

**Charles University in Prague**

**Faculty of Science**

Program: Molecular and Cell Biology, Genetics and Virology



Summary of the PhD Thesis

**The role of human RECQ5 helicase in the maintenance of genomic stability**

**Václav Urban, M.Sc.**

Academy of Sciences of the Czech Republic

Institute of Molecular Genetics ASCR, v.v.i.

Laboratory of Genome Integrity

Supervisor: Pavel Janščák, Dr., Ph.D.

**Prague, 2016**

Charles University in Prague  
and  
The Academy of Sciences of the Czech Republic

PhD study program: Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology

Chairman: Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc.

Institute: Institute of Molecular Genetics ASCR, v.v.i.  
Laboratory of Genome Integrity

Author: Václav Urban, M.Sc.

Supervisor: Pavel Janščák, Dr., Ph.D.

It is possible to read the PhD Thesis in the Library of Biological Sciences, Charles University  
in Prague, Faculty of Science.

## **Abstract**

DNA replication is the most vulnerable process of DNA metabolism in proliferating cells and therefore it is tightly controlled and coordinated with processes that maintain genomic stability. Human RecQ helicases are among the most important factors involved in the maintenance of replication fork integrity, especially under conditions of replication stress. Collisions between replication and transcription machineries represent a significant source of genomic instability. RECQ5 DNA helicase binds to RNA-polymerase (RNAP) II during transcription elongation and suppresses transcription-associated genomic instability. Here we show that RECQ5 also associates with RNAPI and enforces the stability of ribosomal DNA arrays in cells exposed to replication stress. We demonstrate that RECQ5 associates with transcription complexes in DNA replication foci and counteracts replication fork stalling in RNAPI- and RNAPII-transcribed genes, suggesting that RECQ5 exerts its genome stabilizing effect by acting at sites of replication-transcription. Moreover, RECQ5-deficient cells accumulate RAD51 foci that are formed in a BRCA1-dependent manner at sites of interference between replication and transcription and likely represent unresolved replication intermediates. Importantly, BRCA1-dependent formation of RAD51 foci at these sites requires active transcription. Further, we provide evidence that RECQ5 promotes RAD18-dependent PCNA ubiquitination at sites of replication-transcription interference by its interaction with PCNA. This is also manifested by the accumulation of RAD18 foci in the absence of RECQ5 or the presence of a RECQ5 mutant defective in PCNA binding. The helicase activity of RECQ5 promotes unloading of ubiquitinated PCNA from chromatin and counteracts the accumulation of RAD51 foci in S-phase cells. These findings suggest that RECQ5 promotes PCNA remodeling at replication forks stalled due to the collision with transcription complex and in coordination with BRCA1-mediated replication fork stabilization promotes the resolution of replication-transcription collisions.

**Contents**

Abstract.....1

Contents .....2

1. Introduction.....3

    1.1. Replication-transcription collisions.....3

    1.2. RECQ5 suppresses transcription associated DNA breakage during replication .....5

2. Aims of the study .....7

3. Material and methods .....7

4. Results and discussion.....8

5. Conclusions.....12

6. References.....13

*Curriculum vitae* ..... 16

*List of publications* ..... 17

## 1. Introduction

Faithful replication of the genome is essential for cell survival. The fidelity of DNA replication is ensured by the high accuracy of replicative DNA polymerases and by a number of associated factors involved in checkpoint signaling pathways, DNA repair, chromatin remodeling, sister chromatid cohesion and cell cycle control. Defects in any of these activities can cause replication fork slowing or stalling, a condition referred to as replication stress, which leads to genomic instability manifested by birth defects, developmental abnormalities, neurodegeneration, premature aging and cancer predisposition (Boyer et al., 2016; Losada, 2014; Macheret and Halazonetis, 2015; Zeman and Cimprich, 2014; Zhang et al., 2016). DNA replication is the most vulnerable process of DNA metabolism in proliferating cells and therefore it is tightly controlled and coordinated with processes that maintain genomic stability. RecQ helicases promote recovery of replication forks being stalled due to different replication roadblocks of either exogenous or endogenous source. They prevent generation of aberrant replication fork structures and replication fork collapse, and are involved in proper checkpoint signaling. The essential role of human RecQ helicases in the genome maintenance during DNA replication is underlined by association of defects in their function with cancer predisposition.

### 1.1. Replication-transcription collisions

Studies in bacterial, yeast and mammalian cells have shown that replication-transcription encounters are unavoidable and represent one of the major sources of replication stress. Replication-transcription encounters cause spontaneous DNA breakage and chromosomal rearrangements, particularly if cells are subjected to other source of replication stress (Helmrigh et al., 2013). Replication fork encounters the transcription machinery head-on on the lagging strand template and co-directionally on the leading strand. Although both types of collisions are associated with replication fork stalling *in vivo*, several lines of evidence indicate that the head-on clashes between replication and transcription mainly affect genome stability (Azvolinsky et al., 2009; Brambati et al., 2015; Merrikh et al., 2011). In bacteria, head-on encounters are clearly more severe since insertion of an inducible ColE1 replication origin upstream or downstream of a ribosomal RNA operon in *E. coli* demonstrated that head-on transcription significantly impairs replication progression (French, 1992). The organization of bacterial genomes probably reflects the unfavourable effects of head-on collisions between replication and transcription. All sequenced bacterial genomes are biased for the majority of genes to be encoded on the leading strand. In *B. subtilis*, ~95% of essential genes and 75% of the other genes are on the leading strand independently of the level of expression (Rocha, 2008).

In yeast, highly expressed chromosomal regions are potential hot spots for replication-transcription conflicts irrespective of the orientation of collisions (Azvolinsky et al., 2009). By genome-wide mapping of replicative DNA polymerase binding to yeast chromatin, it has been demonstrated that highly transcribed RNA polymerase (RNAP) II genes are sites of replication fork pausing (Azvolinsky et al., 2009). In yeast, specific reporter assays have shown that RNAPII transcription concomitant to head-on oncoming, but not co-directional, replication causes a replication fork pause that is linked to a significant increase in DNA recombination (Prado and Aguilera, 2005). However, it remains unclear why head-on collisions are more challenging to preserve genomic stability. DNA instability can arise from tethering of highly transcribed genes to the nuclear envelope, which may lead to generation of topological tension as replication fork approaches (Bermejo et al., 2011). Phosphorylation of nucleoporins by S-phase checkpoint kinases detach transcribed genes from nuclear pores to prevent DNA breakage (Bermejo et al., 2011). Importantly, transcription machinery itself has a direct role in defects of replication fork progression. Yeast cells harbouring mutation of RNAPII (*rpb1-1*, *rpb1-S751F* and *rpb9A*) that display transcription elongation defects are sensitive to hydroxyurea (HU) treatment and accumulate replication-born DNA breaks. Moreover, replication defect observed in *rpb1-1* leads to the accumulation of Rad51-dependent Holliday junction-intermediates and activation of dormant origins. *rpb1-1* mutant showed an increased retention of RNAPII on genes, suggesting that active transcription suppresses replication fork slowing (Felipe-Abrio et al., 2015).

In human cells, replication fork slowing is caused by perturbed transcription due to the lack or camptothecin (CPT)-induced inhibition of DNA topoisomerase I (Ribeyre et al., 2016; Tuduri et al., 2009). Cells treated with CPT also display increased level of CHK1 phosphorylation at Ser345 and accumulate reversed forks (DNA structure also referred to as chicken foot). All the above mentioned phenotypes are rescued by premature termination of transcription using cordycepin, suggesting that transcription is the major determinant of replication hindrance by CPT or topoisomerase I deficiency (Ribeyre et al., 2016; Tuduri et al., 2009). Interference between replication and transcription also underlies replication fork slowing and DNA breakage in cells with an oncogene-induced hyperactivation of replication origins (Jones et al., 2013). Cyclin E over-expression significantly increases the number of early S-phase replication foci, which can escalate the number of replication-transcription encounters leading to multiple replication fork stalling. As a result of that, cells accumulate RAD51 foci. However, the inhibition of transcription rescues the rate of replication fork progression and decreases DNA breakage without affecting the replication fork itself (Jones et al., 2013).

A correlation between replication stress–provoked genomic instability and active transcription is particularly apparent in case of common fragile sites (CFSs) and recently identified early replicating fragile sites (ERFSs) (Barlow et al., 2013; Helmrich et al., 2011). CFSs are specific genomic regions that exhibit increased frequency of gaps or breaks on metaphase chromosomes if DNA replication is partially inhibited (Durkin and Glover, 2007). Interestingly, CFSs are frequently located within the coding regions of very long genes (>650 kb), whose transcription is completed even within more than one complete cell cycle that is a prerequisite for inevitable replication-transcription collisions (Helmrich et al., 2011; Helmrich et al., 2006). Further, collisions between replication and transcription complexes at CFSs are accompanied by the formation of RNA:DNA hybrids, structures referred to as R-loops, which can cause chromosomal breakage. There is also evidence that the chromosomal breakage at CFSs is an outcome of replication paucity and subsequent incompleteness due to a low density of replication origins within these loci (Debatisse et al., 2012). In contrast to late replicating CFSs, ERFSs are located within early replicating regions that contain clusters of highly transcribed genes (Barlow et al., 2013). ERFSs break spontaneously during replication, but their fragility is significantly increased by early S-phase replication stress induced by HU, oncogene activation or ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related) inhibition. ERFSs are characterized by the instability of early replication forks whose stalling occurs at intragenic sequences and promoters of highly transcribed genes (Barlow et al., 2013). Importantly, the chromosomal breakage at selected ERFS near *SWAP70* gene is greatly dependent on the level of transcription, suggesting that it is driven by replication-transcription encounters (Barlow et al., 2013). An accumulation of BRCA1 accompanied the replication fork stalling at these sites, indicating involvement of homologous recombination process in replication fork protection and restart (Barlow et al., 2013; Schlacher et al., 2012).

Despite accumulating evidence that conflicts between replication and transcription are frequent events in proliferating cells and have detrimental effects on genome integrity, little is known about the molecular mechanisms underlying their resolution.

## **1.2. RECQ5 suppresses transcription associated DNA breakage during replication**

Subunits of RNAPII are the most prominent proteins that co-immunoprecipitate with RECQ5 from human cell extracts (Aygun et al., 2008; Izumikawa et al., 2008). RECQ5 was shown to interact with the largest catalytic subunit of RNAPII, termed RPB1 (Aygun et al., 2008), and this interaction is enhanced during S-phase (Li et al., 2011). Two regions of RECQ5 polypeptide were identified to mediate the interaction with RPB1: (i) the internal RNAPII-interacting (IRI) domain including KIX motif, which binds to RPB1 jaw domain; and (ii) the Set2-Rpb1-interacting (SRI) domain, which binds to the hyperphosphorylated C-terminal

repeat domain (CTD) of RPB1 (Islam et al., 2010; Kanagaraj et al., 2010; Kassube et al., 2013). Intriguingly, the tertiary structure of the KIX domain resembles the domain II of TFIIIS that resolves the paused state of backtracked RNAPII (Kassube et al., 2013; Wind and Reines, 2000). RECQ5 associates with chromatin particularly at RNAPII-transcribed regions (Izumikawa et al., 2008; Kanagaraj et al., 2010; Saponaro et al., 2014). Moreover, RECQ5 controls the movement of RNAPII across genes to prevent it from pausing or arrest, a condition referred to as transcription stress (Saponaro et al., 2014). Importantly, RECQ5 also localizes to DNA replication foci throughout S phase and interacts physically with the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a key component of the replisome (Kanagaraj et al., 2006). A slight increase in the nuclear level of RECQ5 helps to deal with thymidine-induced replication stress (Blundred et al., 2010). It has been shown that replication stress results in the accumulation of RPA at stalled forks, which can lead to RPA exhaustion and subsequent fork collapse (Toledo et al., 2013). Consistently, the slight increase of RECQ5 cellular concentration suppresses the increased level of RPA foci observed under conditions of replication stress (Blundred et al., 2010). RECQ5-deficient cells display an increased level of RAD51 foci and elevated SCEs (Hu et al., 2007). Depletion of RECQ5 results in transcription-dependent chromosome fragmentation during S phase and accumulation of chromosomal rearrangements with the breakpoints located in the genes and common fragile sites (CFSs) (Li et al., 2011; Saponaro et al., 2014). Interestingly, the incidents of genome instability in RECQ5-depleted cells colocalize with the areas of elevated transcription stress (Saponaro et al., 2014). Finally, inactivation of the *Recql5* gene in mice results in cancer susceptibility which supports the role of RECQ5 as a tumor suppressor (Hu et al., 2007). Together, these findings suggest that RECQ5 prevents genomic instability at sites of concomitant replication and transcription. However, it is unclear whether RECQ5 operates directly at sites of replication-transcription interference.



## **2. Aims of the study**

The main aim of the study was to elucidate the role of RECQ5 helicase in the maintenance of genomic stability.

The specific aims of this study were:

- To characterize the association of RECQ5 with RNA polymerase I and II
- To explore the role of RECQ5 at the interface of replication and transcription
- To study the molecular mechanism underlying the resolution of replication-transcription encounters

## **3. Material and methods**

Standard molecular biology techniques (nucleic acid isolation, DNA cloning, reverse transcription, PCR, SDS-PAGE, immunoblotting, immunoprecipitation, immunofluorescence)

Cell culture, RNA interference, DNA transfection

Flow cytometry

Cell fractionation

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Comet assay

Protein purification, antibody production

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

## 4. Results and discussion

RECQ5 DNA helicase is essential for maintenance of genomic stability, but its exact molecular functions remain unclear. Recent studies have shown that human RECQ5 binds to RNAPII during transcription elongation and maintains genomic stability at RNAPII-transcribed genes by acting as a factor that prevents transcription pausing or arrest, a condition termed transcription stress (Kanagaraj et al., 2010; Li et al., 2011; Saponaro et al., 2014). In our study, we show that RECQ5 also forms a complex with RNAPI, namely with the largest catalytic subunit, RPA194. RECQ5 was significantly enriched on the pre-ribosomal RNA (pre-rRNA) coding region, showing a distribution pattern similar to that of RPA194. Interestingly, we observed a significant enrichment of RNAPI in the pre-rRNA coding region, but not on the promoter, in cells lacking RECQ5. These data suggest that RECQ5 associates with RNAPI and might counteract RNAPI transcription stalling. Our data describing association between RNAPI and RECQ5 are consistent with the proposal that RECQ5 acts as a general transcription elongation factor that is important for preserving genome stability during transcription (Kanagaraj et al., 2010; Li et al., 2011; Saponaro et al., 2014).

However, we also demonstrate that RECQ5 depletion caused DNA copy number variations, particularly within the pre-rRNA coding region of the rDNA repeat unit. Importantly, upon replication stress induced by HU treatment, RECQ5 depletion caused a significant amplification of DNA sequences only within the transcribed part of rDNA. Further, we also demonstrate that RECQ5 depletion causes the persistence of unresolved replication intermediates with replisomes stalled in both RNAPI- and RNAPII-transcribed genes. These findings suggest that the genome stabilization effect of RECQ5 at sites of transcription might reflect a role for RECQ5 in resolving collisions between the replication and transcription machineries. In support of this hypothesis, we have found that inhibition of transcription by actinomycin D (ActD) dramatically impaired the mobility of GFP-RECQ5 in replication foci, whereas no change in the mobility of GFP-RECQ5 outside the replication foci was observed. Thus, RECQ5 associates with active transcription complexes in DNA replication foci, suggesting that it acts at sites of concomitant transcription and replication.

Mechanisms that cells evolved to resolve conflicts between replication and transcription remain elusive. Studies in bacteria and yeast have shown that specific helicases act in conjunction with the replisome to remove transcription complexes and other obstacles that impair replication fork progression (Azvolinsky et al., 2009; Boubakri et al., 2010; Sabouri et al., 2012). However, on very long genes in mammalian cells, collisions between transcription and replication complexes occur within each round of transcription, because the synthesis of the full-length transcript of these genes takes more than one cell cycle (Helmrich et al., 2013).

Therefore, to ensure proper gene expression, cells must have mechanisms that permit RNA chain elongation after the collision with replication fork. In our study, we provide evidence that RECQ5, BRCA1, and RAD18 are recruited independently of each other to sites of replication-transcription collisions. Based on the counts of BRCA1 and RAD18 foci detected in S-phase nuclei, we can speculate that collision between replication and transcription is a quite frequent event in dividing cells. We have concluded that coordinated action of RECQ5 and BRCA1 at sites of replication-transcription interference promotes resolution of the conflict. BRCA1-dependent loading of RAD51 on stalled replication forks, which depends on active transcription, leads to fork stabilization. RECQ5 promotes RAD18-dependent PCNA ubiquitination and unloading at sites of replication-transcription interference that might allow the passage of oncoming transcription complexes across the fork to complete RNA synthesis (Figure 1A). Failure of either of these activities would lead to persistence of stalled replication forks, resulting in genomic instability. In the absence of BRCA1, RECQ5 can mediate PCNA ubiquitination and unloading, but the replication fork fails to restart because of the impaired RAD51 loading. In the absence of RECQ5 or RAD18, BRCA1 can promote assembly of RAD51 filaments to protect stalled replication forks, but RNA polymerase cannot translocate across the replication fork, and hence replication restart is prevented (Figure 1B).

RECQ5 deficiency leads to accumulation of RAD18 and RAD51 foci in S-phase cells. Recently, RAD51 has been shown to form and/or stabilize the regressed arm of replication fork converted to HJ-structure in response to replication fork stalling (Zellweger et al., 2015). Thus, RAD51 foci in RECQ5-deficient cells likely represent unresolved replication intermediates. Consistently, they display a long-term stability in the presence of RAD51 inhibitor B02, which prevents the formation of RAD51 foci in normal cells. We have shown that the helicase activity of RECQ5 is crucial to resolve these replication intermediates. RECQ5 also promotes RAD18-dependent ubiquitination of PCNA at sites of replication-transcription interference by directly interacting with PCNA via its PIP motif. The absence of RECQ5 or inactivation of its PIP motif increased both chromatin binding of RAD18 and frequency of RAD18 foci in S-phase nuclei, suggesting that it is a consequence of a defect in PCNA ubiquitination. Moreover, the helicase activity of RECQ5 is required for PCNA unloading from chromatin. Both activities, ubiquitination and unloading of PCNA, are intensified under brute overexpression of RECQ5 in cells, which results in the inhibition of replication and arrest of cells at G1/S boundary of the cell cycle. In contrast to the finding that RECQ5 inhibits RNAPII-transcription *in vitro* in a manner dependent on the IRI domain (Aygun et al., 2009), we have not observed any negative

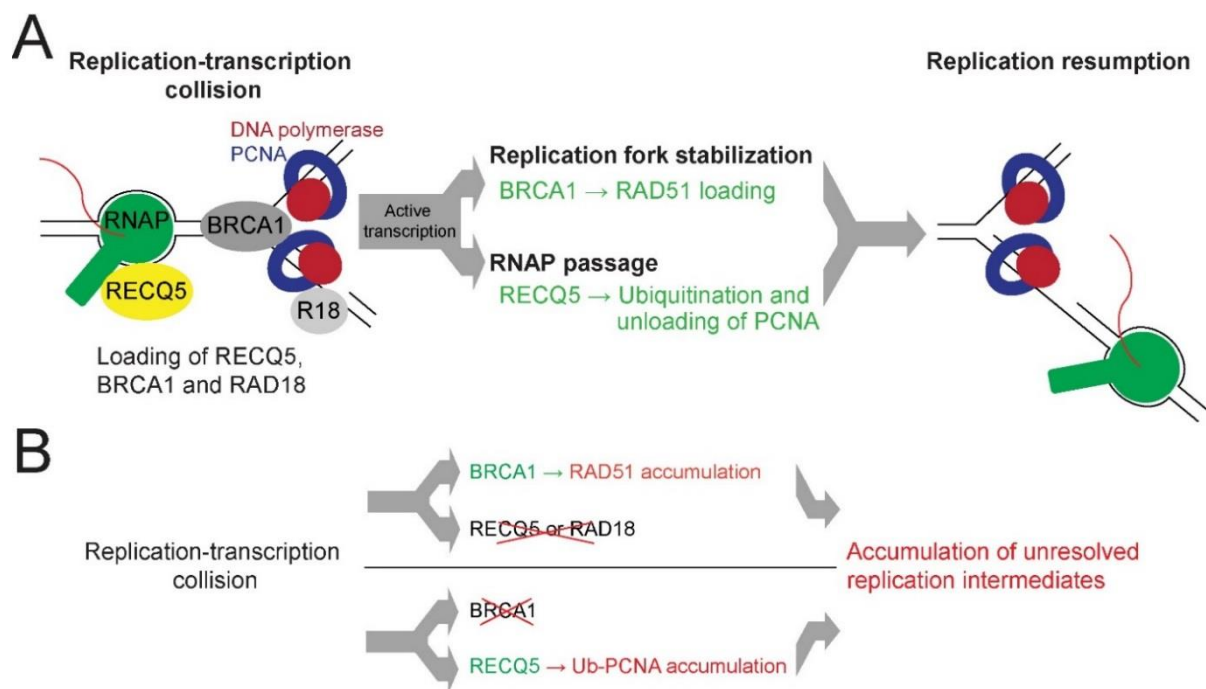


Figure 1. Model for resolution of conflicts between replication and transcription. (A) Scheme of the model. (B) Consequences of BRCA1 and RECQ5/RAD18 deficiencies on the resolution of replication-transcription conflicts. See the text for details (Urban et al., 2016).

effect of RECQ5 overexpression on the rate of transcription *in vivo*, suggesting that RECQ5 influences the replisome to favour transcription. Studies in budding yeast have shown that strains defective in PCNA unloading (e.g., *Δelg1* or PCNA-K164R mutants) exhibit uncontrolled DNA replication and accumulate Rad52 foci, an indication of genomic instability (Yu et al., 2014). Interestingly, these studies have revealed that PCNA is unloaded only from the lagging strand arm of forks stalled by HU treatment (Yu et al., 2014). Thus, one can speculate that RECQ5-driven PCNA unloading and ubiquitination might allow the passage of oncoming transcription complexes across the fork to complete RNA synthesis.

BRCA1 acts to form RAD51 filaments at arrested replication forks to protect them from nucleolytic degradation (Schlacher et al., 2012). Similarly to RECQ5, BRCA1 mobility in S-phase foci was dramatically reduced in cells treated with ActD to arrest transcription. In agreement with the immobilization of BRCA1 upon ActD treatment, the formation of RAD51 foci in S-phase cells was strongly attenuated by ActD, which further confirmed that BRCA1 activity is dependent on active transcription. In support of this notion, previous studies have shown that BRCA1 binds to hyperphosphorylated RNAPII that is present in the transcription elongation complex (Krum et al., 2003). Thus, it is possible that, in the process of resolution of replication-transcription collisions, BRCA1 acts in association with the transcription machinery.

There is accumulating evidence suggesting a role for active transcription in the resolution of replication-transcription collisions. It was shown that RNA polymerase translocation is required for the resolution of head-on collisions between the transcription machinery and bacteriophage  $\Phi$ 29 DNA polymerase in *Bacillus subtilis* (Elias-Arnanz and Salas, 1999). Similarly, studies in budding yeast have shown that RNAPII mutants with a defect in transcription elongation impair replication fork progression and cause genomic instability (Felipe-Abrio et al., 2015). In our study, we have shown that halted RNAPII transcription complexes prevented the movement of the replisome through rDNA in human cells. Interestingly, the data from our ChIP experiments showed that ActD-induced arrest of transcription complex at transcription start site of rDNA results in the increased binding of DNA polymerase  $\epsilon$  within the transcription unit peaking at the site located approximately 8 kb from the transcription start site. This suggests the presence of a topological barrier between colliding transcription and replication complexes, which was recently linked with genomic instability of highly transcribed genes in yeast (Bermejo et al., 2011). Moreover, we provide evidence that replication forks stalled by halted transcription complexes could be elongated once the RNA polymerase is allowed to resume transcription. Thus, RNA polymerase might actively participate in the resolution of replication-transcription encounters.

In conclusion, the process of replication fork stalling and recovery may be a very tangled mechanism that includes complex remodeling of both DNA and protein moieties of replication fork. The study of RecQ helicases can uncover individual steps of this process that prevents genomic instability. In our study, we provide evidence that RECQ5 exerts its genome maintenance function through its involvement in the resolution of collisions between replication and transcription complexes. Interference between replication and transcription represents a significant source of genome instability and contributes to oncogene-induced tumorigenesis (Poveda et al., 2010). Because RECQ5 deficiency is associated with cancer susceptibility in mice (Hu et al., 2007), our study provides further evidence for the role of replication-transcription interference in cancer development. Understanding the mechanisms that maintain replication fork stability may be crucial for diagnosis and therapy of human diseases caused by defects in response to replication stress.

## 5. Conclusions

In this work, we have provided evidence that RECQ5 prevents genomic instability resulting from replication-transcription collisions. We have proposed a mechanism for the resolution of replication-transcription encounters, which involves the coordinated action of RECQ5, BRCA1/RAD51 and RAD18. The major outcomes of this study can be summarized as follows:

- RECQ5 interacts with both RNAPI and II.
- RECQ5 is enriched at the coding regions of RNAPI- and II-transcribed genes.
- RECQ5 prevents RNAPI-transcription stress, and enforces the stability of the pre-rRNA coding regions of rDNA arrays.
- Depletion of RECQ5 leads to accumulation of unresolved replication intermediates with replisomes stalled in both RNAPI- and RNAPII-transcribed genes.
- RECQ5 associates with transcription complexes in replication foci.
- BRCA1, RAD18, RAD51 are recruited to sites of replication-transcription collisions.
- BRCA1 promotes transcription-dependent formation of RAD51 filaments in unperturbed cells.
- RECQ5 promotes RAD18-dependent ubiquitination of PCNA at sites of replication-transcription interference by directly interacting with PCNA.
- The helicase activity of RECQ5 is required for the resolution of replication intermediates stabilized by RAD51 filaments upon replication-transcription encounters.
- Transcription forms a barrier for replication fork progression and active transcription promotes resolution of replication-transcription collisions.

## 6. References

- Aygun, O., Svejstrup, J., and Liu, Y. (2008). A RECQ5-RNA polymerase II association identified by targeted proteomic analysis of human chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 8580-8584.
- Aygun, O., Xu, X., Liu, Y., Takahashi, H., Kong, S.E., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Svejstrup, J.Q. (2009). Direct inhibition of RNA polymerase II transcription by RECQL5. *The Journal of biological chemistry* *284*, 23197-23203.
- Azvolinsky, A., Giresi, P.G., Lieb, J.D., and Zakian, V.A. (2009). Highly transcribed RNA polymerase II genes are impediments to replication fork progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell* *34*, 722-734.
- Barlow, J.H., Faryabi, R.B., Callen, E., Wong, N., Malhowski, A., Chen, H.T., Gutierrez-Cruz, G., Sun, H.W., McKinnon, P., Wright, G., *et al.* (2013). Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. *Cell* *152*, 620-632.
- Bermejo, R., Capra, T., Jossen, R., Colosio, A., Frattini, C., Carotenuto, W., Cocito, A., Doksani, Y., Klein, H., Gomez-Gonzalez, B., *et al.* (2011). The replication checkpoint protects fork stability by releasing transcribed genes from nuclear pores. *Cell* *146*, 233-246.
- Blundred, R., Myers, K., Helleday, T., Goldman, A.S., and Bryant, H.E. (2010). Human RECQL5 overcomes thymidine-induced replication stress. *DNA Repair (Amst)* *9*, 964-975.
- Boubakri, H., de Septenville, A.L., Viguera, E., and Michel, B. (2010). The helicases DinG, Rep and UvrD cooperate to promote replication across transcription units in vivo. *The EMBO journal* *29*, 145-157.
- Boyer, A.S., Walter, D., and Sorensen, C.S. (2016). DNA replication and cancer: From dysfunctional replication origin activities to therapeutic opportunities. *Seminars in cancer biology* *37-38*, 16-25.
- Brambati, A., Colosio, A., Zardoni, L., Galanti, L., and Liberi, G. (2015). Replication and transcription on a collision course: eukaryotic regulation mechanisms and implications for DNA stability. *Frontiers in genetics* *6*, 166.
- Debatisse, M., Le Tallec, B., Letessier, A., Dutrillaux, B., and Brison, O. (2012). Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends in genetics : TIG* *28*, 22-32.
- Durkin, S.G., and Glover, T.W. (2007). Chromosome fragile sites. *Annual review of genetics* *41*, 169-192.
- Elias-Arnanz, M., and Salas, M. (1999). Resolution of head-on collisions between the transcription machinery and bacteriophage phi29 DNA polymerase is dependent on RNA polymerase translocation. *The EMBO journal* *18*, 5675-5682.
- Felipe-Abrio, I., Lafuente-Barquero, J., Garcia-Rubio, M.L., and Aguilera, A. (2015). RNA polymerase II contributes to preventing transcription-mediated replication fork stalls. *The EMBO journal* *34*, 236-250.
- French, S. (1992). Consequences of replication fork movement through transcription units in vivo. *Science* *258*, 1362-1365.
- Helmrich, A., Ballarino, M., Nudler, E., and Tora, L. (2013). Transcription-replication encounters, consequences and genomic instability. *Nature structural & molecular biology* *20*, 412-418.
- Helmrich, A., Ballarino, M., and Tora, L. (2011). Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Molecular cell* *44*, 966-977.
- Helmrich, A., Stout-Weider, K., Hermann, K., Schrock, E., and Heiden, T. (2006). Common fragile sites are conserved features of human and mouse chromosomes and relate to large active genes. *Genome research* *16*, 1222-1230.
- Hu, Y., Raynard, S., Sehorn, M.G., Lu, X., Bussen, W., Zheng, L., Stark, J.M., Barnes, E.L., Chi, P., Janscak, P., *et al.* (2007). RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. *Genes & development* *21*, 3073-3084.
- Islam, M.N., Fox, D., 3rd, Guo, R., Enomoto, T., and Wang, W. (2010). RecQL5 promotes genome stabilization through two parallel mechanisms--interacting with RNA polymerase II and acting as a helicase. *Molecular and cellular biology* *30*, 2460-2472.
- Izumikawa, K., Yanagida, M., Hayano, T., Tachikawa, H., Komatsu, W., Shimamoto, A., Futami, K., Furuichi, Y., Shinkawa, T., Yamauchi, Y., *et al.* (2008). Association of human DNA helicase

RecQ5beta with RNA polymerase II and its possible role in transcription. *The Biochemical journal* *413*, 505-516.

Jones, R.M., Mortusewicz, O., Afzal, I., Lorvellec, M., Garcia, P., Helleday, T., and Petermann, E. (2013). Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie Cyclin E-induced replication stress. *Oncogene* *32*, 3744-3753.

Kanagaraj, R., Huehn, D., MacKellar, A., Menigatti, M., Zheng, L., Urban, V., Shevelev, I., Greenleaf, A.L., and Janscak, P. (2010). RECQ5 helicase associates with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II during productive elongation phase of transcription. *Nucleic acids research* *38*, 8131-8140.

Kanagaraj, R., Saydam, N., Garcia, P.L., Zheng, L., and Janscak, P. (2006). Human RECQ5beta helicase promotes strand exchange on synthetic DNA structures resembling a stalled replication fork. *Nucleic acids research* *34*, 5217-5231.

Kassube, S.A., Jinek, M., Fang, J., Tsutakawa, S., and Nogales, E. (2013). Structural mimicry in transcription regulation of human RNA polymerase II by the DNA helicase RECQL5. *Nature structural & molecular biology* *20*, 892-899.

Krum, S.A., Miranda, G.A., Lin, C., and Lane, T.F. (2003). BRCA1 associates with processive RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry* *278*, 52012-52020.

Li, M., Xu, X., and Liu, Y. (2011). The SET2-RPB1 interaction domain of human RECQ5 is important for transcription-associated genome stability. *Molecular and cellular biology* *31*, 2090-2099.

Losada, A. (2014). Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond. *Nature reviews. Cancer* *14*, 389-393.

Macheret, M., and Halazonetis, T.D. (2015). DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annual review of pathology* *10*, 425-448.

Merrikh, H., Machon, C., Grainger, W.H., Grossman, A.D., and Soutanas, P. (2011). Co-directional replication-transcription conflicts lead to replication restart. *Nature* *470*, 554-557.

Poveda, A.M., Le Clech, M., and Pasero, P. (2010). Transcription and replication: breaking the rules of the road causes genomic instability. *Transcription* *1*, 99-102.

Prado, F., and Aguilera, A. (2005). Impairment of replication fork progression mediates RNA polIII transcription-associated recombination. *The EMBO journal* *24*, 1267-1276.

Ribeyre, C., Zellweger, R., Chauvin, M., Bec, N., Larroque, C., Lopes, M., and Constantinou, A. (2016). Nascent DNA Proteomics Reveals a Chromatin Remodeler Required for Topoisomerase I Loading at Replication Forks. *Cell reports* *15*, 300-309.

Rocha, E.P. (2008). The organization of the bacterial genome. *Annual review of genetics* *42*, 211-233.

Sabouri, N., McDonald, K.R., Webb, C.J., Cristea, I.M., and Zakian, V.A. (2012). DNA replication through hard-to-replicate sites, including both highly transcribed RNA Pol II and Pol III genes, requires the *S. pombe* Pfh1 helicase. *Genes & development* *26*, 581-593.

Saponaro, M., Kantidakis, T., Mitter, R., Kelly, G.P., Heron, M., Williams, H., Soding, J., Stewart, A., and Svejstrup, J.Q. (2014). RECQL5 Controls Transcript Elongation and Suppresses Genome Instability Associated with Transcription Stress. *Cell* *157*, 1037-1049.

Schlacher, K., Wu, H., and Jasin, M. (2012). A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer cell* *22*, 106-116.

Toledo, L.I., Altmeyer, M., Rask, M.B., Lukas, C., Larsen, D.H., Povlsen, L.K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J., and Lukas, J. (2013). ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* *155*, 1088-1103.

Tuduri, S., Crabbe, L., Conti, C., Tourriere, H., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., Pantesco, V., De Vos, J., Thomas, A., Theillet, C., *et al.* (2009). Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nature cell biology* *11*, 1315-1324.

Urban, V., Dobrovolska, J., Huhn, D., Fryzelkova, J., Bartek, J., and Janscak, P. (2016). RECQ5 helicase promotes resolution of conflicts between replication and transcription in human cells. *The Journal of cell biology* *214*, 401-415.

Wind, M., and Reines, D. (2000). Transcription elongation factor SII. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* *22*, 327-336.

Yu, C., Gan, H., Han, J., Zhou, Z.X., Jia, S., Chabes, A., Farrugia, G., Ordog, T., and Zhang, Z. (2014). Strand-specific analysis shows protein binding at replication forks and PCNA unloading from lagging strands when forks stall. *Molecular cell* *56*, 551-563.



Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J.A., Herrador, R., Vindigni, A., and Lopes, M. (2015). Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *The Journal of cell biology* *208*, 563-579.

Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature cell biology* *16*, 2-9.

Zhang, C., Lu, J., and Zhang, P. (2016). The Roles of Chromatin Remodeling Proteins in Cancer. *Current protein & peptide science* *17*, 446-454.

## *Curriculum vitae*

### **Research experience**

- 2008-Present    Pavel Janscak group  
Department of Chromosomal Stability, from 2013 joined to Department of Genome Integrity - Jiri Bartek group  
Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences, Czech Republic  
Main project: *The role of RECQ5 helicase in maintenance of genome stability*
- 2010, 2011    Research internships (2 months each) in Kristijan Ramadan group, University of Zurich, Switzerland  
Interest in methods to study DNA damage and replication
- 2004-2008    Pavel Kotrba group  
Laboratory of Metallomics and Bioremediation of Heavy Metals  
Department of Biochemistry and Microbiology  
Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic  
Main project: *Intracellular sequestration of silver in fruit bodies of ectomycorrhizal fungus Amanita strobiliformis*

### **Education**

- 2008-Present    PhD study  
Department of Genetics and Microbiology  
Faculty of Science, Charles University
- 2003-2008    Master study (finished by M.Sc. degree)  
Department of Biochemistry and Microbiology  
Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology

### **Activities related to Ph.D. study:**

Oral presentation (selected talk), poster: Human RECQ5 DNA helicase promotes resolution of conflicts between transcription and replication complexes in ribosomal DNA arrays; The 8<sup>th</sup> 3R Symposium (2012), Japan.

Oral presentation (selected talk): RECQ5 helicase promotes resolution of conflicts between transcription and replication complexes; RNA club 2015 (2015), Czech Republic (2<sup>nd</sup> best talk award).

## ***List of publications***

### 1. Related to PhD thesis

**RECQ5 helicase promotes resolution of conflicts between replication and transcription in human cells.**

Urban V, Dobrovolna J, Hühn D, Fryzelkova J, Bartek J, Janscak P.

J Cell Biol. 2016 Aug 15;214(4):401-15. IF: 8.7 (2015)

**RecQ-core of BLM unfolds telomeric G-quadruplex in the absence of ATP.**

Budhathoki JB, Ray S, Urban V, Janscak P, Yodh JG, Balci H.

Nucleic Acids Res. 2014 Oct;42(18):11528-45. IF: 9.2 (2015)

**RECQ5 helicase associates with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II during productive elongation phase of transcription.**

Kanagaraj R, Huehn D, MacKellar A, Menigatti M, Zheng L, Urban V, Shevelev I, Greenleaf AL, Janscak P.

Nucleic Acids Res. 2010 Dec;38(22):8131-40. IF: 9.2 (2015)

**Distinct functions of human RecQ helicases during DNA replication.**

Urban V, Dobrovolna J, Janscak P.

Submitted in Biophysical Chemistry.

### 2. Other publication

**Three metallothionein isoforms and sequestration of intracellular silver in the hyperaccumulator *Amanita strobiliformis*.**

Osobová M, Urban V, Jedelský PL, Borovička J, Gryndler M, Ruml T, Kotrba P.

New Phytol. 2011 Jun;190(4):916-26. IF: 7.2 (2015)



**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Autoreferát disertační práce

**Úloha RECQ5 helikázy při udržování stability genomu**

**Ing. Václav Urban**

Akademie věd České republiky

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

Oddělení genomové integrity

Školitel: RNDr. Pavel Janščák, CSc.

**Praha, 2016**

Univerzita Karlova v Praze  
a  
Akademie věd České republiky

Doktorský studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc

Školící pracoviště: Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.  
Oddělení genomové integrity

Autor: Ing. Václav Urban

Školitel: RNDr. Pavel Janščák, CSc.

S dizertací je možno se seznámit v knihovně Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy  
v Praze.

## Abstrakt

V průběhu replikace často dochází k zastavení postupu replikačních vidlic v důsledku poškození DNA templátu, přítomnosti transkripčních komplexů nebo tvorby sekundárních struktur DNA. RecQ helicázy patří v buňce k nejdůležitějším faktorům, které zajišťují stabilitu genomu za podmínek replikačního stresu. Přestože jsou transkripce i replikace esenciálními buněčnými mechanismy, jejich vzájemná interference může vést k poškození DNA a následné genomové nestabilitě. RECQ5 helicáza interaguje s RNA polymerázou II během elongační fáze transkripce a zabraňuje vzniku transkripční indukovaného poškození DNA. V této studii ukazujeme, že RECQ5 interaguje také s RNA polymerázou I a zabraňuje ztrátě či znásobení úseků ribozomální DNA, na kterých dochází k přepisu ribozomální RNA. Prokázali jsme, že během S-fáze buněčného cyklu RECQ5 asociuje s transkripcí v místech právě probíhající replikace. Odstranění RECQ5 pomocí RNA interference vede k zastavení replikačních vidlic v oblastech transkribovaných RNA polymerázou I nebo II, což naznačuje, že RECQ5 udržuje stabilitu genomu v místech kolize mezi replikací a transkripcí. Snížením exprese RECQ5 pomocí RNA interference dochází v jádrech replikujících buněk k akumulaci RAD51 a RAD18 fokusů, které pravděpodobně představují nerozřešené replikační intermediáty, které jsme v buňkách po odstranění RECQ5 také detekovali. Vznik RAD51 fokusů v místech kolize mezi replikací a transkripcí je závislý na přítomnosti BRCA1 a aktivní transkripce. Také jsme prokázali, že aktivní transkripce zabraňuje kolapsu replikačních vidlic a je potřeba pro jejich restart. V místech kolize mezi replikací a transkripcí indukuje helicázová aktivita RECQ5 částečné odstranění PCNA z replikační vidlice, přičemž zbylé PCNA je díky interakci s RECQ5 posttranslačně modifikováno ubikvitinací. RECQ5 pomocí své helicázové aktivity umožňuje také rozřešení replikačních intermediátů stabilizovaných pomocí RAD51. Přítomnost RECQ5 v místech kolize mezi replikací a transkripcí tedy indukuje změny na zastavené replikační vidlici, která je současně chráněna pomocí BRCA1 před kolapsem. Oba tyto procesy vedou k rozřešení kolize a restartu replikace. Tato práce identifikuje RECQ5 jako jeden z klíčových faktorů při řešení kolize mezi replikací a transkripcí.

## Obsah

Abstrakt.....	1
1. Úvod.....	3
1.1. Kolize mezi replikací a transkripcí .....	3
1.2. RECQ5 zabraňuje během replikace poškození DNA indukované transkripcí .....	6
2. Cíle práce.....	7
3. Materiál a metody .....	7
4. Výsledky a diskuze .....	8
5. Závěry .....	12
6. Použitá literatura.....	13
<i>Životopis .....</i>	<i>16</i>
<i>Seznam publikací.....</i>	<i>17</i>



## 1. Úvod

Přesná duplikace genomu je nezbytná pro přežití buněk. Bezchybnost replikace DNA zajišťují vysoce přesné DNA polymerázy a řada souvisejících faktorů, které se účastní v signálních drahách buněčné odpovědi na poškození DNA, opravy DNA, přestavbě chromatinu, udržování soudržnosti sesterských chromatid a řízení buněčného cyklu. Vady v některé z těchto aktivit mohou způsobit zpomalení nebo zastavení replikační vidlice, což je stav označovaný jako replikační stres, který je považován za hlavní předpoklad ke vzniku genomové nestability projevující se vrozenými vadami, vývojovými abnormalitami, neurodegenerací, předčasným stárnutím a predispozicí k rakovině (Boyer et al., 2016; Losada, 2014; Macheret and Halazonetis, 2015; Zeman and Cimprich, 2014; Zhang et al., 2016). Proces replikace DNA je jeden z nejzranitelnějších procesů v metabolismu DNA dělících se buněk, a proto je přísně kontrolován a koordinován s procesy, které udržují stabilitu genomu. RecQ helikázy se přímo účastní obnovení a restartu replikačních vidlic zastavených kvůli překážkám pocházejících jak z endogenního tak exogenního prostředí. RecQ helikázy zabraňují vzniku aberantních struktur a kolapsu replikačních vidlic, a jsou zapojeny do signálních drah buněčné odpovědi na poškození DNA. Lidské RecQ helikázy mají v zachování stability genomu během replikace DNA nepostradatelnou úlohu, jelikož defekty v jejich funkci jsou spojovány s rozvojem rakoviny.

### 1.1. Kolize mezi replikací a transkripcí

Studie v bakteriích, kvasinkách a savčích buňkách prokázaly, že kolize mezi replikací a transkripcí jsou nevyhnutelné a jsou jedním z hlavních zdrojů replikačního stresu. Kolize mezi replikací a transkripcí způsobují dvouvláknové zlomy DNA a chromozomální aberace, a to zejména v případě, kdy jsou buňky vystaveny dalšímu zdroji replikačního stresu (Helmrich et al., 2013). Ke kolizi mezi replikací a transkripcí může dojít čelně na opožděujícím se vlákně replikační vidlice nebo po směru na vedoucím vlákně replikační vidlice. Ačkoliv jsou oba typy kolizí spojeny se zastavením replikačních vidlic v dělících se buňkách, některé výsledky naznačují, že hlavně čelní střety mezi replikací a transkripcí ovlivňují stabilitu genomu (Azvolinsky et al., 2009; Brambati et al., 2015; Merrih et al., 2011). V bakteriích bylo ukázáno, že právě čelní kolize jsou jednoznačně mnohem závažnější, neboť vložení indukovatelného počátku replikace ColE1 proti nebo po směru transkripce ribozomálních RNA v *E. coli* mělo za následek zpomalení replikace jen v případě, kdy mohlo dojít k čelní kolizi (French, 1992). Organizace bakteriálních genomů pravděpodobně odráží nepříznivý efekt čelních kolizí mezi replikací a transkripcí. Všechny sekvenované bakteriální genomy se vyznačují umístěním kódující sekvence většiny genů na vlákně DNA, které je během replikace vedoucím. V *B. subtilis* je přibližně 95% esenciálních genů a 75% ostatních genů

kódováno vláknem DNA, které je během replikace vedoucím, bez vztahu k míře exprese genu (Rocha, 2008).

V kvasinkách jsou potenciálními místy kolizí mezi replikací a transkripcí, bez ohledu na jejich orientaci, především chromozomální oblasti s vysokou mírou transkripce (Azvolinsky et al., 2009). Mapování vazby DNA polymerázy na chromatin ukázalo, že geny vyznačující se vysokou mírou přepisu pomocí RNA polymerázy (RNAP) II jsou místa, kde dochází k zastavení replikačních vidlic (Azvolinsky et al., 2009). Specifické reportérové systémy v kvasinkách ukázaly, že transkripce RNAPII vedoucí k čelním srážkám s replikací způsobuje zastavení replikační vidlice, což je oproti srážkám se stejnosměrnou orientací spojené s výrazným nárůstem v rekombinaci DNA (Prado and Aguilera, 2005). Důvod, proč jsou čelní kolize mezi replikací a transkripcí závažnějším problémem pro zachování stability genomu, zůstává nejasný. Poškození DNA může vzniknout například kvůli spojení vysoce transkribovaných genů s jadernými póry (tvořených nukleoporiny) v jaderné membráně. Toto spojení může pohybem replikačního a transkripčního komplexu proti sobě vést ke vzniku nadšroubovicovitého vinutí v DNA a tudíž ke vzniku topologické bariery (Bermejo et al., 2011). Fosforylací nukleoporinů kinázami ze signální dráhy buněčné odpovědi na poškození DNA dojde k odpojení přepisovaných genů od jaderných pórů, čímž se zabrání vzniku poškození DNA (Bermejo et al., 2011). Samotný transkripční komplex může také přímo zabraňovat zastavení replikační vidlice. Kvasinkové buňky nesoucí mutaci v RNAPII (*rpb1-1*, *rpb1-S751F* a *rpb9Δ*), která způsobuje defekt v transkripci, jsou citlivé na přítomnost hydroxyurey (HU) a akumulují replikací indukované zlomy v DNA. Kromě toho, replikační defekt pozorovaný v *rpb1-1* buňkách vede k aktivaci dormantních počátků replikace a akumulaci tzv. „Holliday junction“ struktur DNA, jejichž vznik závisí na Rad51. Důsledkem mutace RNAPII v *rpb1-1* buňkách dochází také k zastavení RNAPII na genech, což naznačuje, že aktivní transkripce potlačuje zastavení replikační vidlice (Felipe-Abrio et al., 2015).

Narušení transkripce způsobené snížením exprese topoisomerázy I nebo pomocí camptothecinem (CPT) indukované inhibice tohoto enzymu vede ke zpomalení replikačních vidlic v lidských buňkách (Ribeyre et al., 2016; Tuduri et al., 2009). Buňky vystavené působení CPT mají též zvýšenou hladinu fosforylace CHK1 na Ser345 a akumulují aberantní strukturu replikačních vidlic, tzv. „chicken foot“. Všechny výše uvedené fenotypy jsou potlačeny inhibicí transkripce pomocí cordycepinu, který předčasně terminuje transkripci, což naznačuje, že transkripce je rozhodujícím činitelem pro zastavení replikačních vidlic v přítomnosti CPT nebo při nedostatku topoisomerázy I (Ribeyre et al., 2016; Tuduri et al., 2009). Interference mezi replikací a transkripcí je rovněž důvodem zastavení replikačních vidlic a poškození DNA v buňkách s aktivovaným onkogenem, který způsobuje nepřiměřenou

aktivaci počátků replikace (Jones et al., 2013). Nadměrná exprese cyklinu E výrazně zvyšuje počet replikačních ohnisek během počátku S-fáze, což může stupňovat počet replikačních vidlic zastavených transkripčním komplexem. V důsledku zvýšeného počtu kolizí se v jádře buňky akumulují RAD51 fokusy. Inhibice transkripce v buňkách s aktivovaným onkogenem zabrání zastavení replikace a vzniku poškození DNA vedoucí ke genomové nestabilitě, aniž by přímo ovlivnila replikaci (Jones et al., 2013).

Korelace mezi genomovou nestabilitou vyvolanou replikačním stresem a aktivní transkripcí je patrná zejména v případě fragility tzv. „common fragile sites“ (CFSs) a nově identifikovaných „early replicating fragile sites“ (ERFSs) (Barlow et al., 2013; Helmrich et al., 2011). CFSs jsou specifická místa v genomu, která vykazují zvýšenou frekvenci přerušeni nebo zlomů chromozomů pozorovatelných během metafáze v buňkách s částečně inhibovanou replikací (Durkin and Glover, 2007). CFSs jsou často detekovány v oblastech genomu, které kódují velmi dlouhé geny (> 650 kb), jejichž transkripce trvá i déle než jeden buněčný cyklus, což je předpokladem pro nevyhnutelnost kolize mezi replikací a transkripcí (Helmrich et al., 2011; Helmrich et al., 2006). Bylo ukázáno, že kolize mezi replikací a transkripcí je na CFSs doprovázena tvorbou RNA:DNA hybridů (struktur označovaných také jako R-smyčky), které mohou způsobit poškození chromozomů. Existují také důkazy, že chromozomální poškození v CFSs je výsledkem zpomalené replikace a jejího následného nedokončení kvůli nízké hustotě replikačních počátků v těchto oblastech (Debatisse et al., 2012). Na rozdíl od CFSs replikujících se v pozdní S-fázi, ERFSs jsou detekovány v časně replikujících oblastech genomu, které obsahují seskupení genů s intenzivní transkripcí (Barlow et al., 2013). V ERFSs dochází během replikace ke spontánním zlomům DNA, ale jejich fragilita je významně zvýšena působením replikačního stresu vyvolaného pomocí HU, aktivací onkogenu nebo inhibicí ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related) na počátku S-fáze. ERFSs jsou charakterizovány nestabilitou časných replikačních vidlic, k jejichž zastavení dochází v intenzivně transkribovaných oblastech genů a jejich promotorech (Barlow et al., 2013). Důležité je, že chromozomální poškození na vybraném ERFS v blízkosti genu *SWAP70* je silně závislé na míře transkripce, což naznačuje přítomnost kolize mezi replikací a transkripcí (Barlow et al., 2013). Kromě zastavení replikačních vidlic dochází na ERFSs navíc k akumulaci BRCA1, což indikuje zapojení faktorů homologní rekombinace do stabilizace a obnovení replikačních vidlic (Barlow et al., 2013; Schlacher et al., 2012).

Navzdory hromadícím se důkazům, že v dělicích se buňkách jsou konflikty mezi replikací a transkripcí velmi častou událostí a že mají škodlivý vliv na integritu genomu, je známo jen málo o molekulárních mechanismech podílejících se na jejich řešení.

## 1.2. RECQ5 zabraňuje během replikace poškození DNA indukované transkripcí

Podjednotky RNAPII jsou nejvýznamnějšími proteiny, které ko-immunoprecipitují společně s RECQ5 z extraktů lidských buněk (Aygün et al., 2008; Izumikawa et al., 2008). RECQ5 interaguje s největší katalytickou podjednotkou RNAPII označovanou RPB1 (Aygün et al., 2008), přičemž tato interakce je nejvýraznější v průběhu S-fáze (Li et al., 2011). V polypeptidu RECQ5 byly identifikovány dvě oblasti, které jsou odpovědné za interakci s RPB1: (i) „internal RNAPII-interacting“ (IRI) doména včetně KIX motivu, který se váže na „jaw“ doménu RPB1; a (ii) „Set2-Rpb1-interacting“ (SRI) doména, která se váže na hyperfosforylovanou C-terminální repetitivní doménu (CTD) RPB1 (Islam et al., 2010; Kanagaraj et al., 2010; Kassube et al., 2013). Je zajímavé, že terciární struktura KIX domény se podobá doméně II u TFIIIS, která podporuje restart RNAPII z pozastaveného stavu (Kassube et al., 2013; Wind and Reines, 2000). RECQ5 asociuje s chromatinem v místech RNAPII- transkribovaných genů (Izumikawa et al., 2008; Kanagaraj et al., 2010; Saponaro et al., 2014). Zde RECQ5 kontroluje pohyb RNAPII během elongace, aby nedocházelo k jejímu zastavení, což je stav označovaný jako transkripční stres (Saponaro et al., 2014). Navíc, RECQ5 v průběhu S fáze lokalizuje do replikačních fokusů a interaguje s PCNA, který je jednou z hlavních součástí replizómu (Kanagaraj et al., 2006). Mírné navýšení koncentrace RECQ5 v buňce pomocí ektopické exprese pomáhá potlačit následky replikačního stresu vyvolaného přítomností thymidinu (Blundred et al., 2010). Je ukázáno, že replikační stres vyvolává akumulaci RPA, který stabilizuje vzniklé jednořetězcové úseky DNA na zastavených replikačních vidlicích, což může vést až k vyčerpání volného RPA a následnému kolapsu replikačních vidlic (Toledo et al., 2013). Mírné zvýšení koncentrace RECQ5 v buňce právě potlačuje nárůst počtu RPA fokusů v podmínkách replikačního stresu (Blundred et al., 2010). V buňkách postrádajících RECQ5 dochází k nárůstu počtu jaderných RAD51 fokusů a výměně sesterských chromatid (Hu et al., 2007). Odstranění RECQ5 z buněk vede k transkripčně závislému poškození DNA v průběhu S-fáze a akumulaci chromozomových přestaveb se zlomy v DNA, ke kterým dochází v genech a CFSs (Li et al., 2011; Saponaro et al., 2014). Zajímavé je, že zmíněná místa incidence genomové nestability v buňkách po depleci RECQ5 jsou právě místa se zvýšeným transkripčním stresem (Saponaro et al., 2014). Konečně, inaktivace *Recq15* genu v myších vede k rozvoji různých typů nádorového bujení, což ukazuje na tumor supresorovou úlohu RECQ5 (Hu et al., 2007). V závěru, poznatky o RECQ5 ukazují, že zabraňuje nestabilitě genomu v místech, kde dochází současně k replikaci a transkripci. Není však jasné, zda RECQ5 působí přímo v místech kolize mezi replikací a transkripcí.

## 2. Cíle práce

Hlavním cílem této studie bylo objasnění role RECQ5 helicázy při udržování stability genomu.

Specifické cíle této studie byly následující:

- Charakterizovat asociaci RECQ5 s RNA polymerázami I a II
- Zkoumat úlohu RECQ5 v místech kolize mezi replikací a transkripcí
- Studovat molekulární mechanismus vedoucí k řešení kolize mezi replikací a transkripcí

## 3. Materiál a metody

Standardní molekulárně biologické metody (izolace nukleových kyselin, klonování DNA, reverzní transkripce, PCR, SDS-PAGE, imunoblot, imunoprecipitace, imunofluorescence)

Tkáňové kultury, RNA interference, transfekce DNA

Průtoková cytometrie

Frakcionace buněk

Chromatinová imunoprecipitace (ChIP)

Kvantitativní real-time PCR (qPCR)

Comet assay

Purifikace proteinů, produkce protilátek

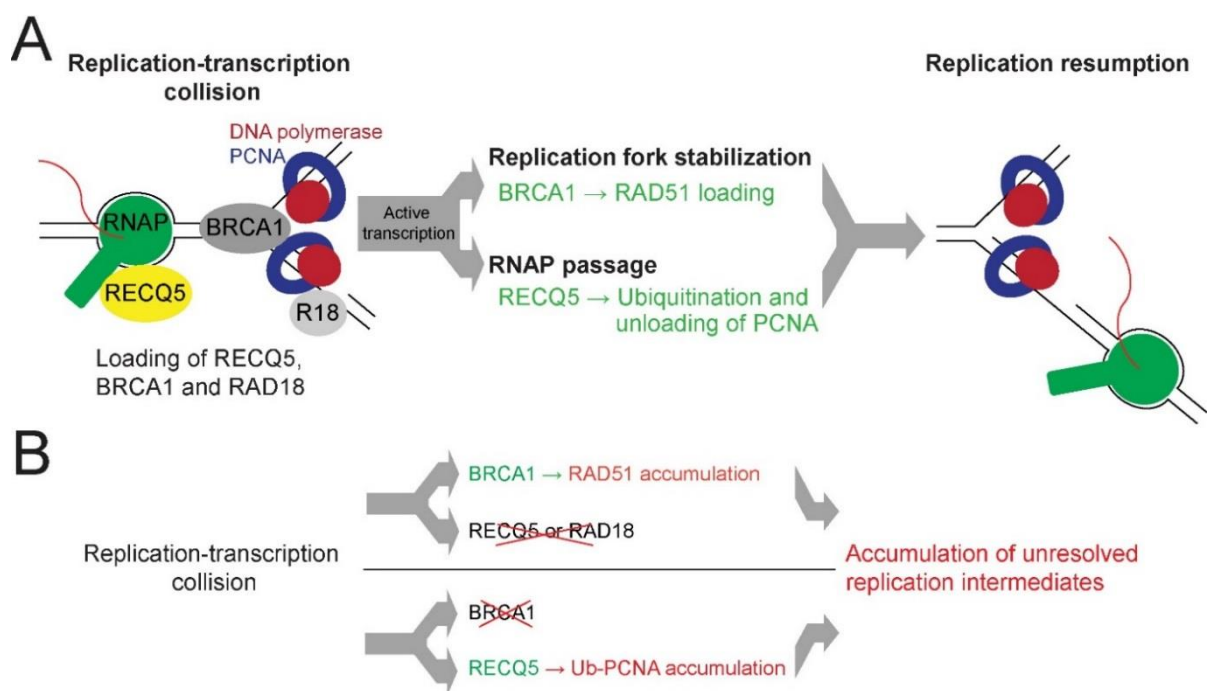
FRAP (z angl. fluorescence recovery after photobleaching)

## 4. Výsledky a diskuze

RECQ5 DNA helikáza je nezbytná pro udržení stability genomu, ale její přesná molekulární funkce zůstává nejasná. Nedávné studie ukázaly, že RECQ5 se váže na RNAPII během elongační fáze transkripce a udržuje genomovou stabilitu v RNAPII-transkribovaných genech tím, že působí jako faktor, který potlačuje transkripční stres (Kanagaraj et al., 2010; Li et al., 2011; Saponaro et al., 2014). V naší studii ukazujeme, že RECQ5 tvoří komplex také s RNAPI, a váže se na její největší katalytickou podjednotku zvanou RPA194. RECQ5 se výrazně akumuluje na chromatinu v oblastech přepisu pre-ribozomální RNA (pre-rRNA), přičemž obohacení na chromatinu má podobný distribuční charakter, jaký je pozorován u RPA194. Zajímavé je, že po depleci RECQ5 z buněk jsme pozorovali významné obohacení RNAPI na chromatinu v oblastech přepisu pre-rRNA, ale ne na promotoru. Tyto data naznačují, že RECQ5 asociuje s RNAPI během transkripce a může zde potlačovat transkripční stres. Naše data popisující vztah mezi RNAPI a RECQ5 jsou v souladu s návrhem, že RECQ5 působí jako obecný transkripční elongační faktor, který je důležitý pro zachování stability genomu v průběhu transkripce (Kanagaraj et al., 2010; Li et al., 2011; Saponaro et al., 2014).

Také ukazujeme, že deplece RECQ5 způsobuje variabilitu počtu kopií segmentů DNA především v rámci pre-rRNA kódující oblasti, která je součástí ribozomální repetitivní DNA (rDNA). K nejvýraznějším změnám v buňkách po depleci RECQ5 dochází během působení replikačního stresu vyvolaného přítomností HU, kdy pozorujeme výrazné amplifikace sekvencí DNA, avšak pouze v transkribované části rDNA. Odstranění RECQ5 z buněk způsobuje také perzistenci nevyřešených meziproductů replikace, které vznikly zastavením replizómu v RNAPI- a RNAPII-transkribovaných genech. Tato zjištění naznačují, že stabilizace genomu v místech transkripce působením RECQ5 může odrážet úlohu RECQ5 v řešení kolize mezi replikací a transkripcí. Tuto hypotézu jsme podpořili zjištěním, že inhibice transkripce pomocí aktinomycinu D (ActD) výrazně snižuje mobilitu GFP-RECQ5 v replikačních fokusech, přičemž mimo replikační fokus zůstává mobilita GFP-RECQ5 beze změny. Tento výsledek ukazuje, že RECQ5 asociuje s aktivními transkripčními komplexy právě v místech replikace DNA, což naznačuje, že působí v místech kolize transkripce a replikace.

Mechanismy, které se v buňkách vyvinuly k řešení konfliktů mezi replikací a transkripcí jsou stále nejasné. Studie v bakteriích a kvasinkách ukázaly, že spojení specifických helikáz s replizómem vede k odstranění transkripčních komplexů a jiných překážek bránících v postupu replikační vidlice (Azvolinsky et al., 2009; Boubakri et al., 2010; Sabouri et al., 2012). Nicméně, během transkripce velmi dlouhých genů v savčích buňkách, jejichž doba



Obrázek 1. Model, který naznačuje řešení kolize mezi replikací a transkripcí. (A) Schéma modelu. (B) Následky deplece BRCA1 a RECQ5 nebo RAD18 na řešení kolize mezi replikací a transkripcí. Detaily mechanismu jsou uvedeny v textu (Urban et al., 2016).

transkripce přesahuje i délku buněčného cyklu, je kolize mezi transkripcí a replikací nevyhnutelná (Helmrich et al., 2013). Buňky tedy musí mít mechanismy, které zajišťují správnou expresi genů i za podmínek kolize mezi replikací a transkripcí. V naší studii jsme ukázali, že se RECQ5, BRCA1 a RAD18 rekrutují nezávisle na sobě do míst kolizí mezi replikací a transkripcí. Na základě počtu BRCA1 a RAD18 fokusů detekovaných v buněčných jádrech během S-fáze můžeme spekulovat, že kolize mezi replikací a transkripcí je v dělících se buňkách poměrně častá událost. Závěrem naší práce je, že koordinované působení RECQ5 a BRCA1 v místech kolizí replikace a transkripce vede k řešení konfliktu. BRCA1 stabilizuje v místech kolizí zastavené replikační vidlice tvorbou RAD51 filament, což je závislé na aktivní transkripci. RECQ5 indukuje v místech kolize ubikvitinaci PCNA uskutečněnou pomocí RAD18 a také podporuje částečné odstranění PCNA ze zastavených replikačních vidlic, což může umožnit průchod transkripčního komplexu přes replikační vidlici a dokončení syntézy RNA (Obrázek 1A). Disfunkce některé z těchto aktivit způsobí přetrvávání zastavených replikačních vidlic, což vede ke genomové nestabilitě. Při absenci BRCA1 může RECQ5 indukovat ubikvitinaci PCNA a jeho částečné odstranění, ale k obnovení a restartu replikační vidlice nedojde kvůli nepřítomnosti RAD51. Po odstranění RECQ5 nebo RAD18 sice BRCA1 umožní tvorbu RAD51 filament stabilizujících zastavené replikační vidlice, ale RNA polymeráza nedokáže překonat replikační vidlici, čímž je opět zabráněno restartu replikace (Obrázek 1B).

Deplece RECQ5 vede k akumulaci RAD18 a RAD51 fokusů v jádrech S-fázních buněk. Nedávné studie ukázaly, že přítomnost RAD51 na zastavených replikačních vidlicích vede k tvorbě nebo stabilizaci regresního ramene replikační vidlice, což je struktura DNA, která vzniká spojením dceřiných vláken při přestavbě replikační vidlice na tzv. Holliday junction (Zellweger et al., 2015). Detekované RAD51 fokusy v RECQ5-depletovaných buňkách pravděpodobně představují tyto replikační intermediáty, jelikož vykazují dlouhodobou stabilitu v přítomnosti inhibitoru B02, který zabraňuje tvorbě nových RAD51 fokusů. V této práci dále ukazujeme, že helikázová aktivita RECQ5 je potřebná pro vyřešení těchto replikačních intermediátů. Dále, zmíněnou ubikvitinaci PCNA pomocí RAD18 indukuje RECQ5 v místech kolize mezi replikací a transkripcí a to přímou interakcí s PCNA prostřednictvím svého PIP motivu. Deplece RECQ5 helikázy nebo mutace v jejím PIP motivu se projeví akumulací RAD18 na chromatinu a vyšším počtem RAD18 fokusů v jádrech S-fázních buněk, což naznačuje, že se jedná o důsledek poruchy v ubikvitinaci PCNA. Kromě toho je helikázová aktivita RECQ5 také potřebná k částečnému odstranění PCNA z chromatinu. Obě tyto aktivity (ubikvitinace a odstranění PCNA) jsou zesíleny nadměrnou expresí RECQ5 v buňkách, což vede k inhibici replikace a zastavení buněk na rozhraní G1/S fázi buněčného cyklu. Na rozdíl od publikovaného zjištění, že RECQ5 inhibuje pomocí své IRI domény transkripci RNAPII *in vitro* (Aygün et al., 2009), jsme žádný negativní vliv nadměrné exprese RECQ5 na míru transkripce *in vivo* nepozorovali. Tento výsledek naznačuje, že RECQ5 svým vlivem na replizóm napomáhá transkripci. Studie v kvasinkách ukázaly, že kmeny defektní v odstraňování PCNA z replikační vidlice (charakterizované např. *Δelg1* nebo mutací PCNA v Lys164) mají poškozenou replikaci a akumulují Rad52 fokusy, což svědčí o genomové nestabilitě (Yu et al., 2014). Tato studie také ukázala jednu zajímavost, že PCNA je působením HU odstraňováno pouze z opoždujícího se řetězce replikační vidlice (Yu et al., 2014). Což umožňuje spekulovat, že odstranění PCNA pomocí RECQ5 by mohlo umožnit transkripčnímu komplexu, který se čelně srazil s replizómem, projít přes replikační vidlici a dokončit syntézu RNA.

BRCA1 umožňuje tvorbu RAD51 filament na zastavených replikačních vidlicích, čímž je chrání před degradací jadernými nukleázami (Schlacher et al., 2012). Podobně jako u RECQ5, mobilita BRCA1 v S-fázních fokusech je výrazně snížena inhibicí transkripce pomocí ActD. V přítomnosti ActD dochází k poklesu počtu RAD51 fokusů v jádrech S-fázních buněk, což je v souladu s imobilizací BRCA1 a dále to potvrzuje, že aktivita BRCA1 je závislá na aktivní transkripci. Předchozí studie už ukázaly, že se BRCA1 váže na hyperfosforylovanou RNAPII, která je přítomna v elongačním fázi transkripce (Krum et al., 2003). Je tedy možné, že BRCA1 působí v místech kolize mezi replikací a transkripcí ve spojení s transkripčním komplexem.



Současné studie ukazují, že aktivní transkripce má při řešení kolize mezi replikací a transkripcí významnou úlohu. Ukázalo se, že projitím RNA polymerázy přes DNA polymerázu bakteriofága  $\Phi 29$  v *Bacillus subtilis* dojde k rozřešení čelních kolizí (Elias-Arnanz and Salas, 1999). Podobně, studie v kvasinkách ukázaly, že mutace v RNAPII, která způsobí defekt v elongaci transkripce, způsobuje zpomalení postupu replikačních vidlic a nestabilitu genomu (Felipe-Abrio et al., 2015). V naší studii ukazujeme, že zastavený transkripční komplex RNAPI brání v pohybu replizómu na rDNA v lidských buňkách. Pomocí chromatinové imunoprecipitace jsme ukázali na zajímavost, že vlivem přítomnosti transkripčního inhibitoru ActD dochází k výraznému obohacení RNAPI v místech počátku přepisu pre-rRNA, což vyvolá významnou akumulaci DNA polymerázy  $\epsilon$  v místě vzdáleném přibližně 8 kb od počátku transkripce pre-RNA. Tento výsledek naznačuje možnost vzniku topologické bariéry během kolize mezi transkripcí a replikací. Tento jev byl nedávno v kvasinkách spojen s rozvojem genomové nestability v důsledku intenzivní transkripce některých genů (Bermejo et al., 2011). Naše výsledky také ukazují, že k obnovení a restartu replikačních vidlic dojde po uvolnění zastavených transkripčních komplexů odmytím ActD. RNA polymeráza se tedy může aktivně podílet na řešení kolize mezi replikací a transkripcí.

Závěrem lze říci, že mechanismy probíhající na zastavených replikačních vidlicích a mechanismy vedoucí k jejich restartu mohou být velmi složité a zahrnovat komplexní přestavbu replizómu i samotné struktury DNA v replikační vidlici. Studium RecQ helikáz může odhalit jednotlivé kroky tohoto procesu, které zabraňují rozvoji genomové nestability. V naší studii jsme ukázali, že RECQ5 udržuje integritu genomu prostřednictvím svého zapojení do řešení kolizí mezi replikací a transkripcí. Interference mezi replikací a transkripcí představuje významný zdroj genomové nestability a přispívá k tvorbě nádorů v buňkách s aktivovaným onkogenem (Poveda et al., 2010). Vzhledem k tomu, že u myši bez funkční RECQ5 helikázy dochází k rozvoji různých typů rakovin (Hu et al., 2007), naše studie poskytuje další důkaz o úloze interference mezi replikací a transkripcí v rozvoji rakoviny. Pochopení mechanismů, které udržují stabilitu replikační vidlice, může mít zásadní význam pro diagnózu a terapii lidských onemocnění způsobených poruchami v reakci na replikační stres.

## 5. Závěry

V této práci ukazujeme, že RECQ5 zabraňuje vzniku genomové nestability v místech kolize mezi replikací a transkripcí. Navrhli jsme mechanismus pro řešení těchto kolizí, který předpokládá koordinovanou činnost RECQ5, BRCA1/RAD51 a RAD18 v místech kolize. Hlavní výsledky této studie je možno shrnout takto:

- RECQ5 interaguje s RNAPI a II.
- RECQ5 je obohacena na chromatinu v oblastech kódujících úseků RNAPI- a II-transkribovaných genů.
- RECQ5 zabraňuje transkripčnímu stresu v místech transkripce RNAPI a zajišťuje stabilitu DNA úseků kódujících pre-rRNA.
- Deplece RECQ5 vede k akumulaci replikačních intermediátů, které vznikly zastavením replikačních vidlic v oblastech transkribovaných RNAPI a RNAPII.
- RECQ5 asociuje s transkripčními komplexy v replikačních fokusech.
- BRCA1, RAD18, Rad51 jsou rekrutovány do míst kolize mezi replikací a transkripcí.
- Tvorba RAD51 filament v místech kolize pomocí BRCA1 je závislá na aktivní transkripci.
- RECQ5 indukuje ubikvitinaci PCNA pomocí RAD18 v místech kolize mezi replikací a transkripcí přímou interakcí s PCNA prostřednictvím svého PIP motivu.
- Pro rozřešení replikačních intermediátů stabilizovaných pomocí RAD51 v místech kolize mezi replikací a transkripcí je potřebná helikázová aktivita RECQ5.
- Transkripční komplex vytváří bariéru pro postup replikační vidlice a aktivní transkripce podporuje řešení kolizí mezi replikací a transkripcí.

## 6. Použitá literatura

- Aygun, O., Svejstrup, J., and Liu, Y. (2008). A RECQ5-RNA polymerase II association identified by targeted proteomic analysis of human chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 8580-8584.
- Aygun, O., Xu, X., Liu, Y., Takahashi, H., Kong, S.E., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Svejstrup, J.Q. (2009). Direct inhibition of RNA polymerase II transcription by RECQL5. *The Journal of biological chemistry* *284*, 23197-23203.
- Azvolinsky, A., Giresi, P.G., Lieb, J.D., and Zakian, V.A. (2009). Highly transcribed RNA polymerase II genes are impediments to replication fork progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell* *34*, 722-734.
- Barlow, J.H., Faryabi, R.B., Callen, E., Wong, N., Malhowski, A., Chen, H.T., Gutierrez-Cruz, G., Sun, H.W., McKinnon, P., Wright, G., *et al.* (2013). Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. *Cell* *152*, 620-632.
- Bermejo, R., Capra, T., Jossen, R., Colosio, A., Frattini, C., Carotenuto, W., Cocito, A., Doksani, Y., Klein, H., Gomez-Gonzalez, B., *et al.* (2011). The replication checkpoint protects fork stability by releasing transcribed genes from nuclear pores. *Cell* *146*, 233-246.
- Blundred, R., Myers, K., Helleday, T., Goldman, A.S., and Bryant, H.E. (2010). Human RECQL5 overcomes thymidine-induced replication stress. *DNA Repair (Amst)* *9*, 964-975.
- Boubakri, H., de Septenville, A.L., Viguera, E., and Michel, B. (2010). The helicases DinG, Rep and UvrD cooperate to promote replication across transcription units in vivo. *The EMBO journal* *29*, 145-157.
- Boyer, A.S., Walter, D., and Sorensen, C.S. (2016). DNA replication and cancer: From dysfunctional replication origin activities to therapeutic opportunities. *Seminars in cancer biology* *37-38*, 16-25.
- Brambati, A., Colosio, A., Zardoni, L., Galanti, L., and Liberi, G. (2015). Replication and transcription on a collision course: eukaryotic regulation mechanisms and implications for DNA stability. *Frontiers in genetics* *6*, 166.
- Debatisse, M., Le Tallec, B., Letessier, A., Dutrillaux, B., and Brison, O. (2012). Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends in genetics : TIG* *28*, 22-32.
- Durkin, S.G., and Glover, T.W. (2007). Chromosome fragile sites. *Annual review of genetics* *41*, 169-192.
- Elias-Arnanz, M., and Salas, M. (1999). Resolution of head-on collisions between the transcription machinery and bacteriophage phi29 DNA polymerase is dependent on RNA polymerase translocation. *The EMBO journal* *18*, 5675-5682.
- Felipe-Abrio, I., Lafuente-Barquero, J., Garcia-Rubio, M.L., and Aguilera, A. (2015). RNA polymerase II contributes to preventing transcription-mediated replication fork stalls. *The EMBO journal* *34*, 236-250.
- French, S. (1992). Consequences of replication fork movement through transcription units in vivo. *Science* *258*, 1362-1365.
- Helmrich, A., Ballarino, M., Nudler, E., and Tora, L. (2013). Transcription-replication encounters, consequences and genomic instability. *Nature structural & molecular biology* *20*, 412-418.
- Helmrich, A., Ballarino, M., and Tora, L. (2011). Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Molecular cell* *44*, 966-977.
- Helmrich, A., Stout-Weider, K., Hermann, K., Schrock, E., and Heiden, T. (2006). Common fragile sites are conserved features of human and mouse chromosomes and relate to large active genes. *Genome research* *16*, 1222-1230.
- Hu, Y., Raynard, S., Sehorn, M.G., Lu, X., Bussen, W., Zheng, L., Stark, J.M., Barnes, E.L., Chi, P., Janscak, P., *et al.* (2007). RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. *Genes & development* *21*, 3073-3084.
- Islam, M.N., Fox, D., 3rd, Guo, R., Enomoto, T., and Wang, W. (2010). RecQL5 promotes genome stabilization through two parallel mechanisms--interacting with RNA polymerase II and acting as a helicase. *Molecular and cellular biology* *30*, 2460-2472.
- Izumikawa, K., Yanagida, M., Hayano, T., Tachikawa, H., Komatsu, W., Shimamoto, A., Futami, K., Furuichi, Y., Shinkawa, T., Yamauchi, Y., *et al.* (2008). Association of human DNA

helicase RecQ5beta with RNA polymerase II and its possible role in transcription. *The Biochemical journal* *413*, 505-516.

Jones, R.M., Mortusewicz, O., Afzal, I., Lorvellec, M., Garcia, P., Helleday, T., and Petermann, E. (2013). Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie Cyclin E-induced replication stress. *Oncogene* *32*, 3744-3753.

Kanagaraj, R., Huehn, D., MacKellar, A., Menigatti, M., Zheng, L., Urban, V., Shevelev, I., Greenleaf, A.L., and Janscak, P. (2010). RECQ5 helicase associates with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II during productive elongation phase of transcription. *Nucleic acids research* *38*, 8131-8140.

Kanagaraj, R., Saydam, N., Garcia, P.L., Zheng, L., and Janscak, P. (2006). Human RECQ5beta helicase promotes strand exchange on synthetic DNA structures resembling a stalled replication fork. *Nucleic acids research* *34*, 5217-5231.

Kassube, S.A., Jinek, M., Fang, J., Tsutakawa, S., and Nogales, E. (2013). Structural mimicry in transcription regulation of human RNA polymerase II by the DNA helicase RECQL5. *Nature structural & molecular biology* *20*, 892-899.

Krum, S.A., Miranda, G.A., Lin, C., and Lane, T.F. (2003). BRCA1 associates with processive RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry* *278*, 52012-52020.

Li, M., Xu, X., and Liu, Y. (2011). The SET2-RPB1 interaction domain of human RECQ5 is important for transcription-associated genome stability. *Molecular and cellular biology* *31*, 2090-2099.

Losada, A. (2014). Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond. *Nature reviews. Cancer* *14*, 389-393.

Macheret, M., and Halazonetis, T.D. (2015). DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annual review of pathology* *10*, 425-448.

Merrikh, H., Machon, C., Grainger, W.H., Grossman, A.D., and Soutanas, P. (2011). Co-directional replication-transcription conflicts lead to replication restart. *Nature* *470*, 554-557.

Poveda, A.M., Le Clech, M., and Pasero, P. (2010). Transcription and replication: breaking the rules of the road causes genomic instability. *Transcription* *1*, 99-102.

Prado, F., and Aguilera, A. (2005). Impairment of replication fork progression mediates RNA polIII transcription-associated recombination. *The EMBO journal* *24*, 1267-1276.

Ribeyre, C., Zellweger, R., Chauvin, M., Bec, N., Larroque, C., Lopes, M., and Constantinou, A. (2016). Nascent DNA Proteomics Reveals a Chromatin Remodeler Required for Topoisomerase I Loading at Replication Forks. *Cell reports* *15*, 300-309.

Rocha, E.P. (2008). The organization of the bacterial genome. *Annual review of genetics* *42*, 211-233.

Sabouri, N., McDonald, K.R., Webb, C.J., Cristea, I.M., and Zakian, V.A. (2012). DNA replication through hard-to-replicate sites, including both highly transcribed RNA Pol II and Pol III genes, requires the *S. pombe* Pfh1 helicase. *Genes & development* *26*, 581-593.

Saponaro, M., Kantidakis, T., Mitter, R., Kelly, G.P., Heron, M., Williams, H., Soding, J., Stewart, A., and Svejstrup, J.Q. (2014). RECQL5 Controls Transcript Elongation and Suppresses Genome Instability Associated with Transcription Stress. *Cell* *157*, 1037-1049.

Schlacher, K., Wu, H., and Jasin, M. (2012). A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer cell* *22*, 106-116.

Toledo, L.I., Altmeyer, M., Rask, M.B., Lukas, C., Larsen, D.H., Povlsen, L.K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J., and Lukas, J. (2013). ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* *155*, 1088-1103.

Tuduri, S., Crabbe, L., Conti, C., Tourriere, H., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., Pantescio, V., De Vos, J., Thomas, A., Theillet, C., *et al.* (2009). Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nature cell biology* *11*, 1315-1324.

Urban, V., Dobrovolna, J., Huhn, D., Fryzelkova, J., Bartek, J., and Janscak, P. (2016). RECQ5 helicase promotes resolution of conflicts between replication and transcription in human cells. *The Journal of cell biology* *214*, 401-415.

Wind, M., and Reines, D. (2000). Transcription elongation factor SII. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* *22*, 327-336.

Yu, C., Gan, H., Han, J., Zhou, Z.X., Jia, S., Chabes, A., Farrugia, G., Ordog, T., and Zhang, Z. (2014). Strand-specific analysis shows protein binding at replication forks and PCNA unloading from lagging strands when forks stall. *Molecular cell* *56*, 551-563.

Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J.A., Herrador, R., Vindigni, A., and Lopes, M. (2015). Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *The Journal of cell biology* *208*, 563-579.

Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature cell biology* *16*, 2-9.

Zhang, C., Lu, J., and Zhang, P. (2016). The Roles of Chromatin Remodeling Proteins in Cancer. *Current protein & peptide science* *17*, 446-454.

## **Životopis**

### **Pracovní zkušenosti**

- 2008-nyní Doktorand na Oddělení genomové integrity, Ústav molekulární genetiky, Akademie věd ČR, vedoucí: Prof. MUDr. Jiří Bártek, DrSc
- 2010, 2011 Zahraniční pracovní stáže (1-2 měsíce každá) v laboratoři vedené Kristijanem Ramadanem nebo Pavlem Janščákem na Univerzitě v Curychu, Švýcarsko
- 2004-2008 Student a vědecký pracovník na Ústavu biochemie a mikrobiologie (Laboratoř metalomiky a bioremediací těžkých kovů), Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, ČR, vedoucí: doc. Ing. Pavel Kotrba, Ph.D.

### **Vzdělání**

- 2008-nyní Doktorské studium na katedře Molekulární a buněčné biologie, genetiky a virologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, ČR  
Dizertační práce: Úloha RECQ5 helicázy při udržování stability genomu, školitel: RNDr. Pavel Janščák, CSc.
- 2003-2008 Magisterské studium ve studijním oboru Obecná a aplikovaná biochemie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, ČR  
Diplomová práce: Intracelulární ligandy stříbra v plodnicích ektomykorrhizní houby *Amanita strobiliformis*, školitel: doc. Ing. Pavel Kotrba, Ph.D.

### **Aktivity související s doktorským studiem:**

Přednáška: Human RECQ5 DNA helicase promotes resolution of conflicts between transcription and replication complexes in ribosomal DNA arrays; The 8th 3R Symposium (2012), Japonsko

Přednáška: RECQ5 helicase promotes resolution of conflicts between transcription and replication complexes; RNA club 2015 (2015), ČR (ocenění, 2. místo za nejlepší přednášku)

## *Seznam publikací*

### 1. Publikace, které jsou podkladem práce

**RECQ5 helicase promotes resolution of conflicts between replication and transcription in human cells.**

Urban V, Dobrovolna J, Hühn D, Fryzelkova J, Bartek J, Janscak P.

J Cell Biol. 2016 Aug 15;214(4):401-15. IF: 8.7 (2015)

**RecQ-core of BLM unfolds telomeric G-quadruplex in the absence of ATP.**

Budhathoki JB, Ray S, Urban V, Janscak P, Yodh JG, Balci H.

Nucleic Acids Res. 2014 Oct;42(18):11528-45. IF: 9.2 (2015)

**RECQ5 helicase associates with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II during productive elongation phase of transcription.**

Kanagaraj R, Huehn D, MacKellar A, Menigatti M, Zheng L, Urban V, Shevelev I, Greenleaf AL, Janscak P.

Nucleic Acids Res. 2010 Dec;38(22):8131-40. IF: 9.2 (2015)

**Distinct functions of human RecQ helicases during DNA replication.**

Urban V, Dobrovolna J, Janscak P.

Předloženo v Biophysical Chemistry.

### 2. Publikace bez vztahu k tématu disertace

**Three metallothionein isoforms and sequestration of intracellular silver in the hyperaccumulator *Amanita strobiliformis*.**

Osobová M, Urban V, Jedelský PL, Borovička J, Gryndler M, Ruml T, Kotrba P.

New Phytol. 2011 Jun;190(4):916-26. IF: 7.2 (2015)

