

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Biologie  
Buněčná a vývojová biologie



**Lenka Stolařová**

**Funkční analýza populačně specifických sekvenčních variant genu  
pro kinázu kontrolního bodu buněčného cyklu *CHEK2***

**Functional analysis of the population-specific checkpoint kinase  
gene *CHEK2* sequence variants**

Diplomová práce

Školitel: Doc. MUDr. Zdeněk Kleibl, PhD.

Praha, 2015

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

Praha 2015

Lenka Stolařová

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Doc. MUDr. Zdeňku Kleiblovi, PhD. za trpělivost, odborné vedení a cenné rady. Také bych chtěla poděkovat MUDr. Petře Kleiblové, PhD a Mgr. Petře Boudové za odbornou pomoc. V neposlední řadě poděkování taktéž patří mým přátelům za jejich podporu.

## Abstrakt

Gen *CHEK2* kóduje serin/threoninovou kinázu Chk2 (Checkpoint kinase 2) aktivovanou v reakci na poškození genomové DNA. Aktivovaná Chk2 kináza dále fosforyluje své substráty (proteiny Cdc25C, BRCA1 nebo p53), a jejich aktivace pak vede k pozastavení buněčného cyklu, reparaci DNA, nebo indukci apoptózy. Vrozené mutace genu *CHEK2* zvyšují riziko nádorových onemocnění (především karcinomu prsu a kolorekta). Analýza vysoce rizikových pacientek s karcinomem prsu v ČR prokázala přítomnost vzácných (především missense) mutací *CHEK2* s nejasným klinickým významem.

Tato práce se zabývá studiem funkčního vlivu těchto variant *in vitro* a stanovením kinázové funkce variantních izoforem kinázy Chk2. Za tímto účelem byly zkonstruovány plazmidy exprimující studované varianty v bakteriálních buňkách *E. coli*. Enzymová aktivita izoforem Chk2 kinázy byla v bakteriálním lyzátu stanovena spektrofotometricky na základě fosforylace arteficiálního substrátu Chk2. Kinázová aktivita bylo korelována s výsledky predikčních programů (SIFT, Polyphen 2, Align GVGD, CADD skóre) hodnotících funkční význam studovaných variant *in silico*.

Z výsledků vyplývá, že z 15 missense mutací (a jedné delece neporušující čtecí rámec) vedou ke ztrátě kinázové aktivity všechny varianty v kinázové doméně Chk2 (p.D265\_H282del, G306A, Y424H; R474H, T476M), které jsou rovněž většinou predikčních algoritmů identifikované jako patogenní mutace. Takto je rovněž hodnocena varianta FHA domény p.R145Q. U dvou variant (p.I157T a R181H) se shoduje nalezený malý vliv na kinázovou funkci s benigní predikcí v *in silico* predikcích. Zatímco v případě varianty R181H tento výsledek odpovídá výsledkům mutačních analýz v rizikových populacích, varianta I157T je považována za patogenní mutaci zvyšující u nosičů riziko vzniku karcinomu prsu a kolorekta přibližně na dvojnásobek. Význam ostatních studovaných missense mutací není konkluzivní a bude vyžadovat další studium.

Výsledky naznačují, že funkční hodnocení kinázové aktivity variant *CHEK2* kinázy *in vitro* je pravděpodobně vhodné zejména pro stanovení významu variant postihujících kinázovou doménu Chk2, čímž může významně přispět k identifikaci potenciálně klinicky významných dědičných variant genu *CHEK2*.

**Klíčová slova:** *CHEK2*, kinázová aktivita, dědičné mutace, funkční analýza *in vitro*

## Abstract

*CHEK2* gene codes for serin/threonine kinase Chk2 (Checkpoint kinase 2). In response to genomic DNA damage, Chk2 phosphorylates its substrates (proteins Cdc25C, BRCA1 or p53), whose activation leads either to cell cycle arrest, DNA damage repair or induction of apoptosis. Germline mutations in *CHEK2* gene increase risk of cancer development (especially breast or colon cancer). Analysis of high risk breast cancer patients in Czech Republic reveals rare *CHEK2* mutations (mainly missense) with yet unknown clinical significance.

This work focuses on functional impact of these variants and analysis of kinase activity of variant isoforms of Chk2 kinase. For this purpose, recombinant constructs were expressed in bacterial cells of *E. coli*. Enzymatic activity of Chk2 kinase isoforms in crude cell lysates was measured by the phosphorylation of Chk2 arteficial substrate spectrophotometrically. Results of *in vitro* kinase assay were correlated to the results of *in silico* prediction using SIFT, Polyphen 2, Align GVGD, CADD score software.

The results show that from 15 analyzed mutations (together with one in frame deletion), kinase activity was abrogated in all variants affecting the kinase domain of Chk2 (p.D265\_H282del, G306A, Y424H; R474H, T476M), in concordance with *in silico* predictions. The same result has been found for a FHA domain variant p.R145Q. No significant changes in kinase activity were observed in case of two FHA domain variants (p.I157T a R181H) which coresponded to benign *in silico* prediction. While R181H results are in agreement with results of mutational analysis in risk populations, I157T has been considered to be a pathogenic variant that increase risk of the breast and colon cancer development. The results in other studied variants remained inconclusive and will require additional analysis to establish their significance.

The results indicate that functional analysis of variant *CHEK2* kinase activity *in vitro* is the most appropriate for analysis of variants in Chk2 kinase domain in which it may help to identify clinically significant hereditary *CHEK2* gene variants.

**Key words:** *CHEK2*, kinase activity, hereditary mutations, functional analysis *in vitro*

## Obsah

Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
Obsah.....	6
Seznam zkratk .....	8
1 Úvod.....	10
2 Přehled literatury .....	10
2.1 Buněčný cyklus a integrita genomu.....	10
2.2 Struktura genu <i>CHEK2</i> a kinázy Chk2.....	13
2.2.1 Doménová struktura proteinu Chk2 .....	13
2.2.2 Regulace aktivity Chk2 kinázy .....	16
2.3 Interakční partneři.....	18
2.4 Mutace <i>CHEK2</i> a nádorová onemocnění .....	21
3 Cíle práce.....	23
4 Metody .....	24
4.1 Použité roztoky a chemikálie.....	24
4.2 Koncepce analýzy kinázové aktivity mutantních variant Chk2 <i>in vitro</i> .....	24
4.3 Seznam studovaných variant <i>CHEK2</i> .....	25
4.4 Příprava variantních sekvencí genu <i>CHEK2</i> .....	26
4.4.1 Genetický materiál .....	26
4.4.2 Site-directed mutageneze .....	27
4.4.3 PCR splicing.....	30
4.4.4 Sekvence.....	34
4.5 Příprava chemicky kompetentních buněk <i>E.coli</i> .....	35
4.6 Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> TOP10, <i>E. coli</i> BL21gold.....	35
4.7 PCR na bakteriích.....	36
4.8 Indukce exprese proteinu v buňkách <i>E.coli</i> BL21gold.....	37

4.8.1	Optimalizace indukce exprese proteinů .....	37
4.8.2	Indukce exprese proteinů pomocí IPTG.....	37
4.9	Optimalizace lýzy buněk .....	38
4.10	Proteinová elektroforéza SDS-PAGE, western-blotting a imunodetekce.....	39
4.11	Funkční analýza kinázové aktivity.....	40
4.12	<i>In silico</i> predikce.....	42
5	Výsledky.....	44
5.1	Konstrukce plazmidů s variantními sekvencemi <i>CHEK2</i> .....	44
5.1.1	Příprava varianty 1100delC <i>CHEK2</i> a missense variant.....	44
5.1.2	Příprava varianty c.846 + 4_7del <i>CHEK2</i> .....	45
5.2	Transformace buněk <i>E.coli</i> .....	47
5.3	Exprese proteinů .....	48
5.3.1	Optimalizace indukce exprese proteinů .....	48
5.4	Stanovení kinázové aktivity.....	51
5.4.1	Optimalizace vstupního množství enzymu .....	51
5.4.2	Měření kinázové aktivity variantních proteinů Chk2.....	52
5.5	Predikce <i>in silico</i> .....	56
6	Diskuze.....	61
7	Seznam použité literatury .....	67

## Seznam zkratek

53BP1	- p53 binding protein 1
ADP/ATP	- Adenosine diphosphate/ adenosine triphosphate
ATM	- Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	- Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein
BRCA1/2	- Breast Cancer gene 1/2
Cdc25A/C	- Cell Division Cycle 25A/C
Cdk	- Cyclin-Dependent Kinase (cyklin-dependentní kináza)
DSB	- Double strand break (dvouřetězcový zlom)
DNA	- Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
EDTA	- Ethylenediaminetetraacetic acid (ethylendiamintetraoctová kyselina)
FHA	- forkhead-associated (doména)
<i>CHEK1/2</i>	- Checkpoint kinase 1/2; gen
Chk1/2	- Checkpoint kinase 1/2; protein
IPTG	- Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
LB	- Luria Broth
Mdm2	- Mouse Double Minute 2
NHEJ	- Non-homologous end joining
p53	- Tumor Protein P53; protein
PBS	- Phosphate-buffered saline
PCR	- Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
PIRH2	- P53-Induced Protein with a RING-H2 Domain; gen <i>RCHY1</i>
Plk3	- Polo-Like Kinase 3
PML	- Promyelocytic Leukemia
<i>PPM1D</i>	- Protein Phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> Dependent, 1D; gen



PTEN	- Phosphatase and Tensin Homolog
SCD	- SQ/TQ cluster domain
SDS	- Sodium dodecyl sulfate (dodecylsírán sodný)
TBE	- Tris/Borate/EDTA
<i>TP53</i>	- Tumor Protein P53; gen
Wip1	- Wild-Type P53-Induced Phosphatase 1; protein
WT	- Wild-type (divoká varianta)

## 1 Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním u žen v České republice. Vyskytuje se nejčastěji v podobě sporadického onemocnění, vzácně (v přibližně 5-10% případů) však v podobě onemocnění dědičného. Hlavními predispozičními geny pro vznik dědičné formy karcinomu prsu jsou geny *BRCA1* a *BRCA2*, které se řadí mezi vysoce penetrantní geny spolu s *PTEN* a *TP53* (celoživotní riziko projevu onemocnění u nosiče mutace až 80 %). Střední riziko vzniku karcinomu prsu představují vrozené mutace v genu *CHEK2*, jenž predisponuje i k řadě dalších nádorových onemocnění.

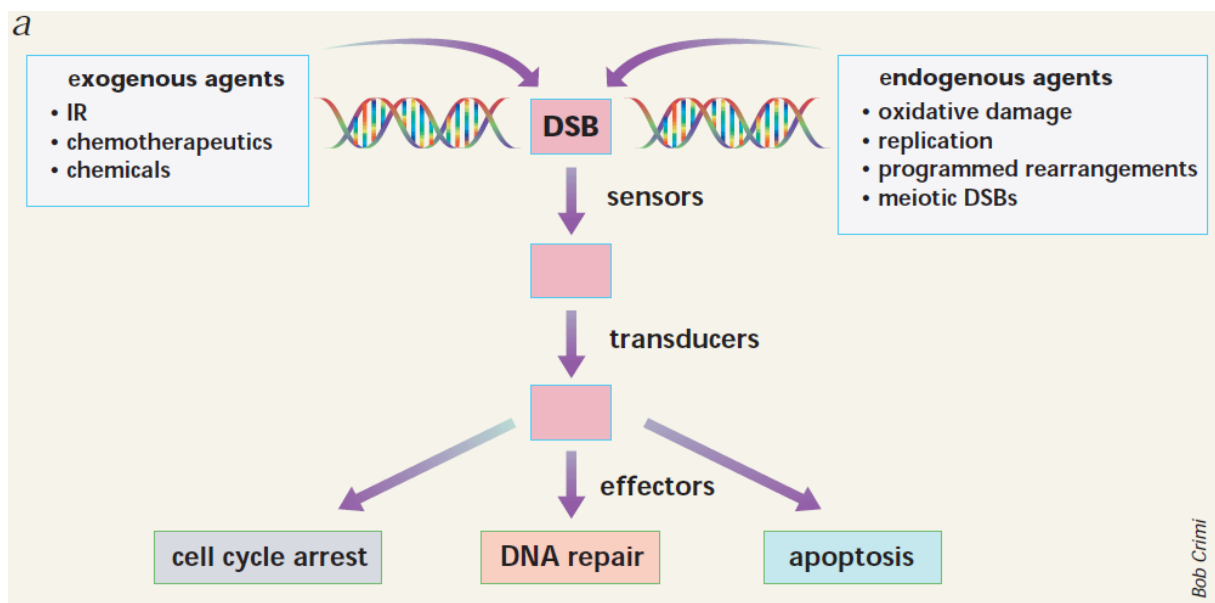
Většina predispozičních genů pro vznik karcinomu prsu, včetně *CHEK2*, kóduje produkty účastnící se procesů reparace genomové DNA a odpovědi na poškození genomové DNA. V souvislosti s karcinomem prsu jsou prokazatelně patogenními variantami *CHEK2* mutace, vedoucí ke zkrácení proteinového produktu, například rekurentní mutace c.1100delC a rozsáhlá delece exonů 9 a 10, jejíž původ byl identifikován v oblasti našich zemí (Walsh, 2006). V rámci mutačních analýz u vysoce rizikových osob však byla identifikována i řada missense mutací, jejichž význam není zatím určen. (Pohlreich *et al.*, 2012). Určení vlivu těchto alterací na funkci proteinového produktu je důležitou informací k posouzení rizika vzniku karcinomu prsu u nosičů těchto variant a v budoucnu i k posouzení přístupu protinádorové léčby pomocí specifických inhibitorů Chk2 (Matijssen *et al.*, 2012).

## 2 Přehled literatury

### 2.1 Buněčný cyklus a integrita genomu

Vznik a obnova buněk ve všech tkáních lidského organismu vyžaduje přesné řízení buněčného dělení, které je zajištěné buněčným cyklem. Tento sled biochemických a signálních dějů slouží k replikaci mateřské buňky do dvou buněk dceřiných. Vstup a průběh buněčného cyklu je za fyziologických okolností pečlivě řízen specializovanými proteiny, mezi které patří komplexy cyklinů a cyklin-dependentních kináz a jejich inhibitory (Lodish *et al.*, 2013). Aktivita a exprese těchto řídicích molekul je ovlivněna celou řadou signálních drah, které vyhodnocují funkční stav dělicí se buňky, její bezprostřední okolí, ale i požadavky celého organismu. Průběh buněčného cyklu lze rozdělit do několika fází, představující logické

biochemické a signální celky zajišťující růst buňky, správnou a úplnou replikaci genetického materiálu a jeho symetrické rozdělení do vznikajících dceřiných buněk. Komplexnost genetické informace a ultimátní požadavek na přesnou replikaci genomové DNA vyžaduje, aby buněčný cyklus byl iniciován pouze v buňkách s intaktním genomem, a aby v průběhu, respektive po skončení replikace DNA, byla tato přesnou kopií templátu mateřské buňky. Ke kontrole neporušenosti DNA – genomové integrity – slouží celá řada kontrolních a opravných mechanismů. Reparační procesy zahrnují opravy různých typů poškození genomové DNA. Signální dráhy účastníci se odpovědi na poškození genomové DNA představují pro každou buňku důležitý prostředek, který slouží nejen ke zprostředkování vlastní reparace, ale rovněž k integraci reparačních dějů s řízením dalších intracelulárních pochodů. V případě dělicích se buněk je to především (dočasná) zástava buněčného cyklu umožňující reparaci poškozené DNA nebo apoptóza, která reprezentuje konečný zánik buněk, u kterých reparace genomové DNA neproběhla úspěšně. Kompetence reparačních dějů a signálních procesů buněčné odpovědi na poškození DNA je nezbytným předpokladem tkáňové homeostázy, jelikož na integritě genomu závisí nejen správná funkce buňky ale i celého organismu. Intaktnost genomu je v průběhu buněčného cyklu sledována v kontrolních bodech, jež jsou tvořeny proteiny, které jsou součástí signálních drah vedoucích k vyhodnocení stavu buňky a je spuštěna adekvátní odpověď. (Bartkova et al., 2005)



**Obr. 1:** Obecné schéma signální dráhy spuštěné v odpovědi na poškození DNA. DSB – dvouřetězcové zlomy DNA, IR – ionizační záření; Převzato z Khanna & Jackson (2001)

Nejvýznamnější poškození genomové DNA představují dvouřetězcové zlomy v DNA, které vznikají endogenně v průběhu přirozených procesů v buňce, jakými jsou poruchy při replikaci genomové DNA, rekombinace při meióze či přeskupování VDJ segmentů u buněk imunitního systému, tak i vnějšími vlivy – např. ionizačním zářením. Pokud by buňka tato poškození nebyla schopna zaznamenat a opravit, mohlo by dojít ke ztrátě či naopak amplifikaci rozsáhlých oblastí genetické informace při náhodné segregaci oddělených fragmentů DNA (postrádajících centromeru) do dceřiných buněk. Proto při závažném poškození genomové DNA je iniciován proces apoptózy, kterou buňka chrání mnohobuněčný organizmus před vývojem nádorového onemocnění.

Buňka není schopna monitorovat veškeré probíhající reakce naráz, proto se kontrolní body nachází před každou důležitou částí, kdy jsou dokončovány probíhající procesy a je nutné zkontrolovat jejich výsledek a intaktnost genomu. V závislosti na stavu buňky a vnějších podmínkách se buňka v G1 kontrolním bodě rozhoduje o dalším postupu. Pokud zaznamená dostatek pozitivních signálů, pokračuje přes restriční bod do S fáze dalšího cyklu. V případě, že buňka není připravena pro vstup do dalšího buněčného cyklu, je možné postup pozastavit - protein Rb váže transkripční faktor E2F a brání tak transaktivaci genů důležitých k G1/S přechodu. Pokud je detekováno poškození DNA, dochází k aktivaci kaskády na jejímž konci je deaktivována Cdc25A fosfatáza, čímž zůstávají neaktivní komplexy cyklin-cyklin-dependentních kináz. Při nedostatku růstových signálů, buňka může vstoupit do G0 fáze, kdy se nebude již dále dělit. Po replikaci v S fázi je DNA kontrolována v G2 kontrolním bodě, který předchází rozdělování genetické informace do dceřiných buněk v mitóze. Při detekci poškození DNA dochází k aktivaci transkripčního faktoru p53, jenž transaktivuje např. gen pro protein p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, jenž inhibuje komplexy cyklinů a cyklin-dependentních kináz, čímž zastavuje buněčný cyklus. Pokud je p53 aktivován ve větší míře, například v případě závažného a neopravitelného poškození genomové DNA, je spuštěna transkripce genů jako jsou *PUMA*, *NOXA*, které zprostředkovávají iniciaci apoptózy. (Lodish *et al.*, 2013)

Signální dráhy nesestávají pouze z jedné linie, ale jedná se spíše o síť, které jsou navzájem propojené a v případě vyřazení některého z členů, např. mutací, částečně i zastupitelné. Pokud však chybí protein, na němž se dráhy sbíhají, a který je efektoem, za něhož nemá buňka adekvátní náhradu, může dojít k deregulaci buňky a její nádorové přeměně. Takovýmto proteinem je právě tumor supresor p53, s nímž je Chk2 součástí osy ATM-Chk2-p53 v odpovědi na poškození genomové DNA například dvouřetězcovými zlomy. Proteiny ATM

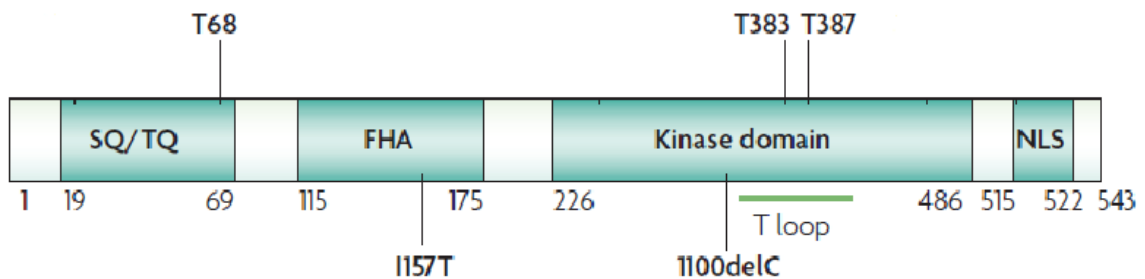
i Chk2 jsou kinázy fosforylující řadu substrátů účastnících se opravných mechanismů a jejich blízký vztah s p53 zvyšuje význam těchto kináz. (Matsuoka, 1998)

## 2.2 Struktura genu *CHEK2* a kinázy Chk2

Gen *CHEK2* je lokalizován na chromozomu 22, na dlouhém raménku (22q12.1), kde zaujímá 54680 bází. *CHEK2* je orientován ve směru minus vlákna a jeho majoritně exprimovaná varianta *CHEK2* mRNA A má 15 exonů, z nichž je 14 kódujících. Oblast genu mezi exonem 10 a 14 je duplikována a v genomu se vyskytuje v podobě pseudogenů na jiných chromozomech (N. Sodha, 2000). Ve své izoformě 1 obsahuje Chk2 protein 543 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost činí 60 915 Da.

### 2.2.1 Doménová struktura proteinu Chk2

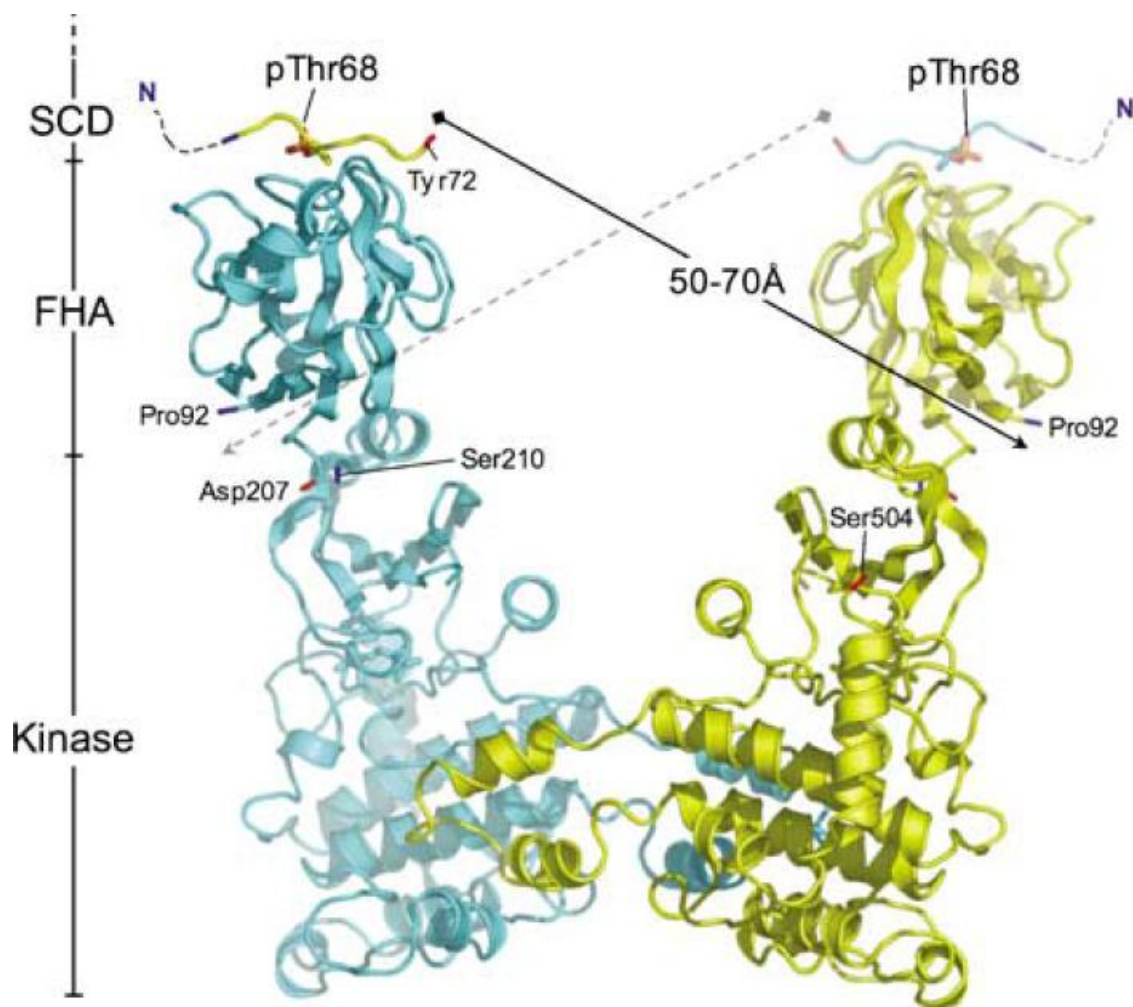
Protein Chk2 lze rozlišit na 3 funkční domény (S. Matsuoka, 1998), viz obr.2. N-koncová část proteinu tvoří tzv. SCD (SQ/TQ cluster domain) doménu, střední část zaujímá FHA (forkhead-associated) doména a značný úsek C-konce vytváří doménu kinázovou (Matsuoka, 1998).



**Obr. 2:** Primární struktura proteinu Chk2 se znázorněnými významnými aminokyselinovými zbytky. Upraveno dle Antoni *et al.* (2007).

N-koncová část je v pozicích 19 – 69 primární sekvence bohatá na páry aminokyselin SQ/TQ a představuje regulační oblast proteinu, jež je označována jako SCD doména. SCD oblasti se často vyskytují u proteinů, které se účastní signalizace při poškození DNA (Traven & Heierhorst, 2005). Zejména kináza ATM u svých substrátů vyžaduje v sekvenci přítomnost serinového či tyrosinového aminokyselinového zbytky následovaného glutaminem (Cortez, 1999; Matsuoka, 1998). Konkrétně u Chk2 je 7 SQ/TQ dvojic v úseku dlouhém 51 aminokyselin, mezi nimiž je pro funkci nejdůležitější pár TQ v pozicích 68 a 69, přesněji

aktivační T68 (viz obr.3), jenž je fosforylován kinázou ATM (Matsuoka, 1998). Podobně je tomu u kvasinkového homologu Cds1 (*Schizosaccharomyces pombe*), kdy je pro fosforylaci kinázou Rad-3 upřednostňován zbytek T11. V případě záměny threoninu v pozici 68 u Chk2, respektive 11 u Cds1 za alanin, nejsou proteiny fosforylovány, což značí význam těchto zbytků. V případě Rad53 (*Saccharomyces cerevisiae*) je pro aktivaci důležitější míra fosforylace SQ/TQ párů než fosforylace konkrétního zbytku, a SQ/TQ páry jsou tak nejspíše zastupitelné (Traven & Heierhorst, 2005).

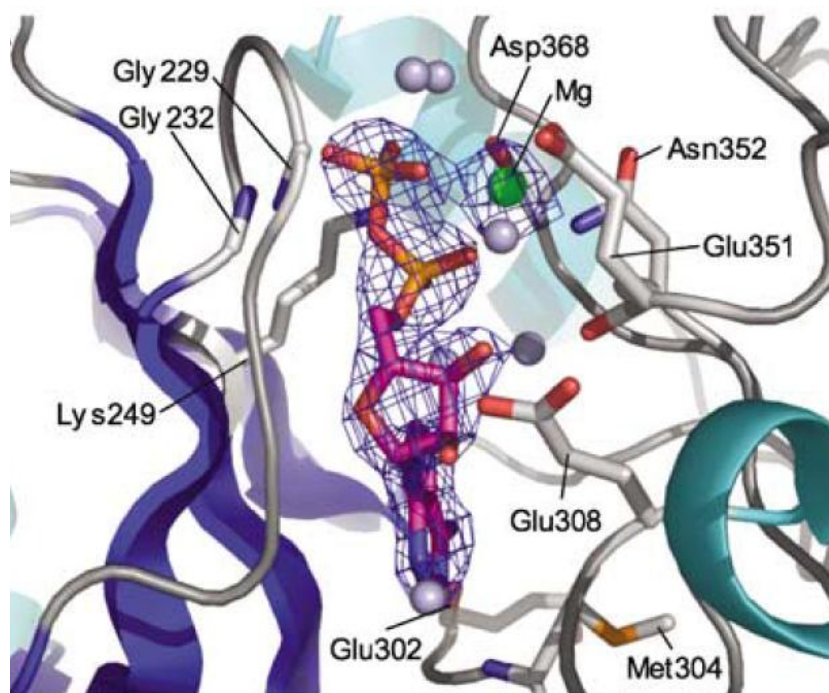


**Obr. 3:** Schéma prostorového uspořádání dimeru kinázy Chk2. K tvorbě dimeru dochází přechodně po fosforylaci Thr68 v SCD doméně, jenž je rozpoznáván a vázán FHA doménou druhé molekuly Chk2. Přiblížení dvou molekul a jejich přechodná vazba umožní výměnu aktivačních klíčků v oblasti kinázových domén a následnou autofosforylaci *in trans*. Vyvolaná konformační změna vyvolá disociaci dimeru a jsou uvolněny dva aktivované monomery kinázy Chk2. Převzato z Oliver et al. (2006).

Aminokyselinové zbytky 92 – 205 tvoří FHA doménu. V porovnání se svým kvasinkovým homologem Rad53, jenž obsahuje dvě FHA domény, se u Chk2 nachází pouze jedna (Matsuoka, 1998). Hlavní úlohou FHA domény je zprostředkování fosfoproteinové interakce, a to přes fosforylovaný threonin, tyrosin, či zřídka fosfoserin. Proteiny obsahující tuto doménu se účastní buněčných procesů, jakými jsou signalizace a opravy poškození DNA, nebo působí jako transkripčními faktory, či jsou součástí kinezinů (Durocher & Jackson, 2002). Obecně se FHA doména skládá z 80 – 100 aminokyselinových zbytků, jež tvoří tzv.  $\beta$ -sendvič. Tento je složen z 11  $\beta$  listů, mezi nimiž se mohou vyskytovat krátké helikální inzerty, jako je tomu u Chk2 mezi  $\beta$ 4 a  $\beta$ 5 listem spojených vzájemně helikálním úsekem dlouhým 8 aminokyselin (Durocher & Jackson, 2002). Byla vyzorována silná preference určitých zbytků v pozici pT+3. Zatímco u FHA1 Rad53 je tímto zbytkem Asp, u Chk2 se jedná o Ile nebo Leu (Durocher *et al.*, 2000; Durocher & Jackson, 2002). Fosfopeptid je poté vázán mezi smyčky  $\beta$ 3/  $\beta$ 4,  $\beta$ 4/  $\beta$ 5 a  $\beta$ 6/  $\beta$ 7 (Durocher & Jackson, 2002).

Kinázová doména s Ser/Thr specifitou zabírá v primární sekvenci proteinu Chk2 aminokyseliny 212 – 501. Vytváří dva laloky, z nichž jeden je označován jako N-lalok, jenž je tvořen zejména sekundární strukturou  $\beta$  listů, druhý lalok – C-lalok obsahuje spíše  $\alpha$  helixy a jeho součástí je aktivační smyčka (Cai, Chehab, & Pavletich, 2009; Oliver *et al.*, 2006). Obecně se jako aktivační smyčka označuje část kinázové domény zahrnující aminokyselinové zbytky DFG a APE (Johnson, Noble, & Owen, 1996). U Chk2 tato smyčka (zbytky 371 – 391), označovaná též jako T-klička, obsahuje Thr383 a Thr387, jež jsou nezbytné pro plnou aktivaci kinázy (Lee & Chung, 2001). Katalytické místo se nachází v zářezu, který vytvářejí N- a C-lalok (Cai *et al.*, 2009; Oliver *et al.*, 2006). K vazbě nukleotidu dochází ve vazebném místě (viz obr.4), podporované glycinovou smyčkou, která se podílí na kontaktu s fosfátovými skupinami. Fosfáty přijímají ještě další dodatečné vodíkové vazby z kinázové domény, pro něž jsou důležité zbytky Lys249, Asp368, Asn352. Kontakt s adeninem je zajištěn vodíkovými vazbami s Glu302 a Met304. Zbytky Glu308 a Glu351 zprostředkovávají kontakt s kyslíkem ve struktuře ribózy (Oliver *et al.*, 2006). Vazba nukleotidu je koordinována  $Mg^{2+}$  ionty.

Na samotném C-konci proteinu je umístěn jaderný lokalizační signál (aminokyseliny v pozicích 515 – 522), který je nezbytný pro přesun Chk2 do buněčného jádra, kde plní svou funkci (Zannini *et al.*, 2003).



Obr. 4:

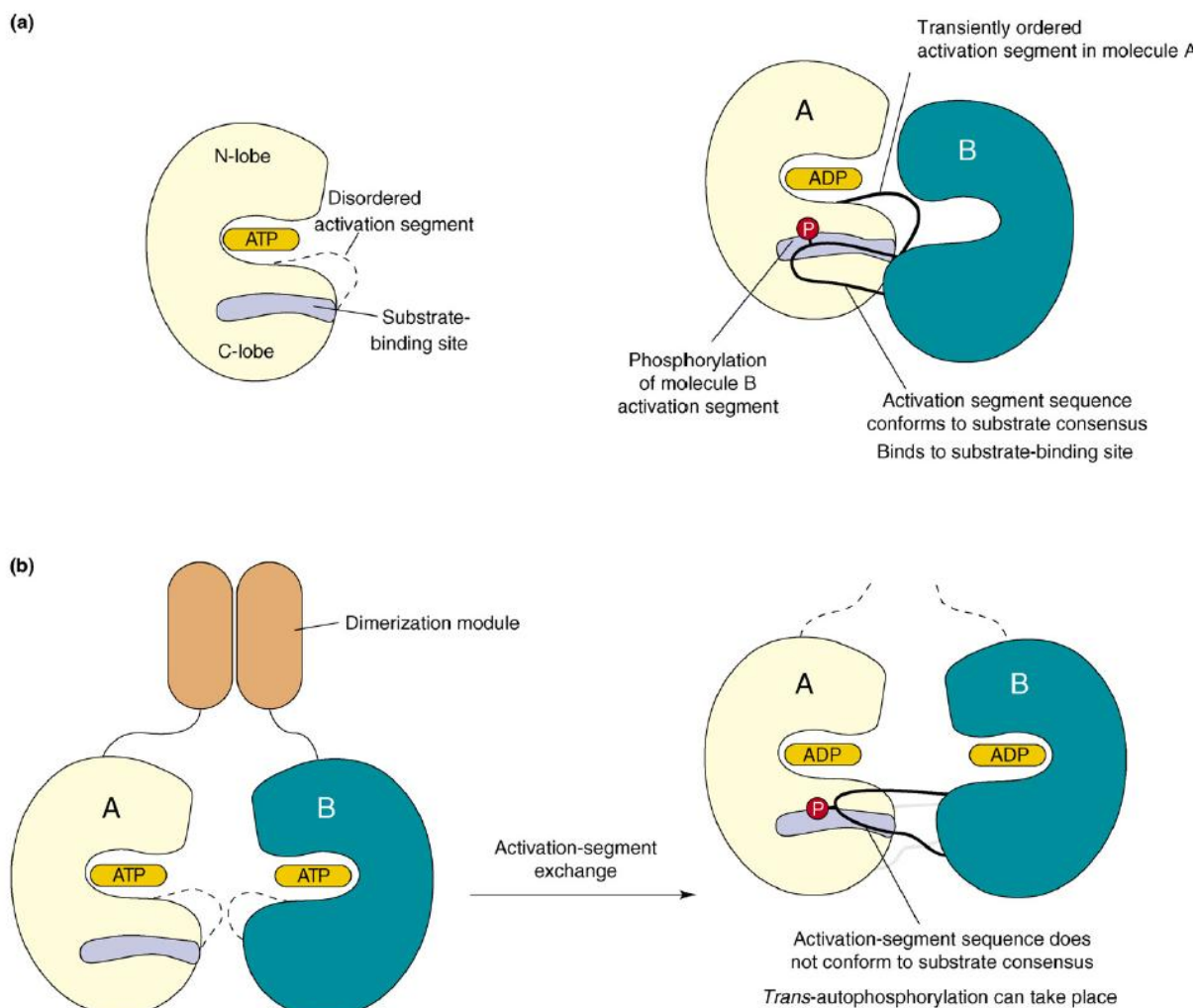
Vazebné místo pro nukleotid v kinázové doméně. Detail vazby molekuly ADP se znázorněnou elektronovou denzitou. Popsány jsou aminokyselinové zbytky podílející se na vazbě nukleotidu. Hořečnatý kation koordinující vazbu je znázorněn zeleně. Převzato z Oliver *et al.* (2006)

### 2.2.2 Regulace aktivity Chk2 kinázy

Při normálním růstu buňky se Chk2 vyskytuje jako neaktivní monomer (Ahn, *et al.*, 2000). Aktivace nastává po přechodné homodimerizaci, ke které dochází v odpovědi na poškození DNA dvouřetězcovými zlomy, kdy je Chk2 fosforylována kinázou ATM na Thr68 (Chaturvedi *et al.*, 1999; Matsuoka, 1998; Matsuoka *et al.*, 2000). Fosforylovaný Thr68 v oblasti SCD domény jednoho monomeru Chk2 je rozpoznáván FHA doménou druhého monomeru a je jí vázán, čímž je vytvořen přechodný homodimer (Xu, Tsvetkov, & Stern, 2002). V tomto uspořádání dochází k *trans*-autofosforylaci dvou threoninových zbytků (Thr 383 a Thr387) aktivační kličky (Lee & Chung, 2001). Sekvence této aktivační smyčky však nesplňuje požadavky pro klasickou sekvenci substrátu kinázové domény Chk2, což indikuje jiný mechanismus rozpoznání a následné fosforylace. Vazba pThr68 FHA doménou dostává do těsné blízkosti kinázové domény obou monomerů a dochází ke vzájemné výměně aktivačních segmentů (Oliver *et al.*, 2006; Oliver, Knapp, & Pearl, 2007). Fosforylace Thr68 má funkci aktivační a pro udržení další aktivity Chk2 není potřeba (Ahn *et al.*, 2002). Existují další interakce, které sice nejsou tak silné jako vazba pThr68 FHA doménou, ale jsou postačující pro přechodnou dimerizaci a následnou aktivaci dvou neaktivních monomerů (Cai *et al.*, 2009). Paradox, že pro aktivační fosforylaci kinázy je nezbytná její aktivace fosforylací je vysvětlován tím, že aktivační smyčka dokáže přechodně zaujímat aktivovanou konformaci



(viz obr.5), což je dostatečné k fosforylaci smyčky druhého monomeru (Oliver *et al.*, 2006). *Trans*-autofosforylace a následná konformační změna vedou k disociaci dimeru a uvolnění dvou plně aktivovaných monomerů (Cai *et al.*, 2009; Oliver *et al.*, 2006). Některé experimenty ukazují, že existuje dimerizace nezávislá na SCD doméně a postačuje pouze doména FHA, samotná kinázová doména dimerizaci nezajistí (Cai *et al.*, 2009)



**Obr. 5:** K aktivaci kinázy Chk2 je nutná její fosforylace. Byly navrženy dva možné mechanismy. (a) V případě, že sekvence aktivačního segmentu odpovídá konsenzus sekvenci substrátu kinázy, zaujímá přechodně aktivační segment jednoho monomeru aktivní konformaci, čímž je umožněna vazba aktivačního segmentu druhého monomeru do vazebného místa, a ten je fosforylován. (b) Aktivační segment Chk2 však nemá sekvenci shodnou se substráty této kinázy a připadá tak v úvahu jiný mechanismus. Dochází k výměně aktivačních segmentů mezi molekulami v dimeru navzájem, oba přechodně zaujímají aktivní konformaci a jsou fosforylovány *in trans*. Převzato z Oliver *et al.* (2007).

K dimerizaci a aktivaci kinázy Chk2 může však dojít i mimo odpověď na poškození DNA ionizačním zářením, což bylo zaznamenáno při nadprodukci proteinu v MEF či 293 buňkách, stejně tak i u *Escherichia coli* (Schwarz *et al.*, 2003).

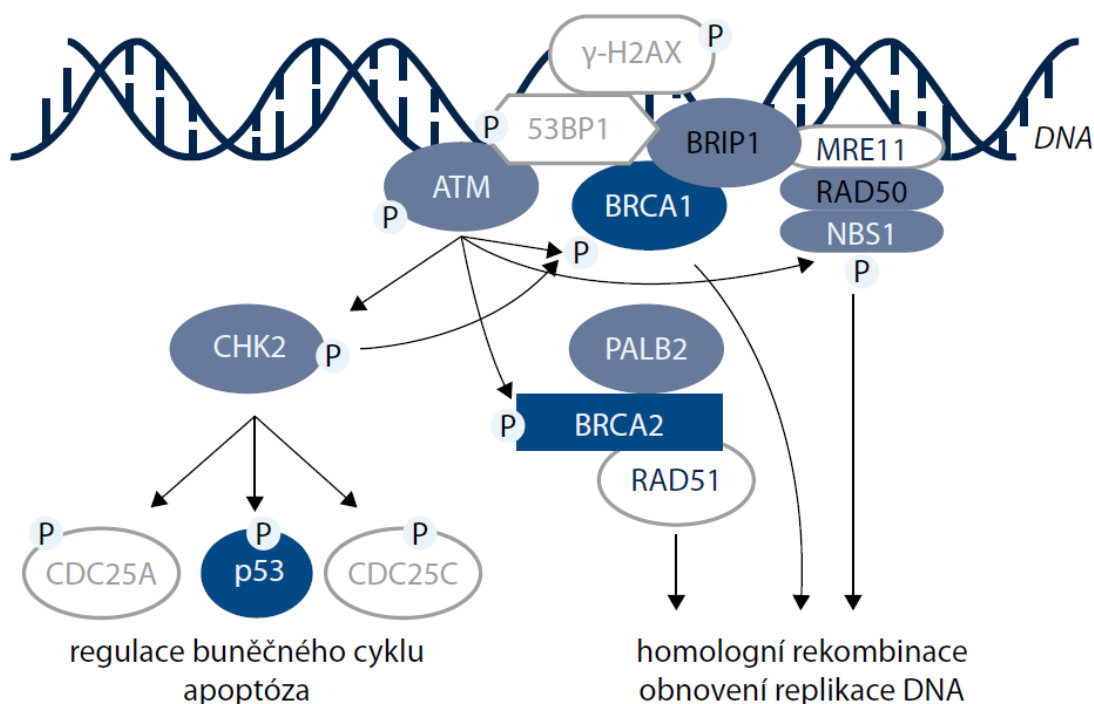
Proti aktivačnímu účinku kinázy ATM na Chk2 působí fosfatáza Wip1, kódovaná genem *PPM1D* (Fujimoto *et al.*, 2006; Oliva-Trastoy *et al.*, 2007). Při pátrání po negativním regulátoru kinázy Chk2 byl kandidátním enzymem právě Wip1, který defosforyluje pSer15 v p53 i pSer345 v Chk1. WIP1 antagonizuje aktivační kinázy ATM a ATR, čímž se podílí na návratu buňky do buněčného cyklu po jeho zastavení v rámci oprav poškození genomové DNA (Lu *et al.*, 2005). Protein Wip1 patří do rodiny typu 2C proteinfosfatáz, jejíž dalšími členy jsou fosfatázy Ptc2 a Ptc3, které jsou důležité pro deaktivaci homologního proteinu Chk2 u *Saccharomyces cerevisiae* Rad53 (Leroy *et al.*, 2003). Aktivita Wip1 se v průběhu buněčného cyklu mění a ustanovuje tak práh citlivosti buňky pro signalizaci poškození DNA (Macurek *et al.*, 2013; Oliva-Trastoy *et al.*, 2007).

Fosforylace není jedinou posttranslační modifikací, kterou Chk2 podstupuje – je také ubikvitinylován PIRH2 ubikvitinligázou (Bohgaki *et al.*, 2013; Kass *et al.*, 2007). V tomto ohledu je důležitý S456, jehož fosforylace se podílí na regulaci stability Chk2 (Kass *et al.*, 2007). Pokud je S456 fosforylován, je Chk2 stabilnější, v opačném případě se stává cílem PIRH2 a je degradován. V experimentech s nefunkční ubikvitinligázou PIRH2, byla zaznamenána častější aktivace G1/S a G2/M kontrolních bodů (Bohgaki *et al.*, 2013).

### **2.3 Interakční partneři**

Na význam kinázy Chk2 poukazují její interakční partneři, kteří se v buňce účastní důležitých procesů, jako jsou kontrola buněčného cyklu, oprava poškozené DNA či indukce apoptózy.

Nejdůležitější substrátem kinázy Chk2 je tumor supresorový protein p53, který je transkripčním faktorem zprostředkovávajícím reakce buňky na stres. V závislosti na typu stresu a míře poškození, především genomové DNA, ale i onkogenní hyperstimulaci, umožňuje zajistit pozastavení buněčného cyklu pro opravu DNA nebo v závažnějších případech, a při neopravitelném poškození DNA indukovat apoptózu buňky. Za normálních podmínek je p53 udržován v neaktivním stavu pomocí ubikvitinligázy Mdm2, která jej ubikvitinyluje a tím cílí k degradaci do proteazomu (Suzuki & Matsubara, 2011). Naopak v odpovědi na poškození genomové DNA je p53 fosforylován kinázou Chk2 na Ser20, čímž je přerušena vazba s Mdm2. Tímto dochází ke stabilizaci a rychlé intracelulární akumulaci molekul p53, které po homotetramerizaci mohou transaktivovat geny, jejichž produkty vedou k opravě daného poškození (Chehab *et al.*, 1999; Chehab & Malikzay, 2000).

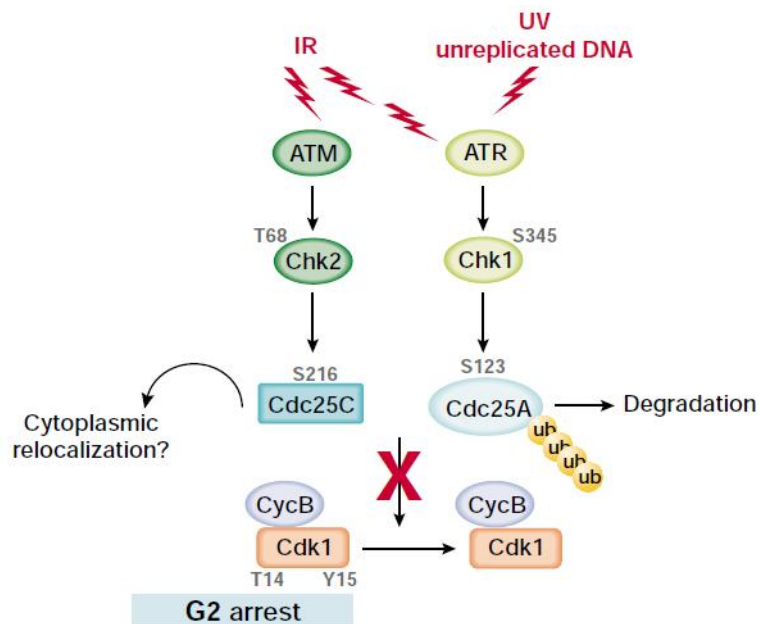


**Obr. 6:** Schéma interakcí Chk2 a proteinů zprostředkovávající odpověď na dvouřetězcové zlomy v DNA. Při detekci DSB je k místu zlomu po aktivaci ATM kinázou rekrutován komplex MRN (Mre11-Rad50-NBS1) a BRCA1, které se spolu s dalším komplexem BRCA2 a Rad51 podílejí na opravě DNA pomocí homologní rekombinace. Kináza ATM také fosforyluje, a tím aktivuje kinázu Chk2, která poté aktivuje proteiny důležité pro regulaci buněčného cyklu a případně apoptózy. Chk2 kolokalizuje v místech zlomů s markery poškozené DNA – proteinem 53BP1 a variantou histonu  $\gamma$ -H2A, Chk2 však poté od míst poškození difunduje a předává signál dále. Převzato z Pohlreich *et al.* (2012)

Dalším z řady tumorsupresorů je protein BRCA1, jenž je základním elementem komplexu účastnícího se opravných mechanismů dvouřetězcových zlomů DNA. Kináza Chk2 fosforyluje BRCA1 na Ser988 v reakci na dvouřetězcové zlomy DNA (viz obr.6), což pak vede k upřednostnění opravy cestou homologní rekombinace před chybovou NHEJ (Lee *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004). Dědičné mutace v genu *BRCA1* jsou nejčastější příčinou vzniku dědičné formy karcinomu prsu a ovaria v ČR (Pohlreich *et al.*, 2005). Obdobně je tomu i v případě mutací genu *BRCA2*, jehož proteinový produkt se taktéž podílí na opravách poškozené genomové DNA. Fosforylací BRCA2 na Thr3387 kinázou Chk2 je vytvořeno vazebné místo pro rekombinázu Rad51 a dochází k translokaci komplexu BRCA2 s Rad51 do jádra, kde se podílí na homologní rekombinaci a stabilizaci replikační vidlice při jejím kolapsu (Lomonosov *et al.*, 2003).

Regulace postupu buněčným cyklem je zajištěna duálně-specifickými protein fosfatázami Cdc25, jež odejímají inhibiční fosfát z komplexů cyklinů a cyklin-dependentních kináz.

Pro vstup do mitózy je nutná aktivace Cdk1 v komplexu s cyklinem B, který je (po úvodních fosforylacích Wee1 a CAK) aktivován pomocí fosfatázy Cdc25C. Pokud buňka zaznamená poškození (viz obr.7) v kontrolním bodě G2 před vstupem do M fáze, je Cdc25C fosforylován na Ser216 kinázou Chk2, čímž dochází k deaktivaci fosfatázy a pozastavení buněčného cyklu (Falck *et al.*, 2001; Matsuoka, 1998). Fosforylovaný Ser216 vytváří vazebné místo pro proteiny 14-3-3 $\sigma$ , pomocí kterých je udržován v cytoplazmě. Pokud je mutován Ser216, není Cdc25C rozeznáván Chk2 a buňka vstupuje do mitózy i přes nedokončenou replikaci nebo poškození DNA (Peng, 1997). Izoforma Cdc25A působí na přechodu G1 a S fáze, kde odejímá inhibiční fosfát z komplexu Cdk2 a cyklinu E, který jej zpětně fosforyluje a vytváří tak zpětnou pozitivní vazbu (Jinno, Suto, & Nagata, 1994). Při detekci dvouřetězcových zlomů DNA je fosforylován pomocí Chk2 Ser123 v Cdc25A a je zastaven postup do S fáze (Falck *et al.*, 2001).

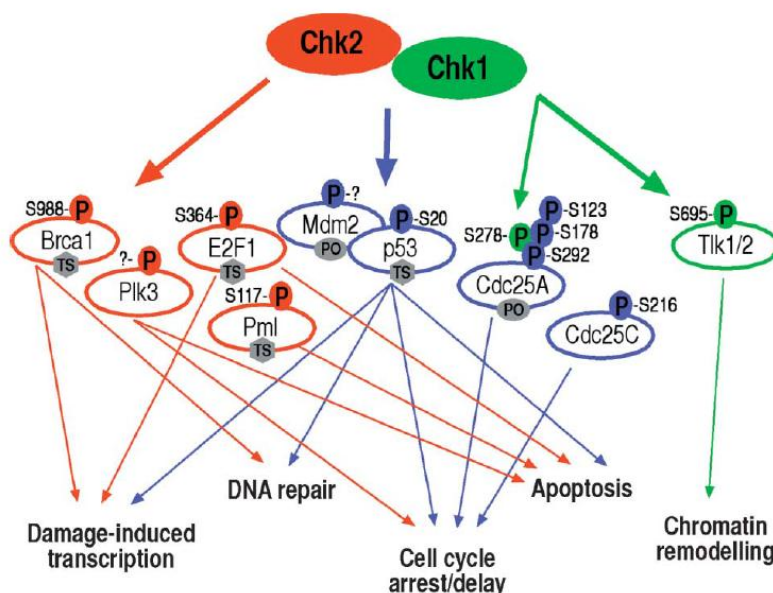


**Obr. 7:** Schéma regulace odpovědi na ionizační a ultrafialové záření přes ATM-Chk2-Cdc25C a ATR-Chk1-Cdc25A vedoucí k zastavení buněčného cyklu v kontrolním bodě G2. Převzato z Donzelli & Draetta (2003).

Podobně jako Chk2 se protein PML podílí na zprostředkování apoptózy po poškození ionizačním zářením. Indukce buněčné smrti se nemusí odvíjet pouze od aktivity p53, ale může být i na p53 nezávislá. Při této cestě se uplatňuje protein PML v regulaci změn v koncentraci Ca<sup>2+</sup> iontů v endoplazmatickém retikulu, cytosolu a mitochondriích (Giorgi *et al.*, 2011). Chk2 spolu s PML kolokalizují v ohniscích poškození v buněčném jádře a kináza Chk2 fosforyluje PML na Ser117, což umožňuje uvolnění PML (Yang, Kuo, Bisi, & Kim, 2002). Protein PML je nádorovým supresorem a translokace genu *PML* se vyskytuje ve většině případů akutních myeloidních leukémií (Pandolfi, 2001; Salomoni *et al.*, 2008)

Dalším interakčním partnerem Chk2 je kináza Plk3, s níž Chk2 uzavírá pozitivní smyčku (Ma & Poon, 2011). Plk3 fosforyluje Chk2 na Ser62 a Ser73, čímž dochází ke konformační změně, která usnadňuje kináze ATM fosforylovat aktivační Thr68 (Bahassi *et al.*, 2006).

Spektrum substrátů kináz Chk2 a Chk1 se překrývá a funkce těchto kináz je tak částečně zastupitelná (viz obr. 8). Je tomu tak například u fosfatáz Cdc25, kdy Ser216 v Cdc25C je fosforylován oběma kinázami (Matsuoka, 1998; Sanchez, 1997). Prostřednictvím Cdc25A a Chk1 dochází k odpovědi na poškození DNA ultrafialovým zářením, zatím co Chk2 zprostředkovává skrze Cdc25A reakci na vystavení buňky ionizačnímu záření (Falck *et al.*, 2001; Mailand, 2000). Chk2 však nedokáže plně nahradit funkci Chk1, což dokazují experimenty u Chk1<sup>-/-</sup> myši, které nejsou životaschopné. Naopak myši s odstraněným genem *CHEK2* žijí, avšak vykazují rezistenci k ionizačnímu záření, a jím způsobená poškození genomové DNA neopravují (Takai *et al.*, 2002).



**Obr.8:** Schéma sítě proteinů, které sdílí kinázy Chk1 a Chk2. Oranžovou barvou jsou znázorněny interakce, kterých se účastní pouze Chk2, zeleně označeny jsou interakce Chk1, modrá značí společné substráty. Převzato z Bartek & Lukas (2003).

## 2.4 Mutace *CHEK2* a nádorová onemocnění

Dědičné mutace v genu *CHEK2* jsou spojeny s Li-Fraumeni syndromem (LFS; OMIM #151623), vyznačujícím se zvýšenou pravděpodobností vzniku nádorového onemocnění, a to zejména karcinomu prsu, osteosarkomu, adenokarcinomu dřeně nadledvin nebo nádorů mozku. Příčinou Li-Fraumeni syndromu jsou nejčastěji mutace genu *TP53* a následná ztráta

druhé alely, avšak v některých případech je *TP53* neporušen. Na základě zjištěné interakce proteinů p53 s Chk2 byl vliv na vznik Li-Fraumeni syndromu připsán i mutaci c.1100delC v *CHEK2* (Bell, 1999). Mutace c.1100delC způsobuje posun čtecího rámce a předčasnou terminaci proteinového produktu Chk2 (p.T367Mfs\*15, který je zkrácen o podstatnou část kinázové domény, což mu znemožňuje fosforylaci jeho substrátů. V první práci Bellové a kol. byla kromě rekurentně se vyskytující patogenní varianty c.1100delC i varianta c.470T>C znamenající nekonzervativní záměnu Ile v pozici 157 za Thr (p.I157T), jež se nachází v FHA doméně (Bell, 1999).

Rozsáhlou analýzu výskytu mutací v *CHEK2* u více jak 4000 pacientů s různým nádorovým onemocněním provedli Cybulski *et al.* (2004). Byly nalezeny dvě mutace předčasně ukončující čtecí rámec (c.1100delC a IVS2+1G>A) a mutace I157T u nádorů ledvin, prostaty, prsu, a studie tak ukázala, že mutace *CHEK2* nejsou spojeny pouze s Li-Fraumeni syndromem.

### 3 Cíle práce

Mutační analýza celé kódující sekvence genu *CHEK2* provedená v Laboratoři onkogenetiky na Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. LF odhalila přítomnost 18 vzácných sekvenčních variant genu *CHEK2* u vysoce rizikových pacientů s karcinomem prsu, jejichž biologický význam není objasněn. Má diplomová práce se zaměřuje na analýzu vlivu těchto mutací na kinázovou funkci proteinového produktu Chk2.

Díličními cíli bylo:

1. Vytvoření konstruktů obsahujících studované sekvenční varianty genu *CHEK2* v expresním vektoru pDream2.1/MS2 (GenScript) pomocí site-directed mutagenese
2. transformace vektoru do bakteriálních buněk *E.coli* BL21, následná indukce exprese proteinů pomocí IPTG, a lýza buněk
3. měření kinázové aktivity Chk2 v hrubém buněčném lyzátu na základě změny míry fluorescence po fosforylaci specifického substrátu kinázy
4. srovnání výsledků funkční analýzy *in vitro* s predikcemi *in silico* nástrojů jako podklad pro hodnocení významu studovaných variant genu *CHEK2*

## 4 Metody

### 4.1 Použité roztoky a chemikálie

*TBE pufr (Tris/borát/EDTA):* 89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA

*PBS (Phosphate-buffered saline):* 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

*TPBS pufr:* PBS pufr + 0,1% Tween20 (Sigma)

*vzorkový pufr pro agarózovou DNA elektroforézu:* 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% bromfenolová modř, 0,03% xylen cyanol, 60% glycerol, 60 mM EDTA

*S.O.C. médium:* 2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) kvasničný extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM glukóza

*Tris-glycinový SDS pufr:* 27,2 mM Tris, 190 mM glycin, 0,1 % SDS

*transferový pufr:* 39 mM glycin, 48 mM Tris, 1,2 mM SDS, 20% methanol

*vzorkový pufr pro proteinovou elektroforézu:* 62,5 mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.1M DTT, 0.01% bromfenolová modř

*LB medium:* 10g/L Tryptone, 5 g/L Yeast Extract, 5 g/L NaCl

### 4.2 Koncepce analýzy kinázové aktivity mutantních variant Chk2 *in vitro*

Pro hodnocení funkční kapacity kinázové aktivity variantních izoform proteinu Chk2 jsme použili syntetický substrát, jehož utilizaci, kinetiku kinázové reakce, je možné sledovat v čase pomocí změn fluorescence. Podobný přístup byl použit např. v práci Desrichard et al. (2011) studující biologický význam missense variant genu *CHEK2* nalezených u pacientů s karcinomem prsu ve francouzské populaci. Sekvence identifikovaných variant byly připraveny pomocí site-directed mutagenese či PCR sestřihu v expresním vektoru pDream2.1/MS (GenScript) obsahujícím WT sekvenci Chk2, izoformy 1 o 543 aminokyselinách. Správnost sekvencí inzertů a především modifikovaných oblastí byla ověřena sekvenací. Následně byly zkonstruované plazmidy transformovány do buněk *E.coli*, ve kterých byla exprese variantních izoform Chk2 indukována pomocí IPTG. Kinázová aktivita Chk2 byla měřena v hrubém buněčném lyzátu na základě změny míry fluorescence



po fosforylaci sekvence specifického substrátu Chk2 kinázy s fluoroforem Sox. Výsledky *in vitro* analýz byly korelovány s výsledky *in silico* predikcí a společný výsledek posloužil pro hodnocení předpokládané patogenity *CHEK2* variant.

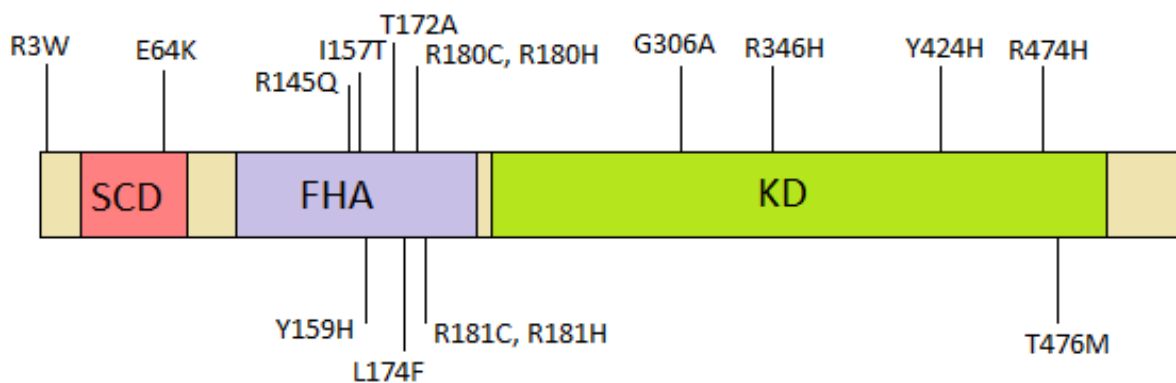
### 4.3 Seznam studovaných variant *CHEK2*

Mutační analýza celé kódující sekvence genu *CHEK2* byla v Laboratoři onkogenetiky na Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK provedena u 820 vysoce rizikových pacientů s karcinomem prsu, u kterých nebyly prokázány mutace v hlavních predispozičních genech BRCA1 a BRCA2. Na základě této analýzy bylo identifikováno několik prokazatelně patogenních mutací vedoucích ke zkrácení proteinového produktu Chk2 (např. c.1100delC) a 17 vzácných, nebo doposud nepopsaných sekvenčních variant *CHEK2* genu, které se nevyskytovaly, nebo signifikantně nižší četností, v souboru 978 souběžně analyzovaných kontrol (Kleiblová et al., Publikace v přípravě). Biologický význam těchto variant genu *CHEK2* je nejasný. Studium vlivu těchto variant nejasného významu na kinázovou funkci Chk2 *in vitro* se zabývá tato práce. S výjimkou jedné intronové elece (c.846+4\_7del), u které byl prokázán in-frame výpadek exonu 6 (18 aminokyselin v oblasti kinázové domény) byly ostatní studované varianty různé missense mutace.

CDS	kodon	protein	doména
c.7C>T	Cgg>Tgg	p.R3W	NT
c.190G>A	Gag>Cag	p.E64K	SCD
c.434G>A	cGg>cAg	p.R145Q	FHA
c.470T>C	aTt>aCt	p.I157T	FHA
c.475T>C	Tac>Cac	p.Y159H	FHA
c.514A>G	Aca>Gca	p.T172A	FHA
c.520C>T	Ctt>Ttt	p.L174F	FHA
c.538C>T	Cgc>Tgc	p.R180C	FHA
c.539G>A	cGc>cAc	p.R180H	FHA
c.541C>T	Cgt>Tgt	p.R181C	FHA
c.542G>A	cGt>cAt	p.R181H	FHA
c.917G>C	gGg>gCg	p.G306A	KD
c.1037G>A	cGt>cAt	p.R346H	KD

c.1270T>C	Tat>Cat	p.Y424H	KD
c.1421G>A	cGt>cAt	p.R474H	KD
c.1427C>T	aCg>aTg	p.T476M	KD
c.1100delC		p.T367Mfs*15	KD
c.846+4_7del		p.D265_H282del	KD

**Tab. 1: Studované varianty *CHEK2*** V tabulce jsou vypsány zkoumané missense varianty Chk2. Pod čarou jsou vypsány varianty, u nichž nedochází k záměně jedné aminokyseliny, ale k delecí části proteinu, a WT Chk2. NT = N-konec, SCD = SQ/TQ cluster domain, FHA = forkhead-associated domain, KD = kinázová doména



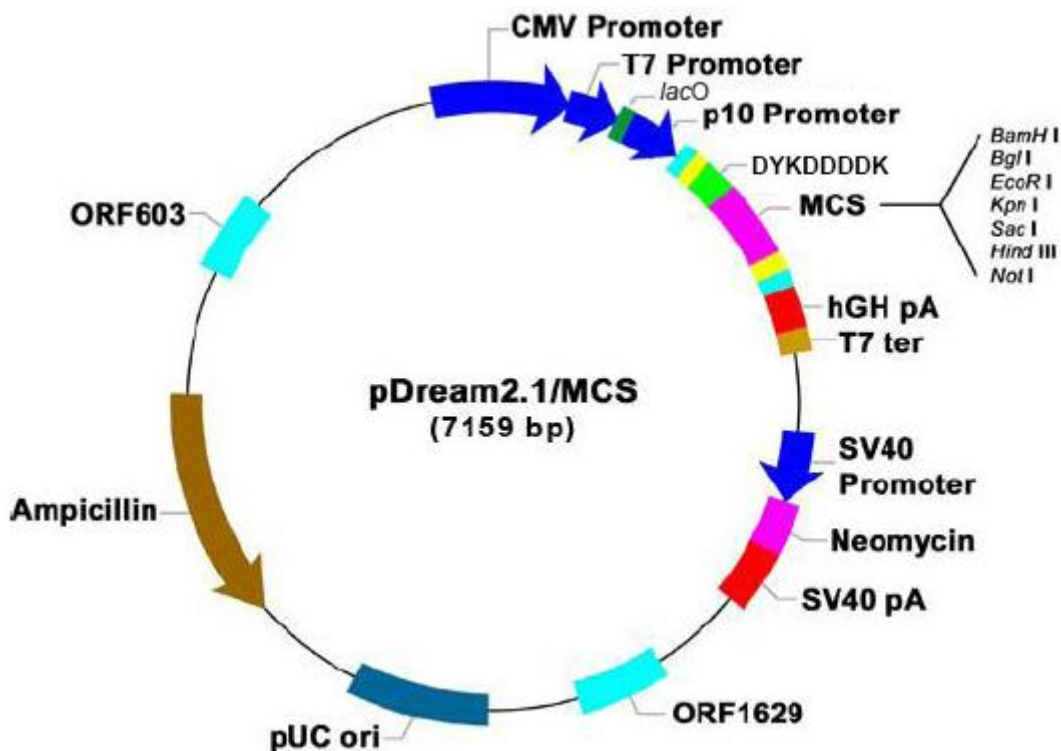
**Obr. 9:** Schéma rozmístění missense mutací v primární sekvenci Chk2. SCD = SQ/TQ cluster domain, FHA = forkhead-associated domain, KD = kinázová doména

## 4.4 Příprava variantních sekvencí genu *CHEK2*

### 4.4.1 Genetický materiál

Výchozím genetickým materiálem byl vektor pDream2.1/MSC (GenScript) se zaklonovanou WT sekvencí genu *CHEK2* (poskytnuto Prof. Dr. Yves-Jean Bignon, MD, PhD; Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France; Desrichard, 2011)

V oblasti MCS obsahuje sedm míst rozeznávaných restrikcími enzymy (viz obr. 10). Vektor nese geny pro ampicilinovou a neomycinovou rezistenci. Zaklonované geny mohou být exprimovány v bakteriálních, hmyzích i savčích buňkách. Před kódující sekvencí proteinu je vložena sekvence pro značku FLAG (DYKDDDDK-GC) pro purifikaci a detekci proteinu.

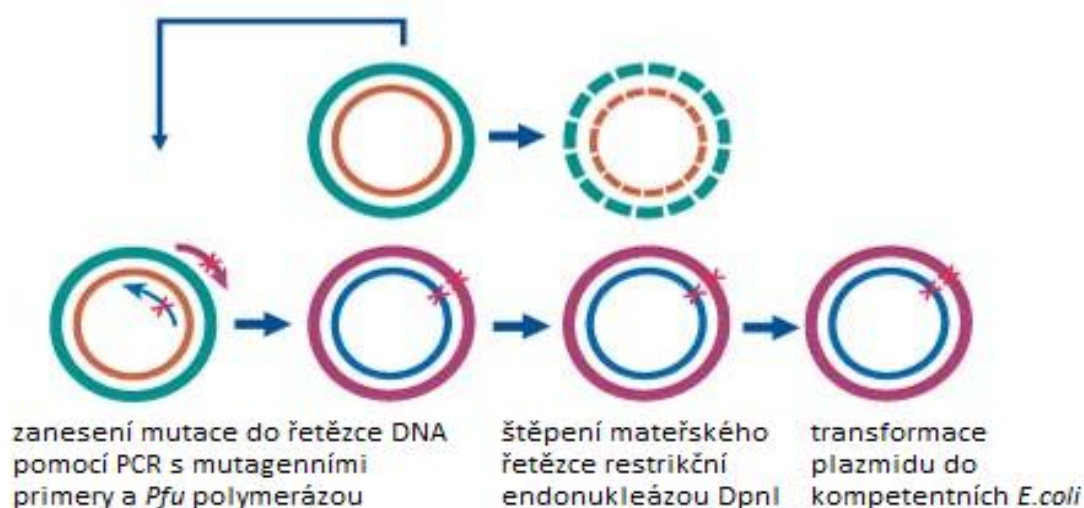


Obr. 10: Schéma vektoru pDREAM2.1/MCS. Převzato a upraveno z <http://www.genscript.com>.

#### 4.4.2 Site-directed mutageneze

Metoda site-directed mutageneze (viz obr.11) používá tzv. mutagenních primerů, které mají ve své sekvenci cílenou záměnu oproti sekvenci templátu. S využitím polymerázy *Pfu* s proofreading aktivitou je zanesena záměna do sekvence plazmidu během PCR. Původní plazmid je poté štěpen restriční enzymem DpnI specificky rozeznávajícím methylované a hemimethylované sekvence, kdy DNA izolovaná z většiny kmenů *E.coli* je methylovaná. V reakci pak zůstane nemethylovaný plazmid s požadovaně změnou sekvencí.

Primery byly navrženy tak, aby se změněný nukleotid nacházel přibližně uprostřed sekvence, přičemž délka primeru byla okolo 43 nukleotidů. Analýza byla provedena v programu AnnHyb (Bioinformatics.org). Dvojice primerů (forward a reverse) jsou k sobě navzájem plně komplementární, a dochází tedy ke tvorbě primer-primer dimerů.



**Obr. 11:** Schématické znázornění postupu pro site-directed mutagenezi. Převzato a upraveno dle <http://www.genomics.agilent.com/>.

Touto metodou byly připraveny missense varianty a varianta 1100delC, jejichž sekvence obsahovala právě jednonukleotidovou záměnu oproti sekvenci WT *CHEK2*.

primer	sekvence (5' - 3')
R3W_f	GACGACAAGATGTCTTGGGAGTCGGATGTTGAGGC
R3W_r	GCCTCAACATCCGACTCCCAGACATCACGACCGC
E64K_f	CTGGGACACTGAGCTCCTTAAAGACAGTGTCCTCACTCAGGAA
E64K_r	TTCCTGAGTGGACACTGTCTTAAAGGAGCTCAGTGTCCCAG
R145Q_f	GCAAGAAACACTTTCAGATTTTCAGGGAAGTGGGTCC
R145Q_r	GGACCCACTTCCCTGAAAATCTGAAAGTGTTTCTTGC
I157T_f	GTGGGTCCTAAAACTCTTACACTGCATACATAGAAGATCACAGTG
I157T_r	CACTGTGATCTTCTATGTATGCAGTGTAAGAGTTTTTAGGACCCAC
Y159H_f	GGTCCTAAAACTCTTACATTGCACACATAGAAGATCACAGTGG
Y159H_r	CCACTGTGATCTTCTATGTGTGCAATGTAAGAGTTTTTAGGACC
T172A_f	GGCAATGGAACCTTTGTAAATGCAGAGCTTGTAGGGAAAGG
T172A_r	CCTTTCCTACAAGCTCTGCATTTACAAAGGTTCCATTGCC
L174F_f	GGAACCTTTGTAAATACAGAGTTTGTAGGGAAAGGAAAACGCCG
L174F_r	CGGCGTTTTCCCTTCCCTACAAGCTCTGTATTTACAAAGGTTCC

R180C_f	GCTTGTAGGGAAAGGAAAA <b>T</b> GCCGTCCTTTGAATAACAA
R180C_r	TTGTTATTCAAAGGACGGC <b>A</b> TTTTTCCTTTCCCTACAAGC
R180H_f	GAGCTTGTAGGGAAAGGAAAAC <b>A</b> CCGTCCTTTGAATAACAATTCTG
R180H_r	CAGAATTGTTATTCAAAGGACGG <b>T</b> GTTTTTCCTTTCCCTACAAGCTC
R181C_f	GCTTGTAGGGAAAGGAAAACG <b>C</b> TGTCCTTTGAATAACAATTCTG
R181C_r	CAGAATTGTTATTCAAAGGAC <b>A</b> GCGTTTTTCCTTTCCCTACAAGC
R181H_f	GCTTGTAGGGAAAGGAAAACGCCATCCTTTGAATAACAATTCTG
R181H_r	CAGAATTGTTATTCAAAGGATGGCGTTTTTCCTTTCCCTACAAGC
G306A_f	GTTTTGGAATTGATGGAAG <b>C</b> GGGAGAGCTGTTTGACAAAG
G306A_r	CTTTGTCAAACAGCTCTCCC <b>G</b> CTTCCATCAATTCCAAAAC
R346H_f	CCTTCATGAAAACGGTATTATACACC <b>A</b> TGACTTAAAGCCAGAG
R346H_r	CTCTGGCTTTAAGTCA <b>T</b> GGTGTATAATACCGTTTTTCATGAAGG
Y424H_f	CTTTTTATCTGCCTTAGTGGG <b>C</b> ATCCACCTTTCTCTGAGCATAG
Y424H_r	CTATGCTCAGAGAAAGGTGGAT <b>G</b> CCCCACTAAGGCAGATAAAAAG
R474H_f	GTAGTGGATCCAAAGGCAC <b>A</b> TTTTACGACAGAAGAAGCCTTAAG
R474H_r	CTTAAGGCTTCTTCTGTCGTA <b>A</b> ATGTGCCTTTGGATCCACTAC
T476M_f	GTGGATCCAAAGGCACGTTTT <b>A</b> TGACAGAAGAAGCCTTAAGAC
T476M_r	GTCTTAAGGCTTCTTCTG <b>T</b> CATAAAACGTGCCTTTGGATCCAC
1100delC_f	GAAGAGGACTGTCTTATAAAGATTATGATTTTGGGCACTCCAAGATTTTG
1100delC_r	CAAAATCTTGAGTGCCCAAATCATAATCTTTATAAGACAGTCCTCTTC

Pozn.: Zeleně jsou vyznačeny jednonukleotidové záměny oproti původní sekvenci.

Pro PCR s mutagenními primery byla zvolena *Pfu* polymeráza s proofreading aktivitou.

Objem reakce byl 12,5µl, dle rozpisu:

<i>Pfu</i> polymeráza (2,5 U/µl)	0,25 µl
10x reakční pufr s MgSO <sub>4</sub>	1,25 µl
dNTP Mix (každý 10mM)	0,25 µl
templát pDREAM_wtCHEK2 (30 ng/µl)	0,4 µl
primer forward (2,5 pmol/µl)	1 µl
primer reverse (2,5 pmol/µl)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	8,35 µl

Amplifikace proběhla v 16 cyklech (94°C – 30 s; 68°C – 15 min), kterým předcházela vstupní denaturace (94°C - 1 min), posledním krokem byla závěrečná elongace (72°C - 10 min).

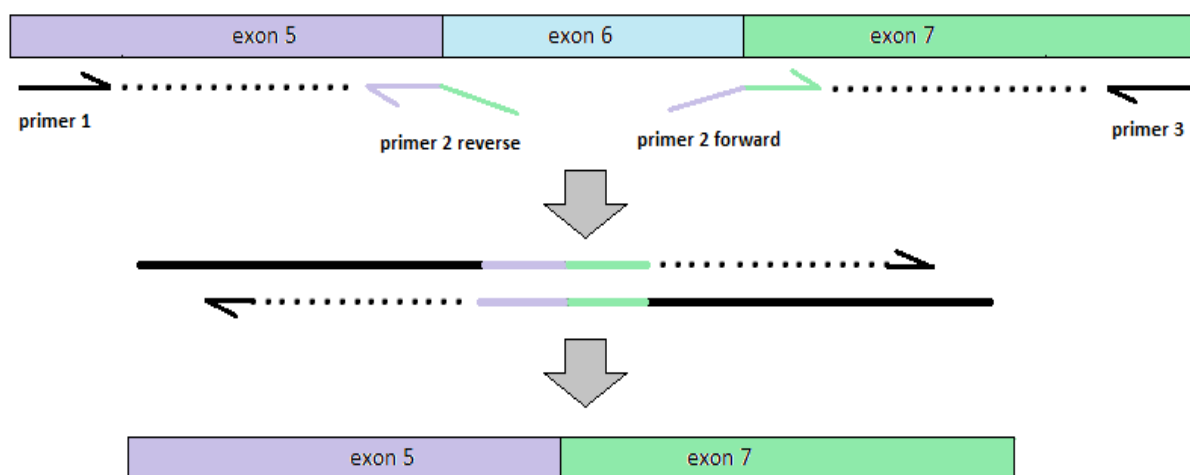
Pro odstranění bakteriálními buňkami metylovaného plazmidu s původní nepozměněnou sekvencí z reakce, bylo využito restrikční endonukleázy DpnI (New England BioLabs), jenž rozeznává sekvenci 5'Gm6ATC3'. Objem reakce byl 8 µl, dle rozpisu:

PCR reakce	5 µl
DpnI	0,2 µl
10x reakční pufr	0,8 µl
ddH <sub>2</sub> O	2 µl

Reakce probíhala při 37°C po dobu 3 h.

#### 4.4.3 PCR splicing

Sekvenční varianta c.846 + 4\_7del CHEK2 s delecí exonu 6 byla připravena pomocí PCR sestřihu (Gratchev). Tato metoda je vhodná pro přípravu i rozsáhlejších delecí studovaného proteinu in vitro (Ševčík *et al.*, 2012). Metoda PCR splicing využívá dvoukrokovou PCR reakci díky níž dochází k odstranění požadované části sekvence, jak je schematicky naznačeno na obrázku č.12.



**Obr. 12:** Schéma postupu PCR sestřihu pro přípravu varianty s in frame delecí exonu 6 *CHEK2*. V prvním kroku je jako templát použita wt sekvence *CHEK2* cDNA, ve druhém kroku jsou dosyntetizovány ve směru 5'-3' PCR produkty první reakce, které k sobě hybridizují v oblasti komplementárního primeru z první PCR. Primer 1 = spl\_f, primer 2 reverse = e6del\_r, primer 2 forward = e6del\_f, primer 3 = splf\_r.

Byl navržen oligonukleotid, jenž nasedá do přední části exonu 5. Druhý primer z tohoto páru nasedá částí na hranici exonu 5 s exonem 6, přičemž se v pozici, kde by normálně začínal první nukleotid exonu 6, nachází již první nukleotid následujícího exonu 7, a exon 6 je takto vynechán. Obdobně byly navrženy i primery pro druhé vlákno.

spl_f	CAAGAACCTGAGGACCAAGAACCTGAGGAGCC
spl_r	GCCACGGGTGTCTTAAGGCTTCTTCTGTCTG
e6del_f	GGTTCAGCAAGAGAGGCACCTTGCATCATCAAGATTA AAAAC
e6del_r	GTTTTTAATCTTGATGATGCAAGGTGCCTCTCTTGCTGAACC

Pozn.: Fialově je označen primer spl\_f, jenž nasedá do oblasti exonu 5 (na obr. 12 znázorněn fialově). Zeleně pak primer spl\_r nasedající do oblasti exonu 7 (na obr. 12 znázorněn zeleně). Primery e6del\_f a e6del\_r nasedají na rozhraní exonů 5 a 7.

Reakční objem byl 15  $\mu$ l, dle rozpisu:

Pfu polymeráza (2,5 U/ $\mu$ l)	0,375 $\mu$ l
10x reakční pufr s MgSO <sub>4</sub>	1,5 $\mu$ l
dNTP Mix (každý 10mM)	1,5 $\mu$ l
templát pDREAM_wtCHEK2 (30 ng/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
primer forward (30 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
primer reverse (30 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	10,125 $\mu$ l

Amplifikace proběhla ve 25 cyklech (95°C – 30 s; 55°C – 30 s; 72°C – 70 s) s úvodní denaturací (95°C - 1 min) a závěrečnou elongací (72°C - 10 min).

Objem reakce byl nanesen na 1% agarózový gel a PCR produkty byly separovány elektroforeticky při 55 V v 1X TBE pufru. Pro určení délky fragmentu bylo využito molekulového markeru GeneRuler DNA Ladder Mix (100-10000 bp, Fermentas). Požadované PCR produkty byly extrahovány z gelu pomocí NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) dle protokolu výrobce.

Dalším krokem byla PCR reakce v teplotním gradientu, ve které byly použity amplifikáty z předchozí reakce, které k sobě navzájem hybridizovaly. Další složky reakce byly přidány do celkového objemu 15  $\mu$ l:

<i>Pfu</i> polymeráza (2,5 U/ $\mu$ l)	0,3 $\mu$ l
10x reakční pufr s MgSO <sub>4</sub>	1,5 $\mu$ l
dNTP Mix (každý 10 mM)	0,3 $\mu$ l
amplifikát A	0,5 $\mu$ l
amplifikát B	0,5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	11,9 $\mu$ l

Amplifikace proběhla v 5 cyklech (95°C – 30 s; 60 - 72°C – 30 s; 72°C – 2 min) s úvodní denaturací (95°C - 1 min) a závěrečnou elongací (72°C - 7 min).

Požadovaný PCR produkt byl separován elektroforeticky v 1,5% agarózovém gelu v 1X TBE pufru při konstantním napětí 50 V. Následně byla DNA z gelu vyříznuta skalpelem a extrahována pomocí NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) dle protokolu výrobce.

Extrahovaná DNA byla amplifikována pomocí PCR reakce v objemu 15  $\mu$ l ve 25 cyklech (95°C – 30 s; 55°C – 30 s; 72°C – 3 min) s úvodní denaturací (95°C - 1 min) a závěrečnou elongací (72°C - 10 min).

<i>Pfu</i> polymeráza (2,5 U/ $\mu$ l)	0,3 $\mu$ l
10x reakční pufr s MgSO <sub>4</sub>	1,5 $\mu$ l
dNTP Mix (každý 10mM)	0,3 $\mu$ l
templát – fragment AB	0,5 $\mu$ l
primer forward (2,5 pmol/ $\mu$ l)	1,2 $\mu$ l
primer reverse (2,5 pmol/ $\mu$ l)	1,2 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	10 $\mu$ l

Správnost sekvence amplifikovaného úseku byla ověřena sekvenací (postup viz 4.3.4).

Pro orientované vložení sekvence DNA vzniklé PCR sestřihem do vektoru byly použity restriční enzymy ApaI a BamHI-HF (New England Biolabs), s jejichž pomocí byly



vytvořeny definované přesahy ve štěpeném plazmidu i na koncích vkládané sekvence. Pro určení, které restriční enzymy štěpí v žádaném úseku v sekvenci plazmidu pDREAM2.1/MCS s vloženým genem *CHEK2* pouze jednou bylo využito online nástroje Web Cutter (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>). BamHI-HF štěpí v celé sekvenci plazmidu pouze jednou, a to v oblasti MCS, kde rozeznává sekvenci 5' G'GATCC 3'. ApaI rozeznává a štěpí sekvenci 5' G'GGCCC 3', jež se nachází v inzertu *CHEK2*, a to v oblasti za exonem 7.

Restriční reakce probíhaly v objemu 20  $\mu$ l dle rozpisu:

10x reakční pufr Cut Smart	2 $\mu$ l
BamHI-HF	1 $\mu$ l
ApaI	1 $\mu$ l
pDREAM_wtCHEK2 (1520 ng/ $\mu$ l)	0,7 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	15,3 $\mu$ l

10x reakční pufr Cut Smart	2 $\mu$ l
BamHI-HF	1 $\mu$ l
ApaI	1 $\mu$ l
inzert (5 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	14 $\mu$ l

Pro každý enzym se optimální teplota pro jeho aktivitu lišila, proto inkubace nejprve probíhala 45 min při 25°C (ApaI), a poté byla teplota zvýšena na 37°C na dalších 45 min (BamHI-HF). Zda proběhlo štěpení bylo ověřeno pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu při 72 V. Štěpený fragment a vektor byly extrahovány z gelu a následně byla změřena jejich koncentrace pomocí přístroje NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) pro další reakci.

Konce vektoru byly ošetřeny alkalickou fosfatázou (rAPid Alkaline Phosphatase, Roche). Reakce o celkovém objemu 20  $\mu$ l byla inkubována 30 min při 37°C, enzym byl inaktivován po dobu 2 min v 75°C.

10x reakční pufr	2 $\mu$ l
vektor	8 $\mu$ l
fosfatáza	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	9 $\mu$ l

Konečným krokem pro vložení požadovaného fragmentu do vektoru byla ligační reakce. Složení reakce dle rozpisu, celkový objem 20  $\mu$ l :

5x reakční pufr	4 $\mu$ l
T4 ligáza	1 $\mu$ l
inzert (12 ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
vektor (63 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	9 $\mu$ l

Reakce byla inkubována v 22°C po dobu 5 min.

#### 4.4.4 Sekvence

Správnost veškerých sekvencí byla ověřována Sangerovým sekvenováním. Pro sekvenační reakci byl používán BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Celkový reakční objem byl 10  $\mu$ l, reakční směs:

BigDye Terminator v3.1mix	1 $\mu$ l
5x reakční pufr	1,5 $\mu$ l
primer (30 mM)	0,2 $\mu$ l
templát – analyzovaná DNA	~1 $\mu$ g
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu$ l

Reakce zahrnovala úvodní denuraci: 96°C (3 min) a a 30 cyklů (96°C - 10 s; 50°C - 5 s; 60°C - 2 min) syntézy fragmentů DNA ukončených fluorofory-značenými dideoxynukleotidovými terminátory jednotlivých bazí (ddNTPs). Následně byla DNA purifikována acetát/EDTA/ethanolovou precipitací, rozpuštěna ve 12  $\mu$ l formamidu a denaturována při 95°C 2 min. Kapilární separace proběhla v sekvenátoru 3130 Genetic

Analyzér (ABI), analýza vzorků byla prováděna softwarem Sequencing Analysis 5.2 (ABI). Pro vyhodnocení elektroforeogramů bylo použito programu FinchTV 1.3.1 (Geospiza) a nástroje Blast Alignment Search Tool ([ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)).

#### **4.5 Příprava chemicky kompetentních buněk *E. coli***

Z 5 ml tekuté kultury *E. coli* v LB médiu, která byla nechána růst přes noc, bylo odebráno 0,5 ml a zaočkováno do 50 ml čerstvého média bez antibiotik. Buňky se nechaly narůst do exponenciální fáze (optická denzita při vlnové délce 600 nm je 0,4 – 0,5), poté byla kultura inkubována na ledu 15 min a stočena při 3000 rpm, 10 min při 4°C. Peleta byla resuspendována ve 20 ml vychlazeného 0,1M CaCl<sub>2</sub>, vzniklá suspenze byla opět inkubována 15 min na ledu a stočena při 3000 rpm, 10 min při 4°C. Nyní byla peleta resuspendována v 5 ml vychlazeného 0,1M CaCl<sub>2</sub> s 15% glycerolem a inkubována 10 min na ledu. Následně byly připraveny 75 μl alikvóty do předem připravených zamrazovacích zkumavek v ethanolové lázni se suchým ledem. Kompetentní buňky pak byly skladovány v -80°C.

#### **4.6 Transformace kompetentních buněk *E. coli* TOP10, *E. coli* BL21gold**

Kompetentní buňky byly nechány roztát na ledu, poté k nim bylo přidáno 1 – 5 μl obsahujících 1 pg – 100 ng plazmidové DNA dle typu vstupního materiálu (PCR reakce, ligační reakce, miniprep). Po inkubaci 30 min na ledu následoval tepelný šok ve 42°C po dobu 30 s, hned po něm byly buňky vráceny na led a pak k nim bylo přidáno 250 μl předeřátého SOC média. Nakonec byly buňky inkubovány 1 h na třepačce při 225 rpm při 37°C. Na předeřáté misky s LB agarem s ampicilinem bylo vyséváno 50 a 100 μl buněčné suspenze a misky byly umístěny přes noc do termostatu do 37°C.

Buňky kmene *E. coli* TOP10 byly využity pro prvotní transformaci a přípravu miniprepů, avšak pro samotnou expresi proteinů nejsou vhodné, proto byly transformovány buňky kmene BL21gold. Postup transformace je stejný jako v případě TOP10 s pouhým rozdílem v době trvání tepelného šoku – u BL21 buněk je zkrácena na 20 s.

Z takto transformovaných a na Petriho misky vyšetých buněk byly připraveny tekuté kultury, ze kterých byly vytvořeny glycerolové zásobní roztoky (výsledná koncentrace glycerolu činila 20 (v/v)%) pro každou variantní sekvenci *CHEK2*.

#### 4.7 PCR na bakteriích

K ověření přítomnosti plazmidu v buňkách byla provedena PCR reakce. Z tekuté bakteriální kultury (v LB mediu) bylo odebráno 10  $\mu$ l a stočeno při 10 000 g, 3 min. K peletě byly přidány složky reakce do celkového objemu 15  $\mu$ l dle rozpisu:

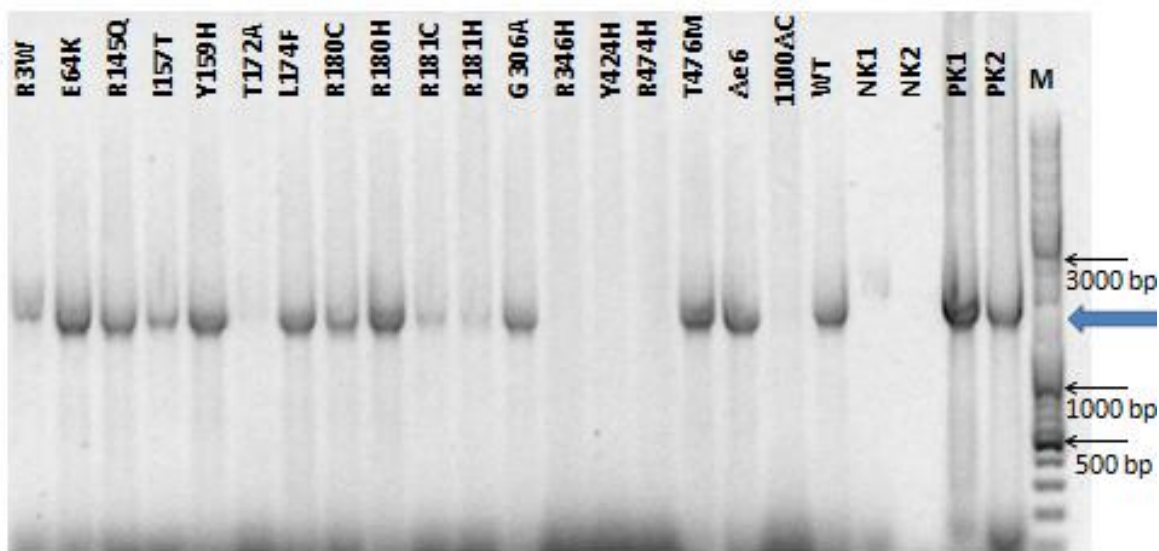
FastStart polymeráza (5 U/ $\mu$ l)	0,12 $\mu$ l
10x reakční pufr	1,5 $\mu$ l
dNTP Mix (každý 10mM)	0,3 $\mu$ l
primer forward (30 pmol/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
primer reverse (30 pmol/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	11,68 $\mu$ l

Do reakce byly zvoleny primery nasedající za hranice inzertu, aby došlo k amplifikaci celé sekvence *CHEK2*.

S6r-35	GTGAGCGGATAACAATTCCGGGACC
T7f+	GGCACTGGAGTGGCAACTTCCA

Amplifikace proběhla ve 30 cyklech (95°C – 30 s; 55°C – 30 s; 72°C – 2 min) s úvodní denaturací (95°C - 5 min) a závěrečnou elongací (72°C - 10 min).

Po amplifikaci byl výsledek ověřen elektroforeticky v 0,7% agaróze při 120 V.



**Obr. 13:** Ověření přítomnosti plazmidu v bakteriálních buňkách. Modrou šipkou je označena molekulová hmotnost očekávaného produktu – amplifikované sekvence *CHEK2*. U vzorky některých variant není viditelný produkt PCR reakce, pravděpodobně tedy neobsahovaly rekombinantní plazmid nesoucí *CHEK2* sekvenci. Tyto varianty byly opakovaně transformovány do buněk. NK1 = buňky bez plazmidu, NK2 = reakční mix bez buněk i bez plazmidu, PK1 = reakční mix s plazmidem, PK2 = reakční mix s plazmidem a buňkami, M = marker molekulových hmotností

## 4.8 Indukce exprese proteinu v buňkách *E.coli* BL21gold

### 4.8.1 Optimalizace indukce exprese proteinů

Pro optimalizaci indukce exprese byly vybrány tři varianty proteinu Chk2 – WT, 1100delC a R145Q. Z tekuté kultury buněk narostlé přes noc bylo odebráno 100  $\mu$ l a zaočkováno do 10 ml čerstvého LB média s ampicilinem. Kultura byla inkubována na třepačce (37°C, 225 rpm) do hodnoty OD<sub>600</sub> 0,5 – 0,6, kdy bylo do jednotlivých zkumavek přidáno 0,1M IPTG (Isopropyl  $\beta$  -D-1-thiogalaktopyranosid) do výsledné koncentrace 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, jedna zkumavka byla ponechána jako kontrola bez IPTG. Poté byla kultura inkubována při 37°C po dobu 3 h a každých 30 min bylo měřeno OD<sub>600</sub>. Druhá část vzorků byla po přidání IPTG inkubována při 30°C po dobu 5 h. Po uplynutí doby inkubace byly kultury stočeny při 4000 rpm, 20 min a zamrazeny v -80 °C.

### 4.8.2 Indukce exprese proteinů pomocí IPTG

Po optimalizaci indukce exprese proteinů byla zvolena indukce IPTG o finální koncentraci 50  $\mu$ M a teplota inkubace 37°C. Každá varianta proteinu Chk2 (WT Chk2 jako pozitivní kontrola, 1100delC se ztrátou kinázové aktivity jako negativní kontrola, 18 missence variant

a Chk2 s delecí exonu 6) byla zpracovávána v triplikátech. Z důvodu časové náročnosti byly varianty rozděleny do tří skupin, přičemž v každé skupině byly varianty WT a 1100delC jako reference. Kvůli dalšímu kroku izolace byly kultury některých variant po indukci IPTG nechány růst déle než 3 h, a to do  $OD_{600} > 1$ . Expresce proteinů byla ověřena pomocí western blotu (viz 4.9).

#### 4.9 Optimalizace lýzy buněk

Pro lýzi bylo využito dvou přístupů, prvním byly buňky *E.coli* lyzovány sonikací a lyzačním roztokem s detergentem NP40 a inhibitory proteáz (Schwarz et al., 2003). Pro zachování neporušených proteinů byly vzorky uchovávány po celou dobu manipulace na ledu.

Rozpis pro přípravu 10 ml lyzačního roztoku:

5M NaCl	0,3 ml
10% NP-40 (Tergitol)	1 ml
1M TrisCl, pH 8,0	0,5 ml
ddH <sub>2</sub> O	8,2 ml
inhibitory proteáz cComplete (Roche)	1 tableta

Výsledné koncentrace jednotlivých složek v roztoku byly 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 50 mM TrisCl, pH 8,0. Nakonec byl přidán lysozym do výsledné koncentrace 1 mg/ml.

Pelety připravené v předešlém kroku, které byly zamrazeny v -80 °C, byly resuspendovány v NP-40 lyzačním roztoku a ponechány 20 min na ledu. Následně byly vzorky sonikovány 4x po dobu 10 s vždy s pauzou 10 s. Poté byly vzorky stočeny při 4°C po dobu 10 min při 13000rpm, nakonec byl oddělen požadovaný supernatant do čisté zkumavky.

V druhém přístupu byl využit komerční kit cComplete Lysis-B (Roche) a to především proto, aby mohlo být zpracováno více vzorků naráz a vyvarovalo se zbytečným prostojům při práci s nativními proteiny. Postup byl dodržen dle protokolu výrobce, kdy byl oproti původnímu přístupu eliminován krok sonikace a k lýzi bylo využito pouze vortexování a centrifugace. Porovnáním vzorků zpracovaných oběma přístupy byly zjištěny stejné výsledky.

Koncentrace buněčných lyzátů byly změřeny pomocí Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Life Technologies) dle protokolu výrobce na přístroji NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) .

#### 4.10 Proteinová elektroforéza SDS-PAGE, western-blotting a imunodetekce

K ověření exprese proteinu bylo použito imunodetekce. Nejprve byly proteiny v buněčném lyzátu separovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Jednotlivé buněčné lyzáty byly naředěny lyzačním roztokem tak, aby v nanášce o objemu 25 µl bylo 5 ng celkového proteinu a byl přidán 6x koncentrovaný SDS vzorkový pufr. Před nanesením na gel byly vzorky denaturovány 5 min při 95°C. Pro separaci bylo použito dvou gelů – separačního a zaostřovacího, složení dle rozpisu:

a) 8% separační gel:

30% akrylamid/ 0,8% bisakrylamid	1,875 ml
4x Tris-Cl/SDS 1,5M, pH 8,8	1,875 ml
dH <sub>2</sub> O	3,75 ml
10% persíran amonný	25 µl
TEMED	4 µl

b) zaostřovací gel

30% akrylamid/ 0,8% bisakrylamid	325 µl
4x Tris-Cl/SDS 0,5M, pH 6,8	625 µl
dH <sub>2</sub> O	1525 µl
10% persíran amonný	12,5 µl
TEMED	2,5 µl

Separace probíhala při konstantním napětí 150 V v 1xTrisGlycinovém pufru (Bio-Rad), pro určení molekulových hmotností byl použit marker Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad).

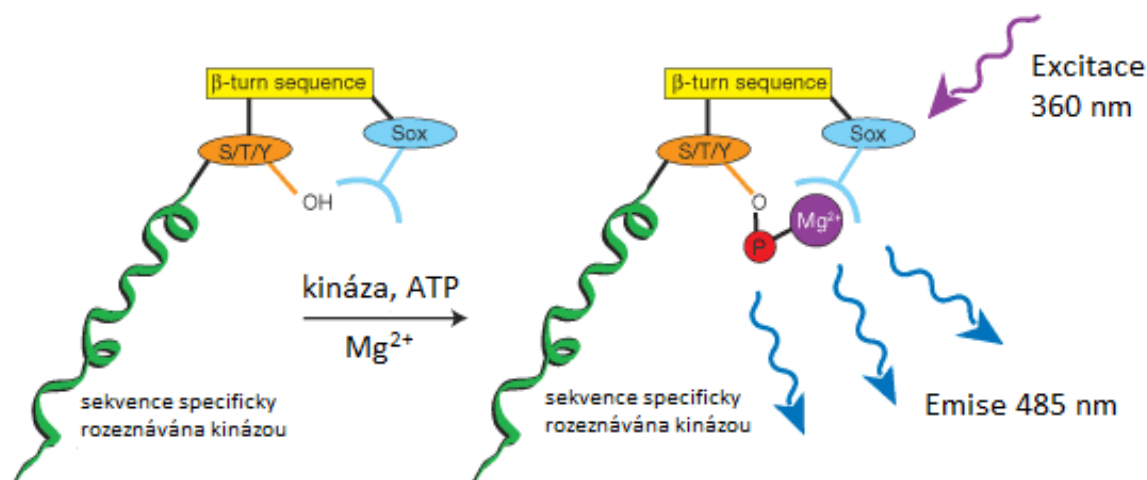
Proteiny z gelu byly poté přenášeny na PVDF (polyvinylidene difluorid) membránu (Hybond, Amersham Biosciences). Tento druh membrány musí být před použitím aktivován namočením do 100% metanolu, poté je membrána omyta destilovanou vodou a namočena do transferového pufru s 10% metanolem. Přenos probíhal v tzv. „wet“ uspořádání při napětí 100 V v transferovém pufru při 4°C. Úspěšnost přenosu byla ověřena pomocí barvení PonceauS staining solution (Sigma).

PVDF membrána s přenesenými proteiny byla dále blokována v PBS s 3% sušeným mlékem a 0,1% Tween20 po dobu 30 min při pokojové teplotě na třepačce. Membrána byla omyta 3x po dobu 10 min v PBS 0,1% Tween20. Následně byla membrána inkubována s primární protilátkou (Anti-FLAG, myší, 3000x) v PBS s 1% sušeným mlékem a 0,1% Tween20 ve 4°C přes noc. Membrána byla opět opláchnuta v PBS s 0,1% Tween20. Inkubace se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (Anti-mouse,IgG-HRP, kozí, 200000x) v PBS s 1% sušeným mlékem a 0,1% Tween20 probíhala po dobu 1h při pokojové teplotě. Nakonec byla membrána omyta v PBS s 0,1% Tween20. Signál byl detekován chemiluminiscenčně po přidání substrátu peroxidázy (Super Signal West Pico Substrate Chemiluminiscent, ThermoScientific) na radiografický film (Amersham Hyperfilm™ MP).

#### **4.11 Funkční analýza kinázové aktivity**

Pro analýzu samotné kinázové aktivity jednotlivých variantních proteinů Chk2 byl zvolen komerční kit Omnia® S/T Peptide 3 Kinase assay kit (Life Technologies). Pro reakci není potřeba izolovat zkoumaný protein a jeho aktivitu lze měřit v buněčném lyzátu (Shults, Janes, Lauffenburger, & Imperiali, 2005). Principem je měření změny fluorescence, která je přímo závislá na fosforylaci substrátu danou kinázou, a tudíž její aktivitě. Substrátem je peptid specificky rozeznáván kinázou, ke kterému je připojen fluorofor Sox (8-hydroxy-5-(N,N-dimethylsulfonamid)-2-methylchinolin) (Shults & Imperiali, 2003). Po fosforylaci dojde k propojení Sox s nově připojeným fosfátem, na specifickém threoninovém zbytku díky chelatovaným  $Mg^{2+}$  iontům. Po následné excitaci při 360 nm lze pozorovat výrazný nárůst emise fluorescence s maximem při 485 nm. Tato reakce je natolik specifická a citlivá, že ji lze provádět i v hrubém buněčném lyzátu.





**Obr. 14:** Princip kinázové analýzy. Převzato a upraveno dle <http://www.lifetechnologies.com>.

Množství zkoumané kinázy, které bude použito do reakce musí být stanoveno empiricky, přičemž optimální je, aby závislost relativních fluorescenčních jednotek (odpovídajících aktivitě kinázy) vynesena do grafu oproti času, vykazovala přibližně lineární průběh. Pro tyto účely byla zvolena varianta WT Chk2, u které byla předpokládána nejvyšší aktivita, a varianta 1100delC, jenž nevykazuje aktivitu žádnou. Byly změřeny koncentrace proteinů v buněčných lyzátech těchto dvou variant a ředěním dvojkovou řadou bylo dosaženo následujících množství celkového proteinu dávaných do reakcí: 65,4  $\mu\text{g}$ ; 32,7  $\mu\text{g}$ ; 16,4  $\mu\text{g}$ ; 8,2  $\mu\text{g}$ ; 4,1  $\mu\text{g}$ ; 2,0  $\mu\text{g}$ ; 1,0  $\mu\text{g}$ ; 0,5  $\mu\text{g}$ .

V případě, kdy by bylo enzymu v reakci mnoho, došlo by k rychlému spotřebování substrátu a saturaci enzymu, a výsledné křivky by byly příliš strmé. V opačném případě by enzym nestíhal substrát fosforylovat, reakce by probíhala sice déle, ale průběh křivek by opět nevyhovoval. Lineární závislost byla žádoucí pro možnost porovnání průběhu reakce u jednotlivých variantních enzymů, kdy bylo předpokládáno, že nejvyšší aktivity, a tím i míry fluorescence, bude dosahovat varianta WT Chk2 a fluorescence ostatních se bude pohybovat v nižších hodnotách. Toto množství bylo určeno u varianty WT Chk2 na 1  $\mu\text{g}$  celkového bakteriálního proteinu. Obdobné množství (1,5  $\mu\text{g}$ ) použili do reakce Desrichard et al. (2011).

Složení reakce o objemu 20  $\mu$ l:

10x kinázový reakční pufr	2 $\mu$ l
10x Omnia® Peptide Substrate	2 $\mu$ l
10x ATP roztok	2 $\mu$ l
10x DTT roztok	2 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	7 $\mu$ l
celkový bakteriální protein	5 $\mu$ l (~1 $\mu$ g)

Všechny varianty proteinu byly vyhotoveny ve třech biologických replikátech, z nichž každý měl svůj technický duplikát. Množství celkového proteinu, které bylo přidáváno do reakce bylo pro každý vzorek 1 a 1,5  $\mu$ g v objemu 5  $\mu$ l. Reakce byla připravena v černé 384-jamkové destičce (Corning 3676) a měřena na přístroji FLUOstar Omega Microplate Reader (BMG Labtech). Míra fluorescence byla zaznamenávána každých 90 s po dobu 1 h.

#### 4.12 *In silico* predikce

Interpretace mutací vedoucích k předčasnému ukončení čtecího rámce, kdy vzniká zkrácený proteinový produkt je poměrně jednoduchá, obzvláště pokud chybí značná část kinázové domény a enzym je tak nefunkční. Naproti tomu u řady missense mutací, jejichž vlivem došlo k záměně jedné aminokyseliny v proteinovém řetězci, nelze vliv této záměny předem jednoduše vyložit. Programy SIFT, PolyPhen2 a Align-GVGD jsou nástroje, které hodnotí, zda má určitá aminokyselinová záměna na funkci proteinu vliv.

Nástroj SIFT (**S**orting **I**ntolerant **f**rom **T**olerant), dostupný na <http://sift.jcvi.org/>, pracuje na základě sekvenční homologie a podobnosti fyzikálně-chemických vlastností aminokyselin – pokud je aminokyselina v určité pozici vysoce konzervovaná, je její záměna vyhodnocena jako intolerantní, naopak při nižším stupni konzervovanosti je záměna spíše tolerována. (Kumar, 2009) Výsledkem je skóre, které určuje pravděpodobnost, že je změna je tolerována, tudíž výsledky blíže k 0 značí negativní vliv dané záměny. Varianty s hodnotami <0,05 jsou označovány za zhoubné, ostatní za tolerované.

PolyPhen2 (**P**olymorphism **P**henotyping **v2**) se na rozdíl od SIFT nezaměřuje jen na sekvenční homologii, ale také na 3D strukturu proteinu přístupnou z databází jakou je např. PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). PolyPhen2 je dostupný na adrese <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>. Výstupem je hodnota

udávající pravděpodobnost, že je substituce zhoubná, a tak na rozdíl od SIFT, jsou hodnoty blíže 0 považovány za tolerované. Připojena je také kvalitativní predikce v podobě čtyř úrovní – „pravděpodobně zhoubná“, „možná zhoubná“, „benigní“ a „neurčeno“. (Adzhubei, 2010)

Align-GVGD (Grantham Variation, Grantham Deviation), pracuje se sekvenční homologií a záměny ve vysoce konzervovaných místech hodnotí dle fyzikálně-chemických vlastností aminokyselin (Tavtigian *et al.*, 2008). Pravděpodobnost, že substituce je zhoubná vyjadřuje škála od „C0“ do „C65“, kde třída „C65“ značí nejvyšší pravděpodobnost. Nástroj je dostupný z <http://agvgd.iarc.fr>, kde má uživatel možnost srovnání své sekvence zájmu s některým z důležitých predizpozičních genů (např. *BRCA1*, *CHEK2*) a lze volit i „hloubku“ pro srovnávání konzervovanosti, např. u *CHEK2* od člověka po *Drosophila melanogaster* nebo *Danio rerio*.

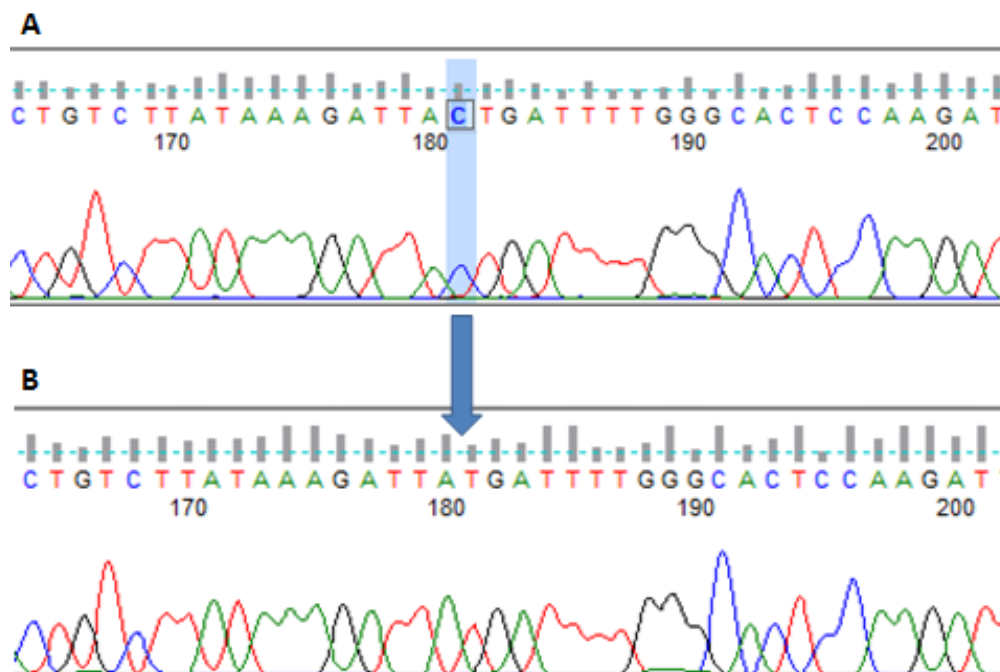
Všechny výše zmíněné nástroje pracují s kódujícími sekvencemi genů. CADD (Combined Annotation Dependent Depletion, <http://cadd.gs.washington.edu/>) je schopen vyhodnotit riziko substituce i v nekódujících oblastech, jakožto netolerantní záměny nejsou omezeny pouze na exonové sekvence genů (Kircher, 2014). Výsledné skóre u missense variant dosahuje maximální hodnoty 35, přičemž substituce s hodnotou >15 jsou považovány za netolerované.

## 5 Výsledky

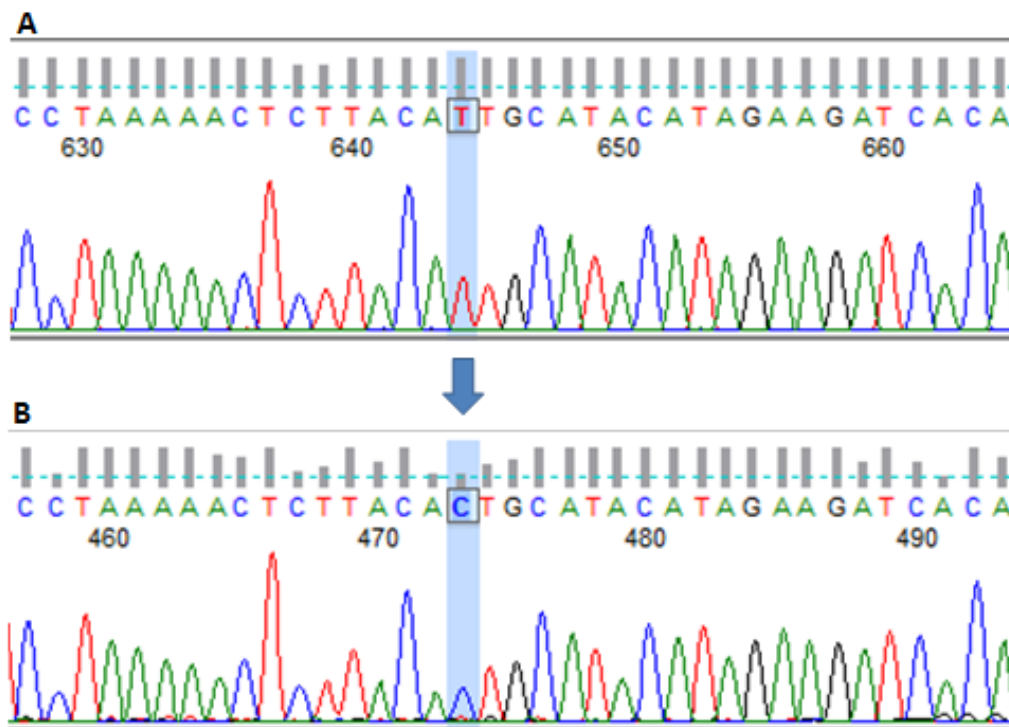
### 5.1 Konstrukce plazmidů s variantními sekvencemi *CHEK2*

#### 5.1.1 Příprava varianty 1100delC *CHEK2* a missense variant

Pomocí site-directed mutagenese byly připraveny vektory nesoucí variantní sekvence genu *CHEK2*, které byly transformovány do bakteriálních buněk. Úspěšnost transformace byla viditelná při výsevu na Petriho misky s LB agarem s ampicilinem, kdy vyrostly pouze kolonie obsahující plazmid nesoucí ampicilinovou rezistenci. Z těchto kolonií bylo vybráno pět, ze kterých byly připraveny tekuté kultury a následně miniprepy. Správnost sekvence inzertu byla ověřena sekvenací.



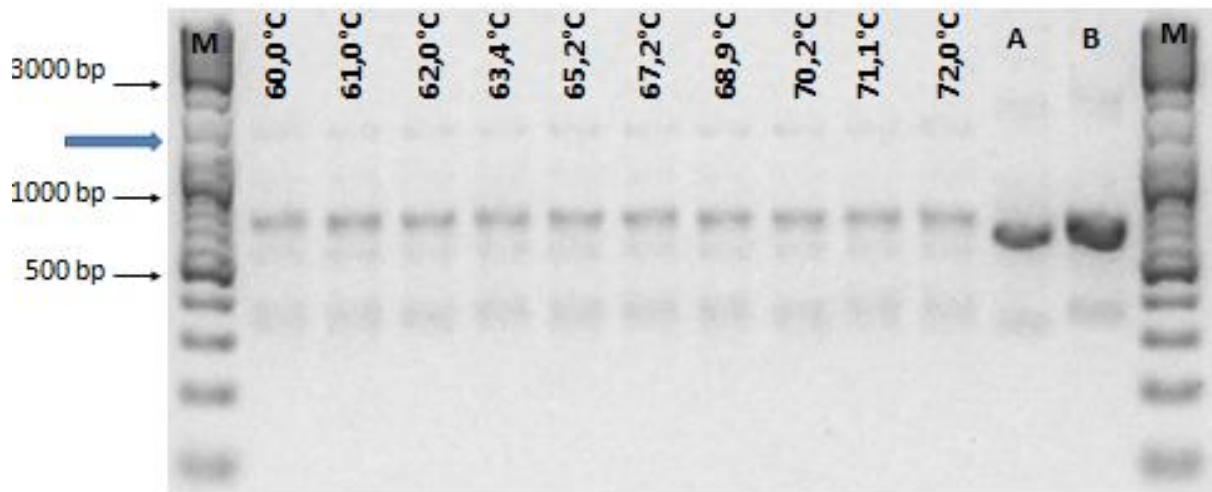
**Obr. 15:** Sekvence varianty *CHEK2* 1100delC. Původní WT sekvence obsahující cytosin v pozici 1100 kódující sekvence (A). Stejná pozice v sekvenci, kde je po site-directed mutagenesi nukleotid deletován (B).



**Obr. 16:** Příklad sekvenční missense varianty *CHEK2* – I157T. Původní WT sekvenční obsahující thymin v pozici 470 kódující sekvenční tripletu ATT (A). Sekvenční s jednonukleotidovou záměnou za cytosin na triplet ACT vedoucí k nekonzervativní záměně aminokyselin p.I157T (B).

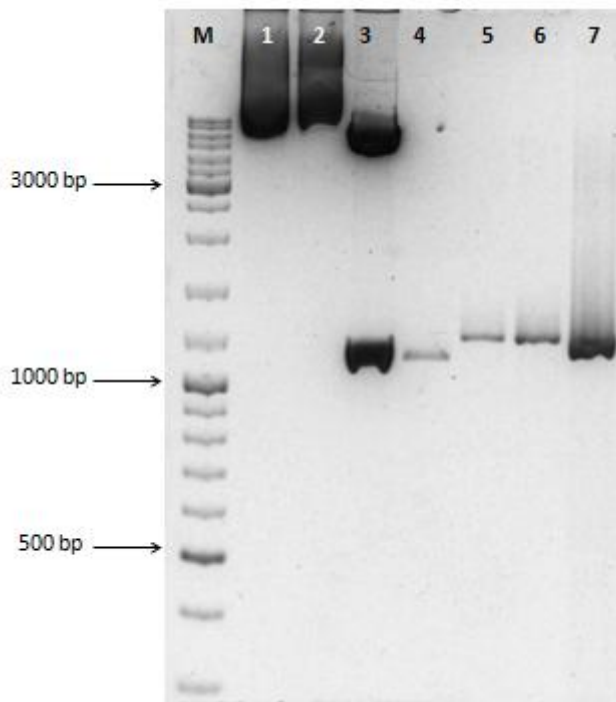
### 5.1.2 Příprava varianty c.846 + 4\_7del *CHEK2*

Varianta c.846 + 4\_7del *CHEK2* znamená in frame delecí 54 nukleotidů odpovídající výpadku 17 aminokyselin. Tato varianta byla připravena metodou PCR sestřihu, kdy pomocí dvou párů primerů došlo k odstranění sekvenční odpovídající exonu 6. Při prvních PCR reakcích byly amplifikovány dva úseky (označeny A a B), jenž byly k sobě komplementární v části odpovídající primerům. Tyto úseky byly v další PCR reakci spojeny ve výsledný fragment již bez sekvenční exonu 6. PCR reakce probíhala v teplotním gradientu, kdy zvolené teploty elongační fáze byly v rozmezí 60 – 72°C. DNA o odpovídající molekulové hmotnosti byla z gelu extrahována a použita v dalším kroku.



**Obr. 17:** Elektroforetický gel PCR v teplotním gradientu. A, B = produkty PCR reakce předešlého kroku amplifikát A, B (viz text výše nebo oddíl 5.4.3.), M = marker molekulových hmotností; Dominantní bandy značí fragmenty A (560 bp) a B (610 bp), u kterých nedošlo ke vzájemnému spojení. Velikost žádaného produktu, kdy jsou oba fragmenty spojeny v jeden je označena modrou šipkou.

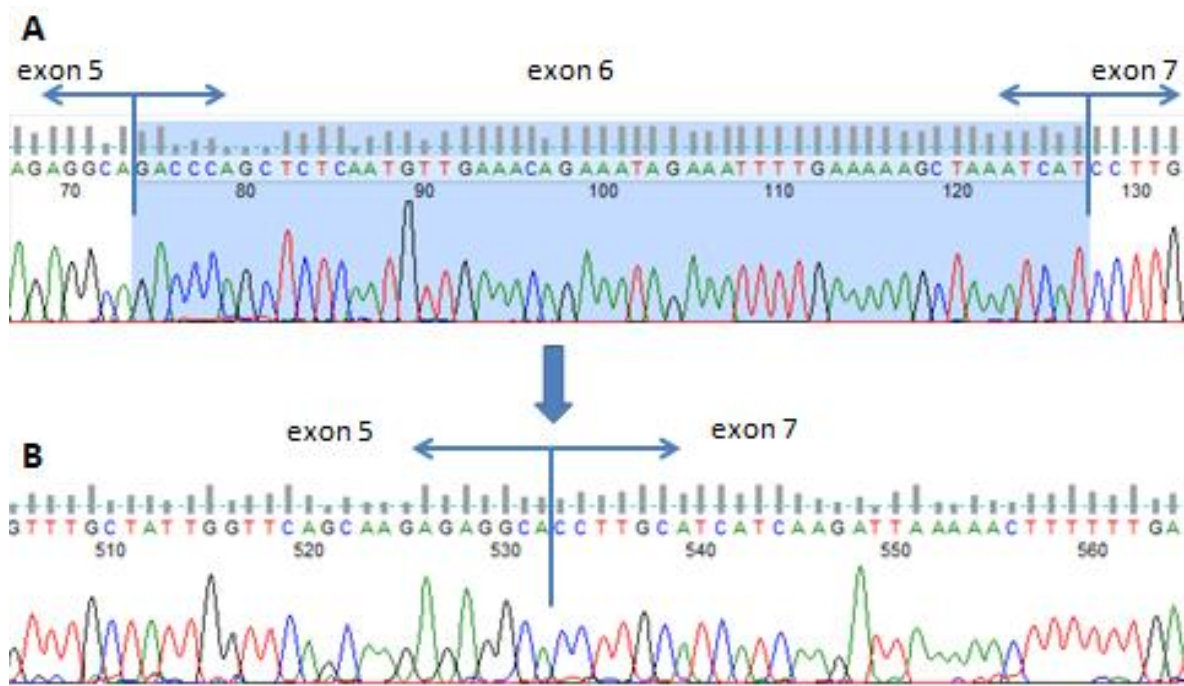
Dále byly pomocí restrikčních enzymů BamHI-HF a ApaI štěpeny sekvence připraveného fragmentu a plazmidu, čímž bylo docíleno vytvoření přesahujících úseků na koncích pro orientované vložení fragmentu do vektoru. Úspěšnost tohoto kroku byla ověřena elektroforetickou separací.



**Obr. 18:** Restrikce enzymy ApaI a BamHI-HF.

Vzorek č.1: 1  $\mu$ l plazmidu s WT *CHEK2* sekvencí ( $c = 1520$  ng/ $\mu$ l); 2: 0,5 $\mu$ l plazmidu s WT *CHEK2* sekvencí ( $c=1520$  ng/ $\mu$ l); 3: je 10  $\mu$ l plazmidu po restrikci; 4: 10  $\mu$ l PCR eluátu ( $c = 5$  ng/ $\mu$ l) po restrikci; 5: 2,5  $\mu$ l PCR eluátu; 6: 5  $\mu$ l PCR eluátu; 7: 3  $\mu$ l původní PCR

Následně byl fragment vložen do vektoru pomocí ligačního enzymu a správnost sekvence celého inzertu byla opět ověřena sekvenací.



**Obr. 19:** Sekvence varianty *CHEK2* c.846+4\_7del. Původní WT sekvence s vyznačeným exonem 6 (A). Sekvence s delecí c.846+4\_7del, vedoucí k výpadku exonu 6 a zkrácení proteinového produktu p.D265\_H282del o 18 aminokyselin (B).

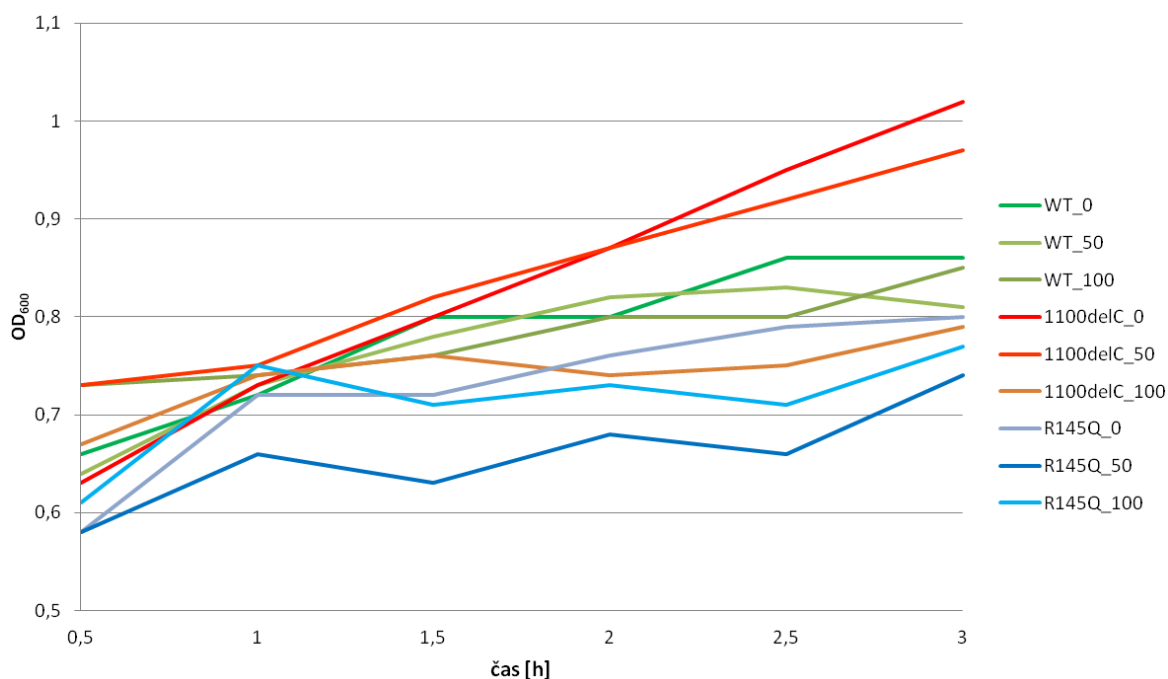
## 5.2 Transformace buněk *E.coli*

Úspěšnost transformace buněk byla ověřena vyšetím na LB agar s ampicilinem, kdy buňky nesoucí plazmid byly k tomuto antibiotiku rezistentní. Transformovány byly dva kmeny buněk *E.coli* – TOP10, kdy byla úspěšná transformace plazmidů se všemi variantními sekvencemi *CHEK2*, a BL21 u kterého se nepodařilo zanést plazmid kódující variantu R346H.

## 5.3 Exprese proteinů

### 5.3.1 Optimalizace indukce exprese proteinů

Pro určení optimálních podmínek indukce exprese proteinu byly tekuté kultury buněk *E. coli* BL21 v exponenciální fázi jejich růstu ( $OD_{600}$  okolo 0,6) indukovány dvěma objemy IPTG a to do konečných koncentrací 50 a 100  $\mu\text{M}$ . Buňky pak rostly po dobu dalších 3 h v 37°C, kdy bylo měřeno  $OD_{600}$  a sledován jejich růst. Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu v závislosti na čase. Z křivek lze pozorovat rozdílné průběhy růstu buněčných kolonií nesoucích plazmidy s odlišnými variantami kinázy Chk2.

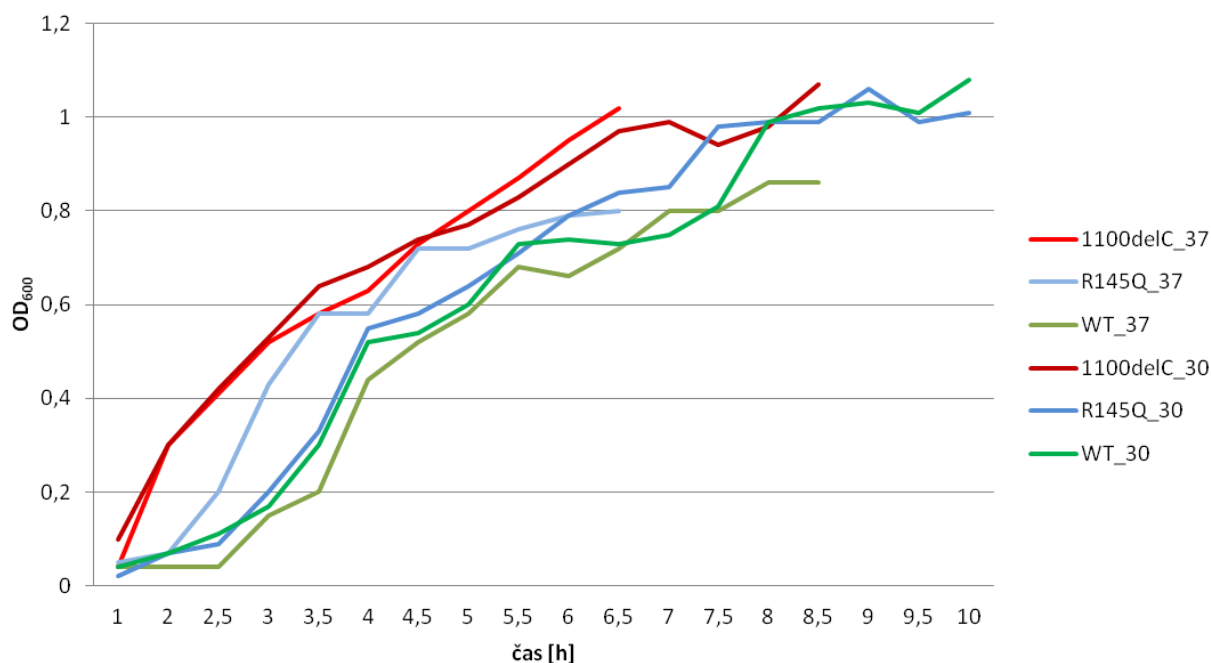


**Obr. 20:** Růstové křivky bakterií exprimující variantní Chk2 kinázu při 37°C po indukci různou koncentrací IPTG (50 $\mu\text{M}$  IPTG = „50“; 100 $\mu\text{M}$  IPTG = „100“), případně neindukované (= „0“). Růst buněk se zpomaloval se vzrůstající koncentrací IPTG, resp. expesí kinázy Chk2.

Protein Chk2 se normálně u bakterií nevyskytuje, pro buňku tedy exprese této kinázy není pravděpodobně nijak žádoucí, jelikož Chk2 může fosforylovat proteiny důležité pro její funkci. V případech, kdy je proteinový produkt pro buňku toxický nebo výrazně omezuje její funkci a růst, je volena nižší teplota kultivace buněk po indukci exprese, např. kultivace při 16°C přes noc. V případě Chk2 byla pro srovnání zvolena indukce exprese při snížené teplotě 30°C.

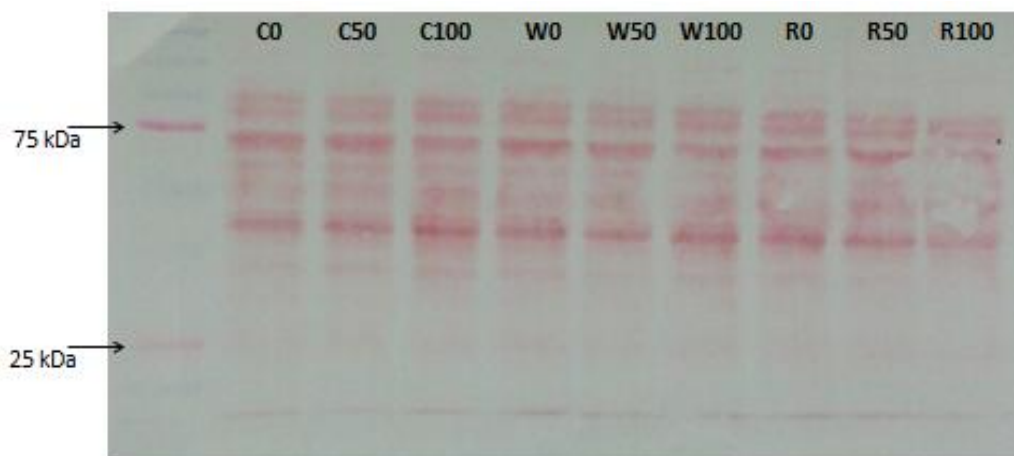


U buněk nesoucích plazmid s variantou 1100delC, která kinázovou aktivitu postrádá, nebylo patrné omezení rychlosti jejich růstu. Naopak plazmid s variantou WT Chk2, z něhož probíhala exprese aktivní kinázy, způsobil u buněk zpomalení růstu. Z missense variant byla vybrána R145Q, jež taktéž zpomalovala růst buněk, avšak ne v takové míře jako WT varianta.



**Obr. 21:** Graf znázorňující růst buněk exprimujících různé varianty Chk2 (WT, 1100delC, R145Q) při teplotách 37°C (= „\_37“) a 30°C (= „\_30“). Z průběhu křivek je patrné, že buňky s plazmidem nesoucím katalyticky neaktivní variantu 1100delC rostou nejrychleji, a to při obou teplotách. Nejpomaleji rostou buňky exprimující WT Chk2.

Narostlé buněčné kolonie byly lyzovány, poté byla změřena celková koncentrace proteinů v hrubém buněčném lyzátu a koncentrace jednotlivých vzorků sjednoceny. Vzorky byly poté nanášeny na SDS-PAGE elektroforézu v množství 20 µg, případně 5 µg.. Poté následoval western blotting; kvantita nanášky celkového proteinu na SDS-PAGE elektroforézu byla zjišťována z barvení roztokem Ponceau (Obr. 22 a 23). Z výsledků bylo patrné, že mezi jednotlivými vzorky nejsou významné rozdíly v celkovém množství buněčných proteinů v lyzátu a následném postupu při sjednocování koncentrací.



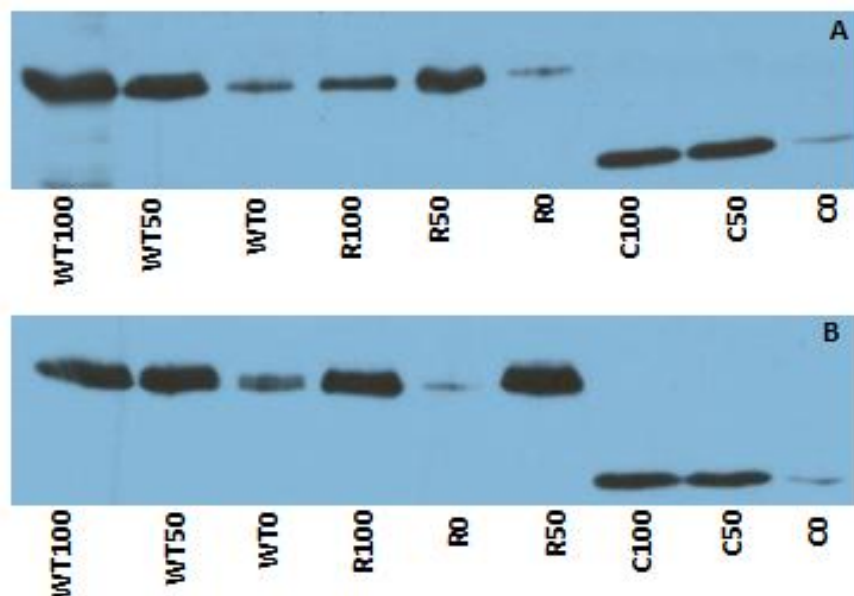
**Obr. 22:** Obrázek SDS-PAGE hrubého lyzátu buněk *E. coli* BL21 exprimujících variantu c.1100delC (C), WT formu Chk2 (W) a variantu R145W (R) po barvení Ponceau ukazuje stejnoměrnou nanášku celkového proteinu při kontrole stanovení koncentrace proteinů v lyzátu před měřením kinázové aktivity. Indukce exprese proteinů v bakteriích pomocí IPTG při 37°C po dobu 3 h. Vzorky označené „0“ jsou buněčné lyzáty z neindukovaných buněk. Označení „50“, respektive „100“ znamená, že buňky byly indukovány IPTG ve výsledné koncentraci 50 μM, respektive 100 μM.



**Obr. 23:** Obrázek SDS-PAGE hrubého lyzátu buněk *E. coli* BL21 exprimujících variantu c.1100delC (C), WT formu Chk2 (W) a variantu R145W (R) po barvení Ponceau ukazuje stejnoměrnou nanášku celkového proteinu při kontrole stanovení koncentrace proteinů v lyzátu před měřením kinázové aktivity. Indukce exprese proteinů v bakteriích pomocí IPTG při 30°C po dobu 5 h. Vzorky označené „0“ jsou buněčné lyzáty z neindukovaných buněk. Označení „50“, respektive „100“ znamená, že buňky byly indukovány IPTG ve výsledné koncentraci 50 μM, respektive 100 μM.

Expresa Chk2 byla specificky zjišťována pomocí western blottingu s protilátkou proti epitopu FLAG. V tomto případě již bylo možné pozorovat očekávané rozdíly, jelikož exprese Chk2 probíhala z plazmidu, jenž byl indukován různými koncentracemi IPTG, případně neindukován. U všech vzorků bylo detekováno alespoň malé množství Ch2, a to i u vzorků,

k nimž nebylo přidáno IPTG, což značí bazální expresi z plazmidu i bez indukce. Mezi vzorky indukovanými 50 či 100 $\mu$ M koncentrací IPTG nebyl patrný významný rozdíl v množství exprimovaného Chk2. Stejně tak nebyla pozorovatelná výrazná změna ani u různých teplot (30°C nebo 37°C) po indukci.



**Obr. 24:** Indukce exprese Chk2 v bakteriích pomocí IPTG při 37°C po dobu 3 h (A), při 30°C po dobu 5 h (B). Vzorky varianty c.1100delC jsou kratší, jelikož tato mutace způsobuje předčasnou terminaci translace a proteinový produkt je tak zkrácen o značnou část kinázové domény, a tudíž na gelu putuje rychleji.; C = 1100delC, R = R145Q; Vzorky označené „0“ jsou z neindukovaných buněk. Označení „50“, respektive „100“ znamená, že buňky byly indukovány IPTG ve výsledné koncentraci 50  $\mu$ M, respektive 100  $\mu$ M.

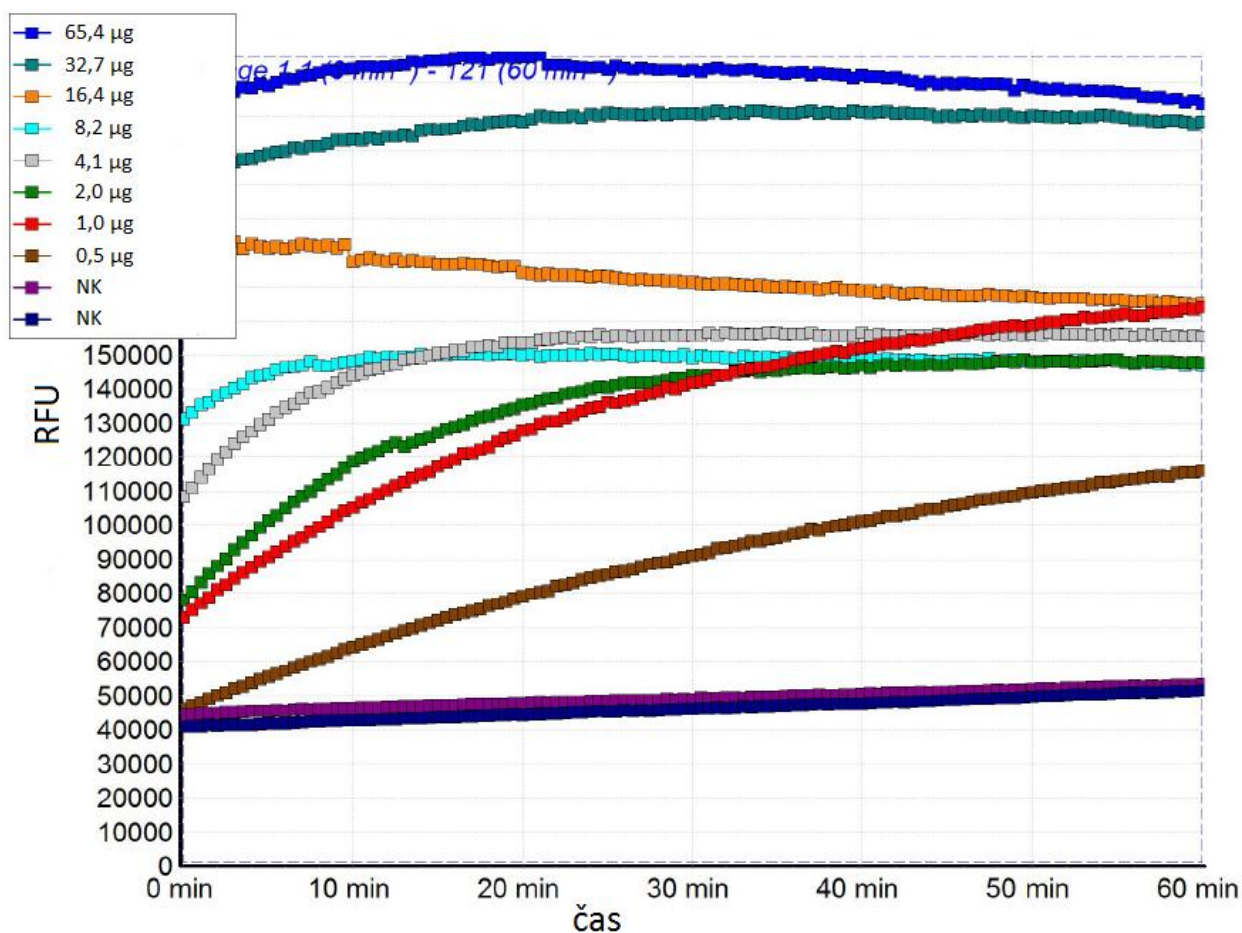
Na základě výsledků optimalizací jsme určili podmínky indukce exprese Chk2 při koncentraci IPTG 50 $\mu$ M, za teploty 37°C po dobu 3 h.

## 5.4 Stanovení kinázové aktivity

### 5.4.1 Optimalizace vstupního množství enzymu

Aktivitu studovaných izoforem Chk2 kináz bylo možné měřit v hrubém buněčném lyzátu. Množství kinázy do reakce bylo určeno množstvím celkového bakteriálního proteinu, které bylo nutné určit experimentálně. Pro různá množství proteinů byl ředěn lyzáat s variantou Chk2 dvojkovou řadou. Fluorescence probíhající reakce byla měřena v intervalu 30 s po dobu

1 h. Naměřené hodnoty (relativní fluorescenční jednotky) byly vyneseny do grafu v závislosti na čase. Z křivek bylo určeno vstupní množství celkového proteinu do reakce na 1  $\mu\text{g}$ .

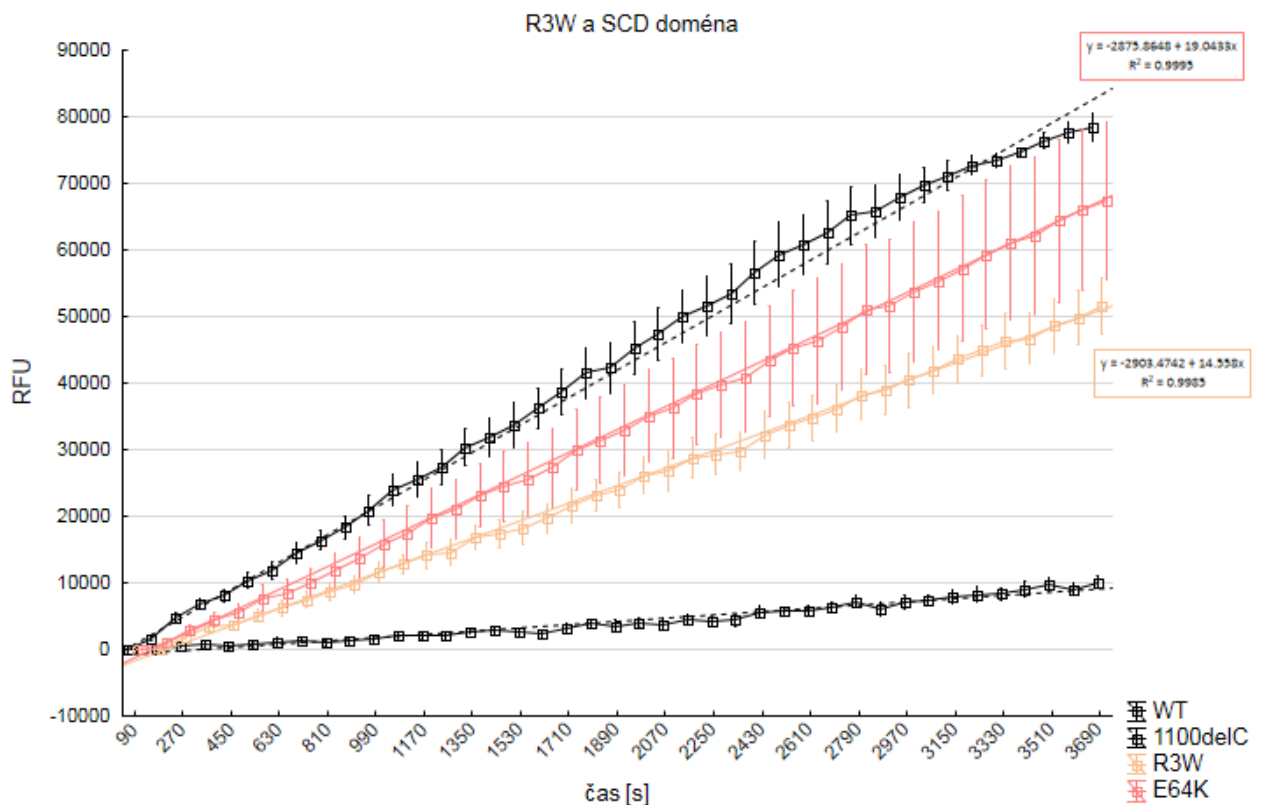


**Obr. 25:** Výstup z měření kinázové aktivity WT Chk2 v různých koncentracích. Míra fluorescence je určena RFU (= relativní fluorescenční jednotka). NK – negativní kontroly bez proteinu

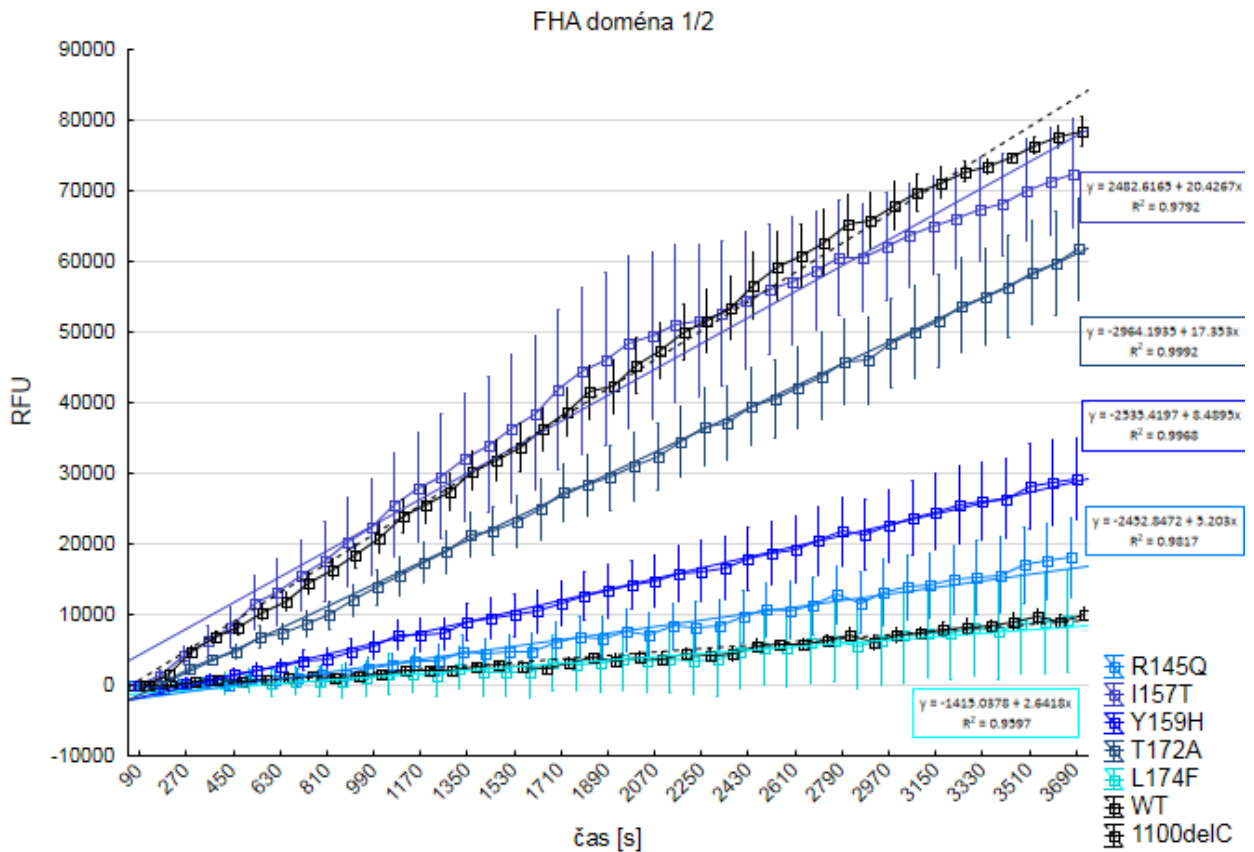
#### 5.4.2 Měření kinázové aktivity variantních proteinů Chk2

Krokem optimalizace bylo určeno vstupní množství celkového proteinu na 1  $\mu\text{g}$ . V práci Desrichard et al. (2011) použili 1,5  $\mu\text{g}$ , a proto bylo toto množství pro případné srovnání taktéž paralelně použito.

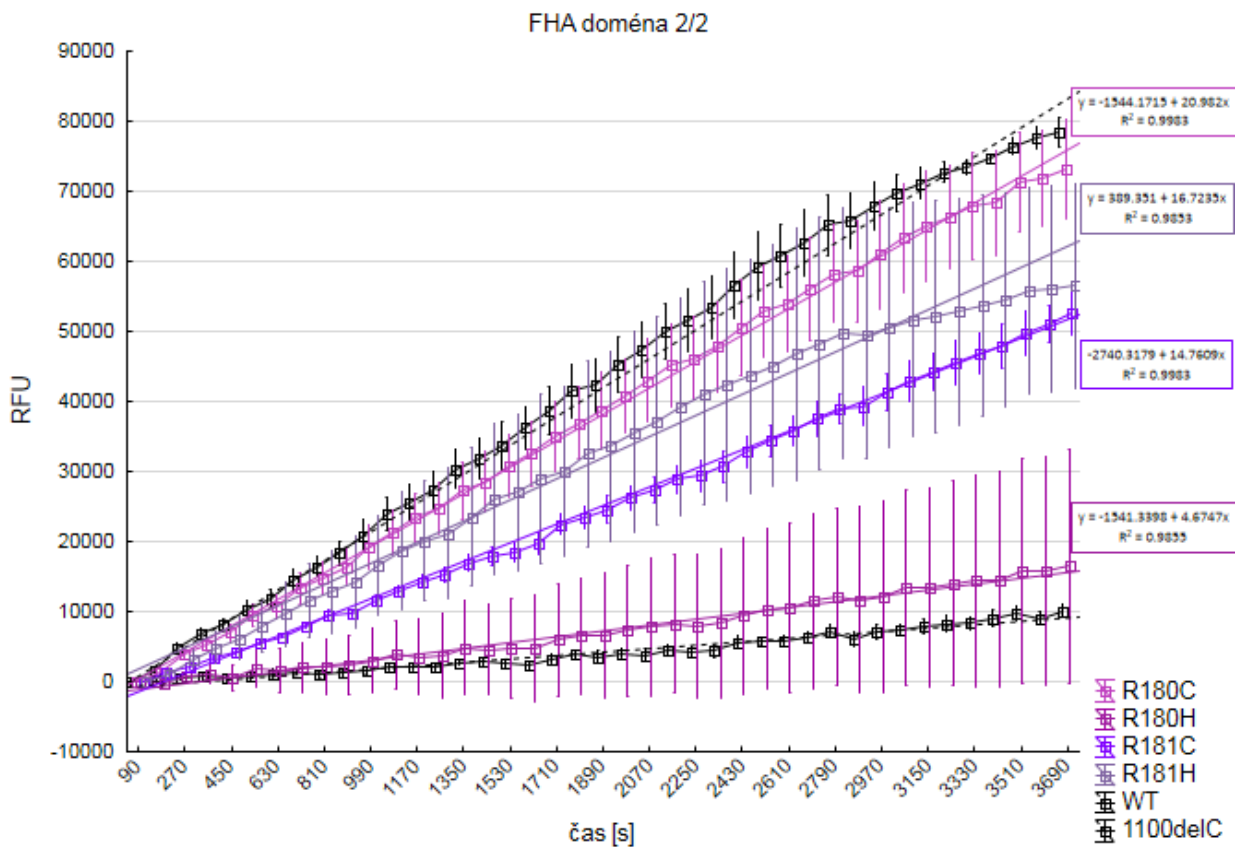
Aby byl přístroj FLUOstar Omega Microplate Reader (BMG Labtech) schopen proměřit všechny jamky se vzorky v 384-jamkové destičce, byla fluorescence měřena v intervalech 90 s po dobu 1 h. Získaná hrubá data byla zpracována (počítán průměr hodnot dvou technických duplikátů každého ze tří biologických triplicátů a byla provedena lineární regrese) a zobrazena pomocí programu STATISTICA 12. Výsledné křivky jednotlivých variantních kináz jsou rozděleny do grafů dle domén, ve kterých se mutace nachází. V každém grafu jsou zobrazeny varianty wt Chk2 kinázy a katalyticky neúčinné varianty c.1100delC jako reference pro plnou a nulovou kinázovou aktivitu Chk2.



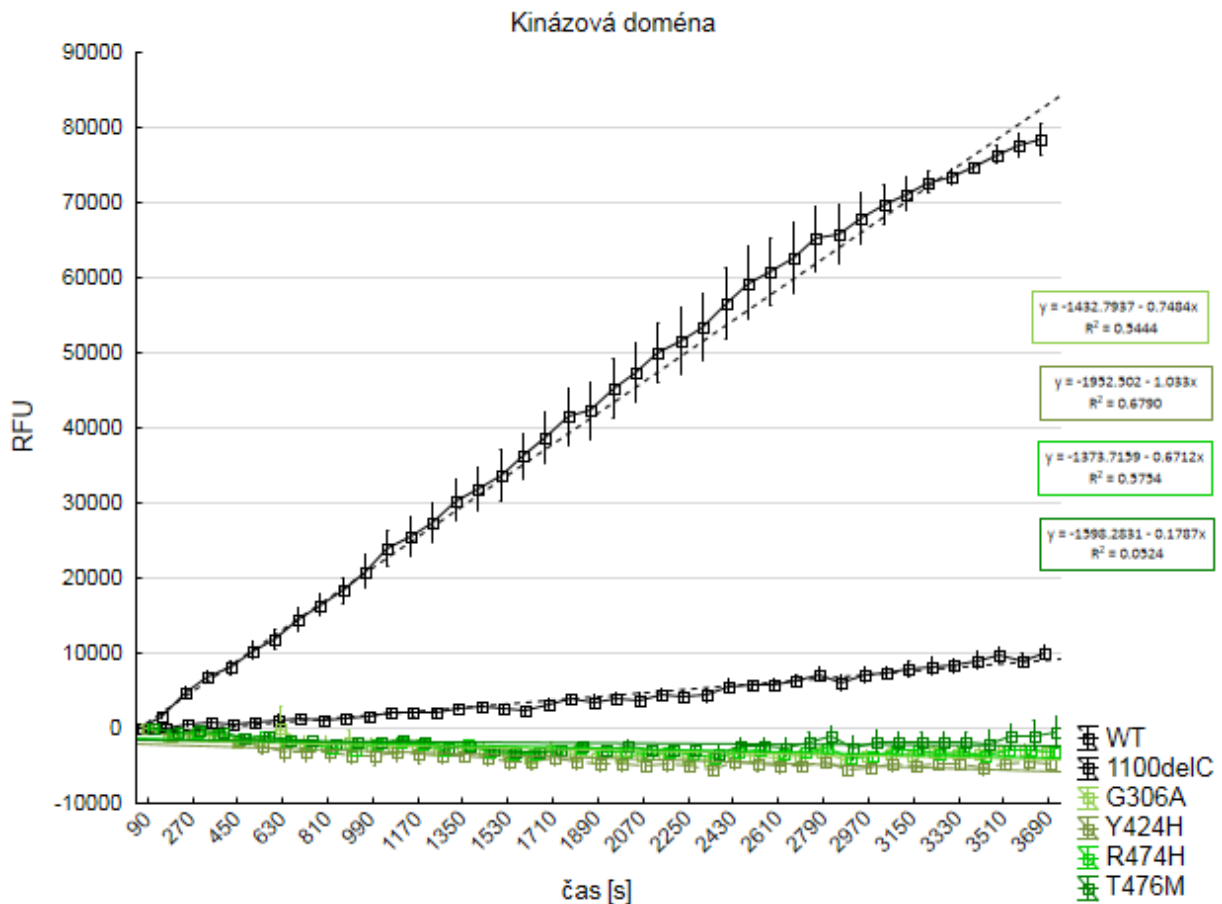
**Obr. 26:** Graf kinázové aktivity variant R3W a E64K.



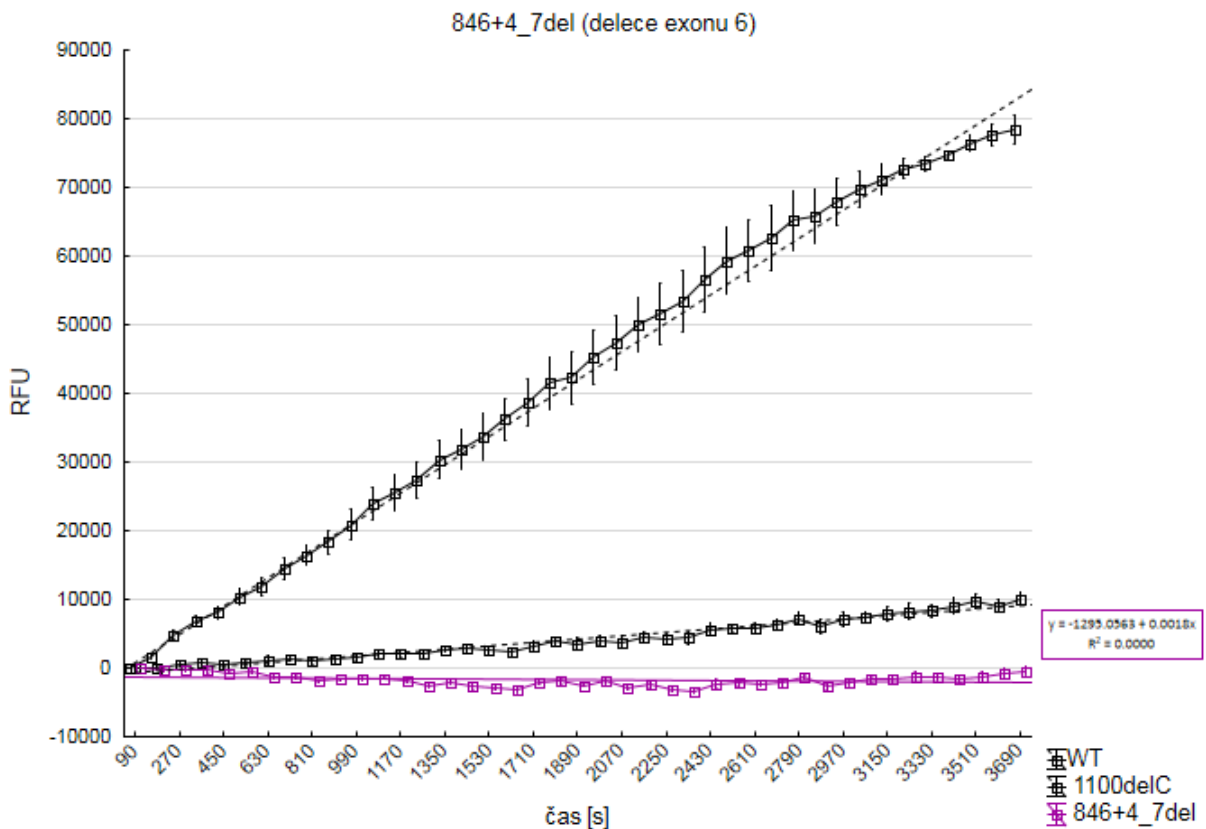
**Obr. 27:** Graf aktivity variantních Chk2 kináz s missense mutací v FHA doméně – R180C, R180H, R181C, R181H.



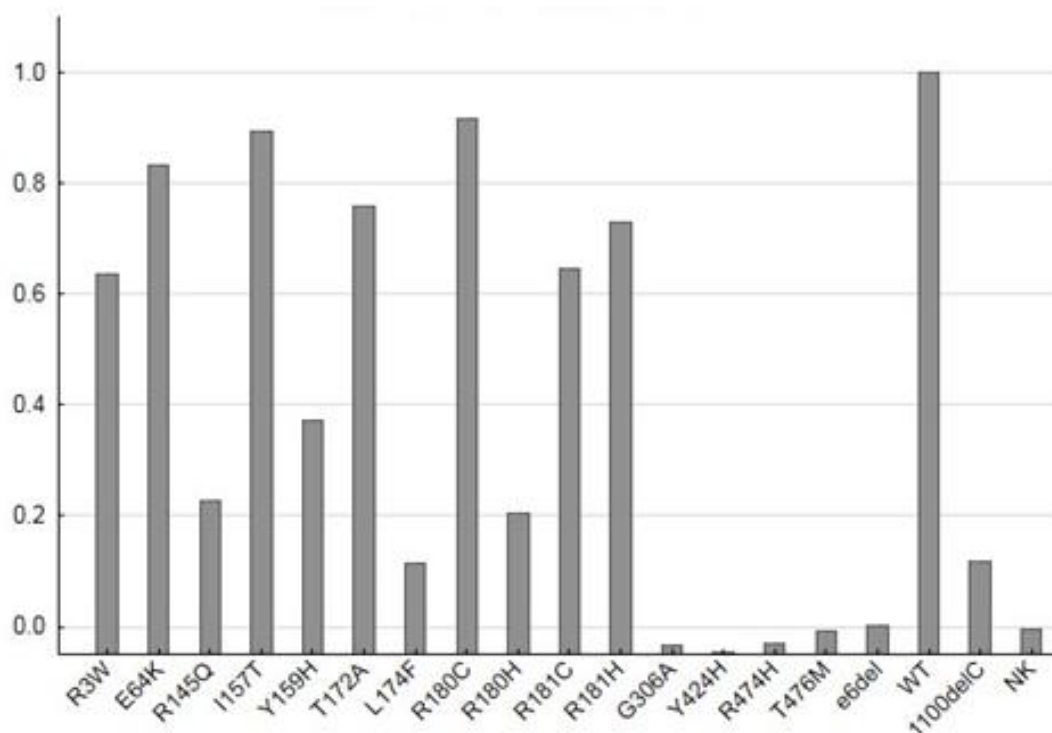
**Obr. 28:** Graf aktivity variantních Chk2 kináz s missense mutací v FHA doméně – R180C, R180H, R181C, R181H.



**Obr. 29:** Graf hodnot fluorescence pro variantní proteiny Chk2 s mutací v kinázové doméně – G306A, Y424H, R474H a T476M.



**Obr. 30:** Graf kinázové aktivity varianty 846+4\_7del znamenající delecí exonu 6 a zkrácení proteinu o 18 aminokyselinových zbytků.



**Obr.31:** Srovnání kinázové aktivity rekombinantních proteinů s jednotlivými izoformami Chk2. Směrnici přímkou lineární regrese varianty WT Chk2 byla přiřazena hodnota 1, vyjadřující plnou kinázovou aktivitu. Netransformované buňky (NK) a varianta 1100delC slouží jako negativní kontrola. Směrnícím přímkou variantních proteinů byly přiřazeny hodnoty dle schopnosti fosforylovat substrát.

## 5.5 Predikce *in silico*

Pomocí *in silico* predikčních nástrojů SIFT, PolyPhen2, Align-GVDG a CADD byly zhodnoceny aminokyselinové substituce a jejich vliv na funkci proteinu. Výstupy jednotlivých nástrojů jsou uvedeny v tabulkách níže.

Substituce	Vstupní formát	SIFT skóre	Predikce
R3W	ENSP00000329178,R3W	0.04	DAMAGING
E64K	ENSP00000329178,E64K	0.12	TOLERATED
R145Q	ENSP00000329178,R145Q	0.16	TOLERATED
I157T	ENSP00000329178,I157T	0.07	TOLERATED
Y159H	ENSP00000329178,Y159H	0.05	DAMAGING
T172A	ENSP00000329178,T172A	0.27	TOLERATED
L174F	ENSP00000329178,L174F	0.7	TOLERATED



<b>R180C</b>	ENSP00000329178,R180C	0.01	<b>DAMAGING</b>
<b>R180H</b>	ENSP00000329178,R180H	0.05	<b>DAMAGING</b>
R181C	ENSP00000329178,R181C	0.19	TOLERATED
R181H	ENSP00000329178,R181H	0.55	TOLERATED
G306A	ENSP00000329178,G306A	0.09	TOLERATED
Y424H	ENSP00000329178,Y424H	0.06	TOLERATED
<b>R474H</b>	ENSP00000329178,R474H	0	<b>DAMAGING</b>
<b>T476M</b>	ENSP00000329178,T476M	0	<b>DAMAGING</b>

**Tab. 2:** SIFT skóre dosahuje hodnot 0 – 1, přičemž udává míru tolerance. Hodnoty nižší než 0,05 SIFT vyhodnocuje za netolerované (červeně vyznačeny).

Substituce	Vstupní formát	Pph2 skóre	Predikce
<b>R3W</b>	O96017 R3W	0.975	<b>probably damaging</b>
E64K	O96017 E64K	0.181	benign
<b>R145Q</b>	O96017 R145Q	0.999	<b>probably damaging</b>
<b>I157T</b>	<b>O96017 I157T</b>	<b>0.514</b>	<b>possibly damaging</b>
<b>Y159H</b>	O96017 Y159H	0.993	<b>probably damaging</b>
T172A	O96017 T172A	0.004	benign
<b>L174F</b>	O96017 L174F	0.961	<b>probably damaging</b>
<b>R180C</b>	<b>O96017 R180C</b>	<b>0.64</b>	<b>possibly damaging</b>
R180H	O96017 R180H	0.125	benign
R181C	O96017 R181C	0.002	benign
R181H	O96017 R181H	0.008	benign
<b>G306A</b>	O96017 G306A	1	<b>probably damaging</b>
<b>Y424H</b>	<b>O96017 Y424H</b>	<b>0.934</b>	<b>possibly damaging</b>
<b>R474H</b>	O96017 R474H	1	<b>probably damaging</b>
<b>T476M</b>	O96017 T476M	1	<b>probably damaging</b>

**Tab.3:** Nástroj PolyPhen2 taktéž udává výsledek na stupnici 0 – 1, kdy udává pravděpodobnost, že mutace je netolerovaná. Červeně jsou označeny substituce, jež byly pomocí PolyPhen2 vyhodnoceny s vysokou pravděpodobností jako netolerované, oranžově varianty se zvýšenou pravděpodobností s dopadem na funkci proteinu.

Substituce	GV	GD	Predikce
R3W	56.71	98.36	Class C25
E64K	44.60	56.87	Class C15
R145Q	0.00	42.81	Class C35
I157T	30.92	69.84	Class C25
Y159H	0.00	83.33	Class C65
T172A	123.69	33.50	Class C0
L174F	224.94	13.17	Class C0
R180C	72.74	137.37	Class C25
R180H	72.74	4.81	Class C0
R181C	229.27	0.00	Class C0
R181H	229.27	0.00	Class C0
G306A	0.00	60.00	Class C55
Y424H	0.00	83.33	Class C65
R474H	0.00	28.82	Class C25
T476M	57.75	81.04	Class C15

**Tab.4:** Align-GVGD spojuje dvě výsledné hodnoty – GV udávající míru konzervovanosti a DG vystihující danou odchylku. Výsledek pak řadí do tříd C0 – C65, kdy nižší třída vyjadřuje vyšší pravděpodobnost tolerance záměny. Červeně jsou vyznačeny substituce zařazené do tříd C45 a výše, oranžově je značena hraniční třída C35. Vstupním formátem substitucí pro Align-GVGD jsou, po zvolení genu (*CHEK2*), jednopísmenné zkratky aminokyselin a pozice záměny v proteinovém řetězci (např. R3W).

Substituce	Vstupní formát	Skóre	Predikce
R3W	chr22_29130703_G_A	7,125711	34
E64K	chr22_29130520_C_T	3,472552	23
R145Q	chr22_29121241_C_T	7,233593	34
I157T	chr22_29121087_A_G	2,759819	21,1
Y159H	chr22_29121082_A_G	6,065728	28,1

T172A	chr22_29121043_T_C	1,447463	13,04
L174F	chr22_29121037_G_A	3,246258	22,8
R180C	chr22_29121019_G_A	3,573675	23,2
R180H	chr22_29121018_C_T	2,902652	21,9
R181C	chr22_29121016_G_A	2,988484	22,2
R181H	chr22_29121015_C_T	1,997856	16,2
G306A	chr22_29095917_C_G	6,261346	28,9
Y424H	chr22_29091220_A_G	6,203969	28,7
R474H	chr22_29090060_C_T	7,901675	35
T476M	chr22_29090054_G_A	6,516582	31

**Tab.5:** Jelikož CADD pracuje i s nekódující oblastí, je vstupním formátem genomová koordináta, kde se nachází změněný nukleotid. Hodnoty větší než 15 (červeně vyznačeny) jsou považovány za netolerované.

Substituace	SIFT	PolyPhen2	Align-GVGD	CADD	Celková predikce
R3W	DAMAGING	probably damaging	Class C25	34	netolerováno
E64K	TOLERATED	benign	Class C15	23	tolerováno
R145Q	TOLERATED	probably damaging	Class C35	34	netolerováno
I157T	TOLERATED	possibly damaging	Class C25	21,1	tolerováno
Y159H	DAMAGING	probably damaging	Class C65	28,1	netolerováno
T172A	TOLERATED	benign	Class C0	13,04	tolerováno
L174F	TOLERATED	probably damaging	Class C0	22,8	tolerováno
R180C	DAMAGING	possibly damaging	Class C25	23,2	netolerováno
R180H	DAMAGING	benign	Class C0	21,9	tolerováno
R181C	TOLERATED	benign	Class C0	22,2	tolerováno
R181H	TOLERATED	benign	Class C0	16,2	tolerováno
G306A	TOLERATED	probably damaging	Class C55	28,9	netolerováno
Y424H	TOLERATED	possibly damaging	Class C65	28,7	netolerováno
R474H	DAMAGING	probably damaging	Class C25	35	netolerováno
T476M	DAMAGING	probably damaging	Class C15	31	netolerováno

**Tab. 6:** Přehled výsledků predikcí ze všech použitých programů pro jednotlivé substituce. Tlustou čarou jsou od sebe odděleny varianty náležející do různých domén.

*In silico* predikční programy představují užitečný nástroj pro předběžné zhodnocení dopadu aminokyselinových záměn na funkci proteinu a především pro výběr kandidátních variant pro funkční analýzy získaných při vyšetření rozsáhlých souborů pacientů. Z výsledků je patrné, že predikce zpracované různými programy se mezi sebou u některých substitucí značně liší. Toto je pravděpodobně důsledkem různé váhy hodnocených parametrů u jednotlivých predikčních algoritmů. Tento efekt je výrazný především u Align-GVGD, který je především zaměřen (a optimalizován) na hodnocení variant nejasného významu v hlavních predispozičních genech BRCA1 a BRCA2 (Tavtigian *et al.* 2008). Podobně je tomu u CADD skóre, jehož neobvykle vysoké hodnoty spíše naznačují, že se jedná o vzácné varianty. Všechny programy se však shodují ve výsledcích pro variantu Chk2 Y159H, která je hodnocena jako netolerovaná záměna s negativním vlivem. Dalším jednoznačným výsledkem je zhodnocení varianty T172A jako benigní bez výrazného dopadu na funkci proteinu.

## 6 Diskuze

Ve své diplomové práci jsem analyzovala vliv vzácných variant genu *CHEK2*, identifikovaných jako hereditární mutace u vysoce rizikových pacientek s karcinomem prsu, na enzymovou funkci jimi kódovaných mutantních izoform Chk2 kinázy. Při své práci jsem kombinovala výsledky predikcí *in silico* s výsledky *in vitro* analýzy kinázové aktivity.

Substituce	<i>In silico</i> výsledek	<i>In vitro</i> aktivita	Shoda
R3W	netolerováno	intermediární	ano
E64K	tolerováno	intermediární	ano
<b>R145Q</b>	netolerováno	nulová	ano
<b>I157T</b>	tolerováno	normální	ano
<b>Y159H</b>	netolerováno	intermediární	ano
<b>T172A</b>	tolerováno	intermediární	ano
L174F	tolerováno	nulová	ne
R180C	netolerováno	normální	ne
R180H	tolerováno	nulová	ne
<b>R181C</b>	tolerováno	intermediární	ano
<b>R181H</b>	tolerováno	normální	ano
<b>G306A</b>	netolerováno	nulová	ano
<b>Y424H</b>	netolerováno	nulová	ano
<b>R474H</b>	netolerováno	nulová	ano
<b>T476M</b>	netolerováno	nulová	ano

**Tab. 7:** Tabulka srovnání výsledků *in silico* a *in vitro* analýz. Aktivita variantní kinázy byla hodnocena 3 stupni – „normální“ aktivita byla srovnatelná s aktivitou WT proteinu, nulová aktivita znamenala ztrátu schopnosti fosforylace, intermediární se odlišovala od obou projevů. Pokud se ve výsledcích objevila hodnota intermediární aktivity, bylo to považováno za shodu. Tučně jsou vyznačeny úplné shody.

Aktivita variantní kinázy se substitucí R3W *in vitro* byla oproti WT kináze snížena přibližně na polovinu. Predikčními nástroji byla tato záměna hodnocena jako netolerovaná, i když aktivitu neztratila. Záměna R3W byla spojována od začátku s Li-Fraumeni syndromem (Lee *et al.*, 2001), později především s karcinomem prsu *et al.*, 2007; Roeb *et al.*, 2012).

Jediná varianta SCD domény - E64K byla *in silico* predikována jako benigní, s výjimkou CADD. V *in vitro* analýze vykazoval variantní protein pouze mírně sníženou aktivitu oproti WT Chk2 a celkově tato záměna tedy byla zhodnocena jako tolerovaná. Experimenty Roeb *et al.* (2012), kteří studovali aktivitu variantních Chk2 proteinů v kvasinkách však ukázaly, že protein nebyl schopen účastnit se odpovědi na poškození DNA. Glu64 se nachází v těsné blízkosti Ser62, který je spolu se Ser73 fosforylován kinázou Plk3a tato fosforylace poté usnadňuje kináze ATM fosforylovat Thr68 (Bahassi *et al.*, 2006). Je možné, že záměna glutamátu za lysin znemožní fosforylaci kinázou Plk3 a následnou aktivaci pomocí ATM, což by mohlo mít za následek ztrátu účasti na signalizaci při detekci poškozené DNA.

FHA doména má roli fosfoproteinového interakčního modulu, kdy zajišťuje interakce s upstream proteiny důležitými pro aktivaci Chk2 (ATM), jakožto s následnými interakčními partnery Chk2 v dalším přenosu signálu a efektoru (p53, BRCA1, Cdc25C).

Porovnáním *in silico* predikcí u variant Y159H a T172A s analýzou kinázové aktivity *in vitro*, lze posoudit, že se výsledky shodují. Variantní kináza Chk2 Y159H vykazuje nízkou aktivitu, s čímž koreluje predikce o netolerované substituci. Cai *et al.* (2009) uvádí, že se Tyr159 v FHA doméně podílí na vazbě kinázové domény druhé molekuly Chk2 a substituce v této pozici by tyto vazby mohla narušovat. Tato mutace nemusí mít vliv pouze na dimerizaci Chk2, ale i při vazbě substrátů podobně jako I157T, kdy se obě záměny nacházejí v místech důležitých pro interakci FHA domény s jinými proteiny (Durocher & Jackson, 2002). T172A je dle predikcí záměna nemající negativní vliv na funkci proteinu, což funkční analýza potvrzuje – aktivita Chk2 T172A je vůči WT mírně snížena. Substituce v méně konzervované pozici, kdy je změněn polární threonin za alanin tak zřejmě nemá v kontextu celé molekuly Chk2 velký význam.

*In silico* predikce i *in vitro* kinázová analýza se shodují, že substituce I157T by neměla mít na funkci proteinu vliv. Varianta I157T je však spojována s řadou nádorových onemocnění, zejména karcinomu prsu a kolorekta (Han, Guo, & Liu, 2013). Přesný dopad substituce na funkci proteinu je však sporný, některé práce tvrdí, že Chk2 I157T je schopen normální aktivity po indukci ionizačním zářením (Lee, *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001). Analýza kinázové aktivity I157T provedená Roeb *et al.* (2012), kteří využili schopnost lidského *CHEK2* komplementovat nefunkční kvasinkový homolog *rad53*, však zjistila, že Chk2 I157T tuto schopnost ztratil a nedokáže zajistit odpověď na poškození DNA. Dále tvrdí, že pozorovaná aktivita srovnatelná s WT variantou kinázy byla nejspíše způsobena přítomností WT proteinu ve studovaných buňkách. Při pohledu na strukturu proteinu Chk2 je Ile 157 v FHA doméně

součástí hydrofobního prostředí a podílí se na vazbě s částí kinázové domény. Záměna Ile za Thr nemění celkovou konformaci proteinu, ale značně snižuje hydrofobicitu v daném úseku FHA domény, a redukuje tak intermolekulární van der Waalsovy kontakty s kinázovou doménou druhé molekuly (Cai *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2001). Chk2 I157T je jako protein stabilní, je v rámci buněčné odpovědi na ionizační záření fosforylován, a je schopen tvořit dimery i s WT Chk2, v čemž může spočívat jeho negativní efekt (Kilpivaara *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2001).

V pozici 145 aminokyselinového řetězce je známa substituce Arg za Trp, která byla objevena ve spojení s Li-Fraumeni syndromem (Bell, 1999). Tato nekonzervativní záměna má za následek špatné složení proteinu, který je pak cílen k degradaci do proteozomu a jeho poločas je zkrácen z více jak 120 min u WT Chk2 na 30 min (Lee *et al.*, 2001). V FHA doméně se nachází fosfoThr vazebné místo které sestává z 11 antiparalelních  $\beta$ -listů. Právě substituce v pozici 145 naruší místní vazby a snad indukuje vznik další  $\beta$ -struktury, která naruší smyčky důležité pro vazbu fosfoproteinů. (Lee *et al.*, 2001) Některá data nasvědčují faktu, že záměnou R145W je narušena schopnost podstupovat autofosforylaci aktivačních zbytků T383 a T387 v aktivační smyčce (Lee & Chung, 2001). V této práci nebyla studována varianta R145W ale varianta známá doposud pouze z české populace R145Q, která byla námi predikována jako netolerovaná a variantní kináza vykazovala výrazně sníženou enzymovou aktivitu. Lze tedy uvažovat, že v této pozici nejsou záměny tolerovány, jelikož i u pacientů s karcinomem prostaty byla identifikována varianta R145P (Dong *et al.*, 2003) Námi studovaná záměna argininu 145 za glutamin, však nemusí mít tak výrazný funkční dopad jako je tomu v případě aromatického zbytku tryptofanu.

U tří variant Chk2 se neshoduje *in silico* predikce s výsledkem analýzy kinázové aktivity. Jednu z nich je L174F, kdy přes predikci benigní substituce, protein Chk2 nevykazoval žádnou kinázovou aktivitu. Tato varianta je doposud popsána pouze v české populaci u pacientek se sporadickým karcinomem prsu (Kleibl *et al.*, 2008). Je tak pravděpodobné, že se jedná o populačně-specifickou variantu.

V FHA doméně se nachází také mutace R180C, R180H, R181C a R181H, které byly popsány v souvislosti s karcinomem prostaty (Dong *et al.*, 2003). Tyto alterace mohou zasahovat strukturu či stabilitu domény na rozhraní jejího styku s druhou molekulou Chk2 (Cai *et al.*, 2009). Tři z těchto čtyř záměn byly vyhodnoceny *in silico* nástroji jako tolerované, což se úplně neshodovalo s výstupem kinázové analýzy. Varianta R180C vykazovala aktivitu srovnatelnou s WT kinázou, i když je záměna predikována jako netolerovaná.

Naopak varianta R180H s predikcí benigní záměny nedokázala substrát fosforylovat. Ve většině případů se hodnotí schopnost fosforylovat specifický substrát, kterým je Cdc25C (Matsuoka, 1998), je však možné, že interakce s jinými substráty mohou být narušeny a aktivita by v tomto případě byla odlišná. Sodha *et al.* (2006) ve své práci uvádí, že Chk2 R180H není tak stabilní jako WT, nicméně jeho aktivita v odpovědi na poškození genomové DNA etoposidem není od WT pozměněna a celkově tuto variantu zhodnotili jako neutrální. Při porovnání výsledků kinázové analýzy s prací Desrichard *et al.* (2011), je patrný rozdíl v míře fosforylace varianty R180H, která v jejich případě není natolik snížena. Variantní izoformy Chk2 se záměnami v pozici 181 (R181C, R181H) jsou považovány za schopné funkce a vykazují mírně sníženou aktivitu, případně normální, vůči substrátu ve srovnání s WT variantou.

Všechny proteiny variantní v kinázové doméně (G306A, Y424H, R474H a T476M) nevykazovaly žádnou aktivitu vůči substrátu, s čímž se shodovaly i predikce *in silico*. S ohledem na fakt, že kinázová doména zajišťuje výkonnou funkci enzymu, ve které jsou aminokyselinové zbytky komplexně uspořádány, není překvapivé, že substituce v této doméně znamenaly ztrátu kinázové aktivity. Vazebné místo pro nukleotid se v kinázové doméně nachází mezi dvěma laloky (viz 2.2.1.), které jsou propojeny zbytky v pozicích 303 – 321, kde se nachází právě Gly306. Vazbu nukleotidu pak zprostředkovávají zbytky Glu302, Met304 a Glu308. (Cai *et al.*, 2009) Je tedy možné, že i záměna Ala namísto Gly je nežádoucí a má vliv na funkci kinázy.

Rekombinantní protein Y424H nevykazoval žádnou kinázovou aktivitu, dle predikcí *in silico*, kdy spadá do konzervované oblasti Chk2 u obratlovců. Tato varianta byla nalezena u mužů s nádorovým onemocněním prostaty, avšak následné studie neprokázaly predikce o ztrátě funkce proteinu (Tischkowitz *et al.*, 2008). Funkční analýza u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* nezjistila změnu na funkci proteinu a variantě Y424H nebyl připsán vliv na vznik nádoru prostaty (Tischkowitz *et al.*, 2008). V další studii bylo zjištěno, že varianta Y424H segreguje v postižených rodinách s výskytem karcinomu prsu (Roeb *et al.*, 2012). Zde výsledek funkční analýzy udává, že kináza Chk2 Y424H nebyla schopna komplementovat ztrátu homologního proteinu Rad53 u *Saccharomyces cerevisiae*. Vliv variantního proteinu může být ovlivněn prostředím, ve kterém se v organismu nachází, jako je tomu u varianty I157T v případě karcinomu plic, kde tato mutace vykazuje protektivní účinek, na rozdíl od prostředí karcinomu prsu či prostaty (Brennan *et al.*, 2007).



Arg474 je konzervován v kinázové doméně, jelikož se podílí na aktivaci proteinu fosforylací *in trans*, kdy dochází k výměně aktivačních smyček monomerů a Glu394 v APE motivu kontaktuje právě Arg474 (Oliver *et al.*, 2006). Je tedy možné, že je v případě substituce ovlivněna schopnost efektivně fosforylovat aktivační smyčku druhé molekuly Chk2.

V C-koncové části kinázové domény se nachází záměna T476M, jež byla spolu s T476K nalezena u rizikových pacientů s karcinomem prsu (Roeb *et al.*, 2012). Na rozdíl od T476K, která vykazovala alespoň nějakou odpověď na poškození DNA, byla varianta T476M katalyticky neúčinná (Roeb *et al.*, 2012). Tyto výsledky jsou shodné s výsledky analýzy kinázové aktivity v této práci i v práci Desrichard *et al.* (2011), kteří taktéž nezaznamenali schopnost fosforylace substrátu Chk2.

Studovanou variantou byla i mutace vedoucí k deleci exonu 6, což na úrovni proteinu znamená ztrátu 18 aminokyselinových zbytků v kinázové doméně. Dle výsledků kinázové analýzy je tato varianta nefunkční, i přesto, že je část katalytické domény zachována.

V této práci byla analýza zaměřena na vliv mutací na schopnost kinázy fosforylovat svůj specifický substrát. Proteiny Chk2 byly produkovány v bakteriích, v nichž chybí aktivační kináza ATM posttranslačně modifikující Chk2 fosforylací Thr68, přes který poté dochází k vazbě druhé molekuly Chk2 pomocí SCD domény a následné aktivaci (Matsuoka *et al.*, 2000). Bylo zjištěno, že k aktivaci dochází taktéž v bakteriálních buňkách, a to při nadprodukci proteinu Chk2 (Schwarz *et al.*, 2003). Cai *et al.* (2009) uvádí, že aktivační Thr68 není nezbytný, přechodná dimerizace postačující k aktivaci kinázy není závislá na SCD doméně.

Analýza funkční aktivity Chk2 *in vitro* je nejspíše vhodná pro studium variant v kinázové doméně, jakožto se výsledky nejvíce shodovaly s analýzou *in silico*. Především v případě FHA domény se výsledky u některých variant lišily výrazně (L174F, R180C, R180H). Nedá se však říci, že shoda *in silico* predikcí s *in vitro* analýzou znamená, že je hodnocení konečné, což ilustruje varianta I157T, které byla vyhodnocena jako tolerantní, avšak je prokazatelně patogenní. Přestože se variantní protein choval v *in vitro* kinázové analýze jako WT, nelze říci, že mutace nemá na funkci kinázy vliv, jelikož ten může spočívat právě ve schopnosti interakce se signálně nadřazenými partnery jako např. s kinázou ATM a následnou aktivační fosforylací. Varianty s nepozměněnou kinázovou aktivitou tedy mohou být v tomto ohledu funkční, avšak v kontextu odpovědi buňky na poškození genomové DNA mohou být defektní, jelikož právě přes kinázu ATM k reakci dochází.

Přínosem pro zjištění vlivu substituce v sekvenci proteinu jsou jistě komplementační testy na kvasinkách, jakožto jak v *Saccharomyces cerevisiae* tak v *Schizosaccharomyces pombe* lze nalézt homologní proteiny Chk2 – Rad53, respektive Cds1, jejichž ztrátu je Chk2 schopen nahradit (Matsuoka, 1998). Dalším možným přístupem je studium funkce variantních Chk2 proteinů v savčích buňkách v odpovědi na ionizující záření.

Spojením segregací analýzy a výsledků analýz *in silico* a *in vitro* bychom získali komplexnější představu o významu nalezených variant. Bohužel však ne vždy je možnost provést analýzu rodokmenu a zjistit tak, zda nalezená varianta segreguje s nádorovým onemocněním v rodině. Identifikace potenciálně klinicky významných dědičných variant genu *CHEK2* je důležitým předpokladem pro hodnocení rizika vzniku nádorového onemocnění, zejména karcinomu prsu.

## 7 Seznam použité literatury

- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S. and Sunyaev, S.R. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*, 7, 248-249.
- Ahn, J., Schwarz, J., Piwnica-Worms, H., & Canman, C. (2000). Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Research*, 5934–5936.
- Ahn, J.-Y., Li, X., Davis, H. L., & Canman, C. E. (2002). Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19389–95.
- Antoni, L., Sodha, N., Collins, I., & Garrett, M. D. (2007). CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nature Reviews. Cancer*, 7(12), 925–36.
- Bahassi, E. M., Myer, D. L., McKenney, R. J., Hennigan, R. F., & Stambrook, P. J. (2006). Priming phosphorylation of Chk2 by polo-like kinase 3 (Plk3) mediates its full activation by ATM and a downstream checkpoint in response to DNA damage. *Mutation Research*, 596(1-2), 166–76.
- Bartek, J., & Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 3(5), 421–9.
- Bartkova, J., Horejsí, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Bartek, J. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 434(7035), 864–70.
- Bell, D. W. (1999). Heterozygous Germ Line hCHK2 Mutations in Li-Fraumeni Syndrome. *Science*, 286(5449), 2528–2531.
- Bohgaki, M., Hakem, Halaby, M. J., Bohgaki, T., Li, Q., Bissey, P., Hakem, R. (2013). The E3 ligase PIRH2 polyubiquitylates CHK2 and regulates its turnover. *Cell Death and Differentiation*, 20(6), 812–22.

- Brennan, P., McKay, J., Moore, L., Zaridze, D., Mukeria, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Hung, R. J. (2007). Uncommon CHEK2 mis-sense variant and reduced risk of tobacco-related cancers: case control study. *Human Molecular Genetics*, 16(15), 1794–801.
- Cai, Z., Chehab, N. H., & Pavletich, N. P. (2009). Structure and activation mechanism of the CHK2 DNA damage checkpoint kinase. *Molecular Cell*, 35(6), 818–29.
- Cortez, D. (1999). Requirement of ATM-Dependent Phosphorylation of Brca1 in the DNA Damage Response to Double-Strand Breaks. *Science*, 286(5442), 1162–1166.
- Desrichard, A., Bidet, Y., Uhrhammer, N., & Bignon, Y.-J. (2011). CHEK2 contribution to hereditary breast cancer in non-BRCA families. *Breast Cancer Research : BCR*, 13(6), R119.
- Dong, X., Wang, L., Taniguchi, K., Wang, X., Cunningham, J. M., McDonnell, S. K., Liu, W. (2003). Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. *American Journal of Human Genetics*, 72(2), 270–80.
- Donzelli, M., & Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Reports*, 4(7), 671–7.
- Durocher, D., & Jackson, S. P. (2002). The FHA domain. *FEBS Letters*, 513(1), 58–66.
- Durocher, D., Taylor, I. a, Sarbassova, D., Haire, L. F., Westcott, S. L., Jackson, S. P., Yaffe, M. B. (2000). The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Molecular Cell*, 6(5), 1169–82.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R. G., Bartek, J., & Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 410(6830), 842–7.
- Fujimoto, H., Onishi, N., Kato, N., Takekawa, M., Xu, X. Z., Kosugi, A., Minami, Y. (2006). Regulation of the antioncogenic Chk2 kinase by the oncogenic Wip1 phosphatase. *Cell Death and Differentiation*, 13(7), 1170–80.

- Giorgi, C., Ito, K., Lin, H., Santangelo, C., Mariusz, R., Lebiedzinska, M., Pandolfi, P. P. (2011). PML Regulates Apoptosis at Endoplasmic Reticulum by Modulating Calcium Release. *Cell*, 330(6008), 1247–1251.
- Gratchev, A., [http://www.methods.info/Tips/mutagenesis/PCR\\_splicing.html](http://www.methods.info/Tips/mutagenesis/PCR_splicing.html), on-line přístup únor 2014
- Han, F., Guo, C., & Liu, L. (2013). The effect of CHEK2 variant I157T on cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *DNA and Cell Biology*, 32(6), 329–35.
- Chaturvedi, P., Eng, W. K., Zhu, Y., Mattern, M. R., Mishra, R., Hurle, M. R., Zhou, B. B. (1999). Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene*, 18(28), 4047–54.
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Stavridi, E. S., & Halazonetis, T. D. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13777–82.
- Chehab, N., & Malikzay, A. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53. *Genes & Development*, 278–288.
- Jinno, S., Suto, K., & Nagata, A. (1994). Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *The EMBO Journal*, 13(7), 1549–1556.
- Johnson, L. N., Noble, M. E., & Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 85(2), 149–58.
- Kass, E. M., Ahn, J., Tanaka, T., Freed-Pastor, W. a., Keezer, S., & Prives, C. (2007). Stability of checkpoint kinase 2 is regulated via phosphorylation at serine 456. *Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 30311–30321.
- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27(3), 247–54.
- Kilpivaara, O., Vahteristo, P., Falck, J., Syrjäkoski, K., Eerola, H., Easton, D., Nevanlinna, H. (2004). CHEK2 variant I157T may be associated with increased breast cancer risk. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 111(4), 543–7.

- Kircher, M, Witten, D. M., Jain, P., O’Roak, B. J., Cooper, G. M., & Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature Genetics*, *46*(3), 310-5.
- Kleibl, Z., Havranek, O., Novotny, J., Kleiblova, P., Soucek, P., & Pohlreich, P. (2008). Analysis of CHEK2 FHA domain in Czech patients with sporadic breast cancer revealed distinct rare genetic alterations. *Breast Cancer Research and Treatment*, *112*(1), 159–64.
- Kleibl, Z., Novotny, J., Bezdickova, D., Malik, R., Kleiblova, P., Foretova, L., ... Pohlreich, P. (2005). The CHEK2 c.1100delC germline mutation rarely contributes to breast cancer development in the Czech Republic. *Breast Cancer Research and Treatment*, *90*(2), 165–7. doi:10.1007/s10549-004-4023-8
- Kumar, P., Henikoff, S. and Ng, P.C. (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, **4**, 1073-1081.
- Laitman, Y., Kaufman, B., Lahad, E. L., Papa, M. Z., & Friedman, E. (2007). Germline CHEK2 mutations in Jewish Ashkenazi women at high risk for breast cancer. *The Israel Medical Association Journal : IMAJ*, *9*(11), 791–6.
- Lee, C. H., & Chung, J. H. (2001). The hCds1 (Chk2)-FHA domain is essential for a chain of phosphorylation events on hCds1 that is induced by ionizing radiation. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(32), 30537–41.
- Lee, J., Collins, K., Brown, A., Lee, C., & Chung, J. (2000). hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature*, *404*(March), 201-204.
- Lee, S. B., Kim, S. H., Bell, D. W., Wahrer, D. C. R., Schiripo, T. A., Jorzak, M. M., Haber, D. A. (2001). Destabilization of CHK2 by a Missense Mutation Associated with Li-Fraumeni Syndrome. *Cancer Research*, *6*, 8062–8067.
- Leroy, C., Lee, S., Vaze, M., & Ochsenbren, F. (2003). PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Molecular Cell*, *11*, 827–835.
- Lodish H, Berk A, et al. *Molecular Cell Biology*. 7th edition. New York: W. H. Freeman; 2013. Chapter 19, The Eucaryotic Cell Cycle.

- Lomonosov, M., Anand, S., Sangrithi, M., Davies, R., & Venkitaraman, A. R. (2003). Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes & Development*, *17*(24), 3017–22.
- Lu, X., Nannenga, B., & Donehower, L. a. (2005). PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes & Development*, *19*(10), 1162–74.
- Ma, H. T., & Poon, R. Y. C. (2011). How protein kinases co-ordinate mitosis in animal cells. *The Biochemical Journal*, *435*(1), 17–31.
- Macurek, L., Benada, J., Müllers, E., Halim, V. a, Krejčíková, K., Burdová, K., Bartek, J. (2013). Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis. *Cell Cycle*, *12*(2), 251–62.
- Mailand, N. (2000). Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA Damage. *Science*, *288*(5470), 1425–1429.
- Matijssen, C., Silva-Santisteban, M. C., Westwood, I. M., Siddique, S., Choi, V., Sheldrake, P., Blagg, J. (2012). Benzimidazole inhibitors of the protein kinase CHK2: clarification of the binding mode by flexible side chain docking and protein-ligand crystallography. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *20*(22), 6630–9.
- Matsuoka, S. (1998). Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase. *Science*, *282*(5395), 1893–1897.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., & Elledge, S. J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro, 32–34.
- Oliva-Trastoy, M., Berthonaud, V., Chevalier, a, Ducrot, C., Marsolier-Kergoat, M.-C., Mann, C., & Leteurtre, F. (2007). The Wip1 phosphatase (PPM1D) antagonizes activation of the Chk2 tumour suppressor kinase. *Oncogene*, *26*(10), 1449–58.
- Oliver, A. W., Knapp, S., & Pearl, L. H. (2007). Activation segment exchange: a common mechanism of kinase autophosphorylation? *Trends in Biochemical Sciences*, *32*(8), 351–6.

- Oliver, A. W., Paul, A., Boxall, K. J., Barrie, S. E., Aherne, G. W., Garrett, M. D., ... Pearl, L. H. (2006). Trans-activation of the DNA-damage signalling protein kinase Chk2 by T-loop exchange. *The EMBO Journal*, 25(13), 3179–90.
- Pandolfi, P. P. Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Hum. Molec. Genet.* 10: 769-775, 2001.
- Peng, C. (1997). Mitotic and G2 Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. *Science*, 277(5331), 1501–1505.
- Pohlreich, P., Kleibl, Z., Kleiblová, P., Janatová, M., Soukupová, J., Macháčková, E., Foretová, L. (2012). Klinický význam analýz genů stř edního rizika pro hodnocení rizika vzniku karcinomu prsu a dalších nádorů v České republice. *Klinická Onkologie*, 25(SUPPL.), 59–66.
- Roeb, W., Higgins, J., & King, M.-C. (2012). Response to DNA damage of CHEK2 missense mutations in familial breast cancer. *Human Molecular Genetics*, 21(12), 2738–44.
- Salomoni, P., Ferguson, B. J., Wyllie, A. H., Rich, T. New insights into the role of PML in tumour suppression. *Cell Res.* 18: 622-640, 2008.
- Sanchez, Y. (1997). Conservation of the Chk1 Checkpoint Pathway in Mammals: Linkage of DNA Damage to Cdk Regulation Through Cdc25. *Science*, 277(5331), 1497–1501.
- Shults, M. D., & Imperiali, B. (2003). Versatile Fluorescence Probes of Protein Kinase Activity. *JACS Communications*, 4, 14248–14249.
- Shults, M. D., Janes, K. a, Lauffenburger, D. a, & Imperiali, B. (2005). A multiplexed homogeneous fluorescence-based assay for protein kinase activity in cell lysates. *Nature Methods*, 2(4), 277–83.
- Schwarz, J. K., Lovly, C. M., & Piwnica-Worms, H. (2003). Regulation of the Chk2 protein kinase by oligomerization-mediated cis- and trans-phosphorylation. *Molecular Cancer Research*, 1(8), 598–609.
- Sodha, N. (2000). Screening hCHK2 for Mutations. *Science*, 289(5478), 359a–359.



- Sodha, N., Mantoni, T. S., Tavgian, S. V., Eeles, R., & Garrett, M. D. (2006). Rare germ line CHEK2 variants identified in breast cancer families encode proteins that show impaired activation. *Cancer Research*, 66(18), 8966–70.
- Suzuki, K., & Matsubara, H. (2011). Recent advances in p53 research and cancer treatment. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 978312.
- Sevcik, J., Falk, M., Kleiblova, P., Lhota, F., Stefancikova, L., Janatova, M., ... Kleibl, Z. (2012). The BRCA1 alternative splicing variant  $\Delta$ 14-15 with an in-frame deletion of part of the regulatory serine-containing domain (SCD) impairs the DNA repair capacity in MCF-7 cells. *Cellular Signalling*, 24(5), 1023–30.
- Takai, H., Naka, K., Okada, Y., Watanabe, M., Harada, N., Saito, S., Motoyama, N. (2002). Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *The EMBO Journal*, 21(19), 5195–205.
- Tavgian, S. V., Byrnes, G. B., Goldgar, D. E., & Thomas, A. (2008). Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications. *Human Mutation*, 29(11), 1342–1354.
- Tischkowitz, M. D., Yilmaz, A., Chen, L. Q., Karyadi, D. M., Novak, D., Kirchhoff, T. Foulkes, W. D. (2008). Identification and characterization of novel SNPs in CHEK2 in Ashkenazi Jewish men with prostate cancer. *Cancer Letters*, 270(1), 173–80.
- Traven, A., & Heierhorst, J. (2005). SQ/TQ cluster domains: concentrated ATM/ATR kinase phosphorylation site regions in DNA-damage-response proteins. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 27(4), 397–407.
- Walsh, T., Casadei, S., & Coats, K. (2006). Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA*, 295(12).
- Wu, X., Webster, S. R., & Chen, J. (2001). Characterization of tumor-associated Chk2 mutations. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2971–4.
- Xu, X., Tsvetkov, L., & Stern, D. (2002). Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization. *Molecular and Cellular Biology*, 22(12), 4419–4432.

- Yang, S., Kuo, C., Bisi, J. E., & Kim, M. K. (2002). PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nature Cell Biology*, 4(11), 865–70.
- Zannini, L., Lecis, D., Lisanti, S., Benetti, R., Buscemi, G., Schneider, C., & Delia, D. (2003). Karyopherin-alpha2 protein interacts with Chk2 and contributes to its nuclear import. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42346–51.
- Zhang, J., Willers, H., & Feng, Z. (2004). Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology*, 24(2), 708–718.