



## **Středoškolská technika 2022**

**Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na  
ČVUT**

# **ÚLOHA UBIKVITINACE RNA POLYMERÁZY II POMOCÍ BRCA1-BARD1 PŘI OPRAVĚ POŠKOZENÉ DNA**

Purkyňovo gymnázium, Strážnice, Masarykova 379

**ÚLOHA UBIKVITINACE RNA POLYMERÁZY II  
POMOCÍ BRCA1-BARD1 PŘI OPRAVĚ  
POŠKOZENÉ DNA**

**The role of ubiquitination of RNA polymerase II by  
BRCA1-BARD1 in the response to DNA damage**

**Autor:** Ema Buchtíková

**Konzultant:** Mgr. Veronika Klápšťová

Strážnice 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

Ve Strážnici dne .....

.....  
Ema Buchtíková

## Poděkování

Nejprve bych chtěla poděkovat **prof. Mgr. Richard Štefl, Ph.D.** za možnost vypracovat svoji práci v jeho laboratoři.

Za vedení práce bych chtěla velmi poděkovat **Mgr. Veronice Klápšťové** za vlídný a profesionální přístup, trpělivost, zasvěcení do problematiky práce, cenné rady a konzultace, a hlavně za všestrannou podporu při tvorbě mé práce.

Také bych chtěla velmi poděkovat **Mgr. Mareku Šebestovi, Ph.D.** za velikou pomoc při psaní a korekturách mé práce a vstřícný přístup.

Paní profesorce **RNDr. Janě Hálkové** děkuji za vstřícný přístup, trpělivost, a hlavně za rady a výpomoc s organizací mé práce.

Děkuji **celému kolektivu prof. Mgr. Richard Štefl, Ph.D.** za příjemnou atmosféru a pomoc při pracích v laboratoři.

Děkuji **centrální laboratoři Proteomika (CEITEC, Masarykova univerzita)** za analýzu ubikvitinace pomocí hmotnostní spektrometrie.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory JMK.



**jihomoravský kraj**

## Anotace

Ubikvitinace RNA polymerázy II (RNAPII) patří mezi zásadní buněčné mechanismy uplatňující se v odpovědi na poškození DNA. Mezi E3 ubikvitin ligázy schopné ubikvitinovat RNAPII patří i komplex BRCA1-BARD1. Tato ubikvitinace, cílící na katalytickou podjednotku RNAPII, RPB1, by mohla bránit zformování preiniciačního komplexu a tím regulovat zahájení syntézy RNA. Cílem této práce bylo exprimovat a purifikovat N-terminální fragmenty RPB1, optimalizovat podmínky pro jejich ubikvitinaci *in vitro* a pomocí hmotnostní spektrometrie identifikovat místa této modifikace. Naše výsledky naznačují, že ubikvitinace N-konce RPB1 by skutečně mohla bránit zformování preiniciačního komplexu, protože některé z ubikvitinovaných lyzinů se nacházejí v místě interakce RNAPII s transkripčním faktorem TFIIE. Výsledky získané v rámci této práce by mohly přispět k pochopení toho, jak je v buňkách regulována transkripce pomocí ubikvitinace RNAPII v odpovědi na poškození DNA.

## Klíčová slova

ubikvitinace; BRCA1-BARD1 komplex; RNA polymeráza II; regulace transkripce; poškození DNA

## Annotation

Ubiquitination of the RNA polymerase II (RNAPII) is one of the key mechanisms involved in the cellular response to DNA damage. One of the E3 ubiquitin ligases that ubiquitinate RNAPII is BRCA1-BARD1 complex. BRCA1-BARD1-mediated ubiquitination of RPB1, the catalytic subunit of RNAPII, may prevent the assembly of the preinitiation complex and, therefore, regulate the initiation of transcription. In order to investigate the aforementioned regulatory mechanism, we set the following aims: (i) to prepare the constructs for expression of the N-terminal fragments of RPB1; (ii) to purify the fragments; (iii) to optimize the *in vitro* ubiquitination assays; (iv) to determine the ubiquitination sites on the N-terminus of RPB1. Our results suggest that the ubiquitination of the N-terminus of RPB1 may indeed block the formation of the preinitiation complex, thereby proving an insight into the role of ubiquitination of RNAPII in the response to DNA damage.

## Keywords

Ubiquitination; BRCA1-BARD1 complex; RNA polymerase II; regulation of transcription; DNA damage

# Obsah

<b>SEZNAM ZKRATEK</b>	<b>9</b>
<b>1 ÚVOD</b>	<b>12</b>
<b>2 PŘEHLED LITERATURY</b>	<b>13</b>
2.1 Transkripce	13
2.1.1 RNA polymeráza II	13
2.1.2 Fáze transkripce u RNAPII	13
2.1.3 Propojení transkripce a oprav DNA	15
2.2 Ubikvitinace	17
2.2.1 Enzymy zajišťující ubikvitinaci	17
2.2.2 Ubikvitinační kód	18
2.2.3 Ubikvitinace v opravách DNA	20
2.3 BRCA1-BARD1 komplex	22
2.3.1 Úloha BRCA1-BARD1 komplexu v udržování stability genomu	23
2.3.2 BRCA1-BARD1 jako E3 ubikvitin ligáza	23
2.4 Ubikvitinace RNAPII	24
<b>3 CÍLE PRÁCE</b>	<b>26</b>
<b>4 MATERIÁLY</b>	<b>27</b>
4.1 Chemikálie, kity, enzymy	27
4.2 Rostoky	28
4.3 Plazmidy	29
4.4 Média	29
4.5 Bakteriální kmeny	29
4.6 Oligonukleotidy	30
4.7 Templáty	30
4.8 Proteiny	30
4.9 Programy PCR	31
<b>5 METODY</b>	<b>32</b>
5.1 PCR	32
5.2 Elektroforéza pomocí agarózového gelu	32

5.3	Restrikční štěpení plazmidů	32
5.4	Gelová extrakce	32
5.5	Příprava rekombinantních molekul DNA	33
5.5.1	Opracování konců molekul T4 DNA polymerázou (LIC treatment)	33
5.5.2	Anelace	33
5.5.3	Koloniová PCR	33
5.6	Elektroforéza SDS-PAGE	33
5.7	Transformace plazmidové DNA do buněk <i>E.coli</i>	34
5.8	Purifikace plazmidové DNA	34
5.9	Expres proteinů v malém objemu	34
5.10	Test solubility	34
5.11	Expres proteinů ve velkém objemu	35
5.12	Purifikace proteinů	35
5.12.1	Lýza buněk a centrifugace	35
5.12.2	Purifikace	35
5.12.3	Gelová filtrace	35
5.13	<i>In vitro</i> ubikvitinační eseje	36
5.14	Western Blot	36
5.15	Analýza ubikvitinace pomocí hmotnostní spektrometrie	36
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>37</b>
6.1	Příprava rekombinantních plazmidů metodou LIC	37
6.1.1	Příprava plazmidů 2GT + RPB1 <sup>1-335</sup> a 2GT + RPB1 <sup>1-356</sup>	37
6.1.2	Příprava plazmidů 2BcT + GST-RPB1 <sup>1-335</sup> a 2BcT + GST-RPB1 <sup>1-356</sup>	37
6.2	Expres a purifikace proteinů	40
6.2.1	Expres proteinů GST-RPB1 <sup>1-335</sup> a GST-RPB1 <sup>1-356</sup>	40
6.2.2	Purifikace GST-RPB1 <sup>1-335</sup> a GST-RPB1 <sup>1-356</sup>	42
6.3	Ubikvitinace GST-RPB1 <sup>1-356</sup> <i>in vitro</i>	45
6.3.1	Ubikvitinace GST-RPB1 <sup>1-356</sup> <i>in vitro</i>	45
6.3.2	Časová optimalizace ubikvitinace GST-RPB1 <sup>1-356</sup>	45
6.3.3	Ubikvitinace zvyšující se koncentrace RPB1 <sup>1-356</sup>	48
6.4	Hmotnostní spektrometrie	50

<b>7</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>57</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b>	<b>60</b>
<b>11</b>	<b>SEZNAM TABULEK</b>	<b>60</b>



## SEZNAM ZKRATEK

53BP1	protein vázající p53, <i>p53-binding protein 1</i>
APS	peroxodisíran amonný
ATP	adenosin trifosfát
BARD1	protein asociovaný s BRCA1 obsahující RING doménu ( <i>BRCA1-associated RING domain protein 1</i> )
BLM	helikáza Bloomova syndromu ( <i>Bloom syndrome helicase</i> )
bp	počet párů bazí, <i>base pairs</i>
BRCA1	protein náchylnosti k rakovině prsu typu 1 ( <i>breast cancer type 1 susceptibility protein</i> )
BRCT	BRCA1 C-terminální repetice
CPSF	faktor zajišťující štěpení a polyadenylaci RNA, <i>Cleavage and polyadenylation specificity factor</i>
CRL4	E3 ubikvitin ligáza <i>Cullin–RING ubiquitin ligase complex 4</i>
CSA	opravný faktor <i>Cockayne Syndrome A</i>
CSB	opravný faktor <i>Cockayne Syndrome B</i>
CstF	faktor stimulující štěpení RNA ( <i>Cleavage Stimulation Factor</i> )
CTD	C-terminální doména ( <i>C-terminal domain</i> )
dCTP	deoxycytidin trifosfát
dGTP	deoxyguanosin trifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DNA-PK	proteinkináza závislá na DNA
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
DSB	dvouvláknový zlom ( <i>double strand break</i> )
DSIF	faktor indukující senzitivitu k DRB ( <i>DRB Sensitivity-Inducing Factor</i> )
DTT	dithiotreitol
DUB	deubikvitinační enzym
<i>E. coli</i>	bakterie <i>Escherichia coli</i>
E1	ubikvitin aktivující enzym
E2	ubikvitin konjugující enzym
E3	ubikvitin ligáza
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EXO1	exonukleáza 1
G <sub>2</sub>	2. generační fáze buněčného cyklu
GST	glutathion-s-tranferáza
H1	histon H1
His	aminokyselina histidin
Hpa1	restrikční endonukleáza pocházející z <i>Haemophilus parainfluenzae</i>

HR	homologní rekombinace
IgG	imunoglobulin G
IPTG	izopropyl $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
Ku70-80	komplex účastnící se nehomologního spojování konců DNA
LB	Luria-Bertani
LIC	klonování nezávislé na ligaci ( <i>ligation independent cloning</i> )
Lys	aminokyselina lyzin
Met	aminokyselina methionin
MRN	komplex MRE11–RAD50–NBS1
MRE11	nukleáza meiotické rekombinace ( <i>meiotic recombination protein 11</i> )
mRNA	mediátorová RNA
NBS1	nibrin
NEB	<i>NewEngland Biolabs</i>
NEDD4	E3 ubikvitin ligáza <i>Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 4</i>
NELF	negativní elongační faktor ( <i>Negative ELongation Factor</i> )
NHEJ	nehomologické spojování konců ( <i>non-homologous end joining</i> )
Ni-NTA	nikl-nitriloctová kyselina
P	aminokyselina prolin
PALB2	partner a lokátor BRCA2 ( <i>Partner And Localizer of BRCA2</i> )
PBS	fosfátový tlumivý roztok ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pGEX	plazmid umožňující expresi s GST
pre-mRNA	pre-mediátorová RNA
P-TEFb	pozitivní transkripční elongační faktor b
PVDF	polyvinylidenfluorid
RAD50	rekombináza ( <i>RADiation sensitive protein 50</i> )
RING	doména <i>Really Interesting New Gene</i>
RIPL	kmen <i>E. coli</i>
R-loop	prodloužené RNA-DNA hybridy
RNA	kyselina ribonukleová
RNAP	RNA polymeráza
RNF8	<i>RING finger protein 8</i>
RPA	replikační protein A ( <i>replication protein A</i> )
RPB1	podjednotka RNA polymerázy II ( <i>RNA polymerase II subunit</i> )
rpm	otáčky za minutu ( <i>round per minute</i> )
rRNA	ribozómová RNA
S	aminokyselina serin
SDS	dodecylsírán sodný

SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza ( <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
Ser	aminokyselina serin
SETX	senataxin
T	aminokyselina threonin
T7R	primer nasedající na T7 terminátor
TATA	sekvence v promotorové oblasti
TBE	Tris-borát-EDTA
TBP	TATA-vazebný protein ( <i>TATA binding protein</i> )
TCR	oprava DNA spřažená s transkripcí, <i>Transcription-coupled repair</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TEV	proteáza <i>tobacco etch virus</i>
TF	transkripční faktory
Thr	aminokyselina threonin
tRNA	transferová RNA
Tyr	aminokyselina tyrosin
UBA1	enzym aktivující ubikvitin, <i>Ubiquitin-like modifier activating enzyme 1</i>
Ubc13	enzym konjugující ubikvitin, <i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 N</i>
UbcH6	enzym konjugující ubikvitin, <i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1</i>
UbcM2	enzym konjugující ubikvitin, <i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 E3</i>
UBD	domény vázající ubikvitin ( <i>Ubiquitin-Binding Domains</i> )
Ube2e2	enzym konjugující ubikvitin, <i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 E2</i>
Ube2k	enzym konjugující ubikvitin, <i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 K</i>
Ube2w	enzym konjugující ubikvitin, <i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 W</i>
UbcH5C	enzym konjugující ubikvitin, <i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3</i>
UV	ultrafialové záření
Y	aminokyselina tyrosin

# 1 ÚVOD

Pod slovním spojením poškození DNA si lidé nejspíš představí něco velmi drastického a nebezpečného, co by je mohlo stát život. I když tato představa není až tak daleko od pravdy, poškození DNA není nic, co by naše buňky mohlo ohrozit víc než nás ranní cesta do práce. Ovšem, i při cestě do práce se může něco velmi pokazit, stejně jako v buňkách se může odehrát něco, co v důsledku povede až k fatální nehodě, jako je rakovinné bujení či smrt samotné buňky. Pořád ale platí, že je to jev tak častý, že si s ním buňka dovede poradit. Má totiž k dispozici spoustu hlídacích a opravných mechanismů, které jsou neustále v pozoru. Jedním z těchto mechanismů může být ubikvitinace RNA polymerázy II (RNAPII), která vzniká, když RNAPII narazí během syntézy RNA na poškození, kvůli němuž musí zastavit. Představte si RNA polymerázu jako vlak, který při syntéze RNA jede po dráze DNA vlákna. Pokud takový vlak najednou narazí na poškození na koleji, je přinucen zastavit. Vlak nemůže ale stát navždy, jeho strojvůdce musí přivolat na pomoc údržbovou službu, která kolej opraví. V případě RNAPII za tím stojí právě ubikvitinace, která vyše signál a tím přivolá na pomoc opravné faktory. Ty opraví DNA anebo v nejhorším případě RNA polymerázu odstaví a degradují.

Při ubikvitinaci jsou klíčovými faktory E3 ubikvitin ligázy, které zajišťují navázání ubikvitinu na cílový protein. Jednou z E3 ubikvitin ligáz, které dovedou RNAPII ubikvitinovat, je BRCA1-BARD1 komplex. Je však možné, že tato ubikvitinace slouží v buňkách k jinému účelu než k signalizaci vedoucí k opravám DNA. Pokud dojde na dráze DNA k fatálnímu poškození, je potřeba zajistit, aby další vlakové soupravy, tedy další RNA polymerázy, na tuto trať nevjížděly. BRCA1-BARD1 komplex by tedy nemusel ubikvitinovat za tím účelem, aby přivolal posily, ale spíš proto, aby varoval RNA polymerázy, které by teoreticky chtěly začít syntézu RNA na této poškozené dráze. Tímto způsobem by se předešlo dopravní zácpě na poškozeném DNA vlákně.

Bylo zjištěno, že ubikvitinace RNAPII pomocí BRCA1-BARD1 komplexu brání interakci mezi RNAPII a transkripčním faktorem TFIIE, která je nezbytná pro formaci preiniciačního komplexu před zahájením syntézy RNA. Ubikvitinace BRCA1-BARD1 by pravděpodobně měla probíhat na N-konci RPB1, největší podjednotky RNAPII, neboť právě v tomto místě dochází k interakci s TFIIE. Ubikvitinací této části RPB1 by BRCA1-BARD komplex mohl zabránit zahájení transkripce.

Abychom ověřili, zda k ubikvitinaci RPB1 pomocí BRCA1-BARD1 skutečně dochází a zda by tato modifikace mohla bránit zahájení transkripce, exprimovali jsme a purifikovali N-terminální fragment RPB1. Tento protein jsme následně ubikvitinovali za podmínek *in vitro* a získali ubikvitinační produkty, které jsme dále analyzovali a identifikovali tak místa, kde k ubikvitinaci dochází. Konečné výsledky této práce dokazují, že BRCA1-BARD1 komplex je za daných podmínek skutečně schopen N-terminální část RPB1 ubikvitinovat a že některé z ubikvitinovaných aminokyselin se nacházejí v místě interakce RPB1 s TFIIE. Tyto modifikace by tedy mohly mít vliv na zahájení transkripce.

## 2 PŘEHLED LITERATURY

### 2.1 Transkripce

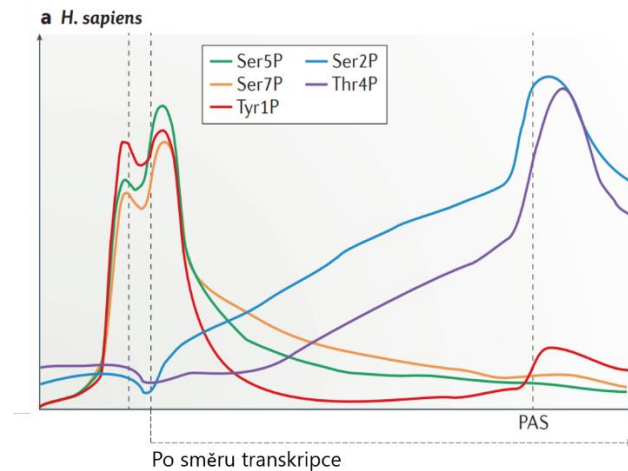
Transkripce je jeden z procesů nezbytných pro chod buňky. Spočívá v přepsání genetické informace deoxyribonukleové kyseliny (DNA) do ribonukleové kyseliny (RNA). Genetická informace je přepisována enzymy, kterým říkáme RNA polymerázy. Jsou známé tři typy. RNA polymeráza I (RNAPI) se specializuje na produkci ribozomální RNA (rRNA), která spolu s ribozomálními proteiny tvoří ribozóm. RNA polymeráza II (RNAPII) přepisuje messenger RNA (mRNA), sloužící jako templát pro výrobu nových proteinů. RNA polymeráza III (RNAPIII) zajišťuje produkci transferové RNA (tRNA), která při translaci připojuje aminokyseliny ke vznikajícímu proteinu.[1]

#### 2.1.1 RNA polymeráza II

RNAPII se skládá z dvanácti podjednotek, RPB1 – RPB12. Největší a nejdůležitější z těchto podjednotek je RPB1, která obsahuje katalytické místo. Na C-konci RPB1 se nachází karboxyl-terminální doména (CTD). CTD reguluje každý krok v transkripci, od začátku iniciace do konce terminace, a procesy, jako jsou posttranskripční úpravy RNA a modifikace chromatinu. CTD se skládá z repetitivní sekvence sedmi aminokyselin  $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ . Počet CTD repeticí se u různých organismů liší (např. CTD kvasinky pивní má 26 repeticí a lidská CTD má repeticí 52). Během transkripce dochází na CTD k různým modifikačním změnám, především k fosforylaci (nejčastěji na  $Ser_2$  a  $Ser_5$  a pak dále na  $Tyr_1$ ,  $Thr_4$  a  $Ser_7$ ) a cis-trans izomeraci prolinů (obr. 1). V každé fázi transkripčního cyklu je na CTD vytvořena určitá kombinace těchto modifikací, která je posléze rozpoznávána faktory specifickými pro tuto fázi.[2]

#### 2.1.2 Fáze transkripce u RNAPII

Transkripce probíhá uvnitř jádra eukaryotických buněk a má 3 hlavní fáze, kterými jsou iniciace, elongace a terminace.



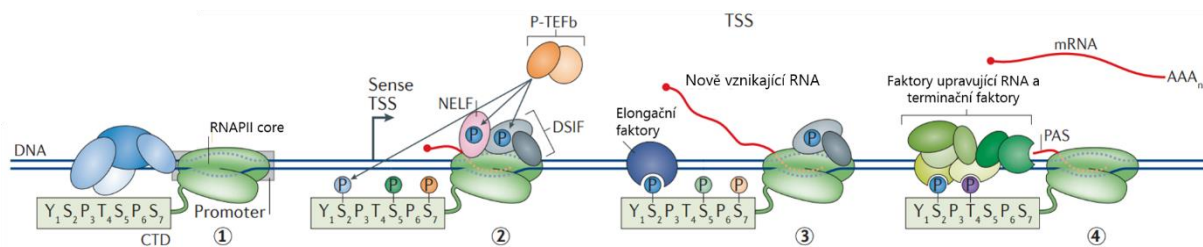
**Obrázek 1: Hladina fosforylace v lidské CTD během transkripčního cyklu.** Během iniciace transkripce dochází k největší fosforylaci CTD na Ser5 a dále Ser7 a Tyr1. Před koncem transkripce ve fázi terminace dochází k fosforylaci CTD na Ser2 a Thr4. Upraveno podle Harlen a Churchman, 2017 [3]

V jádře buňky je DNA vysoce kondenzovaná. Pro zahájení transkripce je potřeba, aby RNA polymeráza měla přístup k promotorové části DNA. V tom ale mohou bránit nukleozómy, které musí být odstraněny nebo posunuty. Poté může dojít k otevření chromatinu a navázání RNA polymerázy na templátovou DNA. Pro nasednutí RNAPII na DNA (obr. 2.1) a iniciaci transkripce jsou nezbytné proteiny známé také jako transkripční faktory. Mezi tyto transkripční faktory patří TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF a TFIIH, které jsou součástí tzv. preiniciačního komplexu. Na začátku iniciace se TFIID díky TATA-vazebnému proteinu (*TATA binding protein*, TBP) naváže na místo, kde se nachází sekvence zvaná TATA box. TFIIB následně propojí RNAPII a promotorovou část a tento komplex je dále stabilizován pomocí TFIIIF. Tímto způsobem nasedá RNAPII na promotor. Následně se připojí TFIIE a TFIIH. TFIIE aktivuje TFIIH, který otvírá DNA a provádí fosforylaci CTD RNAPII na Ser5 a Ser7, čímž podnítí únik z promotoru a přechod z iniciace do fáze elongace.[1]

Elongace je soubor mnoha enzymatických dějů, které vedou ke vzniku RNA. Ve fázi elongace se při pohybu RNA polymerázy po DNA ve směru 3' → 5' syntetizuje RNA, která za RNA polymerázou vytváří řetěz. Pro přidání dalšího ribonukleotidu RNA polymeráza uzavře aktivní místo, vytvoří fosfodiesterovou vazbu za pomoci dvou hořčnatých kationtů a přesune se na další templátovou pozici.[1] Ve vzdálenosti 20 až 100 párů bazí (*base pairs*, bp) od místa začátku transkripce dochází k pozastavení postupu RNAPII na templátu, tzv. *promoter-proximal pausing* (obr. 2.2), které je způsobeno navázáním negativního elongačního faktoru NELF (*Negative ELongation Factor*) a faktoru DSIF (*DRB Sensitivity-Inducing Factor*). Aby byl možný přechod do procesivní elongace, je nezbytná kinázová aktivita pozitivního transkripčního elongačního faktoru b (P-TEFb). P-TEFb fosforyluje NELF, DSIF a CTD RNAPII na Ser2. Po fosforylaci NELF dochází k jeho oddělení a RNAPII může pokračovat v transkripci. *Promoter-proximal pausing* zajišťuje regulaci přechodu do produktivní fáze transkripce. Během produktivní fáze elongace převažuje fosforylace Ser2 nad fosforylací Ser5

a Ser7, které byly vysoce fosforylovány při pozastavení RNAPII. Fosforylace Ser2 umožňuje vazbu transkripčních faktorů důležitých pro elongaci (obr. 2.3).[1, 2]

Poslední fází transkripce je terminace. Při přechodu z elongace je hladina fosforylovaného Ser2 a Thr4 nejvyšší (obr. 2.4). Díky tomu dochází k navázání štěpících, polyadenylačních a terminačních faktorů. Právě terminační faktory CstF (*Cleavage Stimulation Factor*) a CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*) se podílejí na odštěpení pre-mRNA od RNAPII v místě 3' konce, kterým je transkripce ukončena.[3, 4]

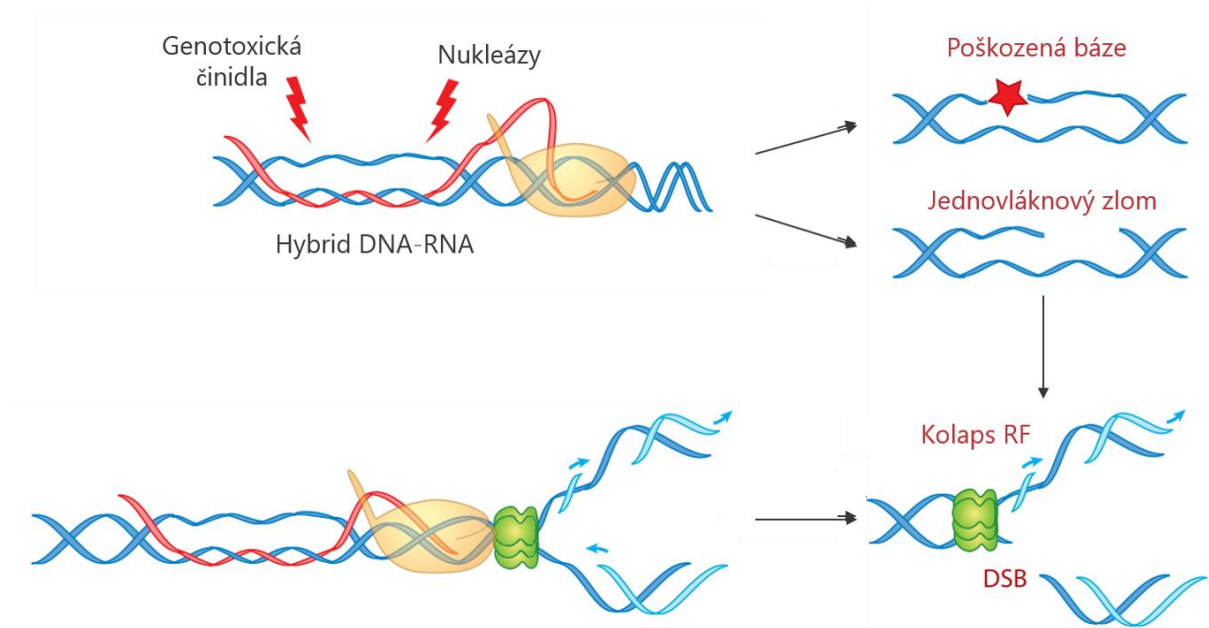


**Obrázek 2: Schéma průběhu transkripčního cyklu.** 1. Dochází k nasednutí RNAPII na promotor. Její CTD není nafosforylována, ale fosforylací Ser5 je umožněno RNAPII utéct z promotoru. 2. Po úniku z promotoru dochází k promotor-proximal-pausing, které slouží k regulaci plynulého přechodu do produktivní fáze elongace. Za pozastavení RNAPII zodpovídají negativní elongační faktory DSIF a NELF. K uvolnění RNAPII dochází za pomoci pozitivního elongačního faktoru P-TEFb, který fosforyluje CTD na Ser2. 3. RNAPII přechází do produktivní fáze a začíná za sebou vytvářet řetězek RNA. 4. Před terminací transkripce se zvýší hladina fosforylace na Thr4, což umožní navázání terminačních faktorů. Následně dochází k odštíření řetězku mRNA. Upraveno podle Harlen a Churchman 2017 [3]

### 2.1.3 Propojení transkripce a oprav DNA

Kromě *promoter proximal pausing* mohou RNAPII zastavit nebo zpomalit nukleozómy, určité typy sekvencí nebo poškození DNA. Pokud RNAPII nečekaně zastaví uprostřed transkripce, může být zachráněna elongačním faktorem TFIIS. TFIIS posune RNAPII zpátky proti směru transkripce, s cílem ji uchovat.[1, 5] Po zacouvání zastavené RNAPII využije buňka tuto příležitost pro opravení poškozeného DNA vlákna pomocí mechanismu zvaného *Transcription-coupled repair* (TCR). Zastavení RNAPII je v tomto případě využito jako mechanismus pro detekci poškození DNA, které díky tomu může být opraveno.[5]

Při zastavení RNAPII během transkripce se však mohou vytvářet také tzv. *R-loops* (obr. 3), RNA-DNA hybridy, které vznikají při chybném spárování templátového vlákna DNA a nově syntetizované RNA. Nově vzniklá vlákna RNA se pohybují v těsné blízkosti otevřené DNA a snadno se s templátem spárují. *R-loops* způsobují zpomalení při replikaci, neboť tvoří překážku pro replikační vidlici. Pokud nejsou tyto překážky včas odstraněny, může dojít ke kolapsu replikační vidlice a zlomům v DNA. Zvýšený výskyt *R-loops* proto může v konečném důsledku vést ke dvouvláknovým zlomům v DNA. Intenzivně transkribované oblasti DNA jsou tedy sice snáze opravovány díky TCR, na druhou stranu jsou však více ohroženy vznikem nového poškození.[6]



**Obrázek 3: Vznik DNA-RNA hybridů (*R-loops*).** V případě, že dojde k vniknutí nově vznikajícího vlákna RNA mezi dvě vlákna DNA, dochází k vytvoření struktury zvané R-loop. Toto místo je vystavené okolním vlivům, v jejichž důsledku může docházet k jednovláknovým zlomům na DNA. Dojde-li k interakci mezi jednovláknovým zlomem a replikační vidlicí, může dojít ke kolapsu replikační vidlice (replication fork, RF) a vzniku zlomu dvouvláknového. Upraveno podle Gaillard a Aguilera 2016 [7]

Při vzniku většího množství dvouvláknových zlomů v buňce dochází k zastavení transkripce v místech jejich výskytu, aby nedocházelo k produkci neúplných transkriptů. Ozáření buněk pomocí UV pak způsobuje obecný pokles transkripce v buňce. Musí dojít k odstranění RNAPII z těla genu a jeho promotoru. Tento děj je zprostředkováván DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*).[8]

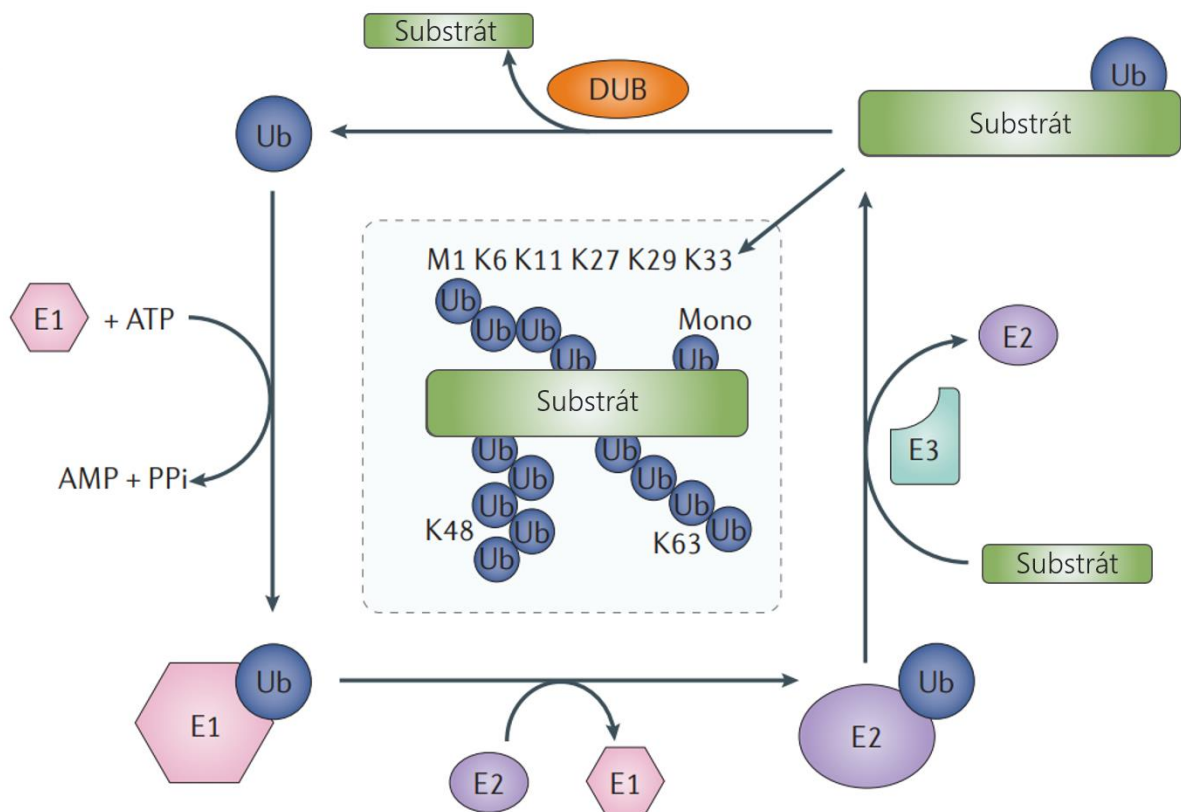


## 2.2 Ubikvitinace

Ubikvitinace je jedním ze signálních procesů probíhajících v buňce, při kterém je k určitým proteinům připojen ubikvitin, 76 aminokyselin dlouhý protein. Ubikvitinace řídí celou řadu buněčných pochodů. Slouží například k označení proteinů, které mají být degradovány, nebo ke zprostředkování či naopak inhibici interakcí mezi proteiny.[9] Ubikvitinaci zajišťuje enzymatická kaskáda skládající z ubikvitin aktivujícího enzymu (E1), ubikvitin konjugujícího enzymu (E2) a ubikvitin ligázy (E3). V lidském genomu najdeme zakódovány dvě E1, přibližně čtyřicet E2 a více než šest set potenciálních E3. Ty totiž obsahují specifické vazebné místo pro substrátový protein, který je třeba propojit s E2 enzymem. Ubikvitiny se na cílový protein vážou izopeptidovou vazbou.[9–11] Izopeptidová vazba vzniká, stejně jako vazba peptidová, mezi karboxylovou skupinou a aminoskupinou, na rozdíl od vazby peptidové je však aspoň jedna ze skupin součástí postranního řetězce.

### 2.2.1 Enzymy zajišťující ubikvitinaci

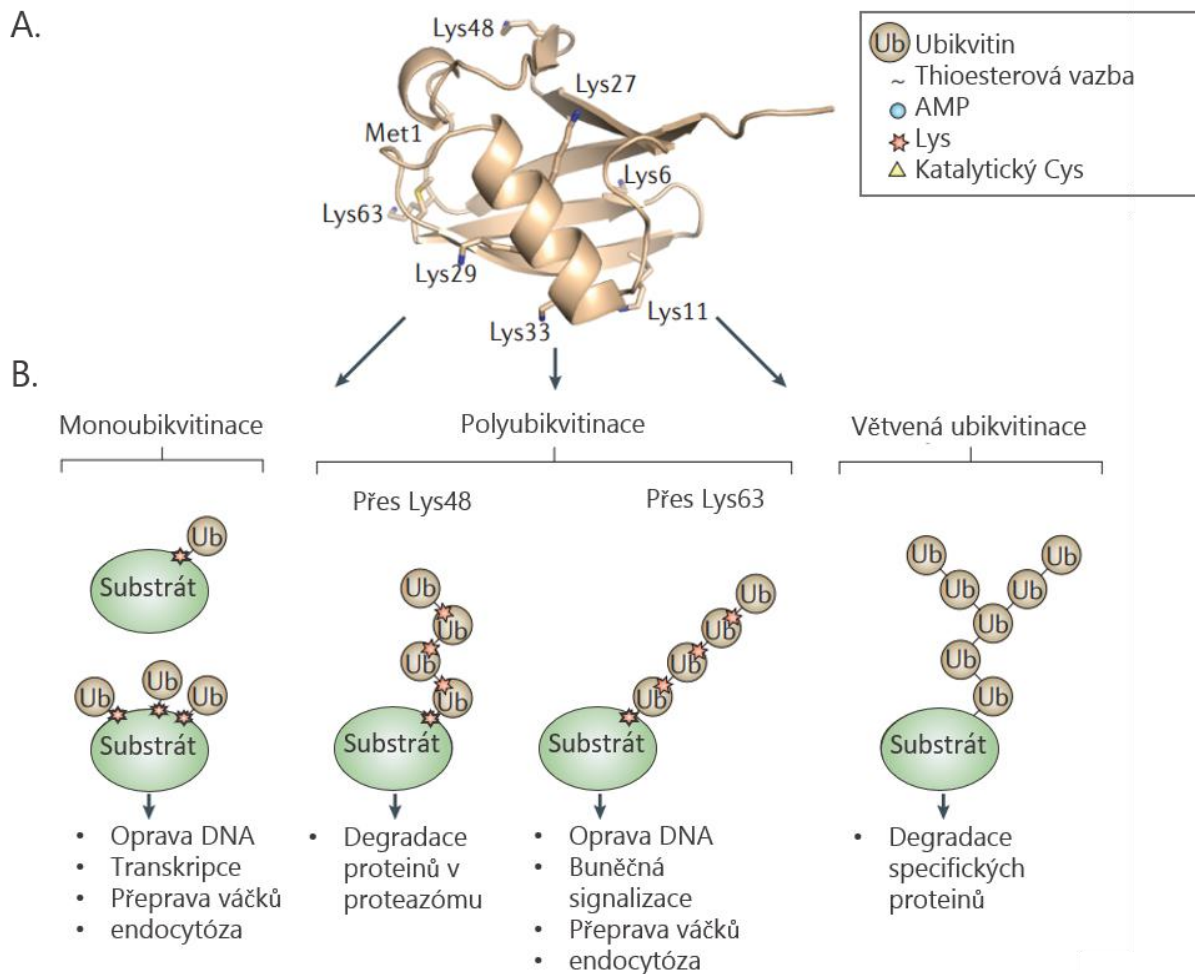
Ubikvitinaci zajišťují tři enzymy (obr. 4). Prvním je ubikvitin aktivující enzym E1, který je zodpovědný za aktivaci ubikvitinu a který pro svou funkci potřebuje ATP. Z hydrolyzy ATP získává E1 energii pro vytvoření vysoce energetické thioesterové vazby mezi C-koncem ubikvitinu a cysteinem ve svém aktivním místě. Takto aktivovaný ubikvitin je poté přenesen k ubikvitin konjugačnímu enzymu E2 a navázán do jeho aktivního místa prostřednictvím thioesterové vazby. Přenos ubikvitinů z E2 enzymu na substrát je zprostředkován E3 ubikvitin ligázou.[10, 12] K odstranění ubikvitinu ze substrátu slouží deubikvitinační enzymy (DUBs), což dělá z ubikvitinace zvratný proces.[11]



**Obrázek 4: Enzymy zajišťující ubikvitinaci a deubikvitinaci.** Ubikvitin je na začátku procesu aktivován E1 a poté je přenesen na E2 a navázán do jeho aktivního místa. Ubikvitin se z E2 přenáší na substrát díky aktivitě enzymu E3. Na substrátu se mohou tvořit různé typy ubikvitinací. Odstranění ubikvitinu ze substrátu mají na starost deubikvitinační enzymy, tzv. DUBs. Upraveno podle Schwertman, Bekker-Jensen a Mailand [13]

## 2.2.2 Ubikvitinační kód

Ubikvitinaci můžeme dělit podle počtu navázaných ubikvitinů na monoubikvitinaci a polyubikvitinaci. Při monoubikvitinaci dochází k přidání jednoho ubikvitinu k substrátu, zatímco při polyubikvitinaci je to ubikvitinů více, zpravidla ve formě lineárního, či větveného řetězce. K řetězení ubikvitinů dochází, když je navázaný ubikvitin dále ubikvitinován, a to na některém ze svých sedmi lyzinových zbytků (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 a Lys63), popřípadě na N-terminálním methioninu (Met1) (obr. 5.A). Řetězce mohou být buď lineární, pokud každý ubikvitin nese pouze jeden další, nebo větvené, když je jeden ubikvitin modifikován dalšími ubikvitiny na dvou či více lyzinech (obr. 5.B).[9, 10]



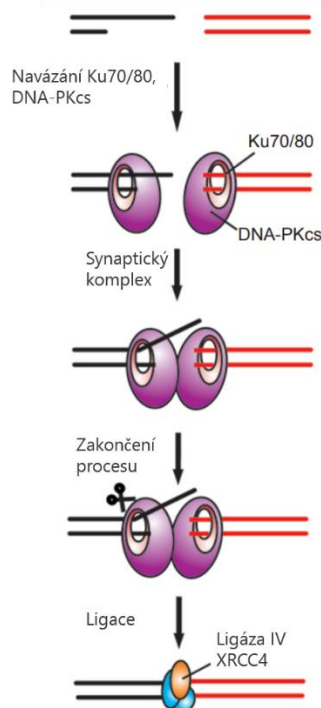
**Obrázek 5: A. Struktura ubikvitínu.** Ubikvitín je protein o 76 aminokyselinách, který obsahuje sedm zbytků lyzinů a jeden methionin. Tyto aminokyseliny lze dále ubikvitinovat, čímž vznikají ubikvitinační řetězce spojené izopeptidovou vazbou. **B. Výsledné produkty ubikvitinace substrátu.** Molekula ubikvitínu se váže na substrát přes aminokyselinu lyzin. Podle počtu ubikvitinů, které jsou připojeny na daný lyzin, dělíme ubikvitinaci na monoubikvitinaci a polyubikvitinaci. Na lyzinových zbytcích vznikají také větvené řetězce. Jednotlivé typy ubikvitinací se liší svou funkcí v signalizaci. Upraveno podle Buetow a Huang 2016 [14]

Až polovina vazeb mezi ubikvitiny je tvořena přes Lys48. Na tomto typu polyubikvitinace je založena proteazomální degradace cílcí na velké množství buněčných proteinů. Pokud je protein označen řetězcem ubikvitinů propojených přes Lys48, dochází k jeho degradaci pomocí proteinového komplexu proteozómu, který štěpením peptidových vazeb degraduje poškozené, špatně sbalené, případně nepotřebné proteiny. Takto se reguluje valná většina buněčných procesů a zabrání se přehlcení buňky přebytečnými proteiny. Druhým nejčastějším typem polyubikvitinace je označení proteinů řetězcem vázaným přes Lys63. Ubikvitinové řetězce vázané přes Lys63 regulují procesy, jako je transport proteinů, aktivace některých proteinových kináz nebo opravy DNA. Lys63 také usnadňuje degradaci některých buněčných struktur, jako jsou například poškozené mitochondrie případně váčky obsahující invazivní patogeny.[10]

## 2.2.3 Ubikvitinace v opravách DNA

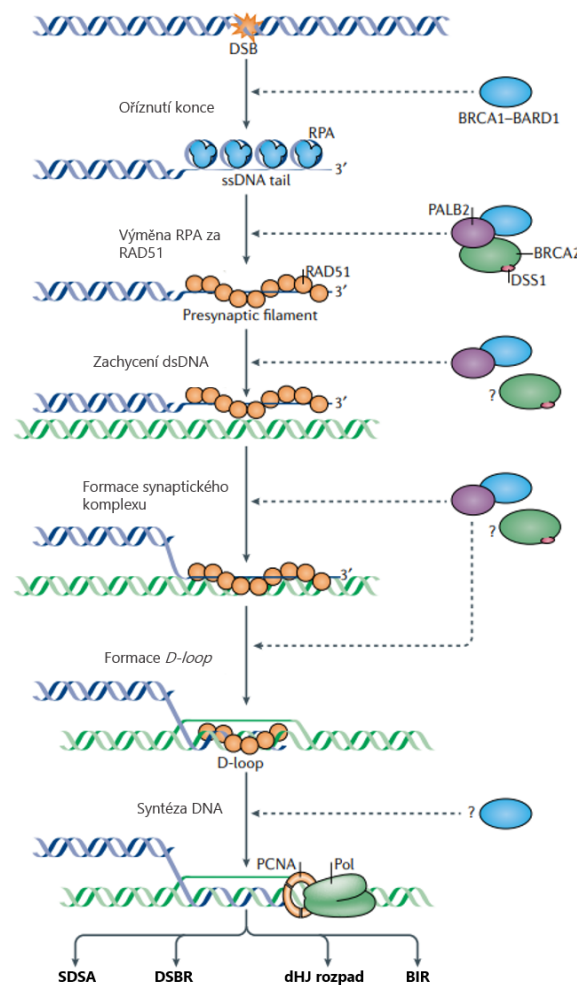
### Poškození DNA a opravné mechanismy

Za nejnebezpečnější formu poškození DNA v eukaryotických buňkách jsou považovány dvouvláknové zlomy (*double strand breaks*, DSBs). Vznik dvouvláknových zlomů mohou vyvolat faktory pocházející jak z vnějšího prostředí (např. UV záření, chemické látky), tak i z fyziologických buněčných procesů (např. kyslíkové radikály). Pokud nedojde k včasné opravě těchto zlomů, může buňka přijít o rozsáhlou část genetické informace, což může vést až k smrti buňky. Dva hlavní mechanismy pro opravu těchto zlomů jsou nehomologické spojování konců (*non-homologous end joining*, NHEJ) a homologní rekombinace (*homologous recombination*, HR). Při NHEJ (obr. 6) je na poškozené konce vázán heterodimer Ku70-Ku80, který konce chrání a poskytuje vazebné místo pro katalytickou podjednotku na DNA závislé proteinkinázy (DNA-PKcs). Fosforylace pomocí DNA-PKcs zajistí navázání nukleázy Artemis, která opracuje konce DNA tak, aby byly vzájemně kompatibilní pro spojení pomocí DNA ligázy IV. Protože jsou při NHEJ konce DNA opracovány a následně spojeny dohromady, dochází při tomto typu opravy ke ztrátě části genetické informace. Pokud jsou navíc chybně propojeny původně nesouvisějící řetězce, vznikají rozsáhlé mutace nebo velká přeskupení chromozomů, což jsou jevy charakteristické pro nádorové buňky.[11]



**Obrázek 6: Schéma nehomologického spojování konců (NHEJ).** Pokud má dojít k opravení zlomu pomocí NHEJ, musí nejprve dojít k navázání heterodimeru Ku70-Ku80 a DNA-PKcs. Díky těmto faktorům jsou nekompatibilní konce opracovány a následně spojeny dohromady. Upraveno podle Weterings a Chen 2008 [15]

Oproti NHEJ, která často generuje chyby, je homologní rekombinace považována za bezchybnou. K homologní rekombinaci však dochází pouze v S a G2 fázi buněčného cyklu, kdy je dostupná sesterská chromatida, sloužící jako templát pro opravu. Během homologní rekombinace (obr. 6) dochází k ořezání konců komplexem MRE11–RAD50–NBS1 (MRN). Endonukleázy EXO1 a BLM (*Bloom syndrom protein*) provedou odstranění zlomených konců a vyprodukují rozsáhlé úseky jednovláknové DNA, která je rychle pokryta replikačním proteinem A (RPA). RPA je následně vyměněn pomocí tumor supresového proteinu BRCA2 (*Breast Cancer 2*) a mediátorových proteinů (např. PALB2 a BRCA1-BARD1) za DNA opravný protein RAD51. Ten umožní vláknku vyhledat jemu podobnou sekvenci v sesterské chromatidě, na které provede tzv. invazi, při níž dochází k propojení vláken DNA a opravné syntéze DNA. Po opravě je čtyřvláknová DNA struktura rozštěpena, čímž znovu vznikají dvouvláknové chromatidy.[11]



**Obrázek 7: Schéma homologní rekombinace za přítomnosti komplexu BRCA1-BARD1.** Při opravě zlomů homologní rekombinací se po zpracování konců naváže RPA, který je poté nahrazen RAD51. Ten umožňuje vyhledání podobné sekvence k opravě zlomu. Propojením DNA vláken vzniká útvar zvaný D-loop a nastává opravná syntéza. Poškozený úsek DNA je tak doplněn podle předlohy tvořené DNA sesterské chromatidy. Komplex BRCA1-BARD1 se tohoto procesu účastní ve vícero krocích, a to v interakci s mnoha různými proteiny. Upraveno podle Tarsounas a Sung 2020 [16]

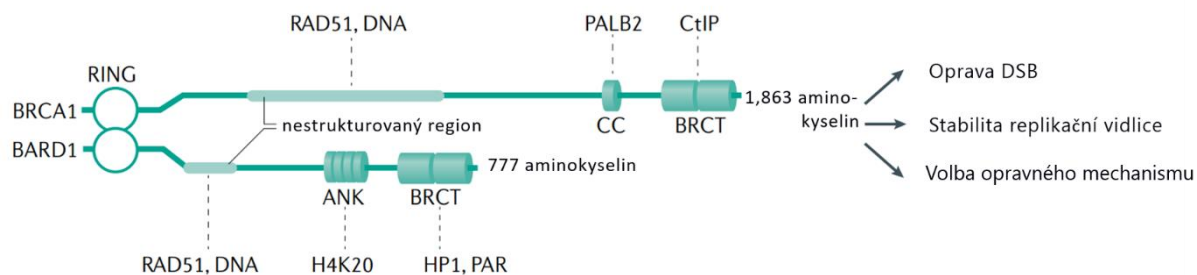
## Ubikvitinace v signalizaci po poškození DNA

Ubikvitinace hraje důležitou roli v signalizaci a opravách dvouvláknových zlomů na DNA. Ubikvitinace pomocí E3 ubikvitin ligáz, jako jsou RNF8 (*RING finger protein 8*) a RNF168 (*RING finger protein 168*), přivolá do místa poškození faktory nezbytné pro opravu zlomů. Tyto opravné faktory obsahují domény vázající ubikvitin (UBDs, *Ubiquitin-Binding Domains*). RNF8 nejprve ubikvitinuje histon H1, čímž vytvoří vazebné místo pro RNF168, který se následně váže do míst dvouvláknových zlomů pomocí UBD. Zde RNF168 ubikvitinuje histon typu H2A. Vazba opravných faktorů, nevyjímaje například protein BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*) a protein 53BP1 (*p53-binding protein 1*), do míst dvouvláknových zlomů nastává právě díky ligázové E3 aktivitě RNF168. BRCA1 jakožto E3 ubikvitin ligáza pravděpodobně také ubikvitinuje histon H2A v místě poškození, přesná funkce této modifikace však zatím není známá.[11]

## **2.3 BRCA1-BARD1 komplex**

BRCA1-BARD1 je komplex proteinů nezbytný pro udržování integrity genomu. Hraje roli v opravných mechanismech DNA, transkripci, ochraně replikační vidlice a při potlačování nádorů. Tumorově supresivní gen BRCA1 (*BRCA1 Cancer type 1*) je nejčastěji mutovaný gen spojený s dědičnou rakovinou prsu a vaječníku. Nositelky mutantních verzí BRCA1 mají 80% riziko, že v průběhu života onemocní rakovinou prsu a 40-65% riziko výskytu rakoviny vaječníku.[16]

Vazebným partnerem BRCA1 je protein BARD1 (*BRCA1-Associated RING Domain protein 1*). BRCA1 a BARD1 se spojují pomocí domény RING (*Really Interesting New Gene*), která se nachází na N-konci těchto dvou proteinů. RING doména obsahuje dvě vazebná místa, v nichž je koordinován zinek, a v komplexu BRCA1-BARD1 je zodpovědná za jeho aktivitu E3 ubikvitin ligázy. Na C-konci BRCA1 i BARD1 se nachází dvě BRCT (*BRCA1 C-Terminal*) repetice. BRCT repetice tvoří doménu rozpoznávající fosfopeptidy a zprostředkovávají tak možnost interakce s různými proteiny fosforylovanými na aminokyselině serinu. Komplexy, které BRCA1 a BARD1 tvoří, jsou proto často závislé na fosforylaci jejich vazebných partnerů. Mezi strukturovanými N-koncovými a C-koncovými doménami se u BRCA1 i BARD1 nachází flexibilní region. Na střední flexibilní část BRCA1 se váže například RAD51 (*RADiation sensitive*), který je nezbytný pro opravu dvouvláknových zlomů pomocí homologní rekombinace. V této střední části se nachází také vazebné místo pro PALB2 (*Partner And Localizer of BRCA2*), který během homologní rekombinace tvoří komplex s BRCA2 (*BRCA2 Cancer type 2*), a doména interagující s nukleovými kyselinami (obr. 8).[16, 17]



**Obrázek 8: Funkční domény BRCA1 a BARD1.** Gen BRCA1 kóduje protein o délce 1863 aminokyselin s mnoha funkčními doménami. BARD1 je dlouhý 777 aminokyselin a s BRCA1 sdílí některé domény. BRCA1 i BARD1 mají na svém N-konci RING (*Really Interesting New Gene*) doménu, díky níž BRCA1 a BARD1 vytváří komplex. Na svém C-konci mají jak BRCA1, tak i BARD1 BRCT (BRCA1 *C-terminal*) doménu, která umožňuje interakci s fosforylovanými proteiny. Díky tomu může BRCA1-BARD1 interagovat se širokou škálou různých proteinů v odpovědi na poškození DNA, jako je CtIP (*CtBP-Interacting Protein*). Ve střední části BRCA1 i BARD1 se nachází nestrukturovaný flexibilní region interagující s RAD51 (*RADiation sensitive*) a DNA. Upraveno podle Tarsounas a Sung 2020 [16]

### 2.3.1 Úloha BRCA1-BARD1 komplexu v udržování stability genomu

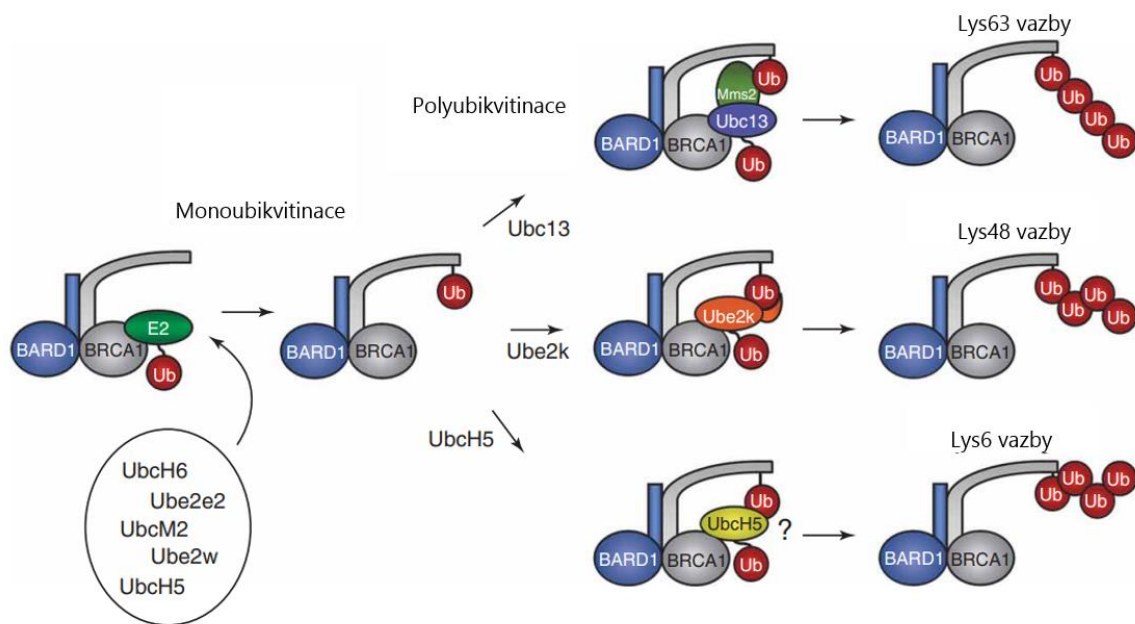
V buňce BRCA1 zastává širokou škálu úloh. Díky své schopnosti interagovat s velkým množstvím proteinů se BRCA1 může účastnit oprav DNA, kontroly buněčného cyklu nebo regulace transkripce.[17] Pro správnou koordinaci těchto úloh je BRCA1-BARD1 součástí několika různých superkomplexů. Kupříkladu BRCA1 interagující s RNAPII může působit pro některé specifické geny jako jejich transkripční koaktivátor. K několika různým superkomplexům se připojí v odpovědi na dvouvláknové zlomy. Kromě úlohy při opravách dvouvláknových zlomů má BRCA1-BARD1 svou funkci i při opravě zastavených replikačních vidlic a případných R-loops. K rozřešení konfliktu mezi transkripcí a replikací dochází díky interakci BRCA1 s předpokládanou RNA-DNA helikázou SENATAXIN (SETX). V elongačním komplexu RNAPII může BRCA1-BARD1 působit jako senzor DNA poškození.[16, 17]

### 2.3.2 BRCA1-BARD1 jako E3 ubikvitin ligáza

BRCA1-BARD1 může fungovat jako E3 ubikvitin ligáza, interagovat s řadou E2 ubikvitin konjugujících enzymů a sestavovat ubikvitinové řetězce (obr. 9). Ubikvitin ligázovou aktivitu nesou RING domény BRCA1 a BARD1. U BRCA1 se v této doméně vyskytuje řada mutací souvisejících s rakovinou, které vyřazují její ubikvitin ligázovou aktivitu. Vyřazení této aktivity je spojováno se samotnou náchylností k rakovině prsu.[16, 18] S RING doménou BRCA1 může interagovat osm různých E2, které rozdělujeme do 3 různých skupin lišících se uspořádáním domén. Do I. skupiny E2 patří UbcH5, UbcH7, Ubc13 a Ube2w, do II. Skupiny Ube2k a do III. skupiny UbcH6, Ube2e2 a UbcM2. Interakce RING domény BRCA1 s konkrétním E2



enzymem určuje, jakým typem ubikvitinového řetězce bude substrát modifikován. Tento mechanismus se uplatňuje při autoubikvitinaci BRCA1-BARD, tedy v případě, že BRCA1-BARD1 zprostředkovává přenos ubikvitinu na sebe sama. Například interakce BRCA1-BARD1 s Ubc13-Mms2 vytváří na BRCA1 řetězce spojené přes Lys63 a interakce s Ube2k řídí syntézu polyubikvitinových řetězců propojených přes Lys48. UbcH5 je unikátní svou schopností přenést na BRCA1 první ubikvitin a následně řetězec prodlužovat. Autoubikvitinace BRCA1-BARD1 zvyšuje ubikvitin-ligázovou aktivitu komplexu více než dvacetkrát. [17, 18] Mezi další substráty BRCA1-BARD1 patří kupříkladu histon H2A, případně podjednotky RPB1 a RPB8 z RNAPII [16]



**Obrázek 9: Schéma autoubikvitinačního mechanismu komplexu BRCA1-BARD1.** Komplex BRCA1-BARD1 má schopnost autoubikvitinace. Typ ubikvitinace závisí na typu E2, která s BRCA1 interaguje. Monoubikvitinace je způsobena interakcí BRCA1 a UbcH6, Ube2e2, UbcM2 and Ube2w. Další typy E2 vedou k polyubikvitinaci. Interakce s Ubc13 katalyzuje tvorbu řetězců ubikvitinu propojených přes Lys63, interakce s Ube2k tvorbu řetězců propojených přes Lys48 a interakce s UbcH5 tvorbu řetězců propojených přes Lys6. Upraveo podle Christensen, Brzovic a Klevit 2007 [18]

## 2.4 Ubikvitinace RNAPII

V případě, že RNAPII narazí na templátové DNA na poškození, které nedovede překonat, dojde k jejímu zastavení. K takovému poškození může dojít například působením UV záření, kdy se zformují dimery pyrimidinu. Ty představují pro RNAPII bariéru, přes kterou se sama bez pomoci nedostane.[8, 19]

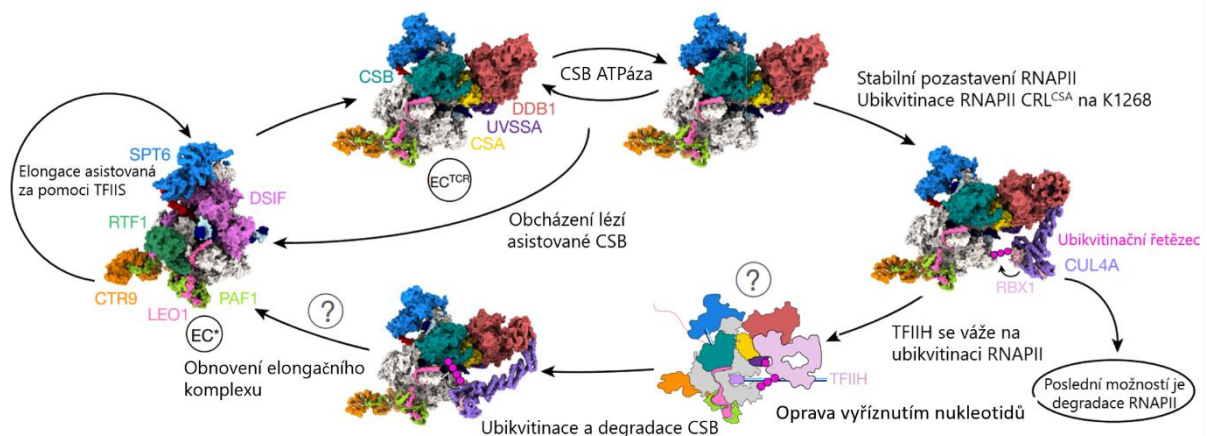
Buňka má k dispozici víc možností, jak si s poškozením DNA poradit (obr. 10), aniž by přišla o RNAPII. První možností je použití TFIIS. Ten v případě, že RNAPII narazí na překážku,



pomůže RNAPII zacouvat, odštěpit konec syntetizované RNA a obnovit transkripci. V případě neúspěchu TFIIS dochází na řadu ATPázová aktivita faktoru CSB (*Cockayne Syndrome B*), který tvoří komplex s CSA. Společně se pokouší RNAPII protlačit směrem vpřed přes poškození. Pokud nedojde k protlačení RNAPII za pomoci CSB, kvůli výskytu objemnějších adduktů na DNA, dochází k ubikvitinaci RPB1 na Lys1268 za pomoci CRL4 (*Cullin-RING ubiquitin ligase complex 4*). Tato akce vede k navázání TFIIH, který využije aktivitu ATPázy a s RNAPII znovu zacouvá, čímž se templátová DNA zpřístupní pro faktory podílející se na TCR a je tak dán volný průchod opravám. Pokud dojde k opravě DNA, je obnoven elongační komplex RNAPII a RNAPII může pokračovat v transkripci. V případě, že i tato možnost selže a poškození je neopravitelné, musí být RNAPII z transkriptu degradována.[19, 20]

V živočišných buňkách za ubikvitinaci RNAPII vedoucí k její degradaci pravděpodobně odpovídají ubikvitin ligázy NEDD4 (*Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 4*) a komplex ElonginA/B/C s Culin5. NEDD4 provede na RPB1 počáteční monoubikvitinaci a komplex ElonginA/B/C-Culin5 poté může RPB1 polyubikvitinovat pomocí řetězce ubikvitinů propojených přes Lys48. Toto je signál pro degradaci RNAPII pomocí proteazómu.[21–23]

Ačkoliv bylo prokázáno, že také BRCA1-BARD1 komplex je schopný ubikvitinovat RNAPII, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*, předpokládá se, že tato ubikvitinace spíše nevede k její degradaci. Je tedy možné, že tato ubikvitinace je součástí jiné signální dráhy. Bylo zjištěno, že BRCA1-BARD1 ubikvitinuje RPB1 a TFIIE v preiniciačním komplexu, čímž zabrání správné asociaci RNAPII s TFIIE a TFIIH a znemožní tak iniciaci syntézy mRNA. TFIIE a TFIIH po ubikvitinaci pomocí BRCA1 z preiniciačního komplexu odpadnou.[24]



**Obrázek 10: Model spřažení transkripce s opravami DNA.** Cyklus začíná od EC\* (aktivní elongační komplex) a ukazuje jednotlivé kroky v případě zastavení RNAPII na poškozené DNA. Může dojít buď k překonání poškození RNAPII nebo v nejhorším případě k degradaci RNAPII. RNAPII může překonat lézi pomocí TFIIS, případně ATPázové aktivity CSB. V případě neúspěchu je ubikvitinován Lys1268 na RPB1, díky čemuž se do místa navážou opravné faktory a poškození může být opraveno. Po opravě DNA dochází k obnovení aktivního elongačního komplexu. Upraveno podle Kopic, Wagner, Chernev, Urlaub a Cramer 2021 [25]

### 3 CÍLE PRÁCE

Při transkripci, jednom z nejdůležitějších buněčných procesů, dochází k syntéze RNA pomocí RNA polymeráz (RNAP), které se během syntézy pohybují po vláknech DNA. Pokud RNAP při pohybu po DNA narazí na poškození, které nedovede překonat, syntéza RNA je zastavena. Aby mohla RNAP v syntéze pokračovat, je potřeba poškozené místo opravit. Zde se může uplatňovat ubikvitinace RNA polymerázy II (RNAPII), který slouží jako jeden ze signálů pro navázání opravných faktorů. Tato situace by však nemusela být jediná, v níž dochází k ubikvitinaci RNAPII. Bylo zjištěno, že ubikvitinace určité části RNAPII by mohla bránit interakci mezi transkripčním faktorem TFIIE a RNAPII, čímž by mohla ovlivnit zahájení transkripčního procesu. Předpokládá se, že v tomto regulačním mechanismu by se mohl uplatňovat BRCA1-BARD1 komplex, který je RNAPII schopen ubikvitinovat, a to na její katalytické podjednotce RPB1.

Abychom zjistili, jestli by ubikvitinace RPB1 pomocí BRCA1-BARD1 komplexu skutečně mohla bránit interakci mezi RNAPII a TFIIE, rozhodli jsme ubikvitinovat N-terminální část podjednotky RPB1, která je za tuto interakci zodpovědná, za podmínek *in vitro*, a identifikovat konkrétní místa, kde k této ubikvitinaci dochází.

K dosažení těchto výsledků jsme si stanovili následující cíle:

1. Připravit konstrukty pro expresi N-terminální části RPB1,
2. Exprimovat a purifikovat tyto fragmenty z bakterií *E. coli*,
3. Optimalizovat podmínky pro ubikvitinaci N-terminální části RPB1 *in vitro*,
4. Určit místa, kde ubikvitinace probíhá.

## 4 MATERIÁLY

### 4.1 Chemikálie, kity, enzymy

<i>Applichem</i>	agaróza; ampicilin; Comassie brilliant blue-R250; dimethylsulfoxid (DMSO); dithiotreitol (DTT); dodecylsírán sodný (SDS); ethanol; glycerol; chloramfenikol; chlorid draselný; chlorid sodný; imidazol; isopropanol; glycin; izopropyl $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG); kyselina boritá; kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA); Luria-Bertani (LB) médium; methanol; N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED); peroxodisírán amonný (APS); polyvinylidenfluoridová (PVDF) membrána; Tris; $\beta$ -merkптоethanol; bromfenolová modř; hydrogenfosforečnan sodný; dihydrogenfosforečnan draselný; chlorid hořčnatý
<i>Bio-Rad</i>	Quick Start™ Bradford
<i>General electric (GE)</i>	Superdex 200 Increase 10/300 GL
<i>Invitrogen</i>	protilátky proti BRCA1 a BARD1; protilátky proti myší IgG; SYBR® DNA gel stain
<i>Laktino</i>	Sušené mléko odtučněné
<i>Merci</i>	kyselina octová
<i>Millipore</i>	Immobilon® western blotting substrát
<i>NewEngland Biolabs (NEB)</i>	Q5® DNA polymeráza; SspI restriční endonukleáza; T4 DNA polymeráza; HpaI restriční endonukleáza; tlumivý roztok 2.1; 2x OneTaq® Quick-load® Master Mix; 5x Q5® tlumivý roztok; 5x Q5® enhancer; 6x nanášecí barva; 10x CutSmart® tlumivý roztok
<i>QIAGEN</i>	agarózové Ni-NTA kuličky; QIAquick® kit pro extrakci DNA z gelu; QIAquick® PCR purifikační kit
<i>Roche</i>	inhibitory proteáz Complete™

<i>Roth</i>	Tween-20
<i>SigmaAldrich</i>	dCTP; dGTP; dNTP; GenElute™ miniprep kit pro izolaci plazmidů; protein SigmaMarker™; Protilátka proti králičí IgG; Whatman® filtrační papír; ATP
<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	Protilátka proti RPB1

## 4.2 Roztoky

Název	Složení
1x TBE	90 mM Tris-HCl, 90 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA
4x SDS nanášecí roztok	0,25M Tris-HCl, 8% SDS, 0,4% bromfenolová modř, 35% glycerol, 0,4 mM β-merkapt ethanol
1x SDS roztok	50 mM Tris-HCl, 0,38 M glycin, 0,1% SDS
Barvicí roztok A	25% izopropylalkohol, 10% kyselina octová, 0,05% Coomassie brilantní modř R-250
Barvicí roztok B	10% izopropylalkohol, 10% kyselina octová, 0,005% Coomassie brilantní modř R-250
Odbarvovací roztok	10% kyselina octová
Lyzační roztok	50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, complete EDTA-free inhibitory proteá, 10 mM imidazol
Promývací roztok	50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM imidazol
Eluční roztok	25 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 400 mM imidazol
Roztok na gelovou filtraci	25 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM DTT

Reakční roztok pro <i>in vitro</i> ubikvitinaci	25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl
PBST	3,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,3 mM KCl, 135 mM NaCl, 0,5% Tween, pH 7,4
Blokovací roztok	5% sušené mléko v PBST

### 4.3 Plazmidy

Název	Připojené štítky	Sekvence	Umístění štítků	Odkaz
2G-T	6× His polyhistidinový štítek, GST	TEV proteázou štěpná sekvence	N-terminální	<a href="https://www.addgene.org/29707/">https://www.addgene.org/29707/</a>
2Bc-T	6× His polyhistidinový štítek	TEV proteázou štěpná sekvence	C-terminální	<a href="https://www.addgene.org/37236/">https://www.addgene.org/37236/</a>

### 4.4 Média

Název	Složení
LB agar	1,5% agar v LB médiu
LB médium	2,5% LB médium v deionizované vodě

### 4.5 Bakteriální kmeny

Bakteriální kmen	Genotyp	Antibiotická rezistence
<i>E. coli</i> DH5a	<i>E. coli</i> supE44 Δ(lacZYA-argF)U196 (Φ80ΔlacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	-

<i>E. coli</i> RIPL (DE3)	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>(r8 m8<sup>-</sup>)</sub> dcm <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> galλ(DE3) endA Hte [argU proL Cam <sup>r</sup> ] [argU ileY leuW Strep/Spec <sup>r</sup> ]	Chloramfenikol
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>)</sub> gal dcm (DE3) pRARE (Cam <sup>R</sup> )	Chloramfenikol

## 4.6 Oligonukleotidy

Název	Sekvence (5'-3')
RPB1 1 v1 F	TACTTCCAATCCAATGCACACGGTGGTGGCCCCC
RPB1 335 v1 R	TTATCCACTTCCAATGTTATTAGGGACGCCAGACTTCTGCAT
RPB1 356 v1 R	TTATCCACTTCCAATGTTATTAGCCATCAGGTTCCCTCGCAC
RPB1 335 v3 R	GGATTGGAAGTAGAGGTTCTCGGGACGCCAGACTTCTGCAT
RPB1 356 v3 R	GGATTGGAAGTAGAGGTTCTC GCCATCAGGTTCCCTCGCAC
GST v3 F	TTAAGAAGGAGATATAGTTCATGTCCCCTATACTAGGTTAT
T7F	TAATACGACTCACTATAGGG
T7R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
pGEX 5 F	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG

## 4.7 Templáty

RPB1 byl darován doktorem Markem Šebestou ve formě plazmidu 438B-RPB1.

## 4.8 Proteiny

Název	Sekvence	Zdroj
UBA1	6xHis-UBA1	Veronika Klápšřová
UBCH5C	6xHis-UBCH5C	Veronika Klápšřová
BRCA1/BARD1	FLAG-BRCA1/6xHis-BARD1	Veronika Klápšřová
ubikvitin	ubikvitin	Veronika Klápšřová

## 4.9 Programy PCR

Program	Krok	Teplota [°C]	Čas [min]	Opakování
Touchdown PCR	1	95	5	1x
	2	95	0,5	10x
	3	62	0,5	
	4	72	2	
	5	95	0,5	10x
	6	58	0,5	
	7	72	2	
	8	95	0,5	10x
	9	54	0,5	
	10	72	2	
	11	72	6	1x
Koloniová PCR	1	95	10	1x
	2	95	0,5	35x
	3	55	0,5	
	4	72	1,5	
	5	72	5	1

## 5 METODY

### 5.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce (*Polymerase chain reaction*, PCR) je metoda, při které se zmnoží určitý fragment DNA ohraničený specifickými oligonukleotidy neboli primery. Při této metodě se cyklicky opakují denaturace, anelace (nasedání primerů) a extenze.

Reakce o objemu 50  $\mu\text{l}$  obsahovala 10  $\mu\text{l}$  5x koncentrovaného tlumivého roztoku, 10  $\mu\text{l}$  5x koncentrovaného enhanceru, 0,5  $\mu\text{M}$  primer *Forward* a 0,5  $\mu\text{M}$  primer *Reverse*, 200  $\mu\text{M}$  směs deoxynukleotidů (dNTPs), 0,5  $\mu\text{l}$  Q5 polymerázy a 50 ng templátové DNA. Použitý protokol viz tab. 4.9. Výsledné produkty byly separovány pomocí agarózové elektroforézy.

### 5.2 Elektroforéza pomocí agarózového gelu

Tato metoda slouží k rozdělení biomakromolekul dle jejich velikosti, na základě pohybu kladných molekul k náboji zápornému.

Vzorky na elektroforézu byly smíchány s 6x NEB nanášecí barvičkou a puštěny na 1 % agarózový gel obsahující SYBR<sup>™</sup> DNA gel stain. Aparatura byla zalita tlumivým roztokem 1x TBE. Vzorky byly separovány při konstantním napětí 120 V po dobu 25 min. Gel byl vizualizován pomocí přístroje Amersham Imager 600.

### 5.3 Restrikční štěpení plazmidů

Plazmidová DNA byla linearizována pomocí restrikčních endonukleáz. Během klonování byly použity plazmidy, které byly linearizovány SspI, nebo HpaI restrikční endonukleázou.

Reakce o objemu 50  $\mu\text{l}$  obsahovala 5  $\mu\text{l}$  10x CutSmart tlumivého roztoku, 1  $\mu\text{g}$  plazmidu 2GT / 2BcT, 1  $\mu\text{l}$  SspI / HpaI. Směs byla inkubována po dobu 1 h při teplotě 37 °C.

### 5.4 Gelová extrakce

Po elektroforéze byla DNA o patřičné délce extrahována z agarového gelu. Pro gelovou extrakci byl použit Gel Extraction Kit od společnosti QIAquick.



## 5.5 Příprava rekombinantních molekul DNA

Jako klonovací metoda bylo použito klonování nezávislé na ligaci (*Ligation Independent Cloning*, LIC). Těto metodě předcházela PCR. PCR produkty a linearizované plazmidy byly opracovány T4 DNA polymerázou, která na lineárních úsecích DNA vytvoří přečnívající konce. Opracované inzerty a vektory byly použité pro přípravu anelační reakce a poté byly transformovány do buněk *E.coli*.

### 5.5.1 Opracování konců molekul T4 DNA polymerázou (LIC treatment)

Extrahované molekuly DNA byly opracovány T4 DNA polymerázou. Reakce o objemu 50  $\mu$ l obsahovala 25  $\mu$ l produktu PCR, 5  $\mu$ l 10x 2.1 tlumivého roztoku, 2,5  $\mu$ l 100mM DTT, 2,5 mM dCTP případně dGTP, 1  $\mu$ l T4 DNA polymerázy. Reakce byla inkubována při 22 °C po dobu 30 min a následně zastavena inkubací při 75 °C po dobu 25 min.

### 5.5.2 Anelace

Po opracování DNA molekul T4 DNA polymerázou byly molekuly inkubovány 10 min na pokojové teplotě v poměru inzerť/vektor 3:1, čímž byly spárovány přesahy vytvořené na vektoru a inzertu T4 DNA polymerázou. Takto připravené vzorky byly následně transformovány do buněk *E. coli* kmene DH5 $\alpha$ .

### 5.5.3 Koloniová PCR

Tato metoda slouží k identifikaci kolonií obsahující plazmid s inzertem. V této metodě je použit primer genově specifický, který se váže na požadovanou sekvenci inzertu, a primer nasedající na plazmid. Produkt vzniká pouze v případě, pokud je do plazmidu správně vložen inzerť.

Buňky z testované kolonie byly odebrány do 20  $\mu$ l deionizované vody a tento vzorek byl následně použit pro přípravu reakční směsi. K 3  $\mu$ l bakteriální suspenze bylo přidáno 5  $\mu$ l 2x koncentrovaného mixu One Taq Quick Load, 1  $\mu$ l 30 % DMSO, 0,5  $\mu$ M primer *Forward* a 0,5  $\mu$ M primer *Reverse*. Reakční směs byla následně inkubována v termocykleru, program viz tabulka 4.9.

## 5.6 Elektroforéza SDS-PAGE

SDS-PAGE neboli elektroforéza v polyakrylamidovém gelu prováděná za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) je metoda sloužící pro separaci biomakromolekul dle jejich velikosti.

Vzorky byly smíchány s 4x SDS roztokem a nadále byly denaturovány po dobu 5 min v 95 °C. Aparatura pro SDS PAGE byla zalita roztokem 1x SDS a denaturované vzorky byly puštěny na gel. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 210 V po dobu 50 min. Gel byl následně

inkubován 15 min v barvicím roztoku A a dále ponechán v barvicím roztoku B po dobu 1 h. Gel byl následně odbarvován po dobu 2 h v odbarvovacím roztoku. Snímky gelu byly pořízeny na přístroji Amersham Imager 600.

## **5.7 Transformace plazmidové DNA do buněk *E.coli***

Plazmidy byly inkubovány se 100  $\mu$ l buněk *E.coli* na ledu po dobu 30 min a poté byla směs vystavena po dobu 45 s tepelnému šoku při 42°C. Bylo přidáno 900  $\mu$ l LB média a buňky byly regenerovány v 37°C po dobu 1 h.

Buňky byly vysety na Petriho misky s LB agarem obsahujícím příslušné antibiotikum a ponechány v 37 °C po dobu 16 h.

## **5.8 Purifikace plazmidové DNA**

K purifikaci plazmidů byl použit Plasmid Purification Kit od společnosti Sigma-Aldrich.

## **5.9 Exprese proteinů v malém objemu**

Kompetentní buňky RIPL a Rosetta, do kterých byly transformované předpřipravené plazmidy, byly vysety na Petriho misky obsahující příslušné antibiotikum. Narostlé kolonie byly poté využity k nasazení noční prekultury, z níž bylo na druhý den 200  $\mu$ l zaočkováno do 20 ml LB média s příslušným antibiotikem (100  $\mu$ g/ml ampicilin, 35  $\mu$ g/ml chloramfenikol). Nadále byla kultura inkubována při teplotě 37 °C, než dosáhla optické hustoty OD<sub>600</sub> 0,5. Exprese proteinů byla indukována pomocí 0,5mM IPTG a kultury byly inkubovány přes noc při teplotě 16 °C za stálého třepání 190 rpm. Další den byla kultura stočena pomocí centrifugy po dobu 12 min při 6000xg a při teplotě 12 °C. Výsledky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

## **5.10 Test solubility**

K ověření solubility exprimovaných proteinů byl bakteriální pelet z 20 ml kultury resuspendován v lyzačním roztoku a suspenze byla následně sonikována přístrojem VCX 500 s amplitudou 40 % po dobu 1 min 30 s (puls 1 s, pauza 5 s). Vzorky byly stočeny na centrifuze při 16000 g po dobu 30 minut.

## 5.11 Exprese proteinů ve velkém objemu

Proteiny byly exprimovány podle stejného protokolu jako při expresi v malém objemu. Bylo připraveno 50 ml prekultury, z níž bylo 25 ml na druhý den zaočkováno do 2 l LB média s příslušným antibiotikem (100 µg/ml ampicilin, 35 µg/ml chloramfenikol). Cílové proteiny byly exprimovány ve 4 l LB média.

## 5.12 Purifikace proteinů

Je to metoda složená z řady procesů, která vede k vyextrahování proteinů z dané směsi.

### 5.12.1 Lýza buněk a centrifugace

Bakteriální pelet byl resuspendován v lyzačním roztoku a suspenze byla následně sonikována přístrojem VCX 500 s amplitudou 40 % po dobu 8 min (puls 30 s, pauza 55 s). Nadále byla použita centrifuga při 21000xg po dobu 1 h.

### 5.12.2 Purifikace

Agarózové Ni-NTA kuličky, které váží specifické proteiny obsahující His-Tag, byly ekvilibrované do promývacího roztoku a 1 h inkubovány se supernatantem. Poté byl supernatant, který nenavázal proteiny, odstraněn na filtrační koloně. Ni-NTA kuličky byly promyty promývacím roztokem. Protein byl nadále 3x eluován 3 ml elučního roztoku a výsledky byly zanalyzovány pomocí SDS-PAGE. Vzorek byl zakoncentrován pomocí koncentrátoru Vivaspin 15 Turbo a dále purifikován pomocí gelové filtrace.

### 5.12.3 Gelová filtrace

Gelová filtrace slouží k separaci molekul dle jejich velikosti. Proteiny procházejí kolonou, naplněnou pórovitým materiálem (např. agarózou). Velké molekuly vychází z kolony jako první, neboť jsou příliš velké, aby prošly skrz všechny póry, a tak gel obtékají. Oproti tomu malé pronikají do všech pórů různých velikostí. Kolona použitá pro gelovou filtraci byla Superdex 200 Increase 10/300. Eluční frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Na základě výsledků elektroforézy byly vybrány pouze eluční frakce obsahující cílové proteiny. Ty byly následně spojeny a zakoncentrovány pomocí koncentrátoru Vivaspin 15 Turbo. Následně byl vzorek rozalíkvótován na 7µl alíkvóty, které byly zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80 °C.

### 5.13 *In vitro* ubikvitinační eseje

Ubikvitinace je kaskáda enzymatických reakcí vedoucích k navázání ubikvitinu na cílový protein, tzv. substrát. *In vitro* ubikvitinační eseje nám umožňují zjistit, zda je zvolený substrát za daných podmínek ubikvitinován.

Reakce byla míchána v reakčním roztoku pro *in vitro* ubikvitinace. K substrátu o koncentraci 0,5 – 32  $\mu\text{M}$  byl přidán ubikvitin o koncentraci 20 $\mu\text{M}$  a ubikvitinační enzymy – UBA1 (E1 enzym) o koncentraci 0,5 $\mu\text{M}$ , UBCH5C (E2 enzym) o koncentraci 1 $\mu\text{M}$  a BRCA1-BARD1 (E3 ubikvitin ligáza) o koncentraci 2 $\mu\text{M}$ . Reakční směs byla inkubována 1 min při 37°C. Následně byla ubikvitinační reakce iniciována přidáním 5mM ATP + MgCl<sub>2</sub> a vzorek byl inkubován po dobu 2 h v 37 °C. Výsledky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a western blotu.

### 5.14 Western Blot

Western blot je technika používaná k ověření přítomnosti určitého proteinu ve vzorku. Nejprve byly proteiny separovány pomocí SDS-PAGE a poté přeneseny na PVDF membránu pomocí blotovacího zařízení. Membrána byla po dobu 1 h inkubována v blokovacím roztoku bohatém na proteiny, které zablokují nespecifické vazby dalších proteinů. Následně byly na proteiny navázány primární protilátky, specifické pro cílový protein, a dále pak sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou. Blot byl vyvolán přidáním substrátu pro křenovou peroxidázu a výsledky byly zobrazeny na přístroji Amersham Imager 600.

### 5.15 Analýza ubikvitinace pomocí hmotnostní spektrometrie

Gel byl předán pracovišti CL Proteomika za účelem štěpení a následné identifikace proteinů ve vybraných prouzcích metodou LC-MS/MS na přístroji Orbitrap Lumos Tribrid spectrometer (Thermo Fisher Scientific).

## 6 VÝSLEDKY

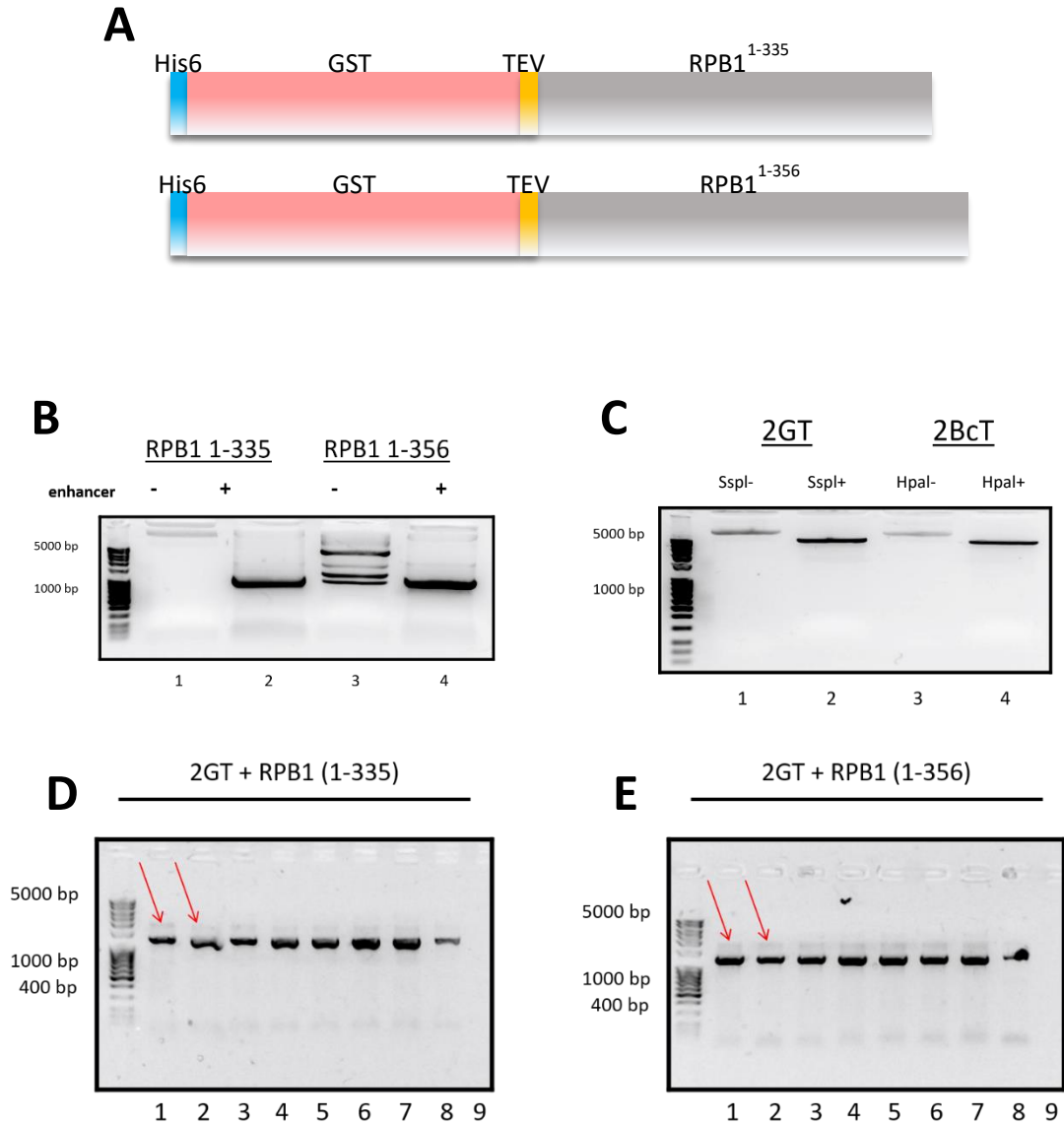
### 6.1 Příprava rekombinantních plazmidů metodou LIC

#### 6.1.1 Příprava plazmidů 2GT + RPB1<sup>1-335</sup> a 2GT + RPB1<sup>1-356</sup>

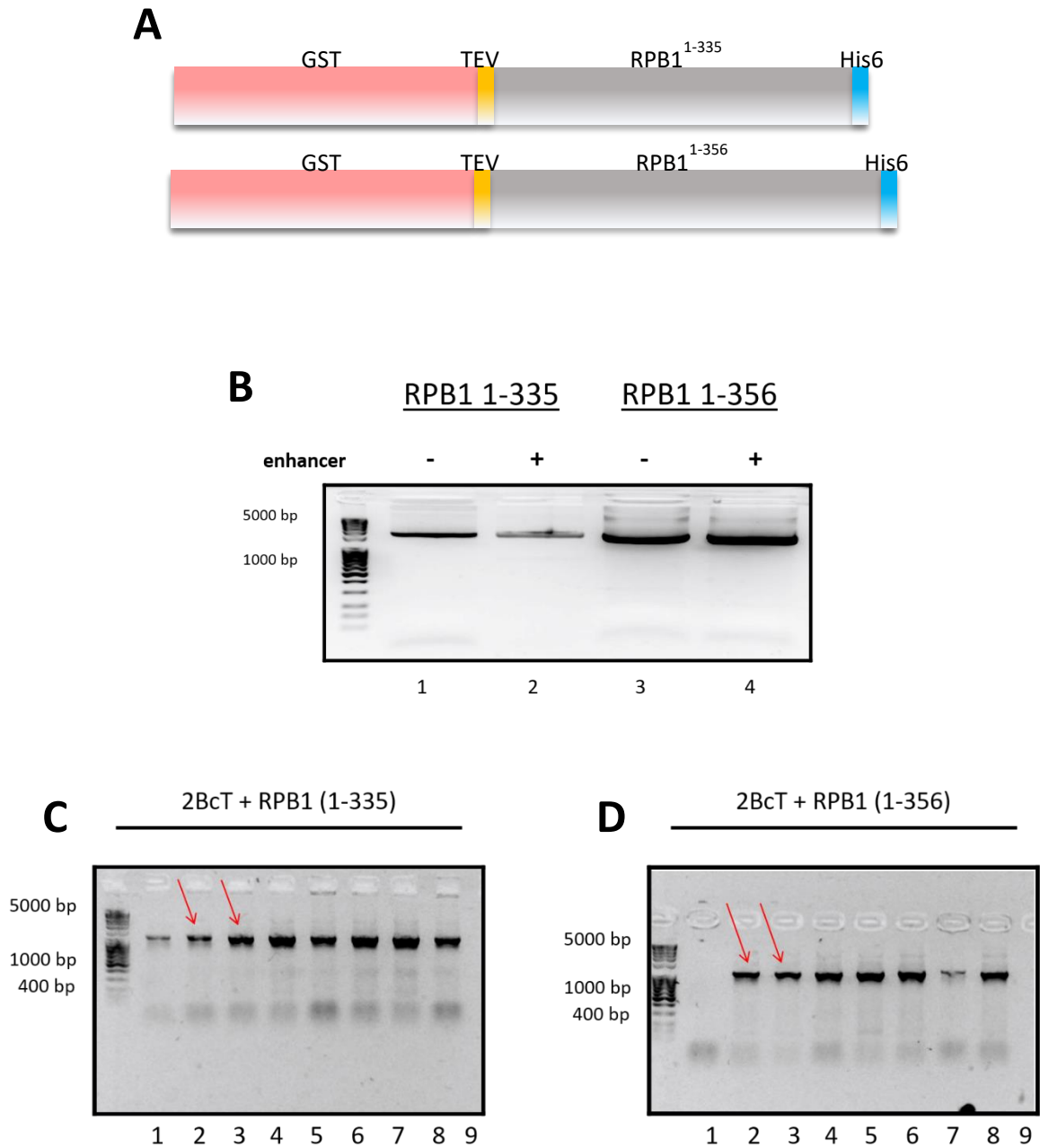
Úseky genů RPB1<sup>1-335</sup> a RPB1<sup>1-356</sup> byly amplifikované pomocí metody PCR za použití oligonukleotidů RPB1 1 v1 F a RPB1 335 v1 R, případně RPB1 356 v1 R (obr. 11.B), a plazmidu 438B-RPB1 jakožto templátu. Inzerty byly vloženy do plazmidové DNA 2GT, který umožňuje expresi cílového proteinu ve fúzi s N-terminálním polyhistidinovým štítkem (His6), glutathion-S-transferázou (GST) a štěpným místem pro TEV (*tobacco etch virus*) proteázu (obr. 11.A). Plazmid 2GT byl linearizován restriční endonukleázou SspI (obr. 11.C) a po opracování T4 DNA polymerázou smíchán do anelační reakce s inzerty, které byly taktéž opracovány T4 DNA polymerázou. Anelační reakce byly poté transformovány do bakterií *E.coli* kmene DH5a. Kolonie bakterií byly druhý den testovány pomocí PCR metody k identifikaci kolonií obsahující rekombinantní plazmid s inzertem (obr. 11.D, E). Pro potvrzení, že byl inzert správně vložen do plazmidu, byl použit primer RPB1 1 v1 F, který se váže na požadovanou sekvenci inzertu, a primer T7 R nasedající na sekvenci v plazmidu 2GT. Tím je zajištěno, že produkt vznikne pouze v případě, že je inzert vložen do plazmidu. Z bakterií tak byly izolovány pouze plazmidy obsahující inzert a jejich sekvence byla následně ověřena sekvenováním. Plazmidy 2GT + RPB1<sup>1-335</sup> a 2GT + RPB1<sup>1-356</sup> byly poté použity jako templát pro další klonování.

#### 6.1.2 Příprava plazmidů 2BcT + GST-RPB1<sup>1-335</sup> a 2BcT + GST-RPB1<sup>1-356</sup>

Abychom získali konstrukt pro expresi fragmentů RPB1 ve fúzi s N-terminálním glutathion-S-transferázou (GST) a C-terminálním polyhistidinovým štítkem (His6) (obr. 12.A), byly úseky GST-RPB1<sup>1-335</sup> a GST-RPB1<sup>1-356</sup> amplifikované pomocí metody PCR za použití primerů GST v3 F a RPB1 335 v3 R, případně RPB1 356 v3 R (obr. 12.B). Jako templát byly použity plazmidy 2GT + RPB1<sup>1-335</sup> a 2GT + RPB1<sup>1-356</sup>. Vzniklé inzerty byly následně vloženy do plazmidu 2BcT, který umožňuje expresi cílového proteinu ve fúzi s C-terminálním štítkem His6. Plazmid byl linearizován pomocí restriční endonukleázy HpaI (obr. 11.C). Postup pro přípravu cílových plazmidů byl totožný s postupem z kapitoly 6.1.1. Pro potvrzení, že byl inzert správně vložen do plazmidu, byl použit primer pGEX 5 F, který nasedá na GST sekvenci přítomnou v inzertu, a primer T7 R, který váže sekvenci přítomnou v plazmidu 2BcT. Plazmidy obsahující inzert (obr. 12.C, D) byly izolovány z bakterií a jejich sekvence byla následně ověřena sekvenováním. Plazmidy 2BcT + GST-RPB1<sup>1-335</sup> a 2BcT + GST-RPB1<sup>1-356</sup> byly poté použity pro expresi cílových fragmentů.



**Obrázek 11: Příprava plazmidů 2GT + RPB1<sup>1-335</sup> a 2GT + RPB1<sup>1-356</sup>.** (A) Schéma konstruktů – His6-GST-TEV-RPB1<sup>1-335</sup> a His6-GST-TEV-RPB1<sup>1-356</sup>. (B) Elektroforéza PCR inzertů obsahujících sekvenční RPB1<sup>1-335</sup> a RPB1<sup>1-356</sup>. (C) Plazmidy 2GT a 2BcT před a po štěpení restričními enzymy SspI a HpaI. (D)(E) Elektroforéza kontrolní PCR plazmidů 2GT + RPB1<sup>1-335</sup> a 2GT + RPB1<sup>1-356</sup>. Šipky označují dále používané vzorky.



**Obrázek 12: Příprava plazmidů 2BcT + GST-RPB1<sup>1-335</sup> a 2BcT + GST-RPB1<sup>1-356</sup>.** (A) Schéma konstruktů – GST-TEV-RPB1<sup>1-335</sup>-His6 a GST-TEV-RPB1<sup>1-356</sup>-His6. (B) Elektroforéza PCR inzertů obsahujících sekvence GST-RPB1<sup>1-335</sup> a GST-RPB1<sup>1-356</sup>. (C)(D) Elektroforéza kontrolní PCR plazmidů 2BcT + GST-RPB1<sup>1-335</sup> a 2BcT + GST-RPB1<sup>1-356</sup>. Šipky označují dále používané vzorky.

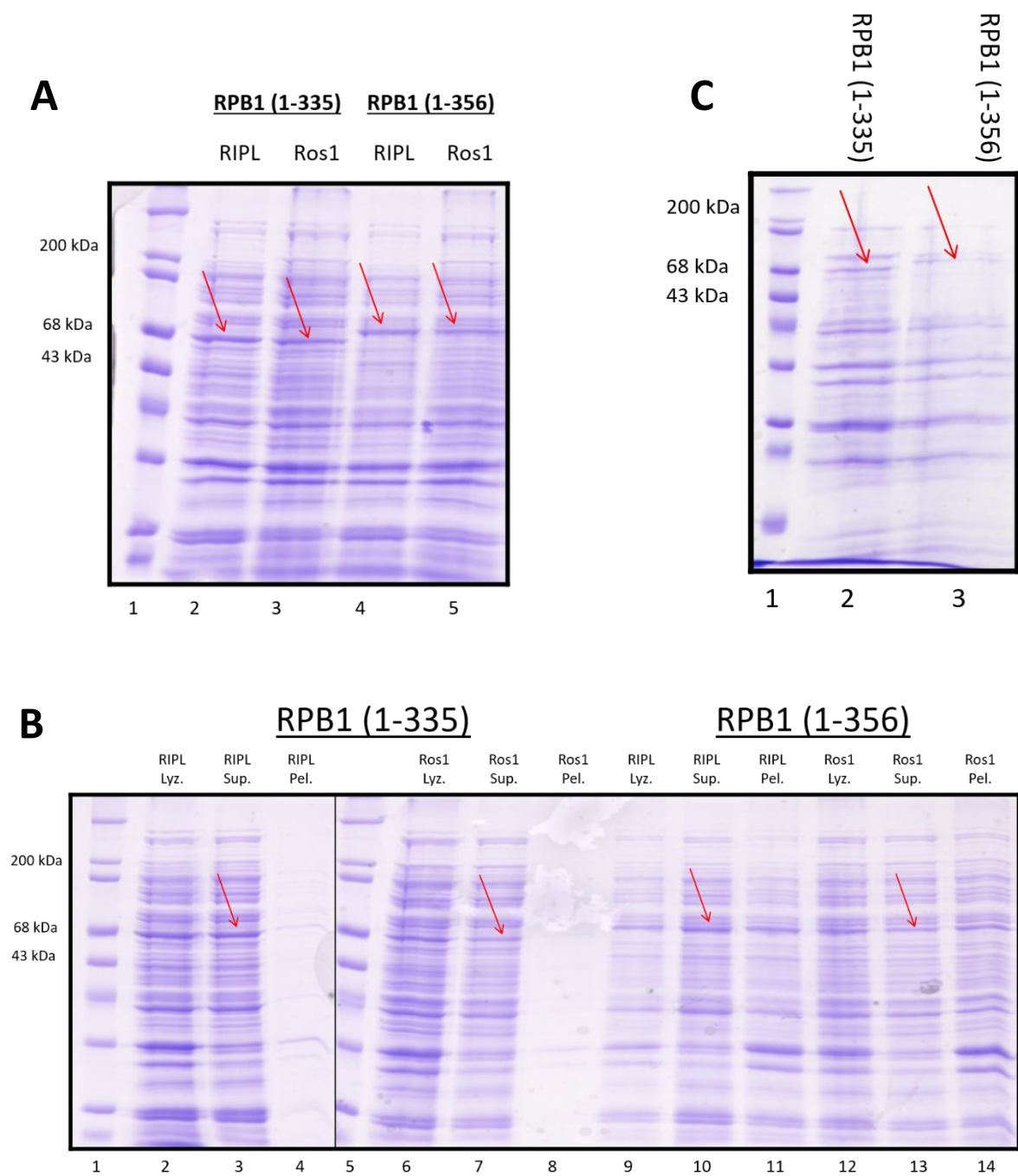
## 6.2 Exprese a purifikace proteinů

### 6.2.1 Exprese proteinů GST-RPB1<sup>1-335</sup> a GST-RPB1<sup>1-356</sup>

Za účelem optimalizace exprese RPB1 fragmentů byly plazmidy 2BcT + GST-RPB1<sup>1-335</sup> a 2BcT + GST-RPB1<sup>1-356</sup> transformovány do dvou různých kmenů buněk *E. coli*, Rosetta a RIPL. Exprese proteinů probíhala za stálého třepání 190 rpm (otáček za minutu) při teplotě 16 °C po dobu 16 h. Míra exprese fragmentů RPB1 se mezi bakteriálními kmeny RIPL a Rosetta výrazně nelišila (obr. 13.A).

Pro ověření solubility exprimovaných proteinů byly bakteriální pelety z exprese v malém měřítku resuspendovány v lyzačním roztoku a homogenizovány pomocí sonikace. Solubilní a nesolubilní frakce byla oddělena pomocí centrifugy a výsledné frakce byly porovnány na SDS-PAGE gelu (obr. 13.B). Jak u RPB1<sup>1-335</sup>, tak i u RPB1<sup>1-356</sup> bylo možné pozorovat cílový protein v solubilní frakci, a to v případě obou typů bakteriálních kmenů. Poté byla uskutečněna exprese proteinů ve velkém objemu (obr. 13.C), pro kterou byl zvolen bakteriální kmen RIPL, a to z důvodu mírně vyššího podílu RPB1 fragmentů v solubilní frakci.





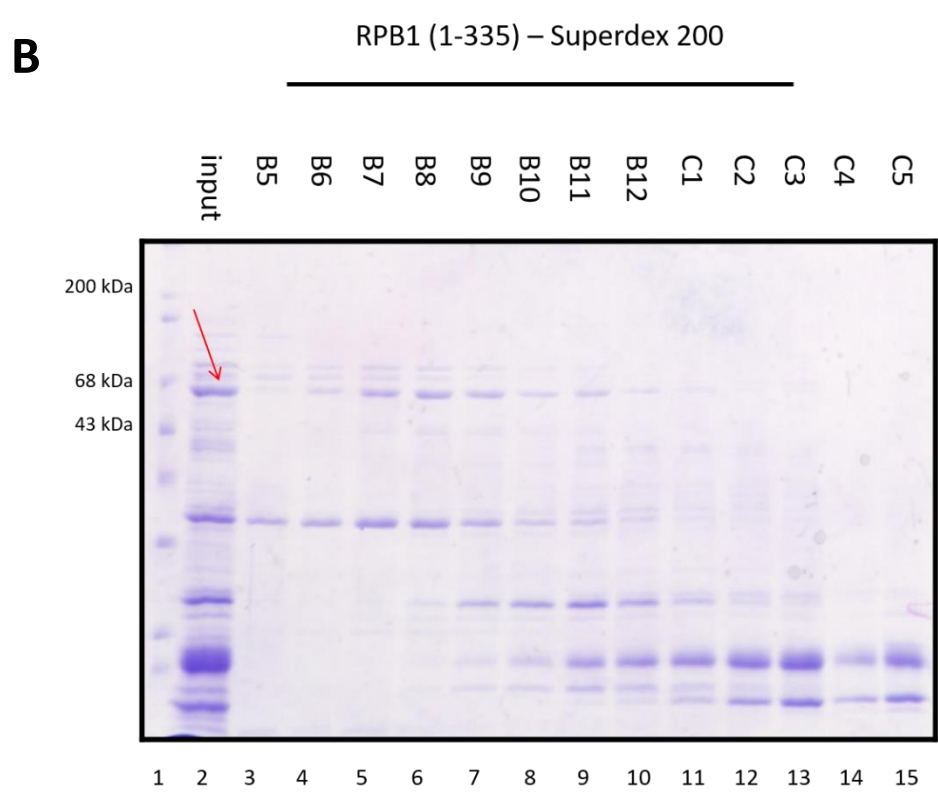
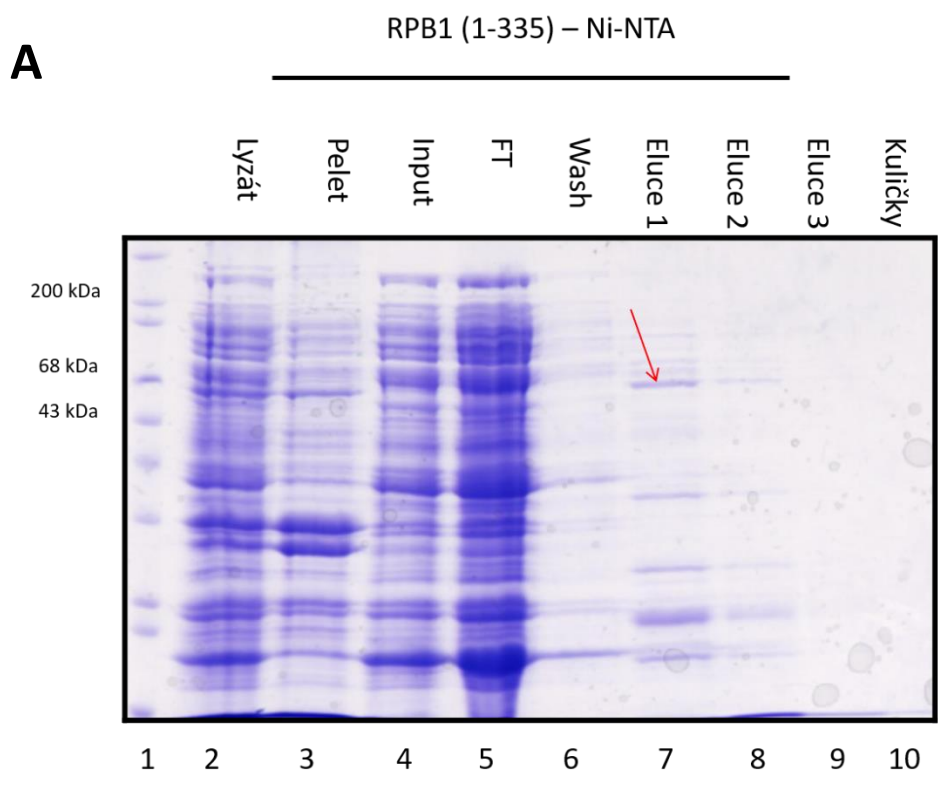
**Obrázek 13: Expresse proteinů GST-RPB1<sup>1-335</sup> a GST-RPB1<sup>1-356</sup>.** (A) Expresní testy GST-RPB1<sup>1-335</sup> a GST-RPB1<sup>1-356</sup> v kmenech *E. coli* Rosetta1 a RIPL. Šipky označují exprimovaný protein. (B) Testy solubility GST-RPB1<sup>1-335</sup> a GST-RPB1<sup>1-356</sup>. SDS-PAGE porovnávací lyzát (Lyz.), supernatant (Sup.) a pelet (Pel.), tedy vstupní, solubilní a nesolubilní frakci. Šipky označují cílové proteiny v solubilní frakci. (C) Expresse GST-RPB1<sup>1-335</sup> a GST-RPB1<sup>1-356</sup> ve velkém objemu kultury RIPL *E. coli*. Šipky označují exprimovaný protein.

## 6.2.2 Purifikace GST-RPB1<sup>1-335</sup> a GST-RPB1<sup>1-356</sup>

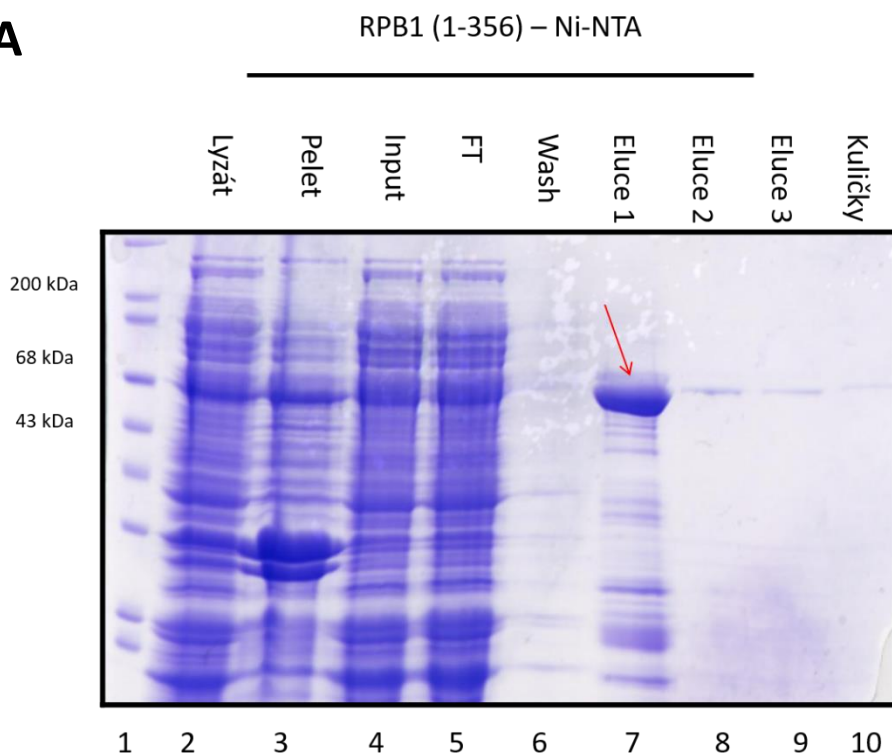
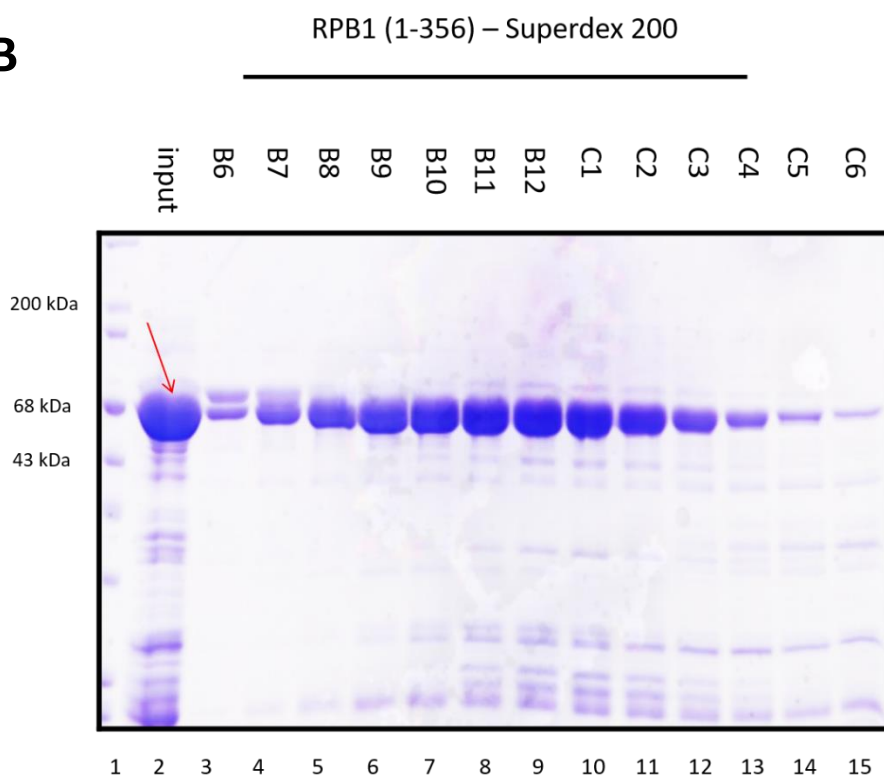
K purifikaci proteinů GST-RPB1<sup>1-335</sup> i GST-RPB1<sup>1-356</sup> byl použit stejný protokol. Bakteriální pelet pocházející z 4 l média byl resuspendován v lyzačním roztoku a homogenizován pomocí sonikace. Solubilní a nesolubilní frakce byla oddělena pomocí centrifugace. Supernatant byl inkubován s agarózovými Ni-NTA kuličkami, které mají schopnost specificky navázat proteiny obsahující polyhistidinový štítek. Navázané proteiny byly eluovány elučním roztokem obsahujícím vysokou koncentraci imidazolu, který zapříčinil jejich uvolnění z Ni-NTA kuliček. Přítomnost proteinů v elučních frakcích byla ověřena pomocí Bradfordova činidla a na SDS-PAGE gelu. Eluční frakce byly zakoncentrovány a nadále purifikovány pomocí gelové filtrace, která slouží k separaci proteinů na základě jejich velikosti.

Nejprve byla purifikována varianta GST-RPB1<sup>1-335</sup>. Již po Ni-NTA purifikaci (obr. 14.A) bylo na gelu patrné, že většina cílového proteinu se nacházela v nesolubilní frakci, tedy v peletu, a z Ni-NTA kuliček se eluovalo pouze malé množství proteinu. Protože vzorek nanášený na gelovou filtraci obsahoval pouze nízkou koncentraci GST-RPB1<sup>1-335</sup> a velké množství kontaminujících proteinů, nepodařilo se získat frakci, která by obsahovala tento protein v dostatečné čistotě (obr. 14.B). Z tohoto důvodu nebyla tato varianta RPB1 nadále využívána.

Oproti tomu v případě varianty GST-RPB1<sup>1-356</sup> byla většina proteinu solubilní a eluční frakce z Ni-NTA purifikace obsahovaly vysokou koncentraci tohoto RPB1 fragmentu (obr. 15.A). Díky tomu bylo protein možno dočistit pomocí gelové filtrace (obr. 15.B), jejíž výsledné frakce B7 – C4 obsahující nejvyšší množství proteinu RPB1 byly koncentrovány a následně zamrazeny při teplotě -80 °C. Tento protein byl nadále používán jako substrát pro *in vitro* ubikvitinační eseje.



**Obrázek 14: Purifikace GST-RPB1<sup>1-335</sup>.** (A) SDS-PAGE frakcí Ni-NTA purifikace GST-RPB1<sup>1-335</sup>. Šipka označuje cílový protein v první eluční frakci. (B) SDS-PAGE frakcí proteinu GST-RPB1<sup>1-335</sup> po gelové filtraci. Šipka označuje cílový protein ve vstupní frakci pro gelovou filtraci.

**A****B**

**Obrázek 15: Purifikace GST-RPB1<sup>1-356</sup>.** (A) SDS-PAGE frakcí Ni-NTA purifikace GST-RPB1<sup>1-356</sup>. Šipka označuje cílový protein v první eluční frakci. (B) SDS-PAGE frakcí proteinu GST-RPB1<sup>1-356</sup> po gelové filtraci. Šipka označuje cílový protein ve vstupní frakci pro gelovou filtraci.

## 6.3 Ubikvitinace GST-RPB1<sup>1-356</sup> *in vitro*

### 6.3.1 Ubikvitinace GST-RPB1<sup>1-356</sup> *in vitro*

Pro zjištění, zda BRCA1-BARD1 komplex ubikvitinuje N-koncový fragment RPB1 za podmínek *in vitro*, byly připraveny *in vitro* ubikvitinační eseje se substrátem GST-RPB1<sup>1-356</sup>. Jako ubikvitinační enzymy byly použity UBA1 (E1 enzym), UBCH5C (E2 enzym) a BRCA1-BARD1 komplex (E3 enzym). Reakce byly iniciovány přidáním ATP a inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 2 h. Produkty ubikvitinace byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE gelu a metody western blot.

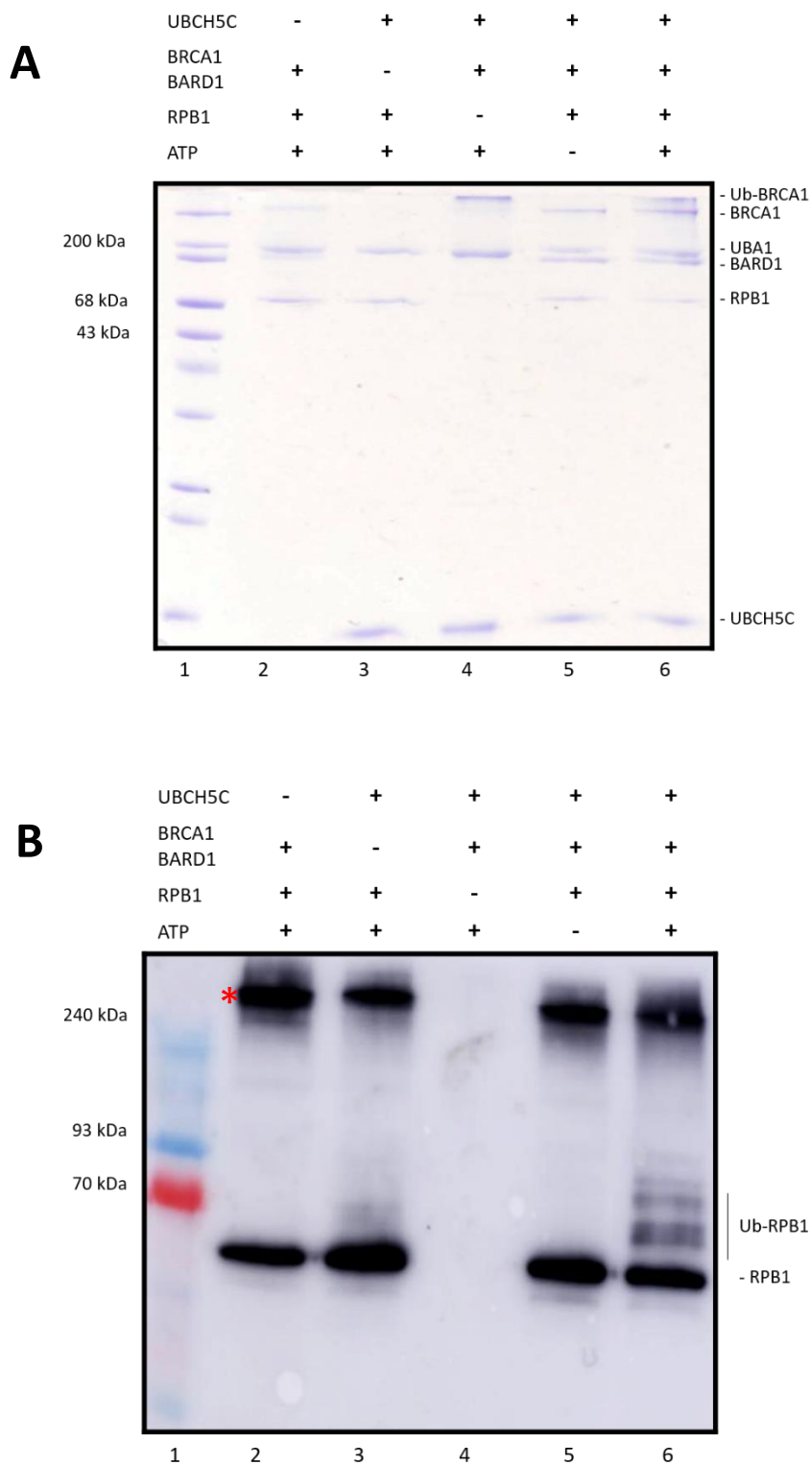
Za výchozích podmínek nebylo možné výsledné produkty ubikvitinace RPB1 na SDS-PAGE gelu pozorovat, neboť jejich koncentrace byla příliš nízká (obr. 16.A). Oproti tomu při analýze pomocí western blotu, vyvolaného protilátkou  $\alpha$ -RPB1, byly ubikvitinační produkty RPB1 detekovány (obr. 16.B).

Ve vzorcích z reakce obsahující všechny potřebné složky kromě RPB1 substrátu docházelo k posunu v migraci proteinů BRCA1 a BARD1 na SDS-PAGE gelu (obr. 16.A). To by mohlo být zapříčiněno zvýšením molekulové hmotnosti těchto dvou proteinů a odpovídat schopnosti BRCA1-BARD1 se autoubikvitinovat, neboť v reakci, do níž nebylo přidáno ATP, k tomuto posunu nedocházelo.

### 6.3.2 Optimalizace ubikvitinace GST-RPB1<sup>1-356</sup>

Ve snaze najít vhodnější podmínky pro *in vitro* ubikvitinaci RPB1, které by vedly k vyšším výtěžkům ubikvitinační reakce, byla prodloužena doba inkubace a zdvojnásobena koncentrace ubikvitinačního enzymu UBCH5C.

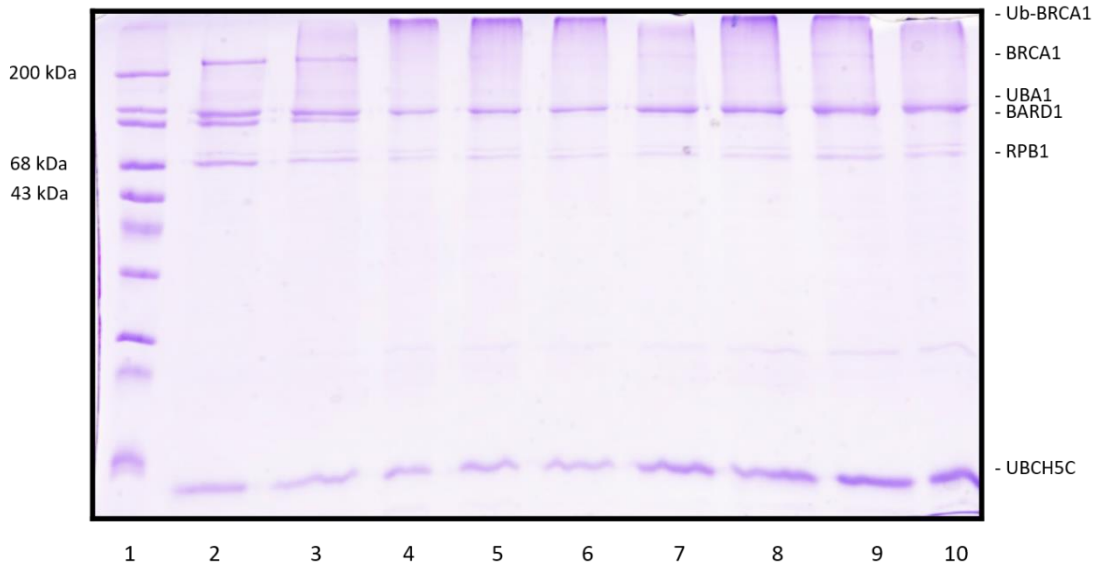
Za daných podmínek se na SDS-PAGE gelu opět objevily produkty autoubikvitinace BRCA1, která po 2 h inkubace dosáhla svého maxima. Na rozdíl od autoubikvitinace BRCA1 nebyla ubikvitinace RPB1 ani za těchto podmínek na SDS-PAGE gelu detekovatelná (obr. 17.A). Na western blotu vyvolaném protilátkou  $\alpha$ -RPB1 se začaly produkty ubikvitinace RPB1 objevovat po 1 h inkubace a po druhé hodině inkubace se hladina ubikvitinace RPB1 již dále nezvyšovala (obr. 17.B). Western blot vyvolaný protilátkou  $\alpha$ -BRCA1 potvrdil, že u BRCA1 dochází v reakcích ke zvyšování molekulové hmotnosti, což by mělo odpovídat autoubikvitinaci tohoto proteinu. Většina proteinu BRCA1 se nacházela v ubikvitinované formě po 2 h inkubace. Efektivita autoubikvitinace BRCA1 byla vyšší v reakcích obsahující dvojnásobné množství UBCH5C (obr. 17.C).



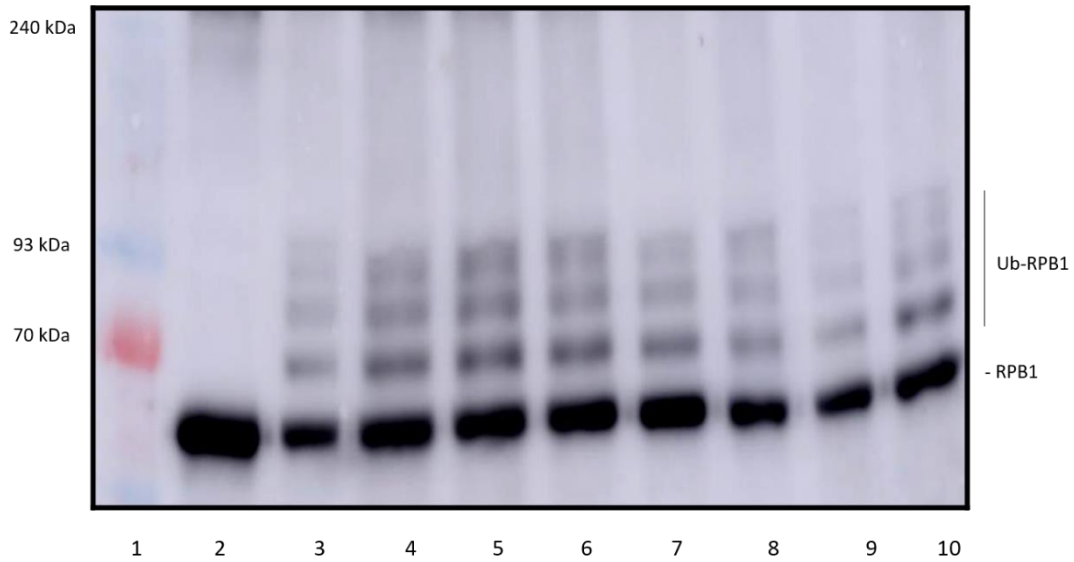
**Obrázek 16: Ubikvitinace GST-RPB1<sup>1-356</sup> *in vitro*.** (A) SDS-PAGE analýza *in vitro* ubikvitinačních reakcí. Produkty reakcí byly porovnávány na SDS-PAGE gelu. Pouze v případě, že byly v reakci přítomné UBA1, UBCH5C, BRCA1-BARD1, RPB1 a ATP, byl na gelu pozorován produkt autoubikvitinace BRCA1. Hladina ubikvitinace RPB1 byla v těchto reakcích nízká, a proto nebylo možné produkty pozorovat na SDS-PAGE. (B) Analýza produktů ubikvitinačních reakcí pomocí western blotu, vyvolaného protilátkou  $\alpha$ -RPB1. V reakci obsahující všechny potřebné složky bylo na western blotu možno detekovat produkty ubikvitinace RPB1. Hvězdička označuje nespecifickou vazbu protilátky anti-RPB1.

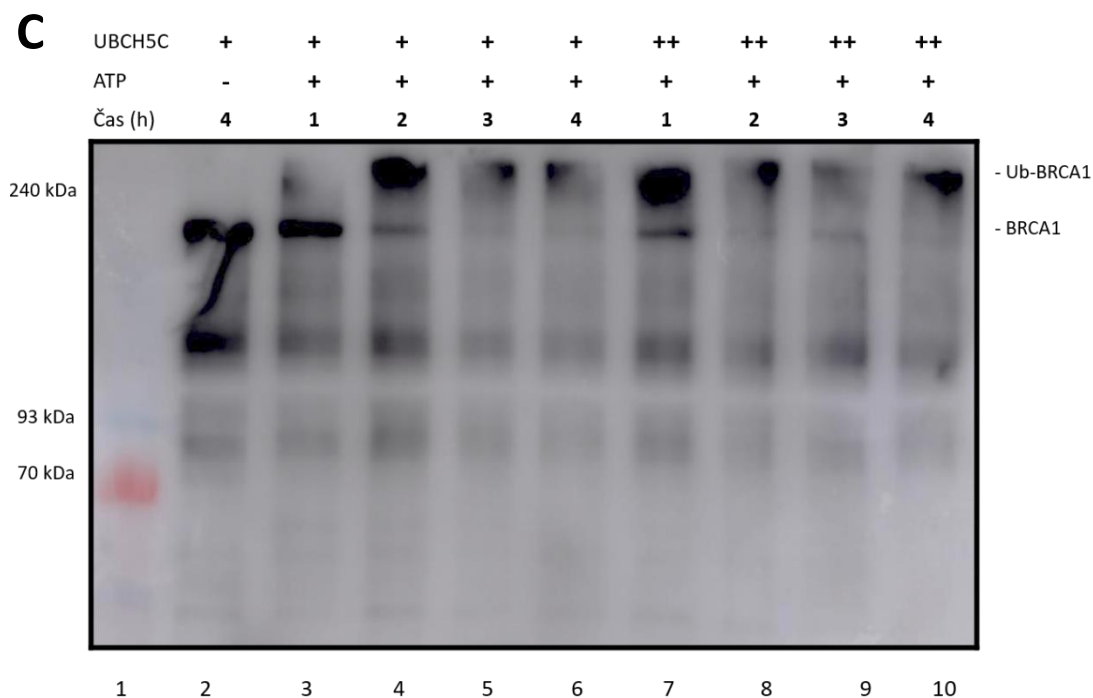
**A**

UBCH5C	+	+	+	+	+	++	++	++	++
ATP	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Čas (h)	4	1	2	3	4	1	2	3	4

**B**

UBCH5C	+	+	+	+	+	++	++	++	++
ATP	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Čas (h)	4	1	2	3	4	1	2	3	4



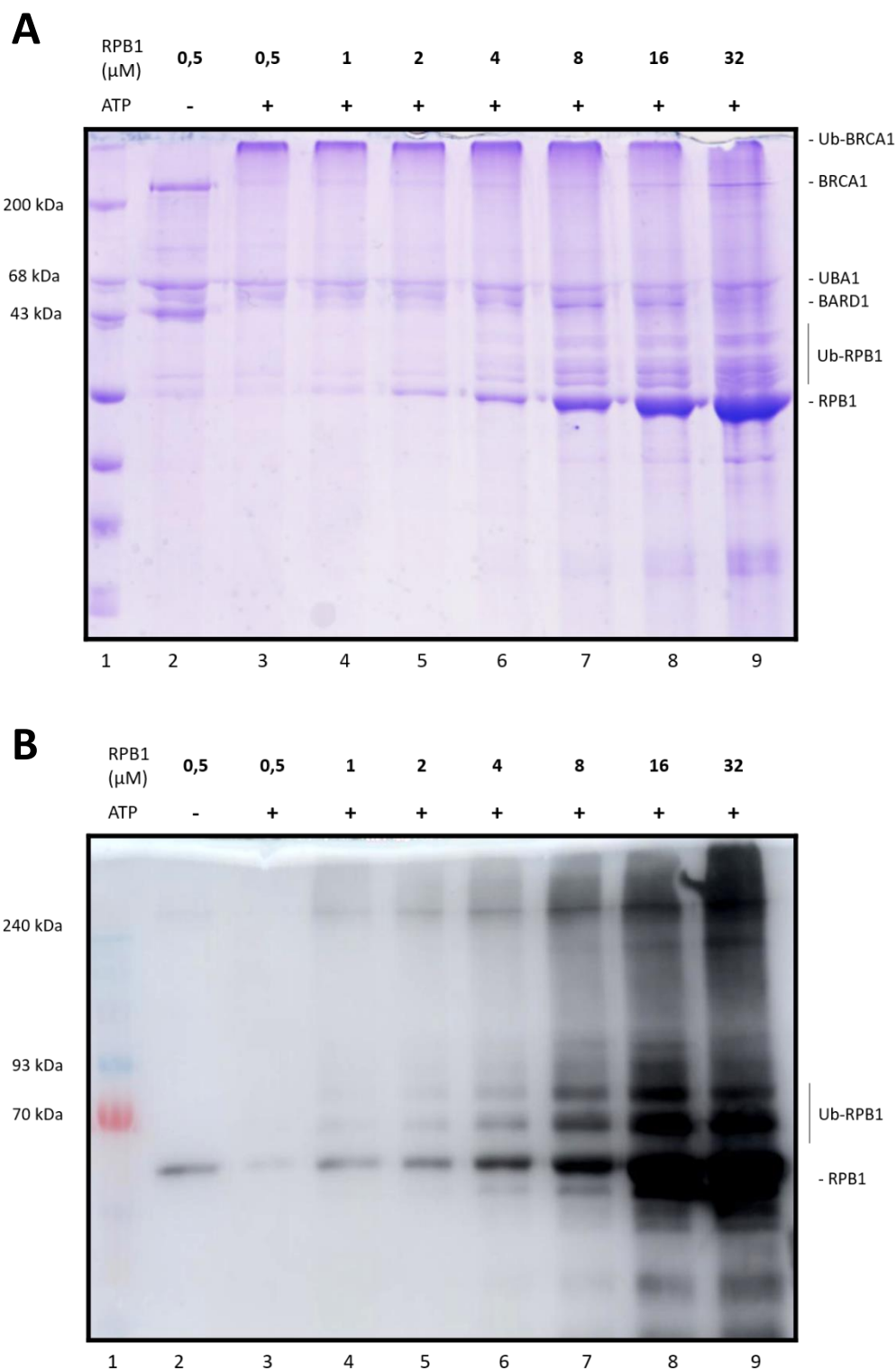


**Obrázek 17: Optimalizace ubikvitinace GST-RPB1<sup>1-356</sup>.** (A) SDS-PAGE analýza *in vitro* ubikvitinačních reakcí. Produkty reakcí byly porovnávány na SDS-PAGE gelu. I přes to, že byla doba inkubace reakcí prodloužena až na čtyři hodiny a testována dvojnásobná koncentrace UBCH5C, nebylo možno pozorovat na SDS-PAGE gelu produkty ubikvitinace RPB1. Autoubikvitinace BRCA1 dosáhla svého maxima po 2 h inkubace vzorků, kdy již nebylo možno na gelu pozorovat neubikvitinovanou BRCA1. (B) Analýza produktů ubikvitinačních reakcí pomocí western blotu, vyvolaného protilátkou  $\alpha$ -RPB1. Produkty ubikvitinace RPB1 se začínají objevovat po 1 h inkubace. Po 2 h inkubace se jejich hladina přestává zvyšovat. (C) Analýza produktů ubikvitinačních reakcí pomocí western blotu, vyvolaného protilátkou  $\alpha$ -BRCA1. Po 2 h inkubace vzorků se nacházela většina proteinu BRCA1 v ubikvitinované formě. Reakce probíhala efektivněji v případě vyšší koncentrace UBCH5C.

### 6.3.3 Ubikvitinace zvyšující se koncentrace RPB1<sup>1-356</sup>

Pro získání množství ubikvitinované RPB1, které by bylo dostačující pro další analýzu, byly připraveny reakce se zvyšujícím se množstvím RPB1 (o finálních koncentracích 0,5 – 32  $\mu$ M). Na SDS-PAGE gelu bylo tentokrát možno pozorovat ubikvitinační produkty RPB1 v reakcích obsahujících 4  $\mu$ M a vyšší koncentrace substrátu. Opět bylo možné pozorovat i autoubikvitinaci BRCA1, jejíž efektivita však s rostoucí koncentrací RPB1 v reakci klesá (obr. 18.A). Na western blotu vyvolaném protilátkou  $\alpha$ -RPB1 bylo potvrzeno, že produkty objevující se na gelu jsou skutečně produkty ubikvitinace RPB1 (obr. 18.B).

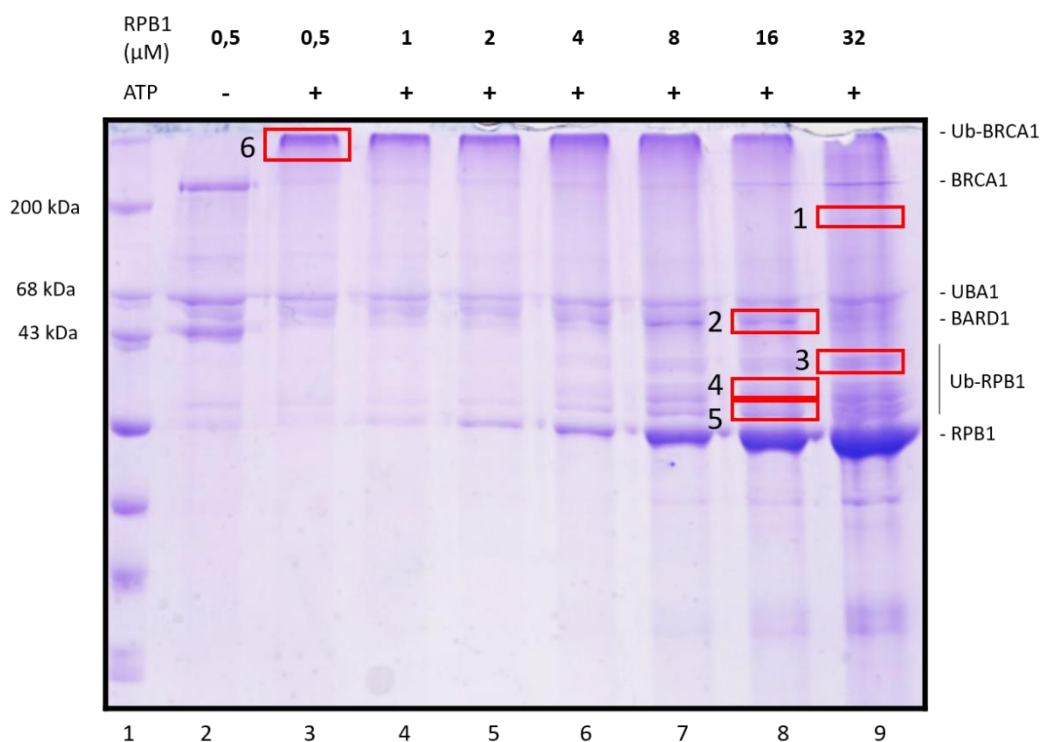




**Obrázek 18: Optimalizace koncentrace substrátu pro *in vitro* ubikvitinace GST-RPB1<sup>1-356</sup>.** (A) SDS-PAGE analýza *in vitro* ubikvitinačních reakcí obsahujících zvyšující se koncentraci RPB1. Produkty reakcí byly porovnávány na SDS-PAGE gelu. Opět bylo možno na SDS-PAGE gelu pozorovat produkty autoubikvitinace BRCA1 a od koncentrace 4 $\mu\text{M}$  byly pozorovatelné i produkty ubikvitinace RPB1. (B) Analýza produktů ubikvitinačních reakcí pomocí western blotu, vyvolaného protilátkou  $\alpha$ -RPB1. S rostoucí koncentrací RPB1 se zvyšovala hladina produktů ubikvitinace RPB1.

## 6.4 Identifikace modifikací RPB1 pomocí hmotnostní spektrometrie

Pro identifikaci ubikvitinovaných lyzinů v BRCA1-BARD1 a RPB1<sup>1-356</sup> byly vzorky analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie. SDS-PAGE gel obsahující produkty ubikvitinace zvyšující se koncentrace RPB1<sup>1-356</sup> (obr. 19) byl předán pracovišti CL Proteomika (CEITEC, Masarykova univerzita) k dalšímu zpracování. Zde byla provedena izolace proteinů z vybraných částí gelu, které byly štěpeny a následně identifikovány metodou LC-MS/MS (kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií) na přístroji Orbitrap Lumos Tribrid spectrometer. Tímto způsobem bylo identifikováno 6 ubikvitinačních míst v BRCA1, 1 ubikvitinační místo v BARD1 a 7 míst v RPB1<sup>1-356</sup> (tab.1). Podařilo se tedy potvrdit, že BRCA1-BARD1 komplex je schopen se za použitých podmínek autoubikvitinovat.



**Obrázek 19: Vzorky pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie.** Pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie byl použit SDS-PAGE gel obsahující vzorky z reakcí se zvyšující se koncentrací RPB1<sup>1-356</sup>. Vybrané části gelu označené čísly 1-6 byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie na pracovišti CL Proteomika.

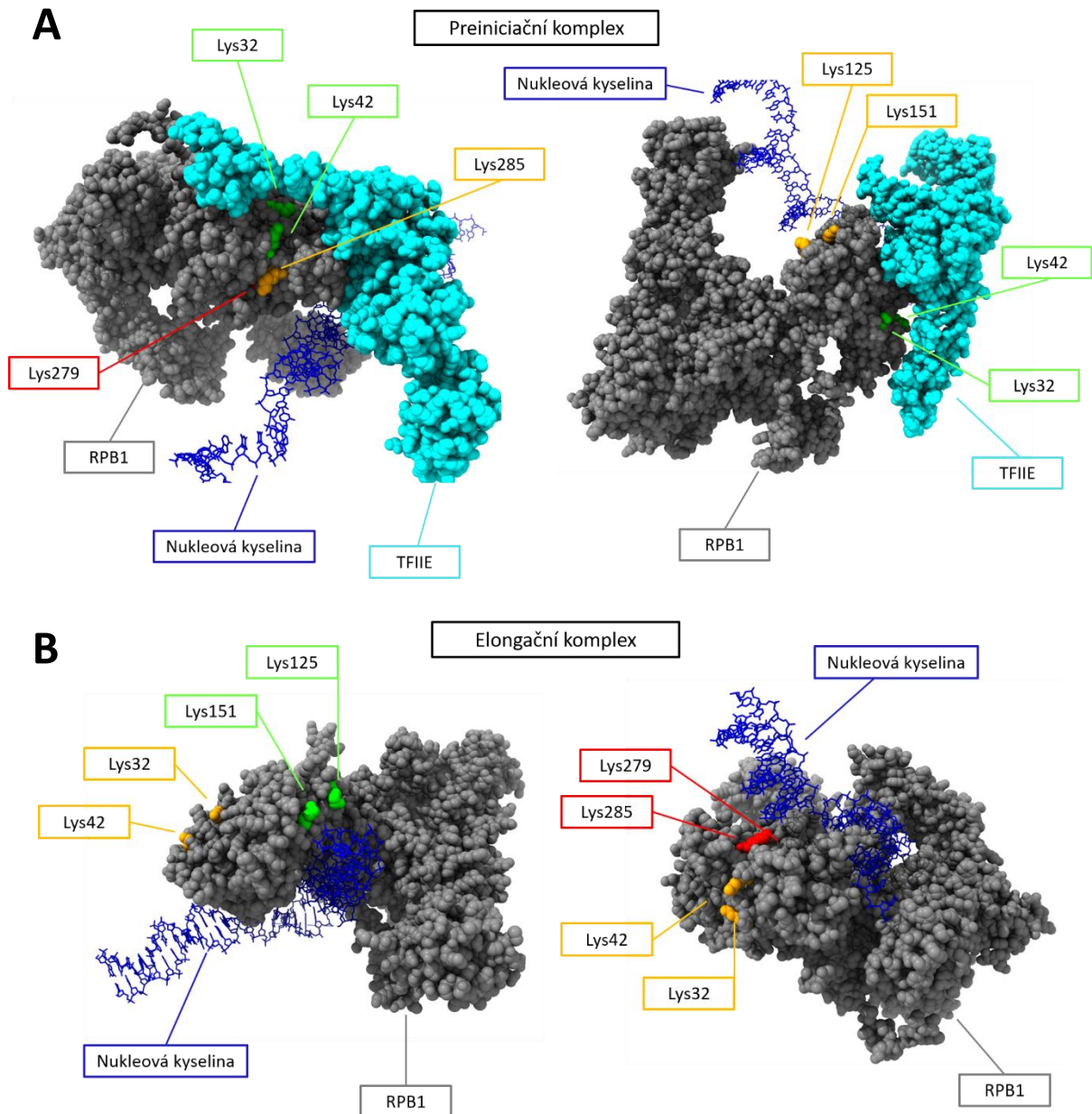
**Tabulka 1:** Výsledky analýzy ubikvitinace BRCA1-BARD1 komplexu pomocí hmotnostní spektrometrie.

Protein	Pozice	Vzorek	Jistota
BARD1	K334	1	střední
BRCA1	K222	6	vysoká
BRCA1	K301	6	vysoká
BRCA1	K672	6	střední
BRCA1	K906	6	vysoká
BRCA1	K1104	6	vysoká
BRCA1	K1119	6	vysoká

**Tabulka 2:** Výsledky analýzy ubikvitinace RPB1<sup>1-356</sup> komplexu pomocí hmotnostní spektrometrie.

Protein	Pozice	Vzorek	Jistota	Pozice v preiniciačním komplexu	Pozice v elongačním komplexu
RPB1	K32	2, 4	střední	V místě vazby TFIIE	Dostupná
RPB1	K42	3	vysoká	V místě vazby TFIIE	Dostupná
RPB1	K125	1, 2, 3	vysoká	Dostupná	V místě interakce s nukleovou kyselinou
RPB1	K151	2, 4	střední	Dostupná	V místě interakce s nukleovou kyselinou
RPB1	K177	2, 3, 4	vysoká	Ve struktuře chybí	Ve struktuře chybí
RPB1	K279	4	vysoká	Uvnitř RPB1, nedostupná	Uvnitř RPB1, nedostupná
RPB1	K285	2, 3	vysoká	Dostupná	Zakrytá SPT5, nedostupná

Pro posouzení funkčního významu zjištěných ubikvitinací v RPB1 byly dané lyziny vyznačeny v 3D modelech preiniciačního a elongačního komplexu (obr. 20) pomocí programu UCSF ChimeraX. Lys177 v daných modelech nebyl přítomen, neboť se pravděpodobně nachází ve flexibilní oblasti RPB1, jejíž struktura nebyla vyřešena. Lys279 není v kontextu celé RPB1 možno ubikvitinovat, protože se nachází zanořený ve struktuře této podjednotky. V případě elongačního komplexu není dostupný ani Lys285, který je při elongaci překrytý elongačním faktorem SPT5, podjednotkou komplexu DSIF. Ostatní lyziny by měly být pro modifikaci v rámci preiniciačního a elongačního komplexu dostupné. V preiniciačním komplexu by mohly mít funkční význam Lys42 a Lys32, které se nacházejí v místě interakce RPB1 a TFIIE a jejich ubikvitinace by mohla této interakci stericky bránit. V elongačním komplexu by mohly hrát roli Lys125 a Lys151 umístěné v blízkosti povrchu RPB1, který interaguje s nukleovou kyselinou, a jejich ubikvitinace by tak mohla vést k narušení této interakce.



**Obrázek 20: Výsledky analýzy ubikvitinace RPB1<sup>1-356</sup> pomocí hmotnostní spektrometrie. (A) Lyziny z RPB1<sup>1-356</sup>, na nichž byla detekována ubikvitinace, byly vyznačeny ve struktuře RPB1, pocházející z 3D strukturního modelu preiniciačního komplexu uloženého v PDB (*Protein data bank*) pod kódem 7NVR. V obrázku jsou z komplexu ponechány pouze podjednotky RPB1 (šedá), TFIIE (světle modrá) a nukleová kyselina (tmavě modrá). V kontextu struktury celého komplexu jsou červeně označené lyziny pro ubikvitinaci nedostupné, žlutě označené lyziny jsou dostupné, ale pravděpodobně bez většího efektu na funkci RNAPII. Zeleně vyznačené lyziny se nacházejí v místě interakce RPB1 a TFIIE a jejich ubikvitinace by mohla této interakci stericky bránit. (B) Lyziny z RPB1<sup>1-356</sup>, na nichž byla detekována ubikvitinace, byly vyznačeny ve struktuře RPB1, pocházející z 3D strukturního modelu elongačního komplexu uloženého v PDB (*Protein data bank*) pod kódem 6TED. V obrázku je z komplexu ponechána pouze RPB1 (šedá) a nukleová kyselina (tmavě modrá). V kontextu struktury celého komplexu jsou červeně označené lyziny pro ubikvitinaci nedostupné, žlutě označené lyziny jsou dostupné, ale pravděpodobně bez většího efektu na funkci RNAP II. Zeleně vyznačené lyziny se nacházejí v místě interakce RPB1 a nukleové kyseliny a jejich ubikvitinace by mohla této interakci bránit.**

## 7 DISKUZE

Ubikvitinace patří mezi jeden z nejdůležitějších signalizačních procesů probíhajících v buňce, který reguluje velké množství pochodů. Jedním z nich je i oprava DNA, kdy ubikvitinace při výskytu poškození na DNA slouží jako signál pro přivolání opravných faktorů. Například ubikvitinace histonů v místě poškození vytváří místo pro navázání dalších proteinů účastnících se oprav. Dalším příkladem může být ubikvitinace RNA polymerázy II (RNAPII) v případě, že dojde k jejímu zastavení na templátovém vlákně z důvodu poškození DNA. V takovém případě se pomocí CRL4<sup>CSA</sup>, E3 ubikvitinační ligázy, ubikvitinuje RNAPII na Lys1268, což vede k zahájení oprav. CRL4<sup>CSA</sup> ale nemusí být jediná, která RNAPII ubikvitinuje a zároveň Lys1268 pravděpodobně není jediným místem na RPB1, kde k ubikvitinaci dochází. Bylo dokázáno, že v rámci preiniciačního komplexu může být RNAPII ubikvitinována pomocí BRCA1-BARD1, což blokuje interakci mezi transkripčním faktorem TFIIE a RNAPII a ovlivňuje tak zahájení transkripce. Protože TFIIE interaguje s RNAPII na N-konci její největší, katalytické podjednotky RPB1, je velká pravděpodobnost, že právě zde k dochází k této ubikvitinaci.

Účelem této práce bylo zjistit, kde a za jakých podmínek probíhá ubikvitinace RNAPII pomocí BRCA1-BARD1 komplexu a zda k této ubikvitinaci skutečně dochází na N-konci RPB1 v místech, kde by tato modifikace mohla zabraňovat interakci TFIIE s RNAPII.

V rámci této práce jsme pracovali s vybranými konstrukty obsahujícími N-konec RPB1, RPB1<sup>1-335</sup> a RPB1<sup>1-356</sup>, jehož ubikvitinace byla testována v podmínkách *in vitro*. Podařilo se nám připravit konstrukty pro expresi obou fragmentů a následně tyto fragmenty exprimovat, ale pouze fragment RPB1<sup>1-356</sup> byl úspěšně purifikován. V případě RPB1<sup>1-335</sup> se nepodařilo získat frakci obsahující protein v požadované čistotě, a to z důvodu nedostatečné solubility fragmentu a jeho degradace v průběhu purifikace. Přes to, že během testů solubility se fragment nacházel v solubilní frakci, v případě purifikace z velkého objemu kultury zůstala většina proteinů nerozpustná. To mohlo být způsobeno například chybným namícháním lyzačního roztoku, což lze ale vyvrátit skutečností, že pro obě dvě kultury byl použit stejný roztok. Další možností je, že fragment RPB1<sup>1-335</sup> byl citlivější na drobné rozdíly, které vznikly při expresi proteinů ve velkém měřítku, než fragment RPB1<sup>1-356</sup>, u nějž se purifikace zdařila a byl nadále využíván pro *in vitro* ubikvitinace. Příkladem by mohlo být pomalejší chlazení větších objemů bakteriálních kultur případně přehřátí vzorku během sonikace, a to z důvodu použití rozdílných parametrů pro homogenizaci vzorku v malém a velkém objemu.

Experimentálně se podařilo potvrdit, že za výchozích podmínek *in vitro* je komplex BRCA1-BARD1 schopný autoubikvitinace, což je ve shodě s daty publikovanými v odborné literatuře. Protože efektivita ubikvitinace byla dostatečně vysoká, bylo možné pozorovat na SDS-PAGE gelu změnu molekulové hmotnosti BRCA1 i BARD1. Posun v migraci BRCA1 se objevil i na western blotu vyvolaném protilátkou  $\alpha$ -BRCA1. To, že změna molekulové hmotnosti BRCA1 a BARD1 byla zapříčiněna ubikvitinací těchto dvou proteinů, bylo následně potvrzeno

i výsledky z hmotnostní spektrometrie, kde bylo identifikováno šest ubikvitinačních míst v rámci BRCA1 a jedno ubikvitinační místo v rámci BARD1.

Oproti tomu v případě ubikvitinace N-koncového fragmentu RPB1 nebyla za výchozích podmínek efektivita reakce dost vysoká na to, aby bylo možné pozorovat ubikvitinační produkty RPB1 na SDS-PAGE gelu. Proto bylo nutné ubikvitinační eseje optimalizovat. Nejprve byla testována delší inkubace připravených reakcí a zvýšení koncentrace E2 enzymu UBCH5C. Hladina ubikvitinace RPB1<sup>1-356</sup> však dosáhla svého maxima již po dvou hodinách inkubace a dále se nezvyšovala. Zvýšení koncentrace UBCH5C vedlo pouze ke zvýšení efektivity autoubikvitinace BRCA1, na ubikvitinaci RPB1 však vliv nemělo. Produkty ubikvitinace RPB1 stále nebyly na SDS-PAGE gelu detekovány. Pro získání produktu na SDS-PAGE gelu bylo nutné zvýšit koncentraci RPB1 v reakci. Spíš než k dosažení větší efektivity reakce však došlo pouze k zvýšení absolutního množství ubikvitinovaného produktu. To však umožnilo analýzu těchto produktů pomocí hmotnostní spektrometrie. Zde bylo potvrzeno, že RPB1 je za daných podmínek skutečně ubikvitinována, a bylo určeno sedm míst, kde k ubikvitinaci RPB1<sup>1-356</sup> dochází.

Pro posouzení relevance těchto ubikvitinací v kontextu celé RNAPII byly dané lyziny vyznačeny v 3D modelech preiniciačního a elongačního komplexu. Bylo zjištěno, že Lys177 se vůbec v daných modelech nenachází, a to pravděpodobně proto, že je obsažen ve flexibilní části RPB1, jejíž struktura není objasněná. Lys279 je v modelech RNAPII viditelný, je však zanořený uvnitř struktury RPB1 a tím pádem by ho nebylo možné ubikvitinovat v případě, že by substrátem byla nezkrácená varianta RNAPII. V případě preiniciačního komplexu by mohly být z funkčního hlediska relevantní Lys32 a Lys42, které se nachází v místě interakce mezi TFIIE a RPB1. Jejich ubikvitinace by mohla blokovat tuto interakci a tím bránit zformování preiniciačního komplexu a zahájení transkripce. V elongačním komplexu by oproti tomu mohly hrát roli Lys125 a Lys151 nacházející se v místě, kde by jejich ubikvitinace mohla bránit interakci RPB1 a nukleové kyseliny, a to by mohlo napomoci uvolnění RNAPII z temlátové DNA pokud narazí na poškození na DNA.

Hlavním výstupem mé práce je tedy model, který popisuje, jak by ubikvitinace N-koncové části RPB1 pomocí komplexu BRCA1-BARD1 mohla ovlivnit zahájení transkripce. Dále se nám v rámci této práce podařilo potvrdit, že v podmínkách *in vitro* je komplex BRCA1-BARD1 schopen autoubikvitinace, a zjistit, kde přesně k této autoubikvitinaci dochází.

## 8 ZÁVĚR

Ubikvitinace reguluje v buňce velké množství procesů. Může se uplatnit kupříkladu při opravě poškozené DNA, kdy slouží jako signál pro přivolání opravných faktorů. To může nastat při transkripci, kdy se RNA polymeráza II (RNAPII) zastaví v důsledku poškození na DNA, které nedovede překonat. K ubikvitinaci RNAPII však může docházet i před zahájením transkripčního cyklu. Pokud ubikvitinace proběhne v místě, kde RNAPII interaguje s transkripčními faktory, jako je TFIIE, je tato interakce zablokována, čímž se zabrání zahájení transkripčního procesu. E3 ubikvitin ligázou zodpovědnou za tuto regulaci iniciace transkripce by mohl být BRCA1-BARD komplex.

Cílem této práce bylo zjistit, za jakých podmínek může probíhat ubikvitinace RPB1, největší podjednotky RNAPII, pomocí BRCA1-BARD1 komplexu a zda k této ubikvitinaci dochází v místech, kde by mohla hrát roli při blokování interakcí mezi RNAPII a TFIIE, a tedy i zahájení transkripce. Za tímto účelem byla exprimována a následně purifikována N-terminální část RPB1, která byla poté ubikvitinována v prostředí *in vitro*. Pomocí *in vitro* ubikvitinačních esejí se nám podařilo optimalizovat postup pro ubikvitinaci RPB1 a autoubikvitinaci BRCA1-BARD1 komplexu. Získali jsme dostatek ubikvitinačních produktů, které bylo možno analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie. Ta nám ukázala šest míst, kde dochází k autoubikvitinaci BRCA1, jedno místo ubikvitinace BARD1 a sedm ubikvitinačních míst RPB1.

Podařilo se nám tedy splnit stanovené cíle:

1. Připravili jsme konstrukty pro expresi N-terminální části RPB1,
2. Exprimovali a purifikovali jsme tyto fragmenty z bakterií *E. coli*,
3. Optimalizovali jsme podmínky pro ubikvitinaci N-terminální části RPB1 *in vitro*,
4. Určili jsme místa, kde ubikvitinace probíhá.

Ze získaných výsledků jsme byly schopni sestavit model, který ukazuje, jak by ubikvitinace N-terminální části RPB1 mohla bránit v interakci mezi RNAPII a transkripčním faktorem TFIIE. Dále jsme ukázali, jakou roli by mohla ubikvitinace této části RPB1 hrát v kontextu elongačního komplexu, kde by mohla narušovat interakci RNAPII s nukleovou kyselinou. Pokud by výsledky získané v rámci této práce byly potvrzeny dalšími experimenty provedenými za použití celého komplexu RNAPII, byly by důležitým příspěvkem k pochopení toho, jak je v buňkách regulována transkripce pomocí ubikvitinace RNAPII.



## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CRAMER, Patrick. *Organization and regulation of gene transcription* [online]. B.m.: Nature Publishing Group. 5. September 2019. ISSN 14764687. Available at: doi:10.1038/s41586-019-1517-4
- [2] HARLEN, Kevin M. and L. Stirling CHURCHMAN. *The code and beyond: Transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain* [online]. B.m.: Nature Publishing Group. 1. April 2017. ISSN 14710080. Available at: doi:10.1038/nrm.2017.10
- [3] HARLEN, Kevin M. and L. Stirling CHURCHMAN. *The code and beyond: Transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain* [online]. B.m.: Nature Publishing Group. 1. April 2017. ISSN 14710080. Available at: doi:10.1038/nrm.2017.10
- [4] PROUDFOOT, Nick J. *Transcriptional termination in mammals: Stopping the RNA polymerase II juggernaut* [online]. B.m.: American Association for the Advancement of Science. 10. June 2016. ISSN 10959203. Available at: doi:10.1126/science.aad9926
- [5] HANAWALT, Philip C. and Graciela SPIVAK. *Transcription-coupled DNA repair: Two decades of progress and surprises* [online]. December 2008. ISSN 14710072. Available at: doi:10.1038/nrm2549
- [6] PROUDFOOT, Nick J. *Transcriptional termination in mammals: Stopping the RNA polymerase II juggernaut* [online]. B.m.: American Association for the Advancement of Science. 10. June 2016. ISSN 10959203. Available at: doi:10.1126/science.aad9926
- [7] GAILLARD, Hélène and Andrés AGUILERA. Transcription as a Threat to Genome Integrity. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2016, **85**, 291–317. ISSN 15454509. Available at: doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014908
- [8] D’ALESSANDRO, Giuseppina and Fabrizio D’ADDA DI FAGAGNA. *Transcription and DNA Damage: Holding Hands or Crossing Swords?* [online]. B.m.: Academic Press. 27. October 2017. ISSN 10898638. Available at: doi:10.1016/j.jmb.2016.11.002
- [9] SWATEK, Kirby N. and David KOMANDER. *Ubiquitin modifications* [online]. B.m.: Nature Publishing Group. 1. April 2016. ISSN 17487838. Available at: doi:10.1038/cr.2016.39
- [10] KWON, Yong Tae and Aaron CIECHANOVER. *The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy* [online]. B.m.: Elsevier Ltd. 1. November 2017. ISSN 13624326. Available at: doi:10.1016/j.tibs.2017.09.002

- [11] SCHWERTMAN, Petra, Simon BEKKER-JENSEN and Niels MAILAND. *Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers* [online]. B.m.: Nature Publishing Group. 1. June 2016. ISSN 14710080. Available at: doi:10.1038/nrm.2016.58
- [12] PLATTA, Harald W., Sven THOMS, Wolf H. KUNAU and Ralf ERDMANN. Function of the Ubiquitin-Conjugating Enzyme Pex4p and the AAA Peroxin Complex Pex1p/Pex6p in Peroxisomal Matrix Protein Transport. In: *Enzymes* [online]. B.m.: Academic Press, 2007, p. 541–572. ISSN 18746047. Available at: doi:10.1016/S1874-6047(07)25021-8
- [13] SCHWERTMAN, Petra, Simon BEKKER-JENSEN and Niels MAILAND. *Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers* [online]. B.m.: Nature Publishing Group. 1. June 2016. ISSN 14710080. Available at: doi:10.1038/nrm.2016.58
- [14] BUETOW, Lori and Danny T. HUANG. *Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases* [online]. B.m.: Nature Publishing Group. 1. October 2016. ISSN 14710080. Available at: doi:10.1038/nrm.2016.91
- [15] WETERINGS, Eric and David J. CHEN. *The endless tale of non-homologous end-joining* [online]. January 2008. ISSN 10010602. Available at: doi:10.1038/cr.2008.3
- [16] TARSOUNAS, Madalena and Patrick SUNG. *The antitumorigenic roles of BRCA1–BARD1 in DNA repair and replication* [online]. B.m.: Nature Research. 1. May 2020. ISSN 14710080. Available at: doi:10.1038/s41580-020-0218-z
- [17] WU, Wenwen, Ayaka KOIKE, Takashi TAKESHITA and Tomohiko OHTA. *The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions* [online]. 7. January 2008. ISSN 17471028. Available at: doi:10.1186/1747-1028-3-1
- [18] CHRISTENSEN, Devin E., Peter S. BRZOVIC and Rachel E. KLEVIT. E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages. *Nature Structural and Molecular Biology* [online]. 2007, **14**(10), 941–948. ISSN 15459993. Available at: doi:10.1038/nsmb1295
- [19] KOKIC, Goran, Felix R. WAGNER, Aleksandar CHERNEV, Henning URLAUB and Patrick CRAMER. Structural basis of human transcription–DNA repair coupling. *Nature* [online]. 2021, **598**(7880), 368–372. ISSN 14764687. Available at: doi:10.1038/s41586-021-03906-4
- [20] TUFEGDŽIĆ VIDAKOVIĆ, Ana, Richard MITTER, Gavin P. KELLY, Michelle NEUMANN, Michelle HARREMAN, Marta RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, Anna HERLIHY, Juston C. WEEMS, Stefan BOEING, Vesela ENCHEVA, Liam GAUL, Laura MILLIGAN, David TOLLERVEY, Ronald C. CONAWAY, Joan W. CONAWAY, Ambrosius P. SNIJDERS, Aengus STEWART and Jesper Q.

- SVEJSTRUP. Regulation of the RNAPII Pool Is Integral to the DNA Damage Response. *Cell* [online]. 2020, **180**(6), 1245-1261.e21. ISSN 10974172. Available at: doi:10.1016/j.cell.2020.02.009
- [21] WILSON, Marcus D., Michelle HARREMAN and Jesper Q. SVEJSTRUP. *Ubiquitylation and degradation of elongating RNA polymerase II: The last resort* [online]. January 2013. ISSN 18749399. Available at: doi:10.1016/j.bbagr.2012.08.002
- [22] ANINDYA, Roy, Ozan AYGÜN and Jesper Q. SVEJSTRUP. Damage-Induced Ubiquitylation of Human RNA Polymerase II by the Ubiquitin Ligase Nedd4, but Not Cockayne Syndrome Proteins or BRCA1. *Molecular Cell* [online]. 2007, **28**(3), 386–397. ISSN 10972765. Available at: doi:10.1016/j.molcel.2007.10.008
- [23] STARITA, Lea M., Andrew A. HORWITZ, Michael Christopher KEOGH, Chikashi ISHIOKA, Jeffrey D. PARVIN and Natsuko CHIBA. BRCA1/BARD1 ubiquitinate phosphorylated RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2005, **280**(26), 24498–24505. ISSN 00219258. Available at: doi:10.1074/jbc.M414020200
- [24] HORWITZ, Andrew A, El BACHIR AFFAR, George F HEINE, Yang SHI and Jeffrey D PARVIN. *A mechanism for transcriptional repression dependent on the BRCA1 E3 ubiquitin ligase*. 2007.
- [25] KOKIC, Goran, Felix R. WAGNER, Aleksandar CHERNEV, Henning URLAUB and Patrick CRAMER. Structural basis of human transcription–DNA repair coupling. *Nature* [online]. 2021, **598**(7880), 368–372. ISSN 14764687. Available at: doi:10.1038/s41586-021-03906-4

## 10 SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1:** Hladina fosforylace v lidské CTD během transkripčního cyklu.
- Obrázek 2:** Schéma průběhu transkripčního cyklu.
- Obrázek 3:** Vznik DNA-RNA hybridů (R-loops).
- Obrázek 4:** Enzymy zajišťující ubikvitinaci a deubikvitinaci.
- Obrázek 5:** A. Struktura ubikvitinu. B. Výsledné produkty ubikvitinace substrátu.
- Obrázek 6:** Schéma nehomologického spojování konců (NHEJ).
- Obrázek 7:** Schéma homologní rekombinace za přítomnosti komplexu BRCA1-BARD1.
- Obrázek 8:** Funkční domény BRCA1 a BARD1.
- Obrázek 9:** Schéma autoubikvitinačního mechanismu komplexu BRCA1-BARD1.
- Obrázek 10:** Model spřažení transkripce s opravami DNA.
- Obrázek 11:** Příprava plazmidů 2GT + RPB1<sup>1-335</sup> a 2GT + RPB1<sup>1-356</sup>.
- Obrázek 12:** Příprava plazmidů 2BcT + GST-RPB1<sup>1-335</sup> a 2BcT + GST-RPB1<sup>1-356</sup>.
- Obrázek 13:** Exprese proteinů GST-RPB1<sup>1-335</sup> a GST-RPB1<sup>1-356</sup>.
- Obrázek 14:** Purifikace GST-RPB1<sup>1-335</sup>.
- Obrázek 15:** Purifikace GST-RPB1<sup>1-356</sup>.
- Obrázek 16:** Ubikvitinace GST-RPB1<sup>1-356</sup> in vitro.
- Obrázek 17:** Časová optimalizace ubikvitinace GST-RPB1<sup>1-356</sup>.
- Obrázek 18:** Optimalizace koncentrace substrátu pro in vitro ubikvitinace GST-RPB1<sup>1-356</sup>.
- Obrázek 19:** Vzorky pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie.
- Obrázek 20:** Výsledky analýzy ubikvitinace RPB1<sup>1-356</sup> pomocí hmotnostní spektrometrie.

## 11 SEZNAM TABULEK

- Tabulka 4.1:** Chemikálie, kity, enzymy
- Tabulka 4.2:** Roztoky
- Tabulka 4.3:** Plazmidy
- Tabulka 4.4:** Média
- Tabulka 4.5:** Bakteriální kmeny
- Tabulka 4.6:** Oligomukleotidy
- Tabulka 4.8:** Proteiny
- Tabulka 4.9:** Programy PCR
- Tabulka 1:** Výsledky analýzy ubikvitinace BRCA1-BARD1 komplexu pomocí hmotnostní spektrometrie.
- Tabulka 2:** Výsledky analýzy ubikvitinace RPB1 1-356 komplexu pomocí hmotnostní spektrometrie.