy Sigma Aldrich v podobě sušiny byly resuspendovány v doporučeném objemu TE pufru na konečnou koncentraci 100 μ M. Oligonukleotidy byly hybridizovány smísením komplementárních sekvencí 1:1 v přítomnosti 500 M NaCl a zahřátím na 95°C pomocí blokového ohříváče SBH130D a pomalým ochlazením na laboratorní teplotu. Poté byla koncentrace NaCl upravena na 100 mM pro správné fungování UDG, které bylo přidáno a směs inkubována při 37°C 7 a více dní (kap. 4.4.1 str. 30), schéma tvorby ICL *in vitro* viz obr. 5.10.



Obrázek 5.10 Schéma tvorby ICL *in vitro*. Nejprve je ssDNA hybridizována, následně je přidána Uracil-DNA glykosylasa, která vyštěpí uracyl za vzniku abazického místa (Ap) a po časovém intervalu se spontánně tvoří kovalentní propojení komplementárních řetězců – ICL.

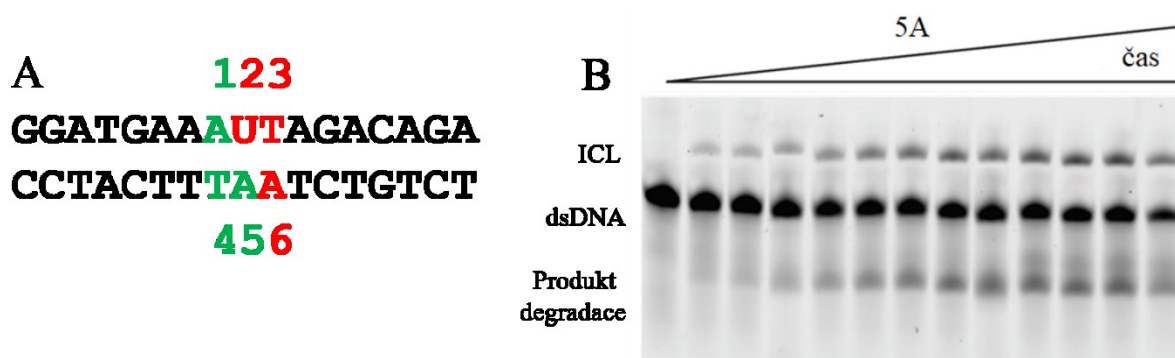
5.4. Izolace substrátu – ICL

Po 7 denní inkubaci byl značený vzorek separován na 15% polyakrylamidovém denaturujícím gelu a nejvyšší pruh byl vyříznut a eluován při 4°C v TE pufru (tab. 3.3 str. 21). Roztok obsahující eluát byl dialyzován a koncentrován za použití

Amicon®Ultra s celulosovou membránou propouštějící molekuly o velikosti do 3 kDa obdobně jako v kap. 4.3.5 str. 30 na 500 µl. Následně byl vzorek koncentrován pomocí Amicon®Ultra 3K-0,5 s maximálním objemem 500 µl na konečný objem přibližně 50 µl.

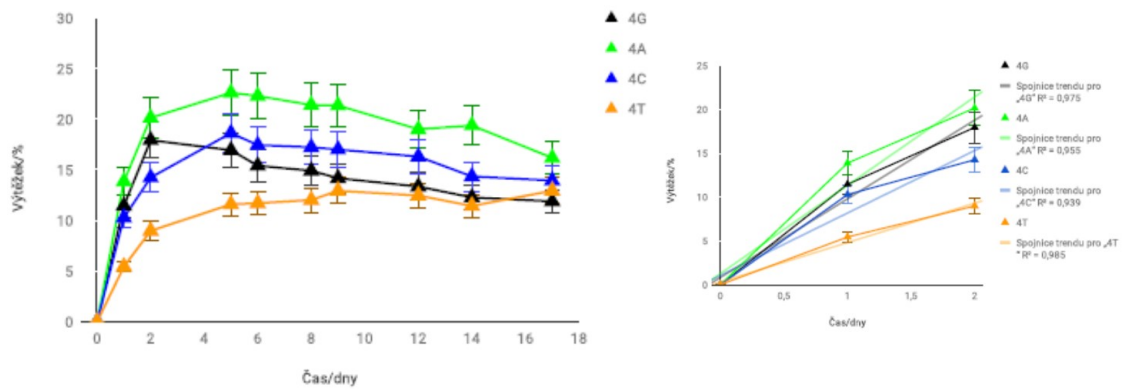
5.5. Optimalizace doby inkubace pro maximální výtěžek tvorby Ap-ICL a charakterizace funkční kinetiky vzniku a rozpadu Ap-ICL

Po dobu dvou týdnů bylo v jednodenních intervalech odebíráno 2 µl směsi hybridizovaných oligonukleotidů s 100 mM NaCl a UDG, kde probíhal spontánní vznik ICL. Pro zastavení reakce byl každý odebraný vzorek doplněn o formamid v poměru 1:9 a zamražen na -20°C. Jednotlivé vzorky byly elektroforeticky separovány na 15% denaturujícím polyakrylamidovém gelu. Výtěžek ICL byl kvantifikován pomocí programu GelAnalyzer a byl vytvořen graf závislostí tvorby ICL na čase v závislosti na použitých sekvencích, viz obr. 5.11, str. 43 a obr. 5.12, str. 44 a obr. 5.13, str. 45.

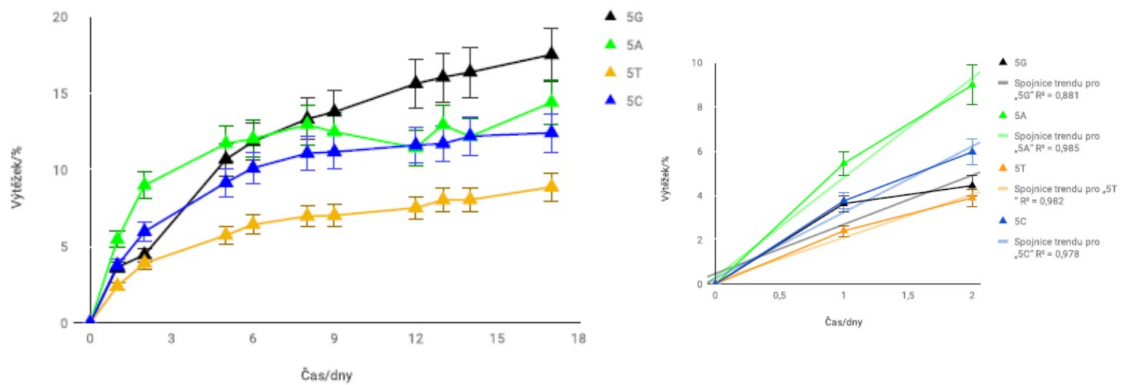


Obrázek 5.11 Charakterizace závislosti tvorby ICL na bázích nacházejících se v blízkosti kovalentního prokřížení řetězců. A) Schéma zobrazující použité sekvence s červeně vyznačenými fixními bázemi s jejich přiřazenými čísly, které se nemění, poněvadž se přímo účastní vzniku kovalentní vazby. Zeleně jsou vyznačeny variabilní báze, jejichž kombinace byly studovány. B) Příklad 15% denaturujícího polyakrylamidového gelu obsahujícího 7M močovinu jedné sekvence – 5A, 4T (adenin v pozici 5 a thymín v pozici 4) se separovanými vzorky zastavené reakce po různých časových intervalech 0 – 14 dní.

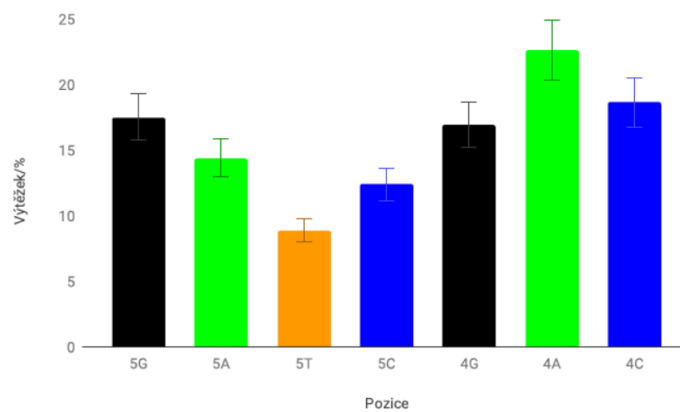
A



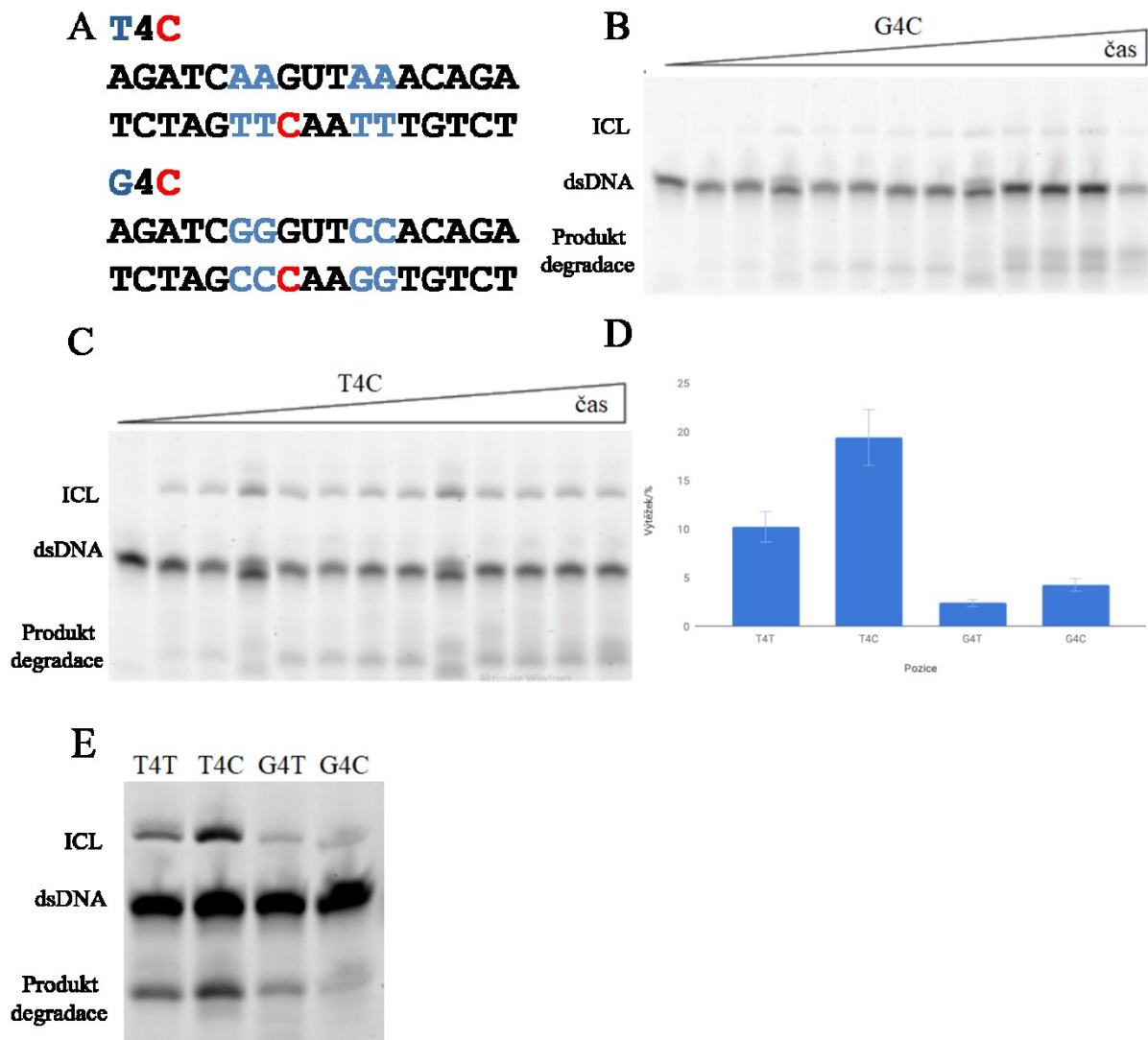
B



C



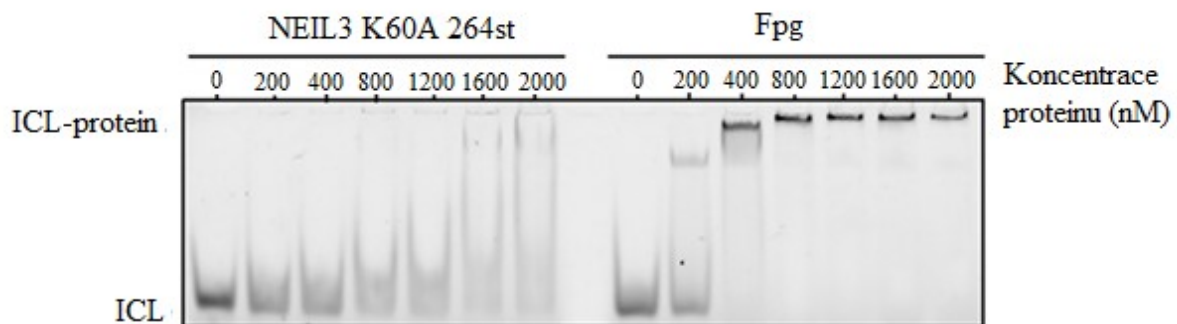
Obrázek 5.12 A) Graf závislosti výtěžku tvorby ICL na čase pro jednotlivé báze v pozici 4 v období 17 dní + graf s fitem křivky na počátku probíhající reakce. B) Graf závislosti výtěžku tvorby ICL na čase pro jednotlivé báze v pozici 5 v období 17 dní + graf s fitem křivky na počátku probíhající reakce. C) Graf srovnání maximálních výtěžků a rychlost tvorby Ap-ICL v závislosti na použité variabilní bázi.



Obrázek 5.13 Charakterizace závislosti tvorby ICL na sekvenci nacházejících se v blízkosti kovalentního prokřížení řetězců. A) Schéma zobrazující použité sekvence s modře vyznačenými bázemi představující AT/GC bohaté regiony. Červeně jsou vyznačeny variabilní báze – T/C doplňující AT/GC bohaté regiony. B) Příklad 15% denaturujícího polyakrylamidového gelu obsahujícího 7M močovinu sekvence G4C se separovanými vzorky zastavené reakce po různých časových intervalech 0 – 14 dní pro porovnání s C) kde se nachází sekvence T4C s výrazně vyššími výtěžky reakce viditelné pouhým okem. D) Graf srovnání maximálních výtěžků v závislosti na použité sekvenci, AT/GC bohatém regionu. E) 15% denaturující polyakrylamidový gel, kde jsou jednotlivé vzorky zastavené reakce po 5 dnech separované pro porovnání vedle sebe.

5.6. Interakce xNEIL3 K60A 264 stop a Fpg s ICL, dsDNA, ssDNA

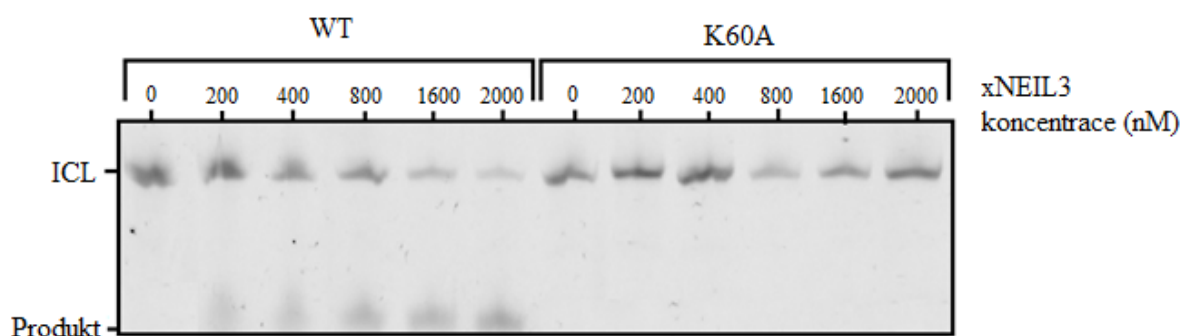
V následujícím experimentu byla sledována interakce enzymů Fpg a xNEIL3 K60A 264st s DNA obsahující Ap-ICL. V reakčním pufru (tab. 3.3 str. 22) byla izolovaná DNA obsahující Ap-ICL sekvence 5G titrována zvyšujícím se množstvím proteinů v individuálních mikrozkušavkách v rozsahu koncentrací 0 až 2000 nM. Vzorčky byly ponechány inkubovat 30 min při 37°C a následně separovány na 15% nativním polyakrylamidovém gelu ve vertikálním elektroforetickém uspořádání. Výsledná separace byla vizualizována pomocí fluorimetru Typhoon FLA-9500, obr. 5.14.



Obrázek 5.14 Separace reakce ICL s proteiny xNEIL3 K60A st a Fpg za konstantní koncentrace ICL - 2 μ M a titrace proteiny. Separováno na 15% nativním gelu a vizualizováno pomocí fluorimetru Typhoon FLA-9500.

5.7. Enzymové reakce opravy Ap-ICL

V reakci s Ap-ICL byly porovnávány enzymy xNEIL3 WT FL a katalyzicky neaktivní xNEIL3 K60A FL. Izolovaný 2 μ M značený ICL o sekvenci T4C byl titrován koncentracemi proteinů *in vitro* až do nejvyšší proteinové koncentrace 2000 nM v reakčním pufru (tab. 3.3 str. 22). Vzorčky byly ponechány inkubovat 30 min při 37°C a následně separovány na 15% nativním polyakrylamidovém gelu ve vertikálním elektroforetickém uspořádání. Výsledná separace byla vizualizována pomocí fluorimetru Typhoon FLA-9500, obr. 5.15.

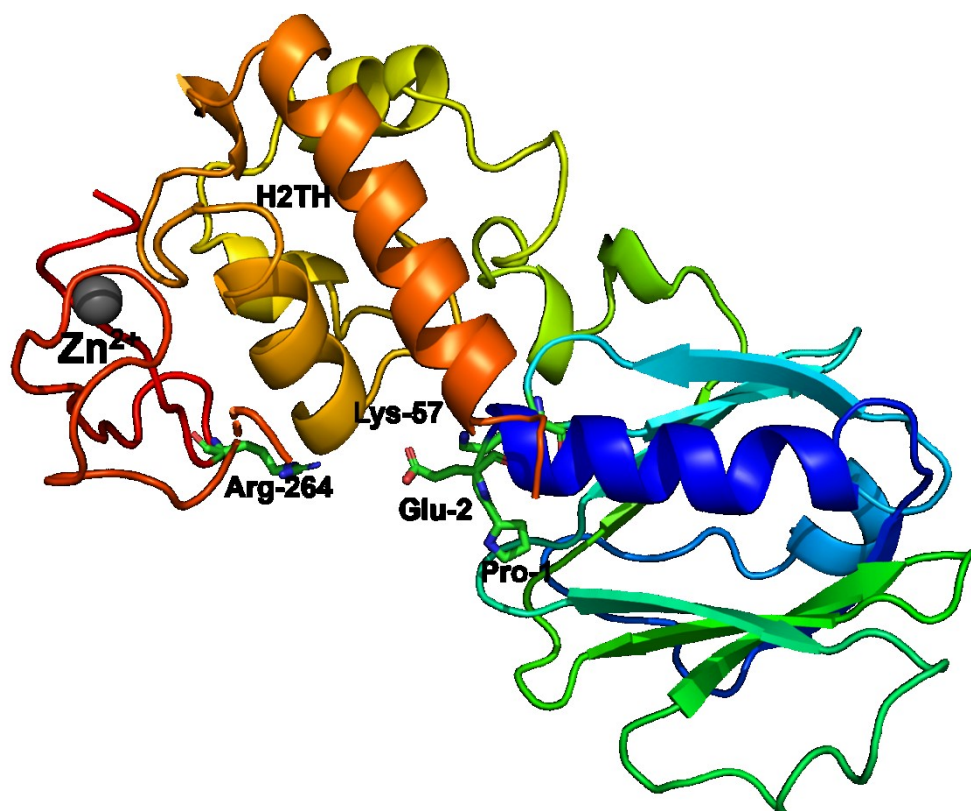


Obrázek 5.15 Separace reakce ICL s xNEIL3 K60A FL a WT FL za konstantní koncentrace ICL - $2\mu\text{M}$ a titrace proteiny. Separováno na 15% nativním gelu a vizualizováno pomocí fluorimetru Typhoon FLA-9500.

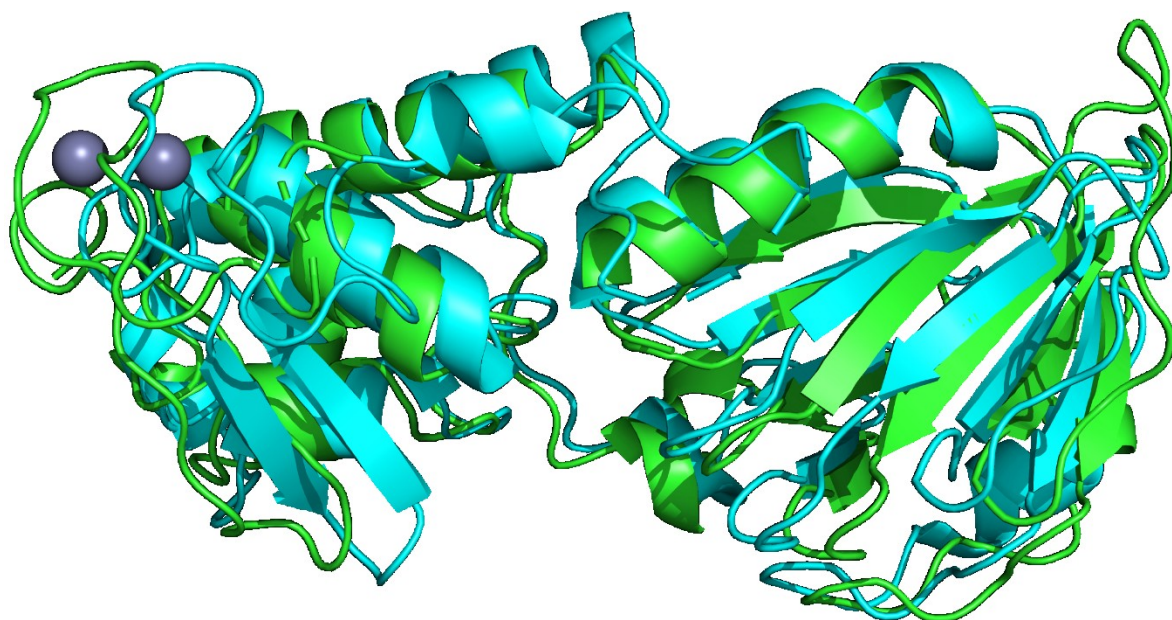
5.8. Krystalizace a krystalografie

5.8.1. Fpg

Krystalizace proteinu Fpg probíhala metodou difuzí par v uspořádání sedící kapky za použití komerčních krystalizačních roztoků (viz tab. 3.3, str. 23). Krystaly Fpg vyrostly za dva dny do velikosti přijatelné pro difrakční experiment, další růst s časem již pozorován nebyl. Krystalizační podmínka obsahovala 100 mM Bicin pH 8,5; 20% (w/v) PEG 6000 a finální pH podmínky bylo 9,0. Pro zamrazení byl vytvořen kryoprotektivní roztok o stejných podmínkách jako roztok krystalizační obsahující navíc 20% glycerol. Difrakční experiment byl proveden na synchrotronu v Helmholtz centru v Berlíně. Difrakční data byla zpracovávána pomocí programu XDS, Phenix a Coot. Fázový problém byl vyřešen pomocí metody molekulárního nahrazení, model 2F5Q⁵², pomocí Phaser v programu Phenix a následné zobrazení map elektronových hustot a zlepšení modelu bylo provedeno v programu Coot. Vytvořený strukturní model s vyznačenými aminokyselinovými zbytky aktivního místa je prezentován na obr. 5.16. Obr. 5.17 ukazuje strukturní srovnání vytvořeného modelu se známou strukturou Fpg z *E. coli*.



Obrázek 5.16 *Strukturní model Fpg modelovaný v programu Coot a upravený v programu PyMol s vyznačenými aminokyselinovými zbytky aktivního místa a DNA vazebnými motivy.*



Obrázek 5.17 *Model strukturního srovnání Fpg z Neisserie meningitidis (zeleně) s Fpg z E. coli (pdb kód=1k82, modře) krystalizované v sevřené konformaci s DNA, vytvořený v programu PyMol.*

Tabulka 5.1 Statistika sběru dat a vyhodnocení modelu struktury Fpg z *Neisseria meningitidis*

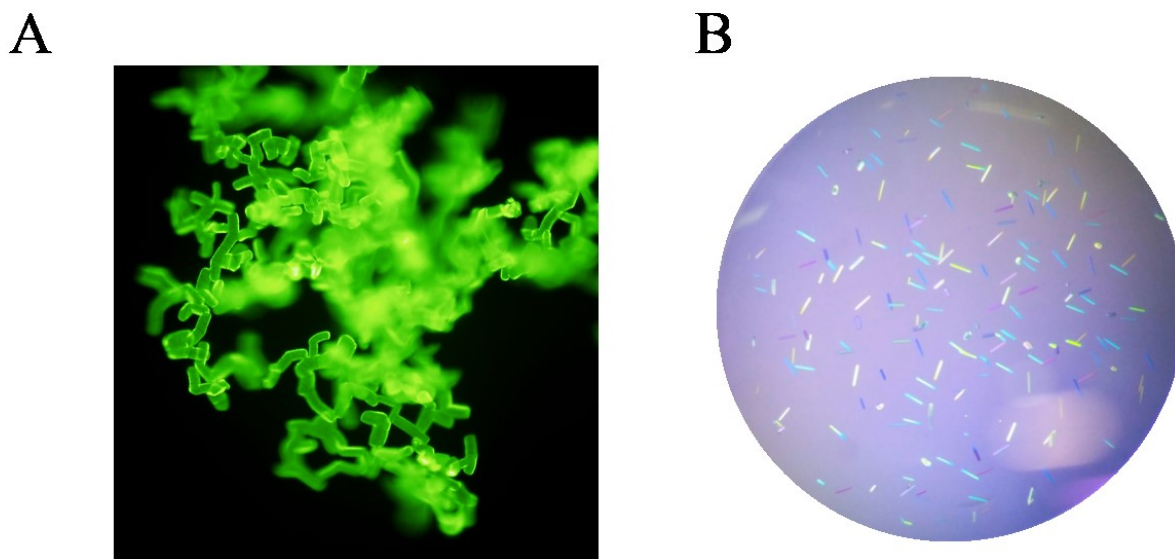
Vlnová délka záření	0,9184	Počet nevodíkových atomů	3971
Rozpětí rozlišení (Å)	42,431 – 2,850 (2,952 – 2,850)*	Makromolekuly	3969
Prostorový grupa	P 1 2 1	Ligandy	2
Rozměry elementární buňky	a=66,3784Å b=37,9596Å c=110,303Å $\alpha=\gamma=90$ $\beta=89,9699$	Vody	0
Celkový počet reflexí	375339 (36903)*	Počet zbytků proteinu	548
Počet jedinečných reflexí	12736 (1162)*	RMS (vazby)	0,010
Multiplicita	29,5 (29,5)*	RMS (úhly)	1,293
Kompletnost	89,76 (90,08)*	Ramachandran („outliers/favored“)	0/95,53
I/sigma	9,23 (1,05)*	Kolizní skóre	18,15
„R-merge“	1,03 (4,252)*	Průměrný B-faktor	59,52
„R-work“	0,2230 (0,3532)*	Makromolekuly	59,51
„R-free“	0,2968 (0,4100)*	Ligandy	82,49

*V závorce jsou uvedeny hodnoty pro slupku s nejvyšším rozlišením

5.8.2. Krystalizace Ap-ICL DNA

Příprava a izolace substrátu pro krystalizaci byla popsána v mé bakalářské práci. Krystalizace izolovaného ICL probíhala metodou difuzí par v uspořádání sedící kapky za použití komerčních krystalizačních roztoků sady HELIX a následně byly podmínky optimalizovány. Ověření přítomnosti DNA v krystalech bylo provedeno ponecháním v roztoku se SYBR Gold, fluorescenční barvou která se vmezeřuje do řetězce DNA. Pomocí fluorescenčního mikroskopu byl vytvořen snímek dokazující přítomnost DNA

v krystalech, viz obr. 5.18. Difrakční experiment byl proveden na domácím zdroji a nejlepší rozlišení bylo 15 Å. Přesto optimalizaci podmínek i délky sekvence studované molekuly nebylo dosaženo dostatečné kvality krystalů pro sběr dat.



Obrázek 5.18 A) *Krystaly DNA obarvené SYBR Gold a vizualizované pomocí UV mikroskopu, zvětšení 10x.* B) *Krystaly DNA zobrazené mikroskopem s použitím polarizačního světla.*

6. Diskuse

Ap-ICL, běžné poškození vznikající spontánně v molekule DNA v přítomnosti neopravného Ap místa. Četnost tohoto poškození jako i závislost jeho vzniku na okolní sekvenci je neznámá, ale je velmi biologicky relevantní z důvodu variability genomové DNA. Z toho důvodu jsme navrhli několik sekvencí oligonukleotidů délky 17 nt s variabilními bázemi poblíž vznikajícího poškození a s AT/GC bohatou sekvencí, pro zjištění sekvencí specifity umožňující vytvoření tohoto málo prozkoumaného poškození DNA. Experimenty byly navrženy tak, aby v minimálním počtu sekvencí rámcově pokryly většinu možných biofyzikálně odlišných variant. Dalším krokem pro zajištění biologické relevance je prodloužení oligonukleotidů a ta bude zkoumána nad rámec této diplomové práce.

Při testování závislosti na AT nebo GC bohaté sekvenci byla zjištěna závislost vzniku kovalentního prokřížení komplementárních řetězců, kde množství vznikajícího ICL výrazně převyšovalo ve volnějším uspořádání AT bohaté sekvence. Závislost množství

vznikajícího poškození na malých změnách sekvence v těsné blízkosti a to v oblasti jednoho nukleotidu od nepřírozené N-glykosidové vazby je nižší. Nicméně stejně pozorujeme určitý trend, ze kterého lze usoudit nejvyšší specifitu vzniku poškození v AT bohaté sekvenci a v přítomnosti adeninu v pozici 5 a cytosinu v pozici 4, z toho v blízkosti poškození vysoce převyšují purinové báze na řetězci s Ap místem, viz obrázek 6.1 s ideální sekvencí.

123
AGATCAAGUTAAACAGA
TCTAGTTCAATTTGTCT
456

Obrázek 6.1 Sekvence oligonukleotidu s největším výtěžkem Ap-ICL s číselně vyznačenými pozicemi testovanými na vliv na rychlost tvorby a výtěžek Ap-ICL.

Připravili jsme protein Fpg z organismu *Neisseria meningitidis* v bakteriálním expresním systému *E. coli* v dostatečném množství a čistotě pro krystalizaci. Měření difrakce poskytlo rozlišení 2,9 Å. Rozlišení je poměrně nízké, stavba modelu tak byla obtížnější. Na základě strukturního srovnání se známými homology Fpg lze říci, že náš strukturní model je poměrně přesný, avšak zaujímá sevřenější formaci než-li např. Fpg z *E. coli*, jejichž strukturní srovnání je uvedeno výše (kap. 5.8.1).

V další části práce jsme se zabývali interakcí přečištěného poškození dsDNA ICL s Fpg a různými konstrukty xNEIL3. Přírozený substrát pro Fpg je poškození vznikající působením oxidačních činidel nebo Ap místo. Avšak bylo zjištěno, že s velkou afinitou váže i dsDNA ICL, jehož struktura dosud není vyřešena. S ohledem na toto zjištění se chceme v budoucnu soustředit také na krystalizaci Ap-ICL v komplexu s Fpg, jehož strukturní model prezentujeme výše (kap 5.8.1). Ke krystalizaci samotné DNA obsahující Ap-ICL byly využity substráty, jejichž příprava a izolace byla popsána v mé bakalářské práci a bylo dosaženo nejvyššího rozlišení 15 Å. Přírozený substrát pro NEIL3 je neznámý. DsDNA není pravděpodobně přírodním substrátem pro NEIL3, při strukturním srovnání mNEIL3 s Fpg v modelu s DNA bylo ukázáno, že jedna ze

smyček do dsDNA zasahuje a pravděpodobně by bránila ve vazbě takového substrátu. Předpokládá se jeho potenciál vázat a opravovat především ssDNA nebo rozpletené dvoušroubovice spojené Ap-ICL. Tomu nasvědčuje i přítomnost motivů čtyř zinkových prstů. Dva z nich jsou podle publikací zodpovědné za vazbu ssDNA a jeden (NZF motiv) za aktivaci NEIL3 opravné dráhy. Náš zkrácený konstrukt obsahuje pouze jeden zinkový motiv typický pro Fpg/Nei rodinu. Podle našich experimentů takto zkrácený konstrukt NEIL3 váže dsDNA ICL, i když s nižší afinitou než-li Fpg. Přirozený substrát pro NEIL3 glykosylasu se předpokládá DNA v uspořádání podobnému replikační vidličce, kde NZF motiv přivolá NEIL3 k poškození, ssDNA vazebné motivy stabilizují intermediát a Fpg/Nei zinkový motiv se bude účastnit opravy v aktivním místě proteinu.

Esejí porovnávající aktivitu xNEIL3 FL WT a xNEIL3 FL K60A byla ověřena nezbytnost lysinu v pozici 60 pro katalýzu substrátu. Ukázalo se, že C-terminální histidinová kotva na vazbu na substrát nemá vliv a NEIL3 WT FL je na rozdíl od mutantní varianty schopen štěpit Ap-ICL na produkt.

7. Závěr

- Na základě sekvenční homologie s NEIL3 a enzymů Fpg/Nei rodiny byl navržen konstrukt xNEIL3 glykosylasy a spolu s konstrukty plné délky a homologním proteinem Fpg byly za pomoci bakteriální exprese vyprodukované jednotlivé enzymy, které byly následně izolovány za využití afinitní chromatografie nebo iontově výměnné chromatografie a následné gelové chromatografie. Jejich správnost byla ověřena pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektroskopie.
- Byla zjištěna závislost vzniku poškození DNA zvané Ap-ICL na lokální sekvenci DNA. Nejvyšší výtěžky daného poškození vykazuje sekvence bohatá na AT. Vznik Ap-ICL je relativně pomalý proces a jeho vznik byl sledován v rámci hodin a dní od vzniku Ap.
- Při porovnání vaznosti xNEIL3 a Fpg na Ap-ICL bylo zjištěno, že dsDNA pravděpodobně není vhodný substrát pro NEIL3. Toto tvrzení je podpořeno vytvořením modelu mNEIL3 s Fpg v komplexu s DNA.
- Fpg bylo následně krystalizováno a řešena jeho struktura metodou molekulárního nahrazení.
- Ap-ICL je opravovaného pomocí NEIL3 opravné dráhy, avšak byla dokázána vaznost tohoto poškození i homologním Fpg. V aktivním místě NEIL3 v pozici 60 se nachází lysin. Ukázali jsme, že mutantní varianta NEIL3 K60A není schopna opravovat námi navržený DNA substrát.

8. Reference

- [1] Zietlow, L. R. (2011) *The Role of A-family DNA Polymerases in DNA Interstrand Cross-link Repair*, Proquest, Umi Dissertation Publishing.
- [2] McCulloch, S. D., and Kunkel, T. A. (2008) The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases, *Cell Res. 18*, 148-161.
- [3] Lindahl, T., and Nyberg, B. (1972) Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid, *Biochemistry 11*, 3610-&.
- [4] Lindahl, T., and Nyberg, B. (1974) HEAT-INDUCED DEAMINATION OF CYTOSINE RESIDUES IN DEOXYRIBONUCLEIC-ACID, *Biochemistry 13*, 3405-3410.
- [5] Lindahl, T., Karran, P., and Wood, R. D. (1997) DNA excision repair pathways, *Curr. Opin. Genet. Dev. 7*, 158-169.
- [6] Murray, R. K. (2003) *Harper's illustrated biochemistry*, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York.
- [7] Alberts, B. (2007) *Molecular biology of the cell*, Garland Science, New York.
- [8] Iyama, T., and Wilson, D. M. (2013) DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells, *DNA Repair 12*, 620-636.
- [9] Raschle, M., Knipsheer, P., Enoiu, M., Angelov, T., Sun, J. C., Griffith, J. D., Ellenberger, T. E., Scharer, O. D., and Walter, J. C. (2008) Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair, *Cell 134*, 969-980.
- [10] Chvalova, K., Brabec, V., and Kasparkova, J. (2007) Mechanism of the formation of DNA-protein cross-links by antitumor cisplatin, *Nucleic Acids Res. 35*, 1812-1821.
- [11] Deans, A. J., and West, S. C. (2009) FANCM Connects the Genome Instability Disorders Bloom's Syndrome and Fanconi Anemia, *Mol. Cell 36*, 943-953.
- [12] Duxin, J. P., and Walter, J. C. (2015) What is the DNA repair defect underlying Fanconi anemia?, *Curr. Opin. Cell Biol. 37*, 49-60.
- [13] Fishel, M. L., Delaney, S. M., Friesen, L. D., Hansen, R. J., Zuhowski, E. G., Moschel, R. C., Egorin, M. J., and Dolan, M. E. (2003) Enhancement of platinum-induced cytotoxicity by O-6-Benzylguanine, *Mol. Cancer Ther. 2*, 633-640.
- [14] Johnson, S. W., Swiggard, P. A., Handel, L. M., Brennan, J. M., Godwin, A. K., Ozols, R. F., and Hamilton, T. C. (1994) Relationship between platinum-DNA adduct formation and removal and cisplatin cytotoxicity in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human ovarian-cancer cells, *Cancer Res. 54*, 5911-5916.
- [15] Price, N. E., Johnson, K. M., Wang, J., Fekry, M. I., Wang, Y. S., and Gates, K. S. (2014) Interstrand DNA-DNA Cross-Link Formation Between Adenine Residues and Abasic Sites in Duplex DNA, *J. Am. Chem. Soc. 136*, 3483-3490.
- [16] Sun, G. H., Zhao, L. J., and Zhong, R. G. (2016) The Induction and Repair of DNA Interstrand Crosslinks and Implications in Cancer Chemotherapy, *Anti-Cancer Agents Med. Chem. 16*, 221-246.
- [17] Nakamura, J., and Swenberg, J. A. (1999) Endogenous apurinic apyrimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues, *Cancer Res. 59*, 2522-2526.

- [18] Sczepanski, J. T., Jacobs, A. C., Majumdar, A., and Greenberg, M. M. (2009) Scope and Mechanism of Interstrand Cross-Link Formation by the C4 '-Oxidized Abasic Site, *J. Am. Chem. Soc.* *131*, 11132-11139.
- [19] Johnson, K. M., Price, N. E., Wang, J., Fekry, M. I., Dutta, S., Seiner, D. R., Wang, Y. S., and Gates, K. S. (2013) On the Formation and Properties of Interstrand DNA-DNA Cross-Links Forged by Reaction of an Abasic Site with the Opposing Guanine Residue of 5 '-Cap Sequences in Duplex DNA, *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 1015-1025.
- [20] Gilboa, R., Zharkov, D. O., Golan, G., Fernandes, A. S., Gerchman, S. E., Matz, E., Kycia, J. H., Grollman, A. P., and Shoham, G. (2002) Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA, *J. Biol. Chem.* *277*, 19811-19816.
- [21] Ide, H. (2001) DNA substrates containing defined oxidative base lesions and their application to study substrate specificities of base excision repair enzymes, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 68 68*, 207-221.
- [22] Pichierri, P., and Rosselli, F. (2004) The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways, *Embo J.* *23*, 1178-1187.
- [23] Semlow, D. R., Zhang, J. Q., Budzowska, M., Drohat, A. C., and Walter, J. C. (2016) Replication-Dependent Unhooking of DNA Interstrand Cross-Links by the NEIL3 Glycosylase, *Cell* *167*, 498-+.
- [24] Barnes, D. E., and Lindahl, T. (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells, *Annu. Rev. Genet.* *38*, 445-476.
- [25] Zhang, J. Q., and Walter, J. C. (2014) Mechanism and regulation of incisions during DNA interstrand cross-link repair, *DNA Repair* *19*, 135-142.
- [26] Long, D. T., Joukov, V., Budzowska, M., and Walter, J. C. (2014) BRCA1 Promotes Unloading of the CMG Helicase from a Stalled DNA Replication Fork, *Mol. Cell* *56*, 174-185.
- [27] Hoffmann, S., Smedegaard, S., Nakamura, K., Mortuza, G. B., Raschle, M., de Opakua, A. I., Oka, Y., Feng, Y., Blanco, F. J., Mann, M., Montoya, G., Groth, A., Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2016) TRAIIP is a PCNA-binding ubiquitin ligase that protects genome stability after replication stress, *J. Cell Biol.* *212*, 63-75.
- [28] Harley, M. E., Murina, O., Leitch, A., Higgs, M. R., Bicknell, L. S., Yigit, G., Blackford, A. N., Zlatanou, A., Mackenzie, K. J., Reddy, K., Halachev, M., McGlasson, S., Reijns, M. A. M., Fluteau, A., Martin, C. A., Sabbioneda, S., Elcioglu, N. H., Altmuller, J., Thiele, H., Greenhalgh, L., Chessa, L., Maghnie, M., Salim, M., Bober, M. B., Nurnberg, P., Jackson, S. P., Hurles, M. E., Wollnik, B., Stewart, G. S., and Jackson, A. P. (2016) TRAIIP promotes DNA damage response during genome replication and is mutated in primordial dwarfism, *Nature Genet.* *48*, 36-+.
- [29] Prakash, A., Doublet, S., and Wallace, S. S. (2012) The Fpg/Nei Family of DNA Glycosylases: Substrates, Structures, and Search for Damage, In *Mechanisms of DNA Repair* (Doetsch, P. W., Ed.), pp 71-91, Elsevier Academic Press Inc, San Diego.

- [30] Fromme, J. C., and Verdine, G. L. (2003) DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM, *J. Biol. Chem.* 278, 51543-51548.
- [31] Rabow, L. E., and Kow, Y. W. (1997) Mechanism of action of base release by *Escherichia coli* Fpg protein: Role of lysine 155 in catalysis, *Biochemistry* 36, 5084-5096.
- [32] Akkari, Y. M. N., Bateman, R. L., Reifsteck, C. A., Olson, S. B., and Grompe, M. (2000) DNA replication is required to elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links, *Mol. Cell. Biol.* 20, 8283-8289.
- [33] Martin, P. R., Couve, S., Zutterling, C., Albelazi, M. S., Groisman, R., Matkarimov, B. T., Parsons, J. L., Elder, R. H., and Saparbaev, M. K. (2017) The Human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL3 Excise Psoralen-Induced DNA-DNA Cross-Links in a Four-Stranded DNA Structure, *Sci Rep* 7, 13.
- [34] Takao, M., Oohata, Y., Kitadokoro, K., Kobayashi, K., Iwai, S., Yasui, A., Yonei, S., and Zhang, Q. M. (2009) Human Nei-like protein NEIL3 has AP lyase activity specific for single-stranded DNA and confers oxidative stress resistance in *Escherichia coli* mutant, *Genes Cells* 14, 261-270.
- [35] Krokeide, S. Z., Laerdahl, J. K., Salah, M., Luna, L., Cederkvist, F. H., Fleming, A. M., Burrows, C. J., Dalhus, B., and Bjoras, M. (2013) Human NEIL3 is mainly a monofunctional DNA glycosylase removing spiroimindiohydantoin and guanidinohydantoin, *DNA Repair* 12, 1159-1164.
- [36] Price, N. E., Catalano, M. J., Liu, S., Wang, Y. S., and Gates, K. S. (2015) Chemical and structural characterization of interstrand cross-links formed between abasic sites and adenine residues in duplex DNA, *Nucleic Acids Res.* 43, 3434-3441.
- [37] Narayana, N., and Weiss, M. A. (2009) Crystallographic Analysis of a Sex-Specific Enhancer Element: Sequence-Dependent DNA Structure, Hydration, and Dynamics, *J. Mol. Biol.* 385, 469-490.
- [38] Coste, F., Malinge, J. M., Serre, L., Shepard, W., Roth, M., Leng, M., and Zelwer, C. (1999) Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 angstrom resolution: hydration at the platinated site, *Nucleic Acids Res.* 27, 1837-1846.
- [39] Michel, M. A., Elliott, P. R., Swatek, K. N., Simicek, M., Pruneda, J. N., Wagstaff, J. L., Freund, S. M. V., and Komander, D. (2015) Assembly and Specific Recognition of K29-and K33-Linked Polyubiquitin, *Mol. Cell* 58, 95-109.
- [40] Alam, S. L., Sun, J., Payne, M., Welch, B. D., Blake, B. K., Davis, D. R., Meyer, H. H., Emr, S. D., and Sundquist, W. I. (2004) Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers, *Embo J.* 23, 1411-1421.
- [41] Wang, B., Alam, S. L., Meyer, H. H., Payne, M., Stemmler, T. L., Davis, D. R., and Sundquist, W. I. (2003) Structure and ubiquitin interactions of the conserved zinc finger domain of Npl4, *J. Biol. Chem.* 278, 20225-20234.
- [42] Wu, R. A., Semlow, D. R., Kamimae-Lanning, A. N., Kochenova, O. V., Chistol, G., Hodskinson, M. R., Amunugama, R., Sparks, J. L., Wang, M., Deng, L., Mimoso, C. A., Low, E., Patel, K. J., and Walter, J. C. (2019) TRAIIP is a master regulator of DNA interstrand crosslink repair, *Nature* 567, 267-+.
- [43] Wallace, B. D., Berman, Z., Mueller, G. A., Lin, Y. F., Chang, T., Andres, S. N., Wojtaszek, J. L., DeRose, E. F., Appel, C. D., London, R. E., Yan, S., and

- Williams, R. S. (2017) APE2 Zf-GRF facilitates 3'-5' resection of DNA damage following oxidative stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 304-309.
- [44] Liu, M. M., Imamura, K., Averill, A. M., Wallace, S. S., and Doublet, S. (2013) Structural Characterization of a Mouse Ortholog of Human NEIL3 with a Marked Preference for Single-Stranded DNA, *Structure* *21*, 247-256.
- [45] QIAGEN. QIAquick® Spin Handbook, QIAquick Spin Handbook.
- [46] Scientific, T. Product Information T4 DNA Ligase, Thermo Scientific.
- [47] Qiagen. QIAprep® Miniprep Handbook.
- [48] Kabsch, W. (2010) XDS, *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* *66*, 125-132.
- [49] Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* *66*, 213-221.
- [50] Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot, *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* *66*, 486-501.
- [51] Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (1998) Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path, *Protein Eng.* *11*, 739-747.
- [52] Banerjee, A., Santos, W. L., and Verdine, G. L. (2006) Structure of a DNA glycosylase searching for lesions, *Science* *311*, 1153-1157.

