

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně citovat.

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie (N1501)  
Studijní obor: NGEMOVI (1515T010)



**Bc. Jana Fryzelková**

**Úloha helikázy RECQ5 při stabilizaci a opravě replikačních vidlic po  
jejich kolizi s transkripčním komplexem**

Role of human RECQ5 helicase in the resolution of conflicts between transcription and  
replication complexes

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce:  
RNDr. Jana Dobrovolná, Ph.D.

Praha, 2017

**Prohlášení:**

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

V Praze, 2. 5. 2017

## **Poděkování**

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce Janě Dobrovolné za její nekonečnou trpělivost, cenné rady a doporučení při psaní práce, a také Václavu Urbanovi za vedení praktické části. Dále bych ráda poděkovala své rodině, především pak své sestře a jejímu příteli, za velkou podporu. Je na místě poděkovat také doktoru Čápovi a doktorce Schierové za jejich ochotu a pomoc. Nakonec je potřeba zmínit mé kamarádky a kamarády (především Sandru, Anetu, Petra a Standu), kolegy a kolegyně z laboratoře i ze zaměstnání a konečně kolegy mé sestry z ateliéru Mimosa, kteří mi poskytli zázemí při psaní.

V Praze, 2. 5. 2017

## **Abstrakt**

V průběhu replikace může docházet působením různých vnějších a vnitřních faktorů ke zpomalení či zastavení replikačních vidlic. Tento stav je označován jako replikační stres, který je velmi významným zdrojem genomové nestability pozorované v rakovinných buňkách. Jedním z endogenních faktorů, který představuje pro replikační komplex překážku, je transkripční aparát. Především za podmínek zvýšeného replikačního stresu jsou replikační vidlice postupující transkripčně aktivními oblastmi genomu zpomaleny nebo zastaveny, což vede k následnému kolapsu těchto vidlic spojeném s tvorbou dvouvláknových zlomů DNA. Na zachování genomové stability právě při působení replikačního stresu se významně podílí DNA helikáza RECQ5, avšak mechanismy jejího působení nejsou jasné. Tato práce ukázala, že se helikáza RECQ5 účastní řešení kolizí mezi replikačním a transkripčním komplexem v součinnosti s proteinem BRCA1. Protein BRCA1 je klíčovým faktorem procesu homologní rekombinace, jenž je nezbytný pro restart zastavených replikačních vidlic. Dále bylo ukázáno, že se helikáza RECQ5 podílí na ubiquitinaci proteinu PCNA u zastavených replikačních vidlic.

## **Klíčová slova**

DNA helikáza RECQ5, replikační stres, kolize replikačního a transkripčního komplexu, protein BRCA1, ubiquitinace PCNA, restart replikace

## **Abstract**

The progression of replication forks can be slowed down or paused by various external and internal factors during DNA replication. This phenomenon is referred to as replication stress and substantially contributes to genomic instability that is a hallmark of cancer. Transcription complex belongs to the internal replication-interfering factors and represents a barrier for progression of the replication complex. The replication forks are slowed down or paused while passing through the transcriptionally active regions of the genome that can lead to subsequent collapse of stalled forks and formation of DNA double-strand breaks, especially under conditions of increased replication stress. DNA helicase RECQ5 is significantly involved in maintenance of genomic stability during replication stress, but the mechanisms of its action are not clear. In this diploma theses, we have shown that RECQ5 helicase, in collaboration with BRCA1 protein, participates in the resolution of collisions between replication and transcription complexes. BRCA1 protein is a key factor in the homologous recombination process, which is essential for the restart of stalled replication forks. Furthermore, we have shown that RECQ5 helicase is involved in ubiquitination of PCNA protein at stalled replication forks.

## **Key words**

DNA helicase RECQ5, replication stress, collision between replication and transcription complexes, BRCA1, ubiquitination of PCNA, replication restart

# OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>7</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>2. PŘEHLED LITERATURY</b> .....	<b>12</b>
2.1 Replikace .....	12
2.1.1 Replikace u bakterií a eukaryot.....	12
2.1.2 Replikační stres .....	17
2.2 Kolize replikačního aparátu s transkripčním komplexem .....	18
2.2.1 Příčiny a prevence kolize komplexů .....	18
2.2.2 Důsledky kolize komplexů.....	23
2.2.3 Mechanismy oprav kolizí komplexů a obnovení replikace .....	26
2.3 Helikáza RECQ5 .....	30
2.3.1 Charakteristika helikázy RECQ5 .....	30
2.3.2 Funkce a význam helikázy RECQ5 .....	32
2.4 Protein BRCA1 .....	35
2.4.1 Charakteristika proteinu BRCA1 .....	35
2.4.2 Role proteinu BRCA1 v opravě replikačních vidlic .....	36
<b>3. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>38</b>
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>39</b>
4.1 Materiál.....	39
4.1.1 Buněčné linie a kultivační média .....	39
4.1.2 Chemikálie a komerční roztoky .....	40
4.1.3 Použité pufrы a roztoky a složení gelů pro PAGE .....	41
4.1.4 Protilátky.....	43
4.1.5 siRNA a plazmidy.....	44
4.2 Metody.....	45
4.2.1 Kultivace buněčných kultur .....	45
4.2.2 Ozařování buněk a ovlivnění buněčných kultur chemikáliemi.....	45
4.2.3 RNA interference – transfekce buněk siRNA.....	46

4.2.4 Transfekce buněk plazmidem .....	46
4.2.5 Nepřímé imunofluorescenční značení proteinů a určení fáze buněčného cyklu...	47
4.2.6 Fluorescenční mikroskopie a kvantifikace proteinových fokusů v jádrech .....	49
4.2.7 Příprava celkového buněčného lyzátu, izolace chromatinové frakce a měření koncentrace proteinů .....	51
4.2.8 SDS-PAGE.....	53
4.2.9 Imunoblot a jeho obrazová analýza .....	53
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>55</b>
5.1 Snížení exprese genů RECQ5 a BRCA1 pomocí RNA interference .....	55
5.2 Vliv helikázy RECQ5 na funkci proteinů podílejících se na opravě poškozené DNA	57
5.3 Vliv snížené exprese RECQ5 a inhibice transkripce na formování BRCA1 fokusů...	65
5.4 Vliv snížené exprese RECQ5 a inhibice transkripce na ubiquitinaci PCNA .....	68
5.5 Vliv zvýšené exprese RECQ5 na ubiquitinaci PCNA.....	73
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>76</b>
<b>7. SOUHRN .....</b>	<b>83</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>84</b>

## SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Anglický název	Český název
53BP1	<i>p53-binding protein 1</i>	vazebný protein p53
A	<i>adenine</i>	adenin
AA/Bis	<i>acrylamide/bis-acrylamide</i>	směs akrylamidu a N,N'-metylen bisakrylamidu
ADD	<i>sodium ascorbate</i>	askorbát sodný
AK	–	aminokyselina
APS	<i>ammonium peroxodisulfate</i>	persíran amonný
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>	adenosintrifosfát
BLM	<i>Bloom syndrome helicase</i>	helikáza BLM
BRCA1	<i>breast cancer type 1 susceptibility protein</i>	–
BRCA2	<i>breast cancer type 2 susceptibility protein</i>	–
BRTC	<i>BRCA1-C-terminal domain</i>	C-koncová doména BRCA1
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	hovězí sérový albumin
C	<i>cytosine</i>	cytosin
Cdc6	<i>cell division control protein 6</i>	–
Cord.	<i>cordycepin (3'-deoxyadenosine)</i>	cordycepin
CpG	<i>cytosine-phosphate-guanine</i>	cytosin-fosfát-guanin
CTD	<i>C-terminal domain</i>	C-koncová doména
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>	4',6-diamidin-2-fenylindol
DinG	<i>damage inducible gene G</i>	helikáza DinG
D-MEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	médium D-MEM
dNTP	<i>deoxynucleotide triphosphate</i>	deoxyribonukleotid
DTT	<i>dithiothreitol</i>	dithiotreitol
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	kyselina etylen-diamin-tetraoctová
EdU	<i>5-ethyl-2'-deoxyuridine</i>	5-etyl-2'-deoxyuridin
EGTA	<i>ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>	kyselina etylen-glykol-tetraoctová
esiRNA	<i>endoribonuclease-prepared siRNAs</i>	směs siRNA

<b>Zkratka</b>	<b>Anglický název</b>	<b>Český název</b>
FEN1	<i>flap endonuclease 1</i>	endonukleáza FEN1
G	<i>guanine</i>	guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	zelený fluorescenční protein
HEK293	<i>human embryonic kidney 293 cells</i>	buněčná linie odvozena z lidských embryonálních buněk ledvin
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>	kyselina 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetan-sulfonová
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>	křenová peroxidáza
HU	<i>hydroxyurea</i>	hydroxyurea
IR	<i>irradiation</i>	iradiace, ozáření
kb	<i>kilobase</i>	tisíc bází
Mb	<i>megabase</i>	milion bází
MCM2-7	<i>minichromosome maintenance protein complex</i>	–
MRE11	<i>meiotic recombination 11</i>	–
MRN	<i>MRE11-RAD50-NBS1 complex</i>	komplex proteinů MRE11, RAD50 a NBS1
mRNA	<i>messenger RNA</i>	–
N	–	neovlivněné
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>	nehomologní spojení konců DNA
nt	<i>nucleotide</i>	nukleotid
ORC	<i>origin recognition complex</i>	komplex rozpoznávající replikační počátky
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	fosfátový pufr
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>	eukaryotní svorkový protein
Pol III	<i>DNA polymerase III</i>	prokaryotická DNA polymeráza III
Pol $\alpha$ / primáza	<i>DNA polymerase <math>\alpha</math>/primase</i>	DNA polymeráza $\alpha$ -primáza
Pol $\delta$	<i>DNA polymerase <math>\delta</math></i>	eukaryotická DNA polymeráza $\delta$
Pol $\epsilon$	<i>DNA polymerase <math>\epsilon</math></i>	eukaryotická DNA polymeráza $\epsilon$
pre-mRNA	<i>precursor m-RNA</i>	prekurzorová mRNA
PVDF	<i>polyvinylidene fluoride</i>	polyvinylidenfluorid
rDNA	<i>ribosomal DNA</i>	ribozomální DNA, DNA kódující ribozomální RNA

<b>Zkratka</b>	<b>Anglický název</b>	<b>Český název</b>
RFC	<i>replication factor C</i>	replikační faktor C
RING	<i>really interesting new gene</i>	–
RPA	<i>replication protein A</i>	replikační protein A
RQCD	<i>RecQ C-terminal domain</i>	C-terminální doména RecQ helikáz
rRNA	<i>ribosomal RNA</i>	ribozomální RNA
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným
siBRCA1	–	siRNA cílená na mRNA kódující protein BRCA1
siKont.	–	kontrolní siRNA
siRECQ5	–	siRNA cílená na mRNA kódující protein RECQ5
siRNA	<i>short interfering RNA</i>	krátká interferující RNA
SQCD	<i>SQ cluster domain</i>	–
SRI	<i>Set2-Rpb1-interacting motif</i>	–
SSB	<i>single-strand binding protein</i>	–
ssDNA	<i>single-strand DNA</i>	jednovláknová DNA
T	<i>thymine</i>	tymin
TAR	<i>transcription-associated recombination</i>	rekombinace spojená s transkripcí
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>	–
TEMED	<i>tetramethylethylenediamine</i>	tetrametylendiamin
TOP1	<i>topoisomerase I</i>	topoizomeráza 1
Tris	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>	tris(hydroxymetyl)aminometan
tRNA	<i>transfer RNA</i>	trasferová RNA
U2OS	<i>human osteosarcoma cell line</i>	buněčná linie odvozená z buněk lidského osteosarkomu
ubiPCNA	<i>ubiquitinated PCNA</i>	ubiquitinovaný protein PCNA
WRN	<i>Werner syndrome helicase</i>	helikáza WRN

# 1. ÚVOD

Replikace a transkripce patří k nejprozkoumanějším procesům v prokaryotických i eukaryotických buňkách. Jedná se o základní děje zajišťující zdvojení a přepis genetické informace. S prohlubujícími se znalostmi však vyvstala celá řada nových otázek, jež je potřeba zodpovědět. V případě eukaryotických buněk je nezbytné prozkoumat například kontrolní mechanismy zamezující vzniku chyb při replikaci a transkripci či epigenetické a chromatinové regulace. Průběh replikace a transkripce může být narušen působením celé řady vnitřních i vnějších činitelů, k čemuž významnou měrou přispívají i kolize mezi replikačními a transkripčními komplexy. Některé geny eukaryotických buněk jsou natolik dlouhé, že jejich transkripce trvá déle, než je délka jednoho buněčného cyklu. U těchto genů tedy nutně musí dojít ke střetu transkripce s replikací během S-fáze, kdy multiproteinové komplexy zajišťující proces replikace a transkripce pro sebe vzájemně představují překážku a blokují svůj postup. Aby v takovém úseku mohla být dokončena replikace DNA (a tím zachována integrita genomu) a zároveň aby bylo umožněno dokončit transkripci extrémně dlouhých genů, byly v eukaryotických buňkách vyvinuty dosud nezcela jasné mechanismy rozřešení těchto kolizí (zahrnující např. dočasné změny ve struktuře replikačního komplexu) a mechanismy obnovení (restartu) procesu replikace a transkripce.

Výchozími daty pro tuto diplomovou práci byly výsledky experimentů, podle kterých helikáza RECQ5 asociuje s transkripčním komplexem v místech, kde probíhá replikace. Již dříve bylo navíc ukázáno, že při depleci helikázy RECQ5 v buňkách dochází v průběhu replikace k výraznému nárůstu vzniku dvouřetězcových zlomů DNA, jejichž tvorba je závislá na transkripci. Cílem diplomové práce bylo zkoumat úlohu helikázy RECQ5 v řešení kolizí mezi replikačním a transkripčním komplexem a zjistit, jaké další proteiny kooperují s helikázou RECQ5 na řešení těchto kolizí nebo jsou zapojeny do stabilizace a opravy takto zastavených replikačních vidlic. V rámci této práce jsme se zaměřili na proteiny BRCA1 a 53BP1, které jsou zapojeny v rozdílných mechanismech reparace dvouvláknových zlomů DNA, které mohou být v důsledku zastavené replikace produkovány. Protein BRCA1 je klíčovým faktorem procesu homologní rekombinace, která je díky své potenciální bezchybnosti preferovaným způsobem opravy zastavené replikace. V nedávné době bylo také ukázáno, že BRCA1 hraje vedle stabilizace replikačních vidlic důležitou roli i při jejich

restartu. Dvouřetězcové zlomy DNA mohou být opraveny rovněž pomocí mechanismu nehomologního spojení konců DNA, do kterého je zapojen protein 53BP1. Chtěli jsme zjistit, zda se proteiny 53BP1 a BRCA1 spolupodílí na řešení kolizí replikačního a transkripčního komplexu. Tato práce ukázala, že na rozdíl od proteinu 53BP1 je protein BRCA1 společně s proteinem RECQ5 zahrnut v mechanismu řešení kolizí replikačního a transkripčního komplexu. A další experimenty odhalily vliv proteinů RECQ5 a BRCA1 na proteiny zastaveného replikačního aparátu, respektive na posttranslační modifikaci proteinu PCNA, svorkového proteinu udržujícího DNA polymerázu na DNA, a jeho uvolnění z replikačních vidlic. Data získaná v této diplomové práci dala impuls k řadě detailnějších experimentů, které vedly k navržení modelového mechanismu, jakým by transkripční komplex mohl překonat proti němu postupující komplex replikační.

## 2. PŘEHLED LITERATURY

### 2.1 Replikace

Replikace patří mezi děje nezbytné pro přežití, růst a množení organismů, tedy mezi děje, na nichž je založen veškerý život. Náležitě zdvojení genetické informace uložené v buňce v podobě DNA představuje základní předpoklad pro správné fungování procesů v následující generaci buněk, jako i vývin nadbuněčných struktur. Vedle mechanismů zajišťujících vlastní kopírování DNA proto existují regulační kaskády a opravné procesy, jejichž složitost narůstá s komplexností organismu. Primární mechanismy semi-konzervativní replikace (nově vznikající molekula DNA je tvořena jedním vláknem původní molekuly DNA a podle něj nově syntetizovaným druhým vláknem) jsou však zachovány napříč všemi skupinami organismů – u eukaryot, bakterií i archea.

Návazné kontrolní mechanismy replikace musí zajistit, aby informace uložená ve formě chromozomů byla duplikována právě jednou. U eukaryot musí dále dojít k syntéze asociovaných proteinů s danými chemickými modifikacemi, musí být obnovena chromatinová struktura a následně až v průběhu mitózy jsou chromozomy rovnoměrně rozděleny do nově vznikajících buněk. I přes přísné regulační mechanismy mohou v průběhu replikace vznikat chyby, jejichž frekvence stoupá při narušení některého z klíčových kontrolních či reparativních procesů. Mutace DNA se pak v organismu hromadí a mohou vést ke vzniku genomové nestability s následným rozvojem rakoviny a dalších závažných defektů (Donnell *et al.* 2013).

#### 2.1.1 Replikace u bakterií a eukaryot

Přes značnou podobnost procesu zahájení replikace existuje mezi buňkami bakterií a eukaryot celá řada rozdílů odpovídajících rozdílům ve velikosti a struktuře jejich genomu. Hlavní rozdíl představuje časové a prostorové vymezení replikace – zatímco u bezjaderných bakterií probíhá replikace v cytoplasmě a není spojena se specifickou fází buněčného cyklu a ani nezbytně s buněčným dělením, tak u eukaryot probíhá replikace v jádře a je omezena na S-fázi buněčného cyklu (Kaguni 2011; Stillman 2005).

Bakteriální chromozomální genom je obvykle reprezentován jednou kruhovou molekulou DNA (v buňce jsou dále přítomny také plazmidové DNA), která je kopírována z jednoho replikačního počátku v obou směrech molekuly DNA. Replikační počátky jsou u bakterií již většinou definovány, jedná se o konzervované sekvence DNA, na které nasedají příslušné proteiny (Kaguni 2011). Naproti tomu u vyšších eukaryot je genetická informace uložena ve formě lineárních chromozomů, které jsou replikovány pomocí více replikačních aparátů a tím je proces replikace urychlen. Na každém chromozomu je založeno mnoho potenciálních replikačních počátků, z nichž jen některé jsou aktivovány v průběhu replikace a ostatní jsou dormantní (neaktivní). Avšak například za podmínek replikačního stresu mohou být některé dormantní replikační počátky aktivovány, aby pomohly replikaci DNA dokončit. S výjimkou některých nižších jednobuněčných eukaryot, například *Saccharomyces cerevisiae*, kde jsou replikační počátky dobře zmapované a definuje je sekvence DNA, jsou eukaryotické replikační počátky spíše než na sekvenci DNA závislé na chromatinové organizaci a přístupnosti DNA pro vazbu příslušných proteinů (Donnell *et al.* 2013; Masai *et al.* 2010; Stillman 2005).

Aktivaci počátku replikace zajišťuje sada proteinů rozpoznávající počátky a podmiňující vazbu dalších proteinů, které pak provádějí samotnou replikaci. Jedná se o poměrně velké množství proteinů, jejichž počet obvykle narůstá s komplexností organismu, s danou specificitou vazby a také specifickou rolí. Část z těchto proteinů ke své funkci potřebuje energii ve formě adenosin trifosfátu (ATP), disponují tedy ATPázovou aktivitou (Donnell *et al.* 2013). Tato práce se nebude dopodrobna zabývat všemi proteiny, nicméně budou zmíněny především ty, které jsou pro další experimentální část důležité.

V případě bakterií dochází nejprve k vazbě několika proteinů DnaA (u modelového organismu *Escherichia coli*) na replikační počátek, ty rozvolňují DNA a výsledkem jsou jednovláknové DNA (*single-strand* DNA, ssDNA). Na každé ze dvou ssDNA se pak může vázat DNA helikáza DnaB (u *E. coli*) rozvolňující DNA, a to každá v opačném směru od replikačního počátku. To umožňuje vznik dvou replikačních vidlic pohybujících se v opačném směru od počátku. Na těchto vidlicích probíhá syntéza DNA kontinuálně na vedoucím a přerušovaně na opožděujícím se vlákně. Helikáza rozvolňuje DNA ve směru 5'-3' a je usazena na opožděujícím se vlákně. Na vazbě helikázy do místa počátku replikace se podílí ještě další pomocné proteiny. Topoizomeráza přispívá k uvolnění pnutí na DNA u prot sobě

postupujících vidlic a také k uvolnění vzájemně propojených vláken DNA při terminaci replikace (Enemark *et* Joshua-Tor 2008; Kaguni 2011).

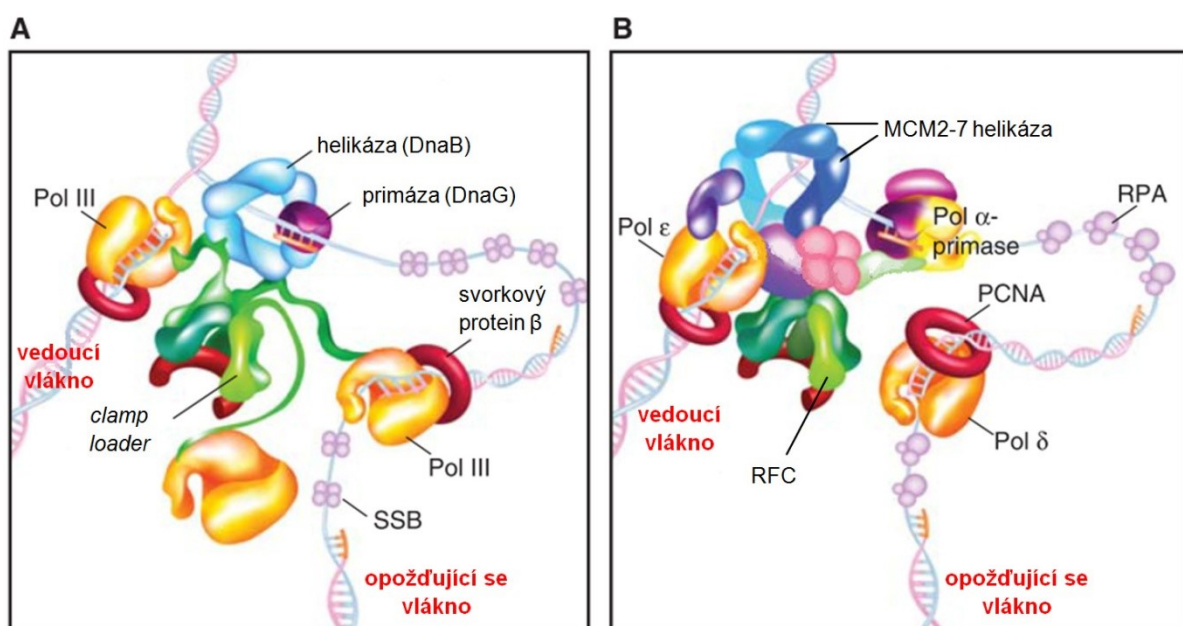
U eukaryot jsou replikační počátky rozpoznávány proteinovými komplexy ORC (*origin recognition complex*), které se v G1 fázi buněčného cyklu váží na DNA replikačního počátku, ale dvoušroubovici nerozvolňují. ORC komplex (jehož součástí je i protein Cdc6) umožňuje vazbu proteinového komplexu MCM2-7 (*minichromosome maintenance protein complex*) s helikázovou aktivitou. Komplex MCM2-7 na DNA nasedá ve dvou kopiích (replikační vidlice v obou směrech od počátku), k jejichž vazbě a aktivaci je potřeba dalších proteinů. MCM2-7 helikáza pak rozvolňuje DNA ve směru 3'-5' a je usazena na vedoucím vlákně. Topoizomeráza uvolňuje pnutí na DNA při práci helikázy (Enemark *et* Joshua-Tor 2008; Stillman 2005).

Vazba helikázy a její aktivace představuje u eukaryot i bakterií jeden z hlavních kontrolních bodů replikace. Stejně tak jako následující proces tvorby primeru. Tyto děje jsou regulovány celou řadou procesů tak, aby k nim docházelo za adekvátních podmínek. U eukaryot je také kontrolováno (spojením cyklin dependentních a dalších kináz s mnohými proteiny), aby k vazbě a aktivaci helikáz a tvorbě primerů docházelo pouze v dané fázi buněčného cyklu – přechod do S fáze. U eukaryot jsou navíc vyvinuty mechanismy, které zabraňují tomu, aby byl některý úsek DNA replikován více než jednou v průběhu jednoho buněčného cyklu (Donnell *et al.* 2013).

Potom, co helikáza začne rozvolňovat DNA a uvolní se ssDNA, přichází na řadu syntéza krátkého primeru pomocí DNA-dependentní RNA polymerázy, primázy. U bakterií i eukaryot tato syntéza začíná na vedoucím vlákně a zřejmě až posléze na opoždujícím se vlákně, kde však probíhá opakovaně. Bakterie využívají primázu DnaG (u *E. coli*), která se přechodně váže na DnaB proteiny v místě počátku a syntetizuje cca 12 nukleotidů (dále nt) dlouhý úsek RNA. U eukaryot tvorbu primeru zastává komplex DNA polymeráza  $\alpha$ -primáza (dále Pol  $\alpha$ / primáza), jehož vazba vyžaduje pravděpodobně další proteiny. Pol  $\alpha$ / primáza syntetizuje úsek RNA o velikosti cca 12 nt RNA a poté krátký úsek DNA, vzniká tak RNA:DNA hybrid (Donnell *et al.* 2013; Frick *et* Richardson 2001).

Primery slouží jako základ pro syntézu DNA prostřednictvím DNA polymerázy. Bakterie (*E. coli*) využívají stejný typ polymerázy, DNA polymeráza III (dále Pol III), na vedoucím i opoždujícím se vlákně. Bakteriální replikační aparát je organizován pomocí tzv.

*clamp loader* komplexu se třemi shodnými podjednotkami, kdy každá z nich váže jednu Pol III. *Clamp loader* zajišťuje navázání svorkového proteinu  $\beta$ , jenž je podjednotkou Pol III, na DNA na syntetizované primery. Čehož je opakovaně využíváno při syntéze jednotlivých Okazakiho fragmentů na opoždujícím se vlákně, kde je potřeba znovunavázání Pol III. Na replikaci se navíc podílí tzv. *single-strand binding* proteiny (dále SSB), které se váží na helikázou uvolněné ssDNA vlákno (u opoždujícího se řetězce), chrání jej a umožňují uvolnění primázy. *Clamp loader* také interaguje s helikázou, drží tedy replikační aparát (viz obr. 1) pohromadě a ten je tak velmi procesivní.



**Obr. 2.1: Organizace replikačního aparátu:** (A) *E. coli*, *clamp loader* interaguje se třemi Pol III, svorkovými proteiny  $\beta$  a helikázou, dále primáza a SSB proteiny; (B) eukaryota, polymerázy jsou na DNA udržovány díky PCNA, jehož vazbu zajišťuje RFC, dále komplex helikázy MCM2-7, RPA a Pol  $\alpha$ / primáza (převzato a upraveno dle Donnell *et al.* 2013).

V případě eukaryot jsou využívány DNA polymeráza  $\epsilon$  (dále Pol  $\epsilon$ ) pro vedoucí vlákno a DNA polymeráza  $\delta$  (dále Pol  $\delta$ ) pro opoždující se vlákno. Funkci svorkového proteinu zde plní protein *proliferating cell nuclear antigen* (dále PCNA, analog podjednotky  $\beta$  u bakterií), který je na místo syntetizovaných primerů navázán pomocí replikačního faktoru C (RFC). Proteiny PCNA jsou vázány na obě vlákna a interagují jak s Pol  $\epsilon$ , tak s Pol  $\delta$ . Obdobně jako u bakterií je vlákno ssDNA chráněno proteiny, *replication protein A* (RPA), které navíc

zajišťují uvolňování Pol  $\alpha$ / primázy při syntéze Okazakiho fragmentů. Replikační aparát eukaryot je držen pohromadě pravděpodobně díky vzájemným proteinovým interakcím a dalším pomocným proteinům (viz obr. 1) (Donnell *et al.* 2013; Johnson *et O'Donnell* 2005).

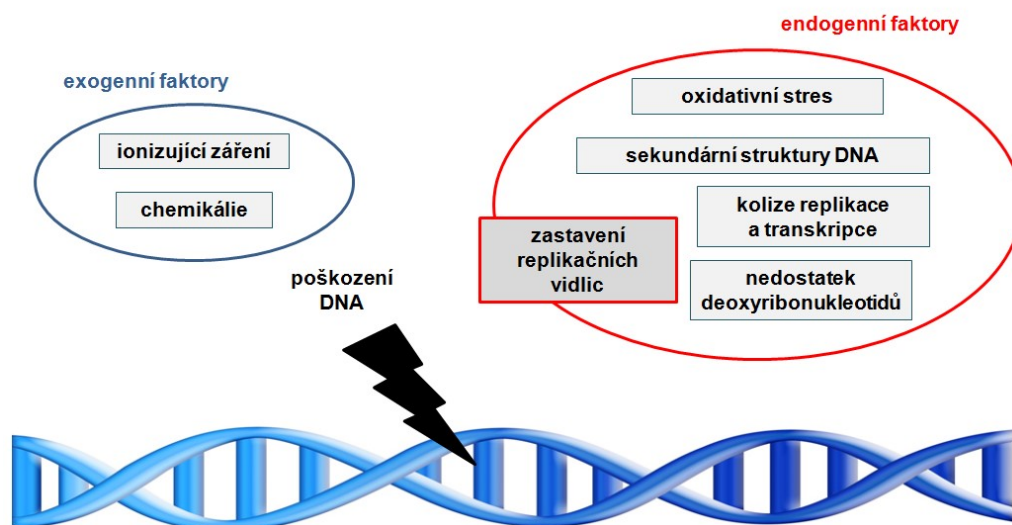
Pro odbourání RNA primerů na opožděujícím se řetězci využívají prokaryota DNA polymerázu I, která následuje Pol III, odbourává RNA primery a syntetizuje místo nich DNA řetězec. Jednotlivé Okazakiho DNA fragmenty jsou pak na závěr spojeny DNA ligázou (Balakrishnan *et Bambara* 2013). Replikace u prokaryot probíhá z jednoho místa a replikační vidlice postupují po DNA v obou směrech až do ukončení replikace. K terminaci replikace dochází u prokaryot na specifických sekvencích označovaných jako terminátory replikace (kde se střetávají replikační aparáty). S těmito terminátory asociuje tzv. Tus-protein, jenž zastavuje procesování helikázy DnaB a replikačních komplexů (Neylon *et al.* 2005).

Do odstranění krátkých RNA primeru na opožděujícím se vlákně jaderných lineárních chromozomů v eukaryotických buňkách je zapojena jak Pol  $\delta$ , tak endonukleáza FEN1 (*Flap Endonuclease 1*). Pol  $\delta$ , replikující opožděující se vlákno, na vlákně DNA postupuje v syntéze, dokud se nestřetne s RNA primerem následného Okazakiho fragmentu. Pol  $\delta$  je schopna vytlačit tyto RNA primery (tvoří tak jednovláknový 5'-přesah, *flap*) a naradit je deoxyribonukleotidy. Degradace RNA primerů je pak dokončena endonukleázou FEN1 a případně i nukleázou Dna2. Úseky nově nasyntetizované DNA jsou pak spojeny pomocí DNA ligázy I (Balakrishnan *et Bambara* 2013). Replikace jaderných, lineárních chromozomů je u eukaryot ukončena několika možnými mechanismy. Jednak může procesující replikační aparát dospět na DNA k místu, kde probíhá další replikace, jednak může dojít k terminaci procesování replikačního aparátu v důsledku modulace proteiny operujícími na DNA. Replikace konců lineárních chromozomů, tzv. telomer, je pak pomocí specializovaných mechanismů organizována tak, aby nedocházelo ke zkracování chromozomů o nezbytné genové sekvence (Dalgaard *et al.* 2009).

## 2.1.2 Replikační stres

Proces replikace je často narušen působením faktorů endogenního i exogenního původu, jež mohou ovlivnit stabilitu replikačního aparátu, jeho procesivitu a progresi. Stav, kdy dochází ke zpomalení nebo zastavení replikačních vidlic a případně k disociaci replikačního aparátu, je označován jako replikační stres. Buňky disponují mechanismy, které umožňují prevenci vzniku vážného poškození DNA spojeného s replikací nebo dokáží takové poškození opravit, a tak zabraňují narušení genomové integrity. V případě poškození DNA a zastavení replikace jsou v buňkách vedle opravných mechanismů spuštěny i signální dráhy vedoucí k pozastavení buněčného cyklu a zablokování aktivace dalších replikačních počátku. Procesy musí být koordinovány tak, aby měla buňka dostatek času na opravu chyb (Mazouzi *et al.* 2014).

Mezi exogenní stresové faktory patří například ionizující záření či působení chemikálií. Replikační stres endogenního charakteru je způsoben například vznikem sekundárních struktur na DNA (na místech obsahujících repetice), *misinkorporací* ribonukleotidů nebo nedostatkem deoxyribonukleotidů (dNTP) pro syntézu nových řetězců. (Mazouzi *et al.* 2014). Významným endogenním zdrojem poškození DNA je také proces transkripce. Transkripční komplex představuje pro replikační aparát bariéru, která brání jeho postupu a způsobuje jeho zastavení a případně i kolaps (Helmrich *et al.* 2006; Lin *et Pasero* 2012).



**Obr. 2.2: Replikační stres:** zjednodušené schéma ukazující faktory endogenního a exogenního původu, které mohou narušit průběh replikace.

Bylo zjištěno, že některá místa lidského genomu jsou svým charakterem pro replikaci problematická a jsou náchylná k negativnímu působení replikačního stresu. Jedná se o tzv. běžná fragilní místa (*common fragile sites*, Helmrich *et al.* 2006) nebo časně replikující fragilní místa (*early-replicating fragile sites*, Barlow *et al.* 2013). Tyto oblasti genomu jsou za podmínek replikačního stresu vysoce náchylné ke zlomům a delecím DNA. V řadě nádorů jsou nalezeny chromozomální zlomy a přestavby v těchto oblastech. Podrobný popis běžných a časně replikujících fragilních míst je uveden v kapitole 2.2.2 Důsledky kolize komplexů.

## **2.2 Kolize replikačního aparátu s transkripčním komplexem**

Replikace představuje pro buňky náročnou fázi buněčného cyklu, během které je genom nejvíce náchylný ke vzniku chyb, a to i za normálních růstových podmínek. Bylo ukázáno, že jedním z faktorů podílejících se na vzniku genomové nestability v průběhu replikace je probíhající transkripce (Helmrich *et al.* 2011; Wilson *et al.* 2014), která je závislá na stejné předloze, tedy molekule DNA. Přestože buňky v průběhu evoluce vyvinuly mechanismy, které omezují střet replikačního komplexu s transkripčním aparátem na stejném úseku DNA, střetům těchto komplexů se v některých případech nelze vyhnout. Příkladem mohou být dlouhé geny (větší než 800 kb), jejichž transkripce trvá déle než jeden buněčný cyklus, a tedy i v průběhu replikace. Dále geny, jejichž produkty jsou vyžadovány pro výstavbu chromatinu nově vzniklé DNA či pro zajištění chodu buňky (např. ribozomální DNA, DNA kódující ribozomální RNA, rDNA) (Helmrich *et al.* 2013; Lin *et al.* 2012). Cílem této kapitoly je popsat příčiny a důsledky kolize replikačního a transkripčního komplexu a mechanismy, které se kolizím snaží zabránit či opravit a znovuzahájit oba procesy bez generování dalších chyb.

### **2.2.1 Příčiny a prevence kolize komplexů**

K interferenci mezi replikací a transkripcí dochází jak u prokaryot, tak i u eukaryot. Mezi faktory, které vedou ke kolizím replikačních a transkripčních komplexů a které ovlivňují charakter dopadu těchto kolizí, patří: vzájemná orientace (směr postupu) a rychlost postupu

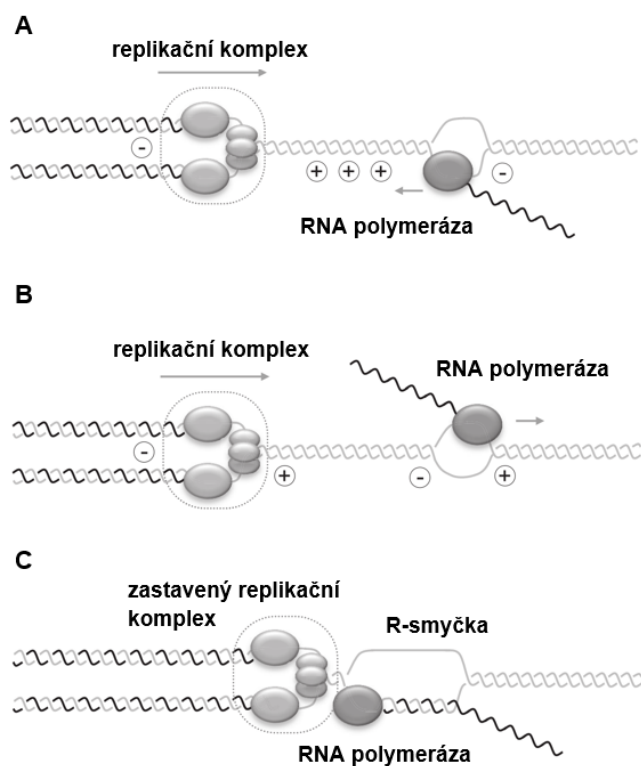
replikačních a transkripčních komplexů, topologický stres generovaný jejich postupem a tvorba tzv. R-smyček (shrnuje na obr. 2.3).

Přímé kolize replikačního a transkripčního komplexu mohou mít v zásadě dvojitý charakter, a to dle směru, ve kterém se dané komplexy po DNA pohybují vzhledem k sobě – mohou být orientovány proti sobě (čelní srážky), nebo ve stejném směru (viz obr. 2.3). Ke kolizím mezi aparáty orientovanými stejným směrem může docházet v důsledku jejich rozdílných rychlostí procesování nebo také díky schopnosti některých RNA polymeráz vracet se po DNA zpět proti směru elongace transkripce (například kvůli kontrole transkribované RNA) (Nudler 2012).

Prokaryotický genom je tvořen pouze jedinou molekulou DNA (pokud pomineme plazmidy) a jeho replikace probíhá v jednom sledu z jednoho replikačního počátku, replikace není specificky místně ani časově ohraničena. Obecně zde dochází častěji ke srážkám, kdy se komplexy pohybují ve stejném směru, a to proto, že rychlost procesování replikačního komplexu (za normálních podmínek cca 600–730 nt/s – Breier *et al.* 2005) je asi 12–30x větší než rychlost procesování transkripčního komplexu (za normálních podmínek cca 50 nt/s – Epshtein *et al.* 2003). V kombinaci s tím, že je replikace vedena pouze z jednoho počátku, jsou tedy srážky nevyhnutelné. Srážky, kdy jsou replikační a transkripční komplexy orientovány ve stejném směru, představují pro buňku menší komplikace než čelní srážky komplexů (Lin *et Pasero* 2012). Bylo zjištěno, že u modelového organismu *Bacillus subtilis* je 75% genů ko-orientováno se směrem replikace (Kunst *et al.* 1997). Wang s kolegy ukázali, že tato ko-orientace je pro buňku výhodná, protože se tak předchází právě škodlivým čelním srážkám (Wang *et al.* 2007). Kolize komplexů orientovaných ve stejném směru je u prokaryot obvykle řešena mechanismy, které výrazně nenarušují průběh replikace a ani transkripce nemusí být přerušena, což má za důsledek minimum komplikací a chyb (Lin *et Pasero* 2012). Dále bylo ukázáno, že u prokaryotických buněk dochází také k čelním srážkám, a to napříč bakteriálním genomem a nikoli pouze v případě vysoce exprimovaných genů, jak bylo očekáváno (Wang *et al.* 2007). Tyto srážky vedou k pozastavení obou komplexů, které může trvat i několik minut. Což bylo potvrzeno ve studii, ve které byla obrácena orientace vysoce transkribovaných ribozomálních genů tak, aby jejich transkripce probíhala proti směru postupu replikačního komplexu, tato změna orientace vedla k nárůstu genomové nestability (Srivatsan *et al.* 2010).

Uspořádání velké části genů tak, že jsou ko-orientovány se směrem replikace, je zachováno u všech známých bakterií (Guy *et Roten* 2004).

Na rozdíl od bakterií, eukaryotické replikační a transkripční komplexy procesují přibližně stejnou rychlostí, a to replikační komplex rychlostí 17–33 nt/s (Hiratani *et al.* 2008) a transkripční aparát rychlostí 17–72 nt/s (Darzacq *et al.* 2007). Není jasné, do jaké míry je ko-orientové uspořádání genů zachováno napříč eukaryotními organismy tak, jak je tomu u bakterií. Ve studii sledující směr procesování transkripčního a replikačního aparátu u několika desítek genů včetně genů kódujících ribozomální proteiny u *S. cerevisiae* nebyla prokázána žádná korelace, ko-orientované uspořádání (Raghuraman *et al.* 2001). U modelového organismu *S. cerevisiae* jsou replikační počátky v genomu dobře zmapované, ale v případě genomu člověka jsou zatím k dispozici zejména experimentálně stanové replikační počátky a transkripční promotory, což obdobnou studii ko-orientovaného uspořádání komplikuje (Lin *et Pasero* 2012).



**Obr. 2.3: Modely kolize replikačního komplexu s transkripčním aparátem: (A)** komplexy se na DNA pohybují směrem k sobě, znaménka značí: (+) pozitivní a (-) negativní nadšroubovicové vinutí, (+)(+)(+) vznikající topologický stres, **(B)** komplexy jsou na DNA orientovány ve stejném směru, **(C)** vznik stabilního RNA:DNA hybridu (R-smyčky) a kolize komplexů (převzato a upraveno dle Lin *et Pasero* 2012).

Významným faktorem zapříčiňujícím kolize mezi replikačním a transkripčním aparátem je vznikající topologický stres na DNA. RNA i DNA polymeráza pro svoji funkci vyžadují rozvolněnou DNA, v případě, že rozvolňování DNA probíhá ve vzájemné blízkosti, popřípadě je-li daný chromatinový úsek pevněji asociován se strukturou jaderné membrány, zvyšuje se topologické pnutí dvoušroubovice, vyvíjí se topologický stres a v důsledku této topologické bariery dojde k zastavení obou komplexů. V eukaryotických buňkách působí topoizomeráza I a II, které v součinnosti s dalšími proteiny toto topologické pnutí uvolňují. Jsou tedy nezbytné pro zachování genomové integrity (Keszthelyi *et al.* 2016).

V posledních letech je s kolizí replikačních a transkripčních komplexů spojována tvorba potenciálně vysoce genotoxických RNA:DNA hybridů označovaných jako R-smyčky (Aguilera *et Garcia-Muse* 2012). Tyto struktury se mohou tvořit během transkripce a skládají z nově přepisované RNA spárované s kódujícím vláknem DNA a z odchyleného nespárovaného komplementárního vlákna DNA. Nespárované DNA vlákno je náchylné k jednovláknovým zlomům (mj. může být štěpeno endonukleázami) a modifikacím nukleotidů (např. deaminace), které vedou k mutacím. Přestože krátkodobý výskyt R-smyček je v lidském genomu relativně častým jevem a tyto struktury se podílejí na přirozených procesech buňky (např. regulace genové exprese), stabilizace těchto struktur ohrožuje integritu genomu. U eukaryotických buněk jsou stabilizované R-smyčky akumulovány v případech poruch spojených s procesováním pre-mRNA a jejího následného exportu z jádra (Felipe-Abrio *et al.* 2015; Gómez-González *et al.* 2011; Li *et Manley* 2005), kdy pak mohou blokovat postup replikační vidlice. Zároveň řada prací ukázala, že k tvorbě stabilizovaných R-smyček dochází v důsledku kolize mezi replikačním a transkripčním aparátem, kdy R-smyčky významně přispívají k následnému poškození DNA (Gan *et al.* 2011; Helmrigh *et al.* 2011; Tuduri *et al.* 2009). Několik prací naznačilo mechanismy, kterými by eukaryotické buňky mohly bránit akumulaci R-smyček. R-smyčky mohou být degradovány enzymem RNáza H1, který specificky štěpí RNA vlákno v RNA:DNA hybridu (Huertas *et Aguilera* 2003; Wahba *et al.* 2011). K odstraňování R-smyček také přispívá RNA:DNA rozvazující enzym, helikáza Sentaxin/Sen1, který asociuje s replikačním komplexem a specificky zabraňuje vzniku R-smyček při jeho střetu s transkripční jednotkou RNA polymerázy II (Alzu *et al.* 2012). Dále, enzym DNA topoizomeráza I uvolňuje negativní vinutí DNA za postupující RNA polymerázou, které přispívá ke vzniku R-smyček (Drolet 2006; El Hage *et al.* 2010).

R-smyčky a stejně tak zpomalení replikačních či transkripčních komplexů v důsledku selhání návazných procesů (nedostatečná syntéza deoxyribonukleotidů nebo interagujících proteinů) mohou vést k zastavení jednoho z procesů, které pak vede ke srážce (Helmrich *et al.* 2013; Lin *et Pasero* 2012).

U prokaryotických i eukaryotických buněk se v průběhu evoluce vyvinuly mechanismy omezující potenciální střety replikačních a transkripčních komplexů, buňky tímto předchází vážným důsledkům vzešlých ze zastavení komplexů a předčasného ukončení procesů.

Zatímco bakteriální buňky předcházejí kolizím mezi replikačním a transkripčním komplexem především uspořádáním genomu tak, aby nedocházelo k čelním srážkám komplexů, tak u eukaryot byly popsány rozličné regulační mechanismy omezující střet replikace a transkripce spočívající v načasování a prostorovém uspořádání procesů. Připomeňme, že replikace u eukaryot probíhá z mnoha replikačních počátků najednou, eukaryotický genom je segregován do jader buněk. Duplikace chromosomální DNA je vymezena striktně do S-fáze (ke krátké syntéze DNA může v rámci oprav DNA poškození docházet i v jiných fázích buněčného cyklu), přičemž transkripce velké části genů probíhá především v G1-fázi, kdy dochází k růstu buňky, a G2-fázi. Avšak i v průběhu S-fáze dochází k transkripci některých genů (např. rDNA, geny kódující tRNA nebo histony). A přestože bylo ukázáno, že transkripce probíhá především v doménách prostorově oddělených od míst replikace (Wei *et al.* 1998), akumulují se důkazy o střetech replikace a transkripce a jejich negativním dopadu na stabilitu eukaryotního genomu (Helmrich *et al.* 2013).

V případě vyšších eukaryot dochází k přesnému načasování replikačních a transkripčních procesů. Příkladem může být načasování replikace a transkripce genu kódujícího regulační protein cyklin B1, který je replikován v časně S-fázi, ale transkribován v pozdní S-fázi (Helmrich *et al.* 2011; Hiratani *et al.* 2009). Replikační počátky jsou mnohdy nabohaceny uvnitř sekvencí promotorů genů. Otevření chromatinové struktury, zahájení transkripce a uvolnění transkripčních faktorů z těchto míst tak může vyvolat vazbu pre-iniciačního replikačního komplexu. Na čemž mohou mít podíl také komplexy remodelující chromatin a rovněž komplexy modifikující histony či DNA (Cadoret *et al.* 2008; Helmrich *et al.* 2013). V průběhu S-fáze tedy dochází k progresivní aktivaci a inaktivaci různých

transkripčních a replikačních domén podle toho, v jakém aktuálním stádiu se buňka nachází (Hiratani *et al.* 2008).

U organismu *S. cerevisiae* byl objeven další mechanismus zabraňující kolizím komplexů, a to tzv. bariéra replikační vidlice (*replication fork barrier*) (Brewer *et al.* 1988). Ta byla identifikována poprvé u lokusu, jenž nese několik desítek jednotek (kopií) 35S rRNA genů, které jsou transkribovány v průběhu celého buněčného cyklu. Bariéra replikační vidlice zastavuje progres replikačních vidlic, jež procesují v opačném směru než komplex transkribující jednotky 35S rRNA, čímž zabraňuje čelním srážkám komplexů (Brewer *et al.* 1988). Obdobné bariéry separující vysoce transkribované geny od probíhající replikace byly objeveny také u vyšších eukaryot, například u rostlin (López-Estraño *et al.* 1999) a savců (Lopez-Estraño *et al.* 1998).

I přes to, že se u vyšších eukaryot vyvinula komplikovaná funkční organizace genomu (prostorové a časové oddělení replikace a transkripce), která má předcházet kolizím replikačních a transkripčních aparátů, nelze těmto srážkám zcela zabránit. Molekulární mechanismy, které umožňují rozřešit tyto kolize, jsou zásadní pro udržení stability genomu, avšak nebyly dosud podrobně popsány a pochopeny.

### 2.2.2 Důsledky kolize komplexů

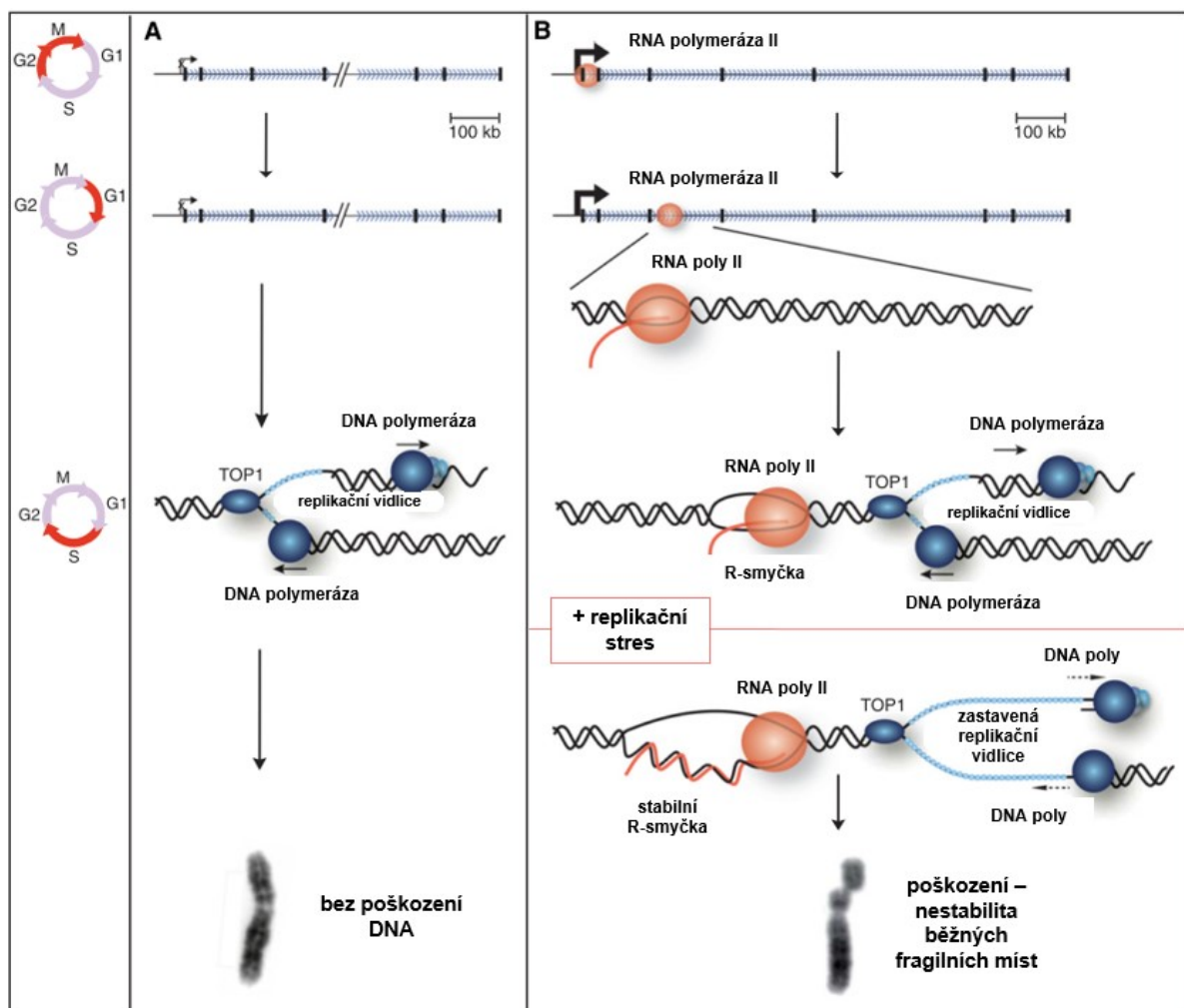
Studie u prokaryotických i eukaryotických buněk ukázaly, že kolize replikačního a transkripčního komplexu způsobují zpomalení, zastavení či kolaps replikačních vidlic a s tím související poškození DNA. Kolize mezi aparáty mohou vést k akumulaci srážek s dalšími transkripčními komplexy, ke zlomům DNA (jednoho i obou řetězců DNA), rekombinacím DNA, chromozomovým přestavbám a obecně ke generování chyb v sekvencích DNA, poškození chromozomů a ve vážných případech i k vývinu rakovinných buněk či buněčné smrti. Četnost chyb a poškození narůstá s intenzitou narušení endogenních procesů či mechanismů zabraňujících srážkám. Důsledky kolize komplexů představují pro buňku velké potenciální nebezpečí a zátěž (Helmrich *et al.* 2011, shrnuto v Helmrich *et al.* 2013).

Jak bylo popsáno výše, v eukaryotických buňkách existuje několik preventivních mechanismů, které zabraňují potenciálním střetům replikačního a transkripčního komplexu. Aktivita zapojených proteinů, komponent replikačního a transkripčního komplexu, stejně tak

replikačních helikáz a topoizomeráz, je tedy nezbytná pro zabránění vážným důsledkům kolizí (Helmrich *et al.* 2013). Příklady důsledků narušení funkce klíčových komponent lze ukázat na transkripční RNA polymeráze II u modelového organismu *S. cerevisiae*. Specifické mutace proteinu RNA polymerázy II způsobují zastavení transkripčního komplexu či inhibují schopnost proteinu uvolnit se z DNA, zastavený a asociovaný komplex pak představuje překážku pro replikační aparát a zvyšuje se frekvence kolizí. Což vede k narušení progresu replikačních vidlic, aktivaci dormantních replikačních počátků a narušení stability genomu a generování chyb. Funkční RNA polymeráza II se navíc aktivně podílí na znovuzahájení progresu zastavených replikačních vidlic, a to pravděpodobně vlastním uvolněním z daného úseku DNA (Felipe-Abrio *et al.* 2015).

Helmrich *et al.* v několika studiích ukázali, že určitá místa v genomu eukaryotických buněk (zmiňovaná *common fragile sites*, běžná fragilní místa) jsou k negativnímu působení replikačního a transkripčního stresu náchylnější. Jedná se zejména o lokusy velmi dlouhých genů (větší než 800 kb), kde za endogenních, a především stresových podmínek vznikají dvouřetězcové zlomy DNA. Ve studii publikované v roce 2006 nejprve pozorovali, že některá běžná fragilní místa jsou u myši a člověka konzervovaná (Helmrich *et al.* 2006). Jejich studie z roku 2011 pak na modelu lidských buněk ukazuje, že při zvýšení replikačního stresu (navozeném pomocí aphidicolinu, který inhibuje DNA polymerázu) v oblastech dlouhých genů, kde současně (v pozdní S-fázi) probíhá replikace i transkripce, vznikají R-smyčky, dvouřetězcové zlomy DNA a další poškození. A to proto, že replikace některých dlouhých genů (větších než 800 kb) probíhá v pozdní S-fázi a jejich transkripce je pak obvykle zahájena v G2-fázi a trvá déle než jeden buněčný cyklus (i při zachování běžné rychlosti transkripce), tedy i průběhu S-fáze následujícího buněčného cyklu. V diferencovaných lidských buňkách, ve kterých dochází k expresi daných genů, musí tedy replikace a transkripce probíhat v určitých oblastech genomu zároveň (viz obr. 2.4). Také bylo zjištěno, že u těchto dlouhých genů může probíhající replikace působit jako supresor iniciace další transkripce. Helmrich *et al.* dále ukázali, že probíhající transkripce (trvajíc déle než jeden buněčný cyklus) inhibuje iniciaci replikace (Helmrich *et al.* 2011). To potvrzuje dřívější studii, podle které v buňce vystavené replikačnímu stresu nelze aktivovat dormantní replikační počátky v sekvencích dlouhých genů, respektive v oblastech běžných fragilních míst (Ozeri-Galai *et al.* 2011). Rovněž bylo prokázáno, že v lokusech velkých aktivních transkripčních jednotek (větších než

1 Mb), v běžných fragilních místech, jsou často generovány variabilní počty kopií úseků daného genu (Wilson *et al.* 2014). Nestabilita běžných fragilních míst je zapříčiněna i dalšími faktory, například sekundárními strukturami na DNA, vysokým obsahem A–T bází a jejich souhrou (Barlow *et al.* 2013).



**Obr. 2.4: Model vývinu genomové nestability v běžných fragilních místech:** vlevo časová osa průchodu buňky fázemi cyklu, (A) u diferencovaných lidských buněk, u kterých nedochází k expresi daného dlouhého genu, není replikace vystavena překážkám na DNA a tudíž je zachována stabilita běžných fragilních míst, (B) u diferencovaných lidských buněk exprimujících daný dlouhý gen je jeho transkripce zahájena v G2-fázi cyklu, elongace transkripce pokračuje v G1-fázi následného buněčného cyklu až do S-fáze, kde se transkripční aparát (RNA polymeráza II) střetává s replikačním komplexem, za normálních podmínek vzniká poškození ojediněle, avšak při působení replikačního stresu a zastavení replikačních vidlic frekvence poškození narůstá (TOP1 – topoizomeráza 1, převzato a upraveno dle Helmrich *et al.* 2011).

Barlow *et al.* v roce 2013 publikovali studii, ve které v genomu B-lymfocytů identifikovali tzv. časně replikující fragilní místa, jež byla dříve studována u *S. cerevisiae* (Raveendranathan *et al.* 2006). Časně replikující fragilní místa byla lokalizována do klastrů vysoce transkribovaných genů, do lokusů s repetitivními elementy a míst bohatých na CpG (cytosin-fosfát-guanin) ostrovy. Tato místa jsou rovněž náchylná ke zlomům DNA spontánně generovaným v průběhu časně replikace, přičemž frekvence zlomů narůstá při vystavení buněk replikačnímu stresu (zde navozen pomocí hydroxyurey, která inhibuje enzym ribonukleotid-redukázu zajišťující redukci ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy, což vede k depleci dNTP a k pozastavení replikačního aparátu na DNA). Na rozdíl od běžných fragilních míst je pro tato místa charakteristická aktivace dormantních replikačních počátku při působení replikačního stresu, což vede ke zvýšení frekvencí srážek replikačního a transkripčního aparátu a další destabilizaci genomu (Barlow *et al.* 2013).

### 2.2.3 Mechanismy oprav kolizí komplexů a obnovení replikace

Prokaryotické i eukaryotické buňky vyvinuly vedle mechanismů zabraňujících kolizi komplexů také mechanismy, které zajišťují, aby byly procesy transkripce a replikace po kolizích obnoveny, a to bez generování dalších chyb. Což dokazuje fakt, že vysoce proliferující buňky, jež nejsou vystaveny působení exogenního stresu, nevykazují známky poškození v důsledku kolizí komplexů (Helmrich *et al.* 2013).

U prokaryotických organismů dochází častěji ke kolizím komplexů pohybujících se ve stejném směru, tyto kolize mohou být rozřešeny v zásadě dvojím způsobem. A to jednak kontinuální progresí daného replikačního aparátu přes místo střetu s RNA polymerázou, čímž dojde k jejímu uvolnění z templátu DNA a ukončení transkripce. Nebo může postupující replikační komplex překonat RNA polymerázu bez zastavení transkripce (Liu *et al.* 1994; Pomerantz *et O'Donnell* 2008). Postup replikačního komplexu přes úseky s navázanou RNA polymerázou zde pravděpodobně umožňuje spolupráce helikáz Rep a DnaB a dalších pomocných proteinů (Atkinson *et al.* 2011). *In vitro* studie ukázala, že pokud jsou komplexy na DNA orientovány proti sobě, je replikační komplex zastaven na několik vteřin a nejsou-li přítomny pomocné helikázy i na několik minut (Liu *et Alberts* 1995). V *in vivo* studii bylo u *E. coli* pozorováno, že zastavené replikační vidlice zůstávají stabilní a případně může dojít

k znovuzahájení jejich progresu za současného uvolnění RNA polymerázy (Pomerantz *et al.* 2010). U *E. coli* byly objeveny tři specifické replikativní helikázy (Rep, DinG a UvrD), které zde pravděpodobně umožňují progresi replikačního komplexu přes sekvence DNA asociované s RNA polymerázou (Boubakri *et al.* 2009). Při obou formách kolizí tedy může dojít k uvolnění transkripčního komplexu z DNA, což může doprovázet (částečná) degradace RNA-transkriptu (pomocí působení RNáz) (Helmrich *et al.* 2011).

V případě eukaryotických buněk lze pozorovat více specifické a komplexní mechanismy stabilizace a obnovy procesů, z nichž některé jsou jen částečně prostudovány. Zatím neexistuje jednoduchý model řešení kolizí aparátů napříč eukaryoty. Jsou známy mechanismy, které se podílí na stabilizaci replikačních vidlic a transkripčního aparátu, na remodelaci replikačních vidlic a DNA, popřípadě procesy zajišťující znovuzahájení procesů.

U nižších eukaryot lze pozorovat některé obdobné mechanismy jako u prokaryot, například v oblasti pericentromerického heterochromatinu buněk *Schizosaccharomyces pombe* je nejprve uvolněna transkripční RNA polymeráza II, což umožňuje progresi replikačních vidlic (Zaratiegui *et al.* 2011). Bylo zjištěno, že u eukaryot existují helikázy, které jsou schopné uvolňovat překážky z DNA a umožnit tak průchod replikační vidlice. Jednou z nich je u *S. cerevisiae* helikáza Rrm3, která je asociována s vysoce transkribovanými a dlouhými geny při narušení transkripce nebo procesování pre-mRNA. Rrm3 helikáza umožňuje replikačním vidlicím postupovat přes místa s asociovanými transkripčními komplexy (Azvolinsky *et al.* 2009; Prado *et al.* 2005). Obdobné vlastnosti byly popsány také u eukaryotického MCM2-7 komplexu s helikázovou aktivitou, který může uvolňovat překážky z DNA při průchodu replikačních vidlic (Fu *et al.* 2011).

Jeden z možných procesů zapojených do stabilizace replikačních vidlic po jejich narušení byl popsán v roce 2014 Yu *et al.* na modelovém organismu *S. cerevisiae*. Tým vyvinul specifickou metodu, díky které je možné identifikovat proteiny a proteinové komplexy, jenž se specificky váží na vedoucí či opoždějí se vlákno DNA replikačních vidlic. Bylo zjištěno, že protein PCNA je, po srovnání jeho hladin na vedoucím a opoždějícím se vlákně aktivních vidlic, nabohacen na opoždějícím se vlákně. Při narušení replikace prostřednictvím hydroxyurey je tento protein uvolňován právě z opoždějících se vláken. Přičemž bylo zjištěno, že k uvolnění PCNA dochází skrze jeho ubiquitinaci. Narušení

disociace PCNA ze zastavených replikačních vidlic vede ke genomové nestabilitě (Yu *et al.* 2014).

Na modelovém organismu *S. cerevisiae* bylo také popsáno, že při kolizi RNA polymerázy II s replikačním komplexem, kdy komplexy procesují směrem k sobě, dochází k zastavení replikačních vidlic a ke spuštění rekombinace mezi přímými repetitivy DNA. Tento fenomén je označován jako s transkripcí spojená rekombinace (*transcription-associated recombination*, TAR) a je závislý jak na replikaci, tak transkripci procesující v opačném směru než replikace (Prado *et Aguilera* 2005). Fenomén byl popsán i u vyšších eukaryot, kde bylo na savčích buňkách ukázáno, že rekombinace může být jedním ze způsobů přemostění probíhající replikace přes transkripci (Gottipati *et al.* 2008).

Remodelace zastavených replikačních vidlic a jejich restart v buňkách eukaryot byly popsány v řadě studií, na základě kterých bylo vytvořeno několik základních modelů, jež ale potřebují další doplnění a ověření. U zastavených replikačních vidlic může dojít k regresi replikačních vidlic a spárování nově syntetizovaných řetězců do tzv. Hollidayova spoje. Na tomto mechanismu se podílí některé helikázy, například BLM (*Bloom syndrome*) a WRN (*Werner syndrome*) helikáza, přičemž pravděpodobně nemusí docházet k disociaci replikačního komplexu (Petermann *et Helleday* 2010; Ralf *et al.* 2006; Sidorova *et al.* 2008). Dle dalšího modelu dochází k vytvoření Hollidayova spoje a rekombinaci mezi templátovými vlákny DNA a nově nasyntetizovanými vlákny (bez vzniku dvouřetězcových zlomů na DNA) prostřednictvím rekombinačního faktoru RAD51 (Petermann *et al.* 2010). Tento proces však pravděpodobně zahrnuje uvolnění replikačního aparátu (Petermann *et Helleday* 2010). V případě dlouhodobě zastavených replikačních vidlic dochází, dle dalšího popsaného procesu, ke vzniku dvouřetězcových zlomů DNA, formování Hollidayova spoje a rekombinaci (Saintigny *et al.* 2001).

U většiny reparačních procesů dochází k zastavení a uvolnění transkripčního komplexu. Vzniklý RNA transkript, dle modelu u savčích buněk, může zůstat asociován s DNA, přičemž může následně sloužit jako primer pro DNA polymerázu a znovuzahájení replikace (Helmrich *et al.* 2013; Yunger *et al.* 2010). V případě dlouhých genů je nezbytné, aby byl znovu zformován elongační transkripční komplex a transkripce byla obnovena, jelikož transkripce některých genů vyžaduje více než jeden buněčný cyklus. Tento mechanismus byl pozorován *in vitro* na modelu *S. cerevisiae* (Saeki *et Svejstrup* 2009).

Tyto modely stabilizačních a opravných mechanismů však potřebují být doplněny o výsledky dalších studií, stejně tak nejsou identifikovány všechny proteiny zapojené do stabilizace, remodelace a restartu procesů. Vše navíc může komplikovat přetrvávající replikační stres (zformované stabilní R-smyčky, exogenní i endogenní činitele), kolaps replikačních vidlic, jednovláknové i dvouvláknové zlomy DNA (Aguilera *et* Gómez-González 2008).

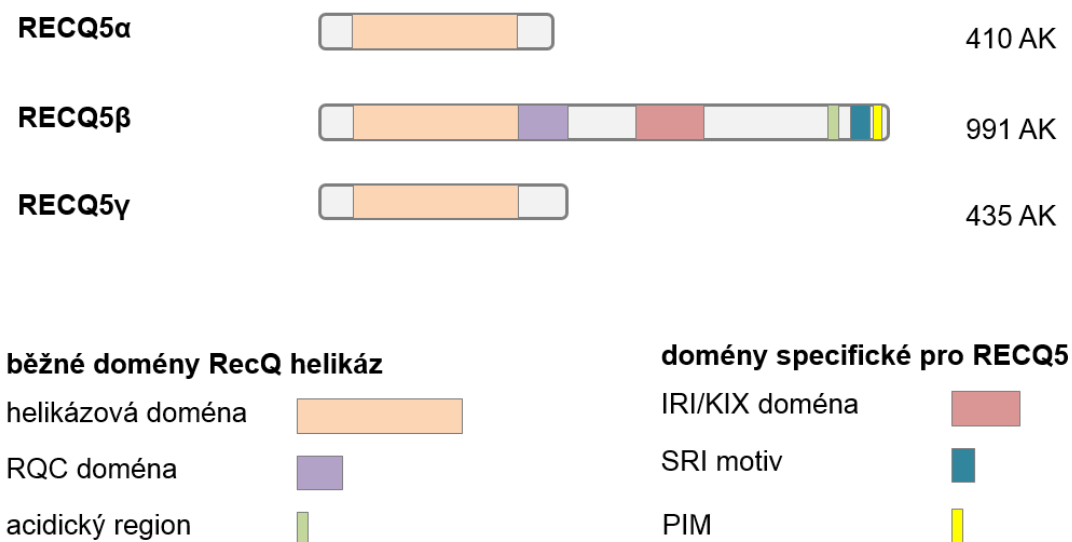
## 2.3 Helikáza RECQ5

Helikáza RECQ5 patří do rodiny sekvenčně konzervovaných RecQ helikáz, jež jsou přítomny u prokaryotních i eukaryotních buněk. RecQ helikázy nejsou hlavními replikativními helikázami, jsou však zapojeny do oprav poškození DNA a jejich funkce jsou potřebné pro zachování genomové integrity a přežití buněk (Bernstein *et al.* 2010). Bakteriální buňky disponují jednou RecQ helikázou (homologní RecQ helikázou, Puranam *et al.* 1994), stejně tak buňky kvasinek, u *S. cerevisiae* je to Sgs1 helikáza (Sun *et al.* 1999). Vyšší eukaryota mají obvykle několik RecQ helikáz, přičemž v lidských buňkách je jich známo pět. Dvě z nich získaly název po onemocněních u člověka, jež provázejí mutace jejich genů, a to helikázy BLM (*Bloom syndrome*) a WRN (*Werner syndrome*) (Ellis *et al.* 1995; Yu *et al.* 1996). Při mutaci další z nich, RECQ4, se u lidí vyvíjí tzv. Rothmund-Thomson syndrom. Tyto syndromy se projevují předčasným stárnutím, náchylností k rakovině a celkovou chromozomovou nestabilitou. Do rodiny dále patří helikázy RECQ1 a RECQ5, jejichž mutace nejsou spojeny s život ohrožujícím syndromy. Všechny lidské RecQ helikázy jsou však klíčové pro udržení integrity a restartu replikačních vidlic, přestože jejich úlohy v tomto procesu jsou specifické (Bernstein *et al.* 2010; Kitao *et al.* 1998; Urban, Dobrovolna *et al.* 2016).

### 2.3.1 Charakteristika helikázy RECQ5

Helikáza RECQ5 byla poprvé u člověka identifikována v roce 1998 (Kitao *et al.* 1998). Jsou známy tři izoformy helikázy RECQ5 – RECQ5 $\alpha$ , RECQ5 $\beta$  a RECQ5 $\gamma$  – vznikající na základě odlišného alternativního sestřihu kódující mRNA. Isoformy RECQ5 $\alpha$  a RECQ5 $\gamma$  jsou lokalizovány v cytoplazmě, zatímco izoforma RECQ5 $\beta$  je jaderným proteinem (Shimamoto *et al.* 2000). Struktura N-konce proteinu všech tří izoform je stejná, leží zde helikázová doména (viz obr. 2.5). Avšak pouze helikáza RECQ5 $\beta$  má ATPázovou aktivitu (která k funkci vyžaduje hořčičnaté kationty) a je schopna rozvolňovat dvoušroubovici DNA. Za helikázovou doménou izoformy RECQ5 $\beta$  je umístěna RQC doména (konzervovaná u RecQ helikáz) obsahující motivy zajišťující adekvátní vazbu a rozvolňování DNA. Následuje C-konec proteinu, jehož stavba je odlišná oproti ostatním izoformám a RecQ helikázám, nesoucí domény umožňující interakce s dalšími proteiny (Garcia *et al.* 2004; Ren *et al.* 2008). A to

SRI (*Set2-Rpb1-interacting*) motiv a IRI doménu (homologie s KIX doménou regulátorů RNA polymerázy II), které interagují s RNA polymerázou II (Islam *et al.* 2010; Kanagaraj *et al.* 2010). Na C-konci proteinu je také lokalizován tzv. PIM motiv (*PCNA-interacting motif*) umožňující asociaci s PCNA (Kanagaraj *et al.* 2006).



**Obr. 2.5:** Schéma základní stavby jednotlivých izoform helikázy RECQ5, kde na pravé straně je uvedena délka polypeptidových řetězců izoform v počtu aminokyselin (AK) a v dolní části jsou zobrazeny jednotlivé domény (RQC doména – doména konzervovaná u RecQ helikáz, SIR motiv – *Set2-Rpb1-interacting motif*, PIM – *PCNA-interacting motif*); převzato dle Popuri *et al.* 2013.

Izoforma RECQ5β je oproti zbylým dvou izoformám exprimovaná výrazněji a navíc k její expresi dochází v tkáních všech buněk, přičemž exprese ostatních RecQ helikáz (BLM, WRN a RECQ4) probíhá v různých tkáních v odlišné míře (Kitao *et al.* 1998; Popuri *et al.* 2013). Helikáza RECQ5 se váže na ssDNA a rozvolňuje DNA ve směru 3′-5′ stejně jako zbylé RecQ helikázy. Pro účinné rozvolňování DNA však vyžaduje přítomnost proteinu RPA (Garcia *et al.* 2004). Vzhledem k tomu, že pro tuto práci je stěžejní studium role izoformy RECQ5β, bude dále označení RECQ5 použito pro tuto izoformu.

### 2.3.2 Funkce a význam helikázy RECQ5

Za téměř dvacet let od identifikace helikázy RECQ5 bylo objeveno mnoho jejích funkcí, mechanismů, do kterých je zapojena, a interakcí s proteiny. Helikáza RECQ5 je zahrnuta v různých procesech operujících na DNA, tedy do replikace DNA, reparace DNA, homologní rekombinace, ale i transkripce (Popuri *et al.* 2013).

Aygün *et al.* v roce 2008 ukázali, že protein RECQ5 interaguje s transkripční RNA polymerázou II v lidských buňkách skrze podjednotku RPB1 této polymerázy (Aygün *et al.* 2008). Později bylo zjištěno, že protein RECQ5 asociuje s podjednotkou RPB1 skrze SRI motiv a IRI doménu, která je homologní s tzv. KIX doménou různých regulátorů RNA polymerázy II. Přičemž k vazbě proteinů prostřednictvím IRI domény dochází, když je RNA polymeráza v hypo- (iniciace transkripce) i hyperfosforylovaném (elongační fáze) stavu, a to skrze tzv. *jaw* doménu RPB1 podjednotky RNA-polymerázy II (Kassube *et al.* 2013). K vazbě skrze SRI motiv dochází v hyperfosforylovaném stavu RNA polymerázy II prostřednictvím CTD domény (*C-terminal repeat domain*) podjednotky RPB1 (Islam *et al.* 2010; Kanagaraj *et al.* 2010). *In vitro* experimenty ukázaly, že je helikáza RECQ5 schopna modulovat transkripci, respektive že inhibuje iniciační i elongační fázi transkripce (Aygün *et al.* 2009). Při depleci helikázy RECQ5 v buňkách (*in vivo*) dochází k zvýšení průměrné rychlosti elongačního transkripčního komplexu, což způsobuje narušení návazných procesů a může to způsobit zastavení komplexu (Saponaro *et al.* 2014). Dále bylo zjištěno, že deplece proteinu RECQ5 vede k formování R-smyček na některých místech genomu (Li *et al.* 2015). Avšak helikáza RECQ5 není schopná rozvolňovat tyto RNA:DNA duplexy (dle studie *in vitro*) (Kanagaraj *et al.* 2010). Deplece helikázy RECQ5 v buňkách vede k poškození a zlomům DNA v běžných fragilních místech genomu. Helikázu RECQ5 tedy lze označit za potřebný transkripční faktor, jenž v průběhu replikace zabraňuje poškození DNA, jehož vznik je spojen s aktivní transkripcí (Saponaro *et al.* 2014).

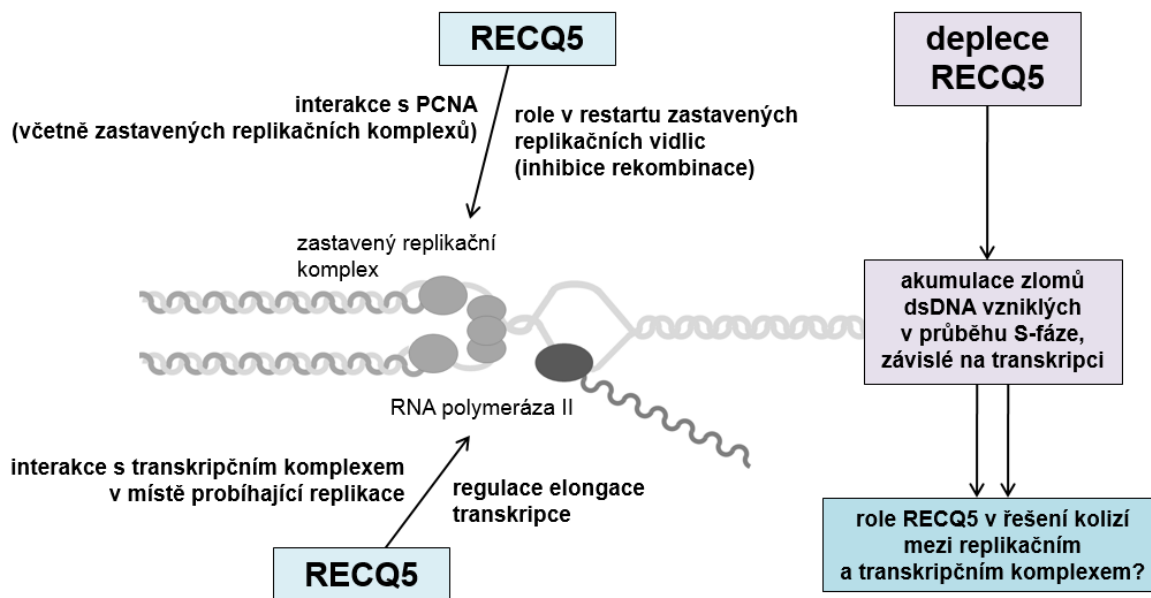
Kanagaraj *et al.* v roce 2006 ukázali, že helikáza RECQ5 interaguje s proteinem PCNA, který je součástí replikačního komplexu, a to v *in vitro* i *in vivo* experimentech. V *in vitro* experimentech pozorovali, že helikáza RECQ5 asociuje s replikačním komplexem v průběhu S-fáze a zůstává s ním asociovaná i při zastavení replikačních vidlic za působení replikačního stresu (vyvolaným UV zářením či působením hydroxyurey). Je tedy možné, že je helikáza RECQ5 zapojena do remodelace narušených replikačních vidlic (Kanagaraj *et al.*

2006). Helikáza RECQ5 interaguje také s endonukleázou FEN1, která je nezbytná pro procesování Okazakiho fragmentů na opožďujícím se vlákně replikačních vidlic. Helikáza RECQ5 stimuluje endonukleázovou aktivitu FEN1, což může hrát důležitou roli při restartu zastavených replikačních vidlic (Speina *et al.* 2010). Helikáza RECQ5 má tedy důležitou roli v zachování genomové integrity v průběhu replikace.

Význam helikázy RECQ5 v opravě poškozené DNA zvyšují i její další pozorované vlastnosti a funkce. Na rozdíl od ostatních RecQ helikáz se protein RECQ5 váže na jednořetězcové zlomy DNA, které byly v lidských buňkách vyvolány působením laseru (Tadokoro *et al.* 2012). Protein RECQ5 dále vykazuje vazbu s proteinem RAD51, jenž je zapojen do oprav dvouřetězcových zlomů skrze homologní rekombinaci. Protein RAD51 umožňuje párování a výměnu vláken DNA díky formování proteinových vláken na ssDNA. Vazba proteinu RECQ5 na protein RAD51 znemožňuje formování filament RAD51 a uvolňuje tento protein z ssDNA. Což představuje možný preventivní krok předcházející neadekvátní homologní rekombinaci při opravách zlomů DNA (Hu *et al.* 2007; Schwendener *et al.* 2010). Protein RECQ5 interaguje také s proteinem MRE11, jenž je součástí tzv. MRN komplexu (zahrnuje proteiny MRE11, RAD50 a NBS1) zapojeného do oprav dvouřetězcových zlomů generovaných i v důsledku působení replikačního stresu (Zheng *et al.* 2009). Helikáza RECQ5 je rovněž důležitým zástupcem homologních RecQ helikáz, zejména WRN a BLM, v případech, kdy jsou narušeny jejich funkce v buňkách (například při mutacích genů kódujících tyto helikázy) (Popuri *et al.* 2013).

Deplece proteinu RECQ5 v lidských buňkách vede k akumulaci dvouřetězcových zlomů DNA v průběhu S-fáze buněčného cyklu, tedy v průběhu replikace. Přičemž nahromadění těchto zlomů je závislé na probíhající transkripci. Deplece helikázy RECQ5 způsobuje také zvýšení hladiny hypersoforylované formy RNA polymerázy II navázané na DNA (Li *et al.* 2011). Jedním z výchozích podnětů pro vypracování této diplomové práce bylo zjištění, že helikáza RECQ5 asociuje s transkripčním komplexem v místech, kde probíhá replikace, tedy pravděpodobně v místech kolizí mezi komplexy (Urban *et al.* 2016). Jelikož bylo dokázáno, že helikáza RECQ5 asociuje jak s replikačním, tak transkripčním komplexem, a že zastává důležitou roli v opravě poškození DNA generovaného v průběhu replikace i transkripce, je možné, že je zapojena do prevence a řešení kolizí mezi replikačním a transkripčním komplexem. Prostřednictvím inhibování elongace transkripce může helikáza

RECQ5 předcházet srážkám s replikačním komplexem a omezit tak frekvence jejich kolizí. Prostřednictvím interakce s proteiny zajišťujícími replikaci a opravy poškozené DNA a díky své helicázové aktivitě pak pravděpodobně zastává funkci ve stabilizaci a znovuoobnovení zastavených replikačních vidlic (Popuri *et al.* 2013). Funkci helicázy RECQ5 v řešení kolizích mezi replikačním a transkripčním komplexem je však potřeba objasnit.



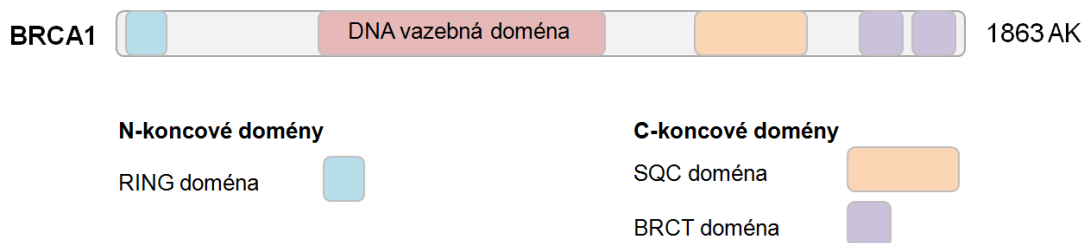
**Obr. 2.6:** Schematické shrnutí dříve pozorovaných funkcí a vlastností helicázy RECQ5, které mohou mít roli v řešení kolizí mezi replikačním a transkripčním komplexem.

## 2.4 Protein BRCA1

Lidský gen kódující protein BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*) byl poprvé mapován a identifikován v roce 1994, a to na základě spojitosti mezi dědičností rakoviny prsu a vaječníků a mutacemi tohoto genu. Protein získal název na základě projevů doprovázejících mutace jeho kódujícího genu (Miki *et al.* 1994). Postupně bylo ukázáno, že BRCA1 je významným tumor-supresorovým proteinem zapojeným do celé řady procesů v buňce. Protein byl popsán jako nezbytná součást komplexu důležitého pro monitorování integrity genomu, který případné poškození signalizují dalším, opravným komplexům (Wang *et al.* 2000). Protein BRCA1 je zapojen od oprav dvouřetězcových zlomů DNA a zastavených replikačních vidlic, do regulace transkripce a interaguje s velkým množstvím proteinů s rozličnými funkcemi (Caestecker *et Van de Walle* 2013). Vzhledem k rolím proteinu BRCA1 v udržování stability genomu se protein jeví jako možný kandidát zapojený do reparační replikačních vidlic po jejich kolizi s transkripčním komplexem.

### 2.4.1 Charakteristika proteinu BRCA1

Protein BRCA1 interaguje s mnoha proteiny skrze několik domén polypeptidového řetězce (viz obr. 2.7), což zapříčiňuje širokou paletu funkcí tohoto proteinu. Je zapojen do aktivace kontrolních bodů buněčného cyklu, opravy poškozené DNA a regulace transkripce a replikace (Caestecker *et Van de Walle* 2013). Na N-konci řetězce leží RING (*really interesting new gene*) doména interagující s proteinem BARD1 (*BRCA1-associated RING domain*), který s proteinem BRCA1 vytváří komplex s E3 ubiquitin-ligázovou aktivitou (Joukov *et al.* 2001). Na C-konci proteinu jsou dvě BRTC domény (*BRCA1-C-terminal domain*), skrze které BRCA1 interaguje s proteiny a komplexy zapojenými v opravách DNA a monitorování integrity genomu (Koonin *et al.* 1996). Důležitá je rovněž SQC doména (*SQ cluster domain*), jež nese několik serinů a threoninů podléhajících fosforylaci. Funkce proteinu BRCA1 je podmíněna fosforylací této domény, přičemž fosforylovaný protein je pak schopen formovat tzv. fokusy, místní nabohacení daného proteinu. Tyto fokusy jsou pak charakteristicky formovány v jádře na poškozené DNA. Fosforylace SQC domény tedy reguluje aktivitu proteinu (Cortez *et al.* 2000; Zhang *et Powell* 2005).



**Obr. 2.7: Schéma základní stavby proteinu BRCA1**, kde na pravé straně je uvedena délka polypeptidového řetězce v počtu aminokyselin (AK) a v dolní části jsou zobrazeny jednotlivé domény (RING – *really interesting new gene*, SQC doména – *SQ cluster domain*, BRCT – *BRCA1-C-terminal domain*); převzato dle Caestecker *et Van de Walle* 2013.

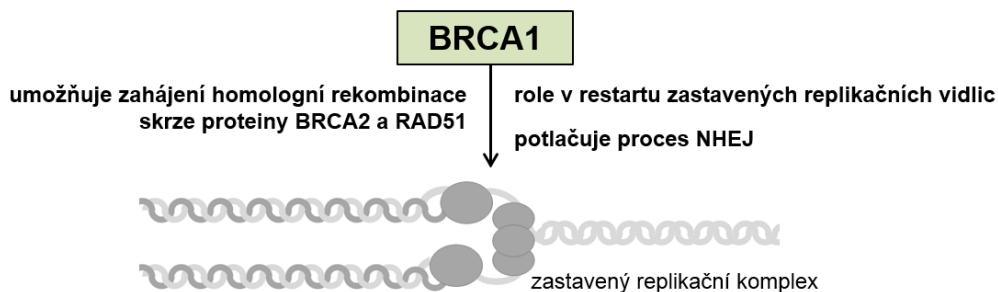
Jak již bylo popsáno výše, při narušení replikace může docházet k zastavení replikačních vidlic a vzniku zlomů na DNA, což může vést k opravám a obnově procesů pomocí homologní rekombinace. Protein BRCA1 je zapojen do oprav dvouřetězcových zlomů DNA skrze homologní rekombinaci a zároveň potlačuje alternativní proces této opravy, tzv. nehomologní spojení konců DNA (*non-homologous end-joining*, NHEJ) (Scully *et al.* 1997; Zhang *et al.* 2004). Zatímco k homologní rekombinaci dochází v S-fázi a G2-fázi buněčného cyklu, tedy potom, co je DNA zreplikováno, NHEJ je proces charakteristický pro G1-fázi cyklu. V průběhu oprav poškození pomocí homologní rekombinace dochází k asociaci mezi semikonzervativně nasyntetizovanými vlákny DNA. Při tomto typu opravy obvykle nevznikají chyby a mutace v DNA. V případě reparace poškození skrze NHEJ dochází pouze ke spojení konců zlomů dvouvláknové DNA, což obvykle vede ke generování chyb a mutací v DNA. Do procesu NHEJ je zapojen také protein 53BP1 (*p53-binding protein 1*) (Caestecker *et Van de Walle* 2013; Chapman *et al.* 2012; Zhang *et Powell* 2005).

#### 2.4.2 Role proteinu BRCA1 v opravě replikačních vidlic

Bylo pozorováno, že k formování jaderných reparačních fokusů zahrnujících protein BRCA1 dochází jak u S-fázních lidských buněk rostoucích za normálních podmínek, tak u S-fázních buněk vystavených působení látek poškozujících DNA či inhibujících replikaci (Scully *et al.* 1997). Z čehož lze usuzovat, že je protein BRCA1 zapojen do oprav poškození endogenního i exogenního původu. Schlacher *et al.* pak v roce 2012 ukázali, že se protein

BRCA1 spolupodílí na obnově zastavených replikačních vidlic díky své klíčové roli v homologní rekombinaci DNA (Schlacher *et al.* 2012). Protein BRCA1 interaguje se zastavenými vidlicemi označenými proteiny RPA a umožňuje navázání proteinů BRCA2 a RAD51, které zajišťují vlastní homologní rekombinaci zastavených DNA vidlic (Scully *et al.* 1997; Schlacher *et al.* 2012). Dále bylo zjištěno, že protein BRCA1 asociuje rovněž s MRN komplexem (tvořen proteiny MRE11, RAD50 a NBS1) (Wang *et al.* 2000). Komplex je zapojen jak do homologní rekombinace, tak do NHEJ, přičemž jeho hlavní úlohou je pravděpodobně stabilizace struktury DNA pro tyto procesy. Protein BRCA1 zřejmě zamezuje průběhu NHEJ (Zhang *et al.* 2004; Zhang *et al.* Powell 2005). Dle studie Tian *et al.* publikované v roce 2013 protein BRCA1 umožňuje účinnou ubiquitinaci PCNA replikačních komplexů, které jsou zastaveny v důsledku vzniku vnitřetězcových a meziřetězcových můstků v DNA. Protein BRCA1 v těchto případech reguluje asociaci E3 ubiquitin-ligázy RAD18 do zastavených replikačních vidlic (Tian *et al.* 2013). Protein BRCA1 tak pravděpodobně zprostředkovává obnovu zastavených replikačních vidlic a potlačuje neadekvátní opravné mechanismy.

Protein BRCA1 je součástí mnoha komplexů a mechanismů zajišťujících integritu genomu a opravy poškozené DNA v lidských buňkách. Řada jeho funkcí je zatím prostudována jen částečně. Jeho úloha v obnově zastavených replikačních vidlic je však zřejmě nezbytná. Protein BRCA1 je zapojen také do regulace transkripce. Bylo zjištěno se komplex BRCA1-BARD1 podílí na ubiquitinaci fosforylované RNA polymerázy II při poškození DNA (Starita *et al.* 2005). Protein BRCA1 by tedy mohl být zapojen do řešení kolizi mezi replikačním a transkripčním aparátem.



**Obr. 2.8:** Schematické shrnutí dříve pozorovaných funkcí proteinu BRCA1 v opravě zastavených replikačních vidlic.

### 3. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem práce bylo studovat mechanismy, kterými RECQ5 přispívá ke stabilizaci replikačních vidlic při replikačním stresu a specificky při jejich zpomalení v důsledku probíhající transkripce. Tedy dále doplnit výchozí data, podle kterých RECQ5 helikáza asociuje s transkripčním komplexem v místě kolize s replikačním aparátem a podílí se na modulaci a obnovení těchto procesů. Cílem práce bylo studovat vliv funkce RECQ5 na proteiny zapojené do oprav poškozené DNA a také na proteiny replikačního komplexu.

Jednotlivé cíle diplomové práce lze definovat takto:

- studovat, zda deplece helikázy RECQ5 v buňkách ovlivňuje funkci proteinů podílejících se na opravě dvouřetězcových zlomů DNA (53BP1 a BRCA1),
- zkoumat, zda je případné ovlivnění specifické pro replikující buňky v S-fázi buněčného cyklu a je závislé na probíhající transkripci, tedy zda se daný protein podílí na stejném procesu oprav replikačních vidlic po kolizi s transkripčním komplexem jako RECQ5,
- dále studovat vliv snížení exprese RECQ5 v buňkách na proteiny replikačního aparátu (PCNA), respektive na procesy zajišťující reparaci zastavených replikačních vidlic.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Buněčné linie a kultivační média

V rámci této diplomové práce byly využity buněčné linie HEK293 a U2OS. Detaily jejich kultivace a potřebný materiál jsou uvedeny v kapitole 4.2.1 a v tabulce 4.1.1.

Buněčná linie **HEK293** (*human embryonic kidney 293 cells*) je odvozena z lidských embryonálních buněk ledvin. Výhodou buněk linie HEK293 je jejich relativně rychlý růst, vysoká výtěžnost izolovaných proteinů a v porovnání s jinými typy buněk výrazně vyšší úspěšnost transfekce. Buňky HEK293 byly v této práci využívány při přípravě proteinových vzorků pro imunoblot.

Linie **U2OS** (*human osteosarcoma cell line*) pochází z buněk lidského osteosarkomu. Tyto buňky byly v rámci práce preferenčně využity pro imunofluorescenční mikroskopii. Oproti buňkám HEK293 vykazuje linie U2OS daleko lepší adhezi k povrchu, což usnadňuje manipulaci s buňkami na sklíčku. Další výhodou buněk U2OS je větší velikost jejich buněčného jádra, která umožňuje lépe rozlišit a identifikovat jaderné proteinové fokusy a studovat lokalizaci jaderných proteinů.

**Tab. 4.1.1:** Seznam médií, pufrů a chemikálií použitých při kultivaci buněk.

Název a specifikace	Výrobce*
fetální hovězí sérum (10%)	Thermo Fisher Scientific (Gibco 10270)
fosfátový pufr ( <i>Phosphate-buffered saline</i> , PBS) s 0,15M NaCl	přípravna médií ÚMG AV ČR
médium D-MEM obsahující 4,5 g/l glukózy ( <i>Dulbecco's modified Eagle's medium, High glucose</i> )	Sigma-Aldrich D6492
směs antibiotik penicilin a streptomycin	Sigma-Aldrich
směs trypsin (0,25%) a EDTA (0,01%) v PBS	přípravna médií ÚMG AV ČR

\* Firmy Invitrogene, Fermentas, GIBCO, LifeTechnologies, Pierce, Thermo, Fisher a další jsou v současné chvíli sloučeny pod jednu firmu Thermo Fisher Scientific, z důvodu přehlednosti jsou vždy uváděny názvy zažitých původních firem.

#### 4.1.2 Chemikálie a komerční roztoky

Tabulka 4.1.2 poskytuje přehled použitých chemikálií, komerčních směsí či roztoků s uvedením jejich výrobců (popřípadě zkratk).

**Tab. 4.1.2:** Seznam chemikálií a komerčních roztoků použitých v rámci vypracování této diplomové práce včetně případné zkratky a výrobce. Tabulka uvádí chemikálie specifické pro řešený projekt, ostatní chemikálie běžné pro provoz molekulárně biologické laboratoře byly pořízeny u firmy Sigma-Aldrich a AppliChem, rozpouštědla byla zakoupena u firmy VWR.

Název	Zkratka	Výrobce
4',6-diamidin-2-fenylindol	DAPI	Sigma-Aldrich
40% směs akrylamidu a N,N'-metylen bisakrylamidu (37,5:1)	AA/Bis	Serva
5-etyl-2'-deoxyuridin	EdU	Thermo Fisher Scientific
azid konjugovaný s fluorescenčním barvivem Alexa647	azid-Alexa647	LifeTechnologies
chemiluminiscenční substrát (ECL Western Blotting Substrate) – standardní a se zvýšenou citlivostí (Femto)	–	Pierce
cordycepin	Cord.	Sigma-Aldrich
čínidlo Bradfordové (Protein Assay Dye Reagent Concentrate)	–	Bio-Rad
digitonin	–	Sigma-Aldrich
hovězí sérový albumin ( <i>bovine serum albumin</i> )	BSA	Sigma-Aldrich
hydroxyurea	HU	Sigma-Aldrich
imerzní olej – typ F ( $n_e = 1,518$ , $V_e = 46$ při 23 °C, pro mikroskop Olympus)	–	Olympus
imerzní olej – typ F ( $n_e = 1,518$ , $V_e = 46$ při 23 °C, pro mikroskop Leica DM6000)	–	Leica Microsystems
metanol	–	VMW
Opti-MEM	–	Gibco
paraformaldehyd	–	Alta Aeser
persíran amonný ( <i>ammonium persulfate</i> )	APS	Serva
Ponceau S	–	Sigma-Aldrich

Název	Zkratka	Výrobce
tetrametylendiamin	TEMED	AppliChem
transfekční činidlo RNA-iMAX	–	Invitrogen
transfekční činidlo TransIT-2020 Reagent	–	Mirus
Vectashield	–	Vector Laboratories
značený proteinový žebříček (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder)	–	Thermo Scientific

### 4.1.3 Použité pufrы a roztoky a složení gelů pro PAGE

Tabulka 4.1.3a podává přehled pufrů a roztoků použitých v rámci diplomové práce, jejich konkrétní využití je popsáno v kapitole 4.2 Metody. Následuje tabulka ukazující složení zaostřovacího gelu a dělicích polyakrylamidových gelů pro elektroforézu.

**Tab. 4.1.3a:** Seznam použitých pufrů a roztoků včetně složení, popřípadě výrobce.

Název	Složení
click reakční směs	2mM síran měďnatý (CuSO <sub>4</sub> ) 100mM askorbát 100mM Tris o pH = 8,5 5nM azid-Alexa647 destilovaná H <sub>2</sub> O
frakcionační pufr A	10mM HEPES-NaOH (pH = 7,9) 10mM KCl 1,5mM MgCl <sub>2</sub> 0,34M sacharóza 10% glycerol 1mM dithiotreitol (DTT) proteinové inhibitory destilovaná H <sub>2</sub> O
frakcionační pufr B	3mM EDTA 0,2mM EGTA 1mM DTT proteinové inhibitory destilovaná H <sub>2</sub> O
lyzační pufr	50mM Tris-HCl (pH = 8,0) 120mM NaCl, 20mM NaF 15mM pyrofosforečnan sodný 0,5mM ortovanadičnan sodný 0,1% (v/v) Triton X-100 destilovaná H <sub>2</sub> O

Název	Složení
pufr pro SDS-PAGE (pH = 8,3)	25mM Tris 192mM glycin 0,1% (w/v) SDS
fosfátový pufr (PBS)	136,9 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
pufr TBST	120mM NaCl 30mM Tris (pH = 7,5) 0,05% (v/v) Tween 20 destilovaná H <sub>2</sub> O
transferový pufr pro imunoblot (pH = 8)	192mM glycin 25mM Tris 20% metanol destilovaná H <sub>2</sub> O
vzorkový roztok pro SDS-PAGE (4x koncentrovaný, 100 ml)	20 ml 1,5M Tris-Cl (pH = 6,8) 20 g SDS 20 ml β-merkaptóetanol 60 ml glycerol 2,6 g bromfenolová modř

**Tab. 4.1.3b:** Složení zaostřovacího gelu a jednotlivých dělicích gelů pro SDS-PAGE

chemikálie	zaostřovací gel	dělicí gel		
		10%	4%	12%
destilovaná H <sub>2</sub> O [ml]	1,5	3,675	2,26	1,55
1,5M Tris-HCl [ml] pH = 6,8; 0,4% SDS	0,625	–	–	–
1,5M Tris-HCl [ml] pH = 8,8; 0,4% SDS	–	1,875	0,875	0,875
APS 10% [μl]	1,0	30	8	17,5
TEMED [μl]	10	10	2,6	2,6
40% AA/Bis [ml]	0,25	1,875	0,35	1,05

#### 4.1.4 Protilátky

Tabulka 4.1.4a poskytuje přehled primárních protilátek použitých v rámci diplomové práce, v tabulce je vždy uveden původ, typ, ředění, použití a výrobce dané protilátky. Tabulka 4.1.4b shrnuje obdobné informace o sekundárních protilátkách.

**Tab. 4.1.4a:** Seznam primárních protilátek s uvedením jejich použití, ředění a výrobce.

Název	Původ	Ředění a použití	Výrobce
anti-53BP1	králík, polyklonální	1:200, v 1% BSA v PBS, imunofluorescence	sc22760, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-BRCA1	myš, monoklonální	1:100, v 1% BSA v PBS, imunofluorescence	GTX70111, GeneTex
anti-BRCA1	myš, monoklonální	1:250, v 5% mléce v TBST, imunoblot	sc-6954, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-Lamin B2	myš, monoklonální	1:1000, v 3% BSA v TBST, imunoblot	gtx628803, GeneTex
anti-PCNA	myš, monoklonální	1:2000, v 3% BSA v TBST, imunoblot	sc-56, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-RECQ5	králík, polyklonální	1:5000, v 3% BSA v TBST, imunoblot	připraveno v laboratoři

**Tab. 4.1.4b:** Seznam sekundárních protilátek, uvedeno též použití, ředění a výrobce.

Název	Host/Izotyp	Ředění a použití	Výrobce
anti-myší- Alexa488	koza, IgG	1:400, v 1% BSA v PBS, imunofluorescence	A-11001, Invitrogen
anti-králičí- Alexa488	koza, IgG	1:400, v 1% BSA v PBS, imunofluorescence	A-11008, Invitrogen
anti-myší- Alexa568	koza, IgG	1:400, v 1% BSA v PBS, imunofluorescence	A-11031, Invitrogen
anti-králičí-HRP	koza, IgG	1:5000, v 3% BSA v TBST, imunoblot	A 6154, Sigma-Aldrich
anti-myší-HRP	králík, IgG	1:10000, v 3% BSA v TBST, imunoblot	A9044, Sigma-Aldrich

#### 4.1.5 siRNA a plazmidy

Za účelem snížení exprese vybraných proteinů byly použity krátké interferující oligoribonukleotidy, siRNA. Tabulka 4.1.5a poskytuje seznam použitých siRNA.

**Tab. 4.1.5a:** Seznam použitých siRNA označených dle cílené mRNA kódující daný protein, uvedeny též kódující sekvence daných duplexů siRNA, další informace a výrobce.

Název	Sekvence a další informace	Výrobce
esiRECQ5	MISSION esiRNA, esiRNA human RECQL5 (esiRNA1), směs krátkých RNA cílených na různé úseky mRNA kódující daný protein	Sigma-Aldrich
siBRCA1 #1	5'-CAGGAAAUGGCUGAACUAGAATT-3' (Gorski <i>et al.</i> 2011)	Microsynth AG
siBRCA1 #2	5'-AAGGAACCUGUCUCCACAAAGTT-3' (Bruun <i>et al.</i> 2003)	Microsynth AG
siBRCA1 #3	5'-ACCATACAGCTTCATAAATAA-3'	Microsynth AG
siKont.	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGA-3', siRNA cílená na mRNA kódující luficerázu, Luciferase GL2	Microsynth AG
siRECQ5	5'-CAGGUUUGUCGCCCAUUGGAA-3'	Microsynth AG

Za účelem nabohacení exprese proteinu RECQ5 byl použit plazmid nesoucí cDNA kódující daný protein. Informace o plazmidu a kontrolním plazmidu uvádí tabulka 4.1.5b.

**Tab. 4.1.5b:** Seznam použitých plazmidů včetně podrobnějších informací a výrobce.

Název	Informace	Výrobce
GFP	plazmid pEGFP-C1 exprimující GFP	Clontech
RECQ5-GFP	pEGFP-C1- hRecQβ5 - plazmid pEGFP-C1 s vloženou cDNA kódující lidský protein RECQ5, klonovací místa EcoRI/XhoI	připraveno v laboratoři (Kanagaraj <i>et al.</i> 2010)

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Kultivace buněčných kultur

V rámci této diplomové práce byly využívány buněčné linie U2OS nebo HEK293 v závislosti na typu experimentu. Oba typy buněčných linií byly vždy kultivovány v médiu D-MEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) obohaceném o 10% fetální hovězí sérum a 1% směs antibiotik penicilin a streptomycin. Buněčné kultury byly udržovány v inkubátoru za teploty 37 °C, v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a při 95% vlhkosti. Buněčné kultury byly rekultivovány v pravidelných intervalech tak, aby nedošlo k navýšení populace buněk nad možnou kapacitu. Buňky byly vždy nejprve zbaveny starého média, dále opláchnuty fosfátovým pufrem (PBS) o teplotě 37 °C a k jejich oddělení od podkladu byl použito působení roztoku trypsin/EDTA. Po jeho krátkém působení bylo přidáno médium předehřáté na 37 °C, buňky byly rozředěny (popřípadě spočítány za pomoci Bürkerovy komůrky) a vysety na novou misku. Pro imunofluorescenční analýzu bylo vždy vyseto přibližně 150 000 buněk U2OS na jamku 6-jamkových desek (1 jamka – 9,6 cm<sup>2</sup>), na 10 mm sterilní krycí sklíčka. Pro izolaci proteinů a jejich analýzu pomocí SDS-PAGE a imunoblotu byly buňky HEK293 (bylo vyseto přibližně 400 000 buněk) kultivovány také v 6-jamkových deskách (1 jamka – 9,6 cm<sup>2</sup>). Přičemž na přípravu jednotlivých vzorků pro SDS-PAGE byly v případě získání celkového buněčného lyzátu použity buňky jednotlivých jamek, v případě izolace chromatinové frakce byly použity buňky ze dvou jamek (celková plocha 19,2 cm<sup>2</sup>).

### 4.2.2 Ozařování buněk a ovlivnění buněčných kultur chemikáliemi

Buněčné kultury U2OS byly hodinu před fixací buněk ozařovány gama-zářením o celkové síle 2 Gy. Ihned po ozáření bylo vyměněno médium v buněčné kultuře za čerstvé (předehřáté na 37 °C). Vzorky buněk pak byly po dobu jedné hodiny kultivovány v inkubátoru (37 °C).

Transkripce byla v buněčných kulturách inhibována působením cordycepinu, který byl k buňkám přidán ve výsledné koncentraci 50 µM, a to buď 2 hodiny před sklizením v případě HEK293 připravovaných pro SDS-PAGE a imunoblot, nebo 3 hodiny před fixací v případě U2OS připravovaných pro imunofluorescenční mikroskopii.

Replikace DNA byla v buněčných kulturách inhibována působením hydroxyurey o výsledné koncentraci 2 mM, která byla k HEK293 buňkám přidána 16 hodin před sklizením.

#### **4.2.3 RNA interference – transfekce buněk siRNA**

Kultury buněk HEK293 nebo U2OS byly při 30–40% konfluenci (buňky pokrývaly přibližně 30–40 % povrchu kultivační nádoby) transfekovány vybranými siRNA pomocí transfekčního činidla Lipofectamine RNAiMax dle instrukcí výrobce.

Pro transfekci buněk v 6-jamkových deskách (1 jamka – 9,6 cm<sup>2</sup>) byly připraveny dvě směsi. Jedna směs obsahovala 200 µl média Opti-MEM a daný objem koncentrované siRNA tak, aby konečná koncentrace siRNA působící na buňky byla 10 nM či 20 nM (konkrétně viz jednotlivé experimenty). Druhá směs obsahovala 200 µl média Opti-MEM a 4 µl transfekčního činidla RNA-iMAX. Oba roztoky byly jednotlivě promíchány a následně smíchány tak, že ke směsi obsahující siRNA byla přidána směs s RNA-iMAX, výsledný transfekční roztok byl důkladně promíchán a byl ponechán k inkubaci po dobu 15 minut.

U daných buněčných kultur bylo ponecháno pouze přibližně 1,6 ml kultivačního média. Po inkubaci byl výsledný transfekční roztok (400 µl) přidán k dané buněčné kultuře, roztoky byly opatrně promíseny (tak, aby nedošlo k uvolnění buněk z povrchu), výsledný objem média obohaceného o směs byl tedy přibližně 2 ml.

Použité siRNA a jejich koncentrace jsou přesně uvedeny dále v textu u konkrétních výsledků. Buněčné vzorky byly sklizeny (v případě vzorků pro SDS-PAGE), nebo fixovány (v případě vzorků pro imunofluorescenci) po 48, nebo 60 hodinách od přidání transfekčního činidla.

#### **4.2.4 Transfekce buněk plazmidem**

Kultury buněk HEK293 nebo U2OS byly v 6-jamkových deskách transfekovány vybraným plazmidem při přibližně 40–50% konfluenci buněk.

Byl připraven transfekční roztok o složení (jednotlivé látky byly přidávány v uvedeném pořadí): 250 µl média Opti-MEM, 2 µg vybraného DNA plazmidu a 4 µl

transfekčního činidla TransIT-2020 Reagent. Výsledný transfekční roztok byl důkladně promíchán a ponechán k inkubaci po dobu 15 minut. Po inkubaci byl transfekční roztok přidán ke stávajícímu médiu (přibližně 2 ml) dané buněčné kultury, médium a roztok byly opatrně promísены tak, aby nedošlo k uvolnění buněk z povrchu.

Použité plazmidy jsou uvedeny dále v textu u konkrétních výsledků. Buněčné vzorky byly sklizeny (v případě vzorků pro SDS-PAGE) po 48 hodinách od přidání transfekčního roztoku.

#### **4.2.5 Nepřímé imunofluorescenční značení proteinů a určení fáze buněčného cyklu**

Konkrétní proteiny v buňkách byly vizualizovány prostřednictvím nepřímého imunofluorescenčního značení a následného snímání pomocí fluorescenčního mikroskopu. Pro tyto účely byly buňky při rekultivaci vysety vždy na sadu krycích sklíček o průměru 10 mm. Transfekce buněk siRNA nebo DNA plazmidem, ozařování, či ovlivnění buněk chemickými sloučeninami pak byly provedeny tak, jak je uvedeno v předcházejících kapitolách.

Po uplynutí časových intervalů (zvolených podle ovlivnění buněk danými chemikáliemi, siRNA či plazmidy) byly buňky fixovány. Jednotlivá sklíčka byla nejprve separována do jednotlivých jamek plastové 24-jamkové misky (jamky obsahovaly 0,5 ml kultivačního média s FBS). Bylo odsáto médium a sklíčka s buňkami byly opatrně opláchnuty 1 ml PBS pufru. Po odsátí PBS pufru bylo do jamek přidáno 0,5 ml 4% paraformaldehydu v PBS, který byl ponechán k působení (stabilizace a fixace) 15 minut. Paraformaldehyd byl následně v jamkách nahrazen vymraženým metanolem o objemu 0,5 ml, miska se sklíčky byla na 20 minut umístěna do -20 °C, kdy docházelo k postupnému odvodnění buněk. Poté byla sklíčka třikrát opláchnuta 1 ml PBS pufru. Před inkubací s primární protilátkou byla sklíčka inkubována s 1% BSA v PBS (0,5 ml/jamka) na dobu 5 minut, kvůli zablokování míst s potenciálními nespecifickými vazbami.

Nepřímé fluorescenční značení proteinů ve fixovaných buňkách bylo provedeno prostřednictvím označení těchto proteinů specifickými protilátkami. Nejprve byly fixované buňky na sklíčkách vystaveny působení roztoku BSA s tzv. primárními protilátkami, které jsou specifické vůči konkrétnímu proteinu (použité protilátky a jejich koncentrace viz kapitola 4.1.4

Protilátky). 20 µl roztoku 1% BSA v PBS s danými primárními protilátkami bylo napipetováno na vrstvu parafilmu a následně byla na kapénky roztoku opatrně položena sklíčka. Inkubace buněk s roztokem protilátek probíhala po dobu 90 minut ve tmě. Po uplynutí doby inkubace byla sklíčka přenesena zpět do jamek plastové misky a byla třikrát opláchnuta 1 ml pufrem PBS (inkubace v PBS během oplachu trvala vždy 3 minuty), čímž došlo k vymytí přebytečných molekul protilátek.

Primární protilátky specificky navázané na dané proteiny v buňkách byly následně označeny tzv. sekundárními protilátkami nesoucími fluorescenční značku. Tyto protilátky vykazují specifickou vazbu vůči protilátkám konkrétního organismu (pokud byla například použita jako primární myší protilátka vůči proteinu BRCA1, byla následně použita sekundární protilátka interagující pouze s myšími protilátkami). Značení sekundární protilátkou probíhalo obdobně jako v případě primárních protilátek (20 µl roztoku 1% BSA v PBS s danými protilátkami), inkubace probíhala po dobu 30 minut, následovalo vymytí přebytečných molekul protilátek prostřednictvím PBS pufrem.

Pro vizualizaci buněčných jader bylo využito barvení DNA pomocí 0,5 ml roztoku DAPI o koncentraci 1 µg/ml po dobu 2 minut, následovalo vymytí přebytečného roztoku DAPI destilovanou vodou a ponechání sklíček k vyschnutí. Suchá sklíčka s buňkami byla na podložní sklíčka upevněna pomocí montovacího činidla Vectashield (vždy 1,6 µl).

Pro určení fáze buněčného cyklu bylo využito značení DNA pomocí EdU, analogu tymidinu (5-etyl-2'-deoxyuridin) a tzv. click reakce. 25µM EdU bylo přidáno k příslušným vzorkům vždy 1 hodinu před fixací buněk. EdU se do nově syntetizované DNA inkorporovalo místo tymidinu u právě se replikujících, tedy S-fázních buněk. Po uplynutí dané doby působení byly buněčné vzorky fixovány. Po fixaci buněk, před inkubací buněk s primárními protilátkami, navazovalo (v případě určení fáze cyklu pomocí EdU) označení inkorporovaných tymidinů v DNA buněk pomocí click reakce. Po odsátí BSA bylo ke vzorkům přidáno 250 µl reakční směsi a vzorky byly inkubovány po dobu 30 minut ve tmě. V průběhu inkubace docházelo k redukci měďnatých iontů ze síranu měďnatého ( $\text{CuSO}_4$ ) na ionty měďné prostřednictvím redukčního činidla askorbátu (ADD), měďné ionty katalyzovaly vznik vazby mezi alkylovou skupinou EdU (inkorporovaného v DNA) a azidem označeným fluorescenční značkou Alexa647. Tímto způsobem byla fluorescenčně označena DNA s inkorporovanými EdU molekulami, tedy buňky procházející replikací. Po inkubaci následovalo opakované

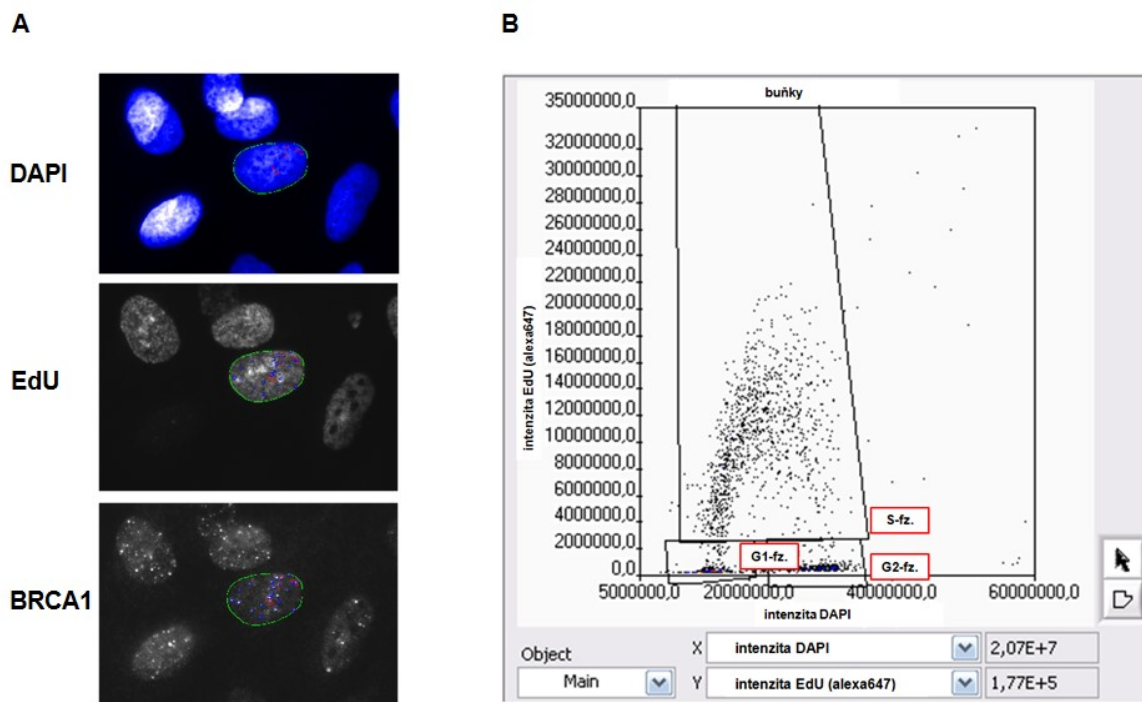
promytí sklíček s fixovanými buňkami pomocí 0,5 ml roztoku BSA a značení proteinů pomocí primárních protilátek).

#### **4.2.6 Fluorescenční mikroskopie a kvantifikace proteinových fokusů v jádrech**

Imunofluorescenčně značené proteiny v buňkách byly vždy nejprve snímány pomocí běžného fluorescenčního mikroskopu Leica DM 6000B vybaveného barevnou kamerou DFC 490. Tento krok byl důležitý především pro kontrolu navázání (označení) specifických protilátek na proteiny. Jako příklad lze uvést, že značené proteiny BRCA1 či RECQ5 jsou proteiny jaderné, pokud by tedy při snímání pod mikroskopem bylo pozorováno, že došlo k nespecifické vazbě protilátek na cytoplazmatické proteiny, byla v průběhu postupu pravděpodobně provedena chyba a experiment bylo potřeba opakovat. Fixována sklíčka byla snímána pomocí objektivu 40x. Pomocí tohoto mikroskopu byly pořízeny i reprezentativní obrázky.

V případě, že nebylo pozorováno nespecifické značení a proteinové fokusy vykazovaly adekvátní charakter, byly fixované buňky podrobeny analýze pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX70 vybaveného zobrazovací platformou ScanR. Jedná se o mikroskop propojený se softwarem, který vždy ve vybraných kanálech fluorescenčního spektra snímá několik stovek pozic na daném sklíčku s fixovanými buňkami, snímáno bylo prostřednictvím objektivu 40x (celkové zvětšení snímků je tedy 40/1,3 N. A., numerická apertura). Získané snímky byly následně analyzovány pomocí přidruženého softwaru (Analysis ScanR software). Nejprve bylo potřeba na snímcích definovat jádra buněk, toto bylo umožněno na základě signálu DAPI navázaného na DNA. Z determinovaných jader byla posléze vybrána pouze ta, která odpovídala buňkám aktuálně neprocházejících mitózou, což bylo provedeno na základě definice adekvátní plochy jádra a faktoru cirkularity jader. U takto vybraných jader byl následně sledován počet proteinových fokusů (míst, kde byl daný protein výrazně nabohacen a obvykle vytvářel cirkulární struktury), a to analýzou snímků stejných pozic na sklíčku snímáných v různých kanálech fluorescenčního spektra. Pomocí softwaru byly identifikovány a spočítány fokusy označených proteinů ve vybraných jádrech (*spot detection modul*). Pro fokusy jednotlivých proteinů byla vždy definována specifická kriteria, tedy maximální a minimální velikost fokusu a kanál fluorescenčního spektra (například protein BRCA1 byl

nepřímo označen specifickou sekundární protilátkou fluoreskující při záření o vlnové délce 568 nm). Tímto způsobem byly spočítány fokusy v několika tisících buněk (obr. 4.2).



**Obr. 4.2: Imunofluorescenční analýza a kvantifikace proteinových fokusů v jádrech buněk v různých fázích buněčného cyklu:** (A) příklad analýzy snímku buněk U2OS, DAPI – jádro, které je vybráno na základě signálu DAPI a faktoru cirkularity, je označeno zeleným ohraničením, EdU – jádro buňky o vysoké intenzitě EdU, tedy jádro buňky procházející S-fází, je zeleně ohraničeno, BRCA1 – vybrané proteinové fokusy BRCA1 jsou modře ohraničeny; (B) graf závislosti intenzity signálu EdU na intenzitě signálu DAPI, kde jsou buňky (jádra) rozděleny podle intenzity signálu DAPI a EdU na G1-fázi, S-fázi a G2-fázi.

V některých případech bylo potřeba rozlišit fázi buněčného cyklu buněk, což bylo umožněno na základě měření intenzity signálu DAPI (odrážející celkové množství DNA) a intenzity signálu EdU v jádrech. Detekované buňky (respektive jádra) byly rozděleny do tří kategorií: buňky v G1-fázi, jež vykazovaly nižší intenzitu DAPI a minimální intenzitu EdU; buňky v S-fázi, které vykazovaly vyšší intenzitu DAPI a vyšší intenzitu EdU; buňky v G2-fázi s vysokou intenzitou DAPI a minimální intenzitou EdU (viz obr. 4.2 B). Kvantifikace proteinových fokusů probíhala obdobně jako u buněk bez rozdělení dle buněčného cyklu, s tím rozdílem, že pomocí softwaru bylo možné identifikovat buněčnou fázi buňky i počet proteinových fokusů v jejím jádře.

Na základě dat získaných pomocí softwaru Analysis ScanR byl posléze stanoven počet buněk s více než 10 fokusy daného proteinu v jádře a následně bylo vypočítáno procentuální zastoupení buněk s více než deseti fokusy ze všech determinovaných buněk (splňujících daná kritéria). Případně bylo vypočítáno procentuální zastoupení buněk s více než deseti fokusy daného proteinu u buněk v konkrétní buněčné fázi. Experimenty byly opakovány vždy třikrát. Z těchto výsledků byl vypočítán aritmetický průměr a stanovena směrodatná odchylka.

#### **4.2.7 Příprava celkového buněčného lyzátu, izolace chromatinové frakce a měření koncentrace proteinů**

Pro studium relativního množství proteinů v buňkách a vlivu různých podmínek na expresi proteinů byl v rámci diplomové práce využíván imublot. Pro tyto účely byly buňky při rekultivaci vysety vždy do jednotlivých jamek 6-jamkové destičky. Transfekce buněk siRNA nebo DNA plazmidem, ozařování či ovlivnění buněk chemickými sloučeninami pak byly provedeny tak, jak je uvedeno v předcházejících kapitolách.

Po uplynutí časových intervalů (zvolených podle ovlivnění buněk danými chemikáliemi, siRNA či plazmidy) byl ze sklizených buněk připraven buď celkový buněčný lyzát, nebo byla izolována pouze chromatinová frakce buněk. Postup sklizení buněčných kultur byl obdobný jako při jejich rekultivaci: médium bylo odsáto, buňky byly opláchnuty předehřátým PBS (1 ml/jamka), vystaveny působení roztoku trypsin/EDTA po dobu 3 minut (0,3 ml/jamka), následně byly buňky uvolněny z povrchu misky lehkým poklepem a bylo přidáno předehřáté médium (1 ml/jamka). Buňky byly z jednotlivých jamek odebrány do jednotlivých mikrozkuvek (pro přípravu celkového lyzátu), nebo byly smíchány buňky dvou jamek (se stejnými podmínkami růstu) a odebrány do mikrozkuvky (pro přípravu chromatinové frakce). Následně byly směsy v mikrozkuvkách centrifugovány (centrifuga s výkyvným rotorem), a to po dobu 1 minuty, při tíhovém zrychlení 300 g a za teploty 4 °C. Tímto byla získána peleta buněk, zbylé médium bylo odsáto a další postup byl proveden za neustálého chlazení buněk na ledu.

V případě přípravy celkového buněčného lyzátu bylo na peletu nanášeno 150–200 µl (dle velikosti pelety) vychlazeného lyzačního pufru, v němž byla peleta resuspendována a lyzační pufr byl ponechán k působení po dobu 10 minut za chlazení na ledu.

V případě izolace chromatinové frakce byla získaná peleta resuspendována ve frakcionačním pufru A (100–150  $\mu$ l dle velikosti pelety) doplněného digitoninem (1 mg/ml) těsně před započítím experimentu, směs byla ponechána k působení po dobu 5 minut za chlazení na ledu, posléze byla směs centrifugována po dobu 4 minut, při 4 °C a při 1500 g. Získaný supernatant byl odebrán a peleta byla resuspendována ve 100–150  $\mu$ l frakcionačního pufru A bez digitoninu, směs byla opět centrifugována po dobu 4 minut, při 4 °C a při 1500 g. Získaný supernatant byl odebrán a peleta byla resuspendována ve 50–150  $\mu$ l frakcionačního (hypotonického) pufru B, následně byl pufr ponechán k působení po dobu 15 minut za chlazení na ledu. Dále byla směs centrifugována po dobu 5 minut, při 4 °C a při 2000 g, opatrně byl odstraněn supernatant a na peletu bylo opatrně nanášeno 50–100  $\mu$ l frakcionačního pufru B.

V případě obou postupů následovalo rozbití DNA pomocí ultrazvuku, tzv. sonikace. Sonikace byla prováděna opakovaně (3–5x sonikační sondou, délka pulzu 10 vteřin, amplituda 2–5 mikronů) do dostatečného rozrušení DNA, přičemž mezi opakováními byly vzorky chlazeny na ledu. Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena nepřímou metodou dle Bradfordové. Do spektrofotometrických kyvet bylo přidáno 200  $\mu$ l činidla Bradfordové, 800  $\mu$ l destilované vody a vždy 10  $\mu$ l standardu, nebo 1  $\mu$ l získaného vzorku. Následně byla měřena absorbance při 595 nm ve spektrofotometru. Nejprve byla sestavena koncentrační řada prostřednictvím standardů (roztoků o dané koncentraci proteinů) a stanovena kalibrační křivka. Na základě výpočtu dle standardizované kalibrační křivky pak byla odečtena koncentrace proteinů u daných získaných vzorků. Stanovená koncentrace byla vždy zaznamenána pro výpočet objemu nanášky vzorku na SDS-PAGE tak, aby na gel bylo nanášeno vždy stejné množství celkového proteinu. Vzorky byly následně připraveny na elektroforetickou separaci – ke vzorku bylo přidáno adekvátní množství vzorkového roztoku pro SDS-PAGE, směs byla promíchána a povařena při 93 °C po dobu 5 minut. Vzorky byly pro další využití uchovávány při -20 °C.

#### **4.2.8 SDS-PAGE**

Proteiny získaných vzorků byly rozděleny na základě molekulové hmotnosti prostřednictvím elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (PAGE) za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS). Při SDS-PAGE byly využívány vždy dva gely – zaostřovací a dělicí gel (složení gelů viz tabulka 4.1.3b). Ve všech případech, kdy byl předmětem zkoumání protein BRCA1, byl jako dělicí gel použit gel gradientový (4–12%).

Elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu byla provedena dle obvyklých postupů ve speciální elektroforetické komůrce naplněné pufrům pro SDS-PAGE. Do jamek byly nanášeny jednotlivé vzorky celkových lyzátů nebo chromatinových frakcí buněk obohacené o vzorkový roztok, bylo nanášeno vždy stejné množství proteinových vzorků (od 40 µg po 100 µg proteinů, dle koncentrace). Jako standard molekulové hmotnosti byl používán značený proteinový žebříček, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder. Elektroforetická separace probíhala při konstantním elektrickém napětí 90 V (při průchodu proteinů zaostřovacím gelem) či 120 V (při separaci proteinů v dělicím gelu) a při maximální výši elektrickém proudu 400 mA, přibližně po dobu 2 hodin.

#### **4.2.9 Imunoblot a jeho obrazová analýza**

V rámci diplomové práce byly využity dvě varianty western blotu (přenos proteinů z gelu na membránu v elektrickém poli), a to „mokrý“ a „polosuchý“ varianta. V obou variantách western blotu byly použity polyvinylidenfluoridové membrány (PVDF, GE Healthcare) aktivované vychlazeným metanolem po dobu 3 minut, dvě sady tří filtračních papírů namočených do transferového pufru pro imunoblot a dělicí polyakrylamidový gel se separovanými proteiny.

V případě „mokrý“ varianty byla využita standardní aparatura naplněná transferovým pufrům pro western blot, transfer proteinů z gelu na membránu probíhal po dobu 1,5 hodiny při konstantním elektrickém proudu 400 mA. „Polosuchý“ varianta western blotu byla obvykle využívána v případech, kdy byl předmětem zájmu protein BRCA1. Opět byla využita standardní aparatura a transfer proteinů z gelu na membránu probíhal po dobu 1 hodiny a 45 minut při konstantním elektrickém proudu 140 mA na jeden gel.

Po ukončení transferu byly membrány přeneseny do roztoku Ponceau S kvůli vizualizaci přenesení proteinů, kde byly po dobu 5–10 minut inkubovány. Veškerá inkubace membrán probíhala za neustálého promíchávání. Po zdokumentování a opakovaném vymytí barviva Ponceau S pufrům TBST byly membrány po 30 minut inkubovány v 3% roztoku BSA s TBST, nebo v 5% roztoku mléka s TBST (část membrány s proteinem BRCA1), a to z důvodu blokování míst na membráně s potenciálními nespecifickými vazbami. Následně byly membrány nařezány dle molekulové hmotnosti studovaných proteinů. Jednotlivé části membrány pak byly inkubovány s naředěnými (v pufru TBST; v 3% BSA s TBST či v 5% mléce s TBST) primárními protilátkami specifickými vůči danému proteinu (imunoblot). Inkubace probíhala přes noc při 4 °C. Následovaly vymytí přebytečné primární protilátky z membrány pomocí pufru TBST, inkubace (30 minut) části membrány se specifickou sekundární protilátkou spojenou s křenovou peroxidázou a vymytí přebytečné sekundární protilátky (použité protilátky viz tabulka 4.1.4a). Detekce proteinů na membráně pak byla umožněna díky aplikaci chemiluminiscenčního substrátu (standardního nebo se zvýšenou citlivostí – Femto), který byl křenovou peroxidázou navázané sekundární protilátky přeměněn na produkt uvolňující záření. Záření bylo zachyceno filmem a vizualizováno prostřednictvím vyvolání filmu v přístroji.

Výsledné snímky membrán po imunoblotu byly podrobeny obrazové analýze v programu ImageJ. Byla změřena intenzita signálu nepřímo vizualizovaného proteinu na filmu, která odráží jeho množství na membráně.

## 5. VÝSLEDKY

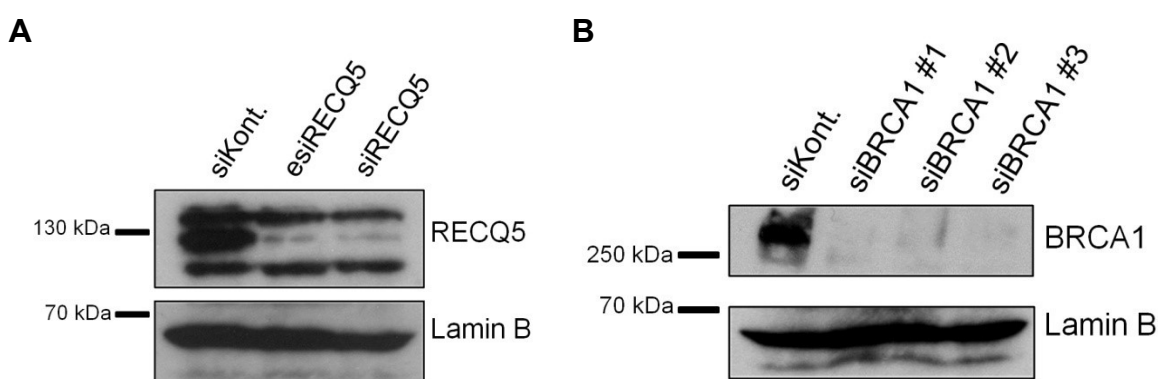
### 5.1 Snížení exprese genů RECQ5 a BRCA1 pomocí RNA interference

Lokalizace proteinu RECQ5 v replikačních fokusech byla popsána již dříve (Kanagaraj *et al.* 2006), avšak jeho přesná úloha v procesu replikace DNA není známá. Abychom mohli studovat, zda je protein RECQ5 důležitý pro reparační procesy probíhající na zastavených replikačních vidlicích, bylo potřeba vytvořit nástroj, kterým bychom účinně snížili expresi tohoto proteinu. Rozhodli jsme se pro použití RNA interference, konkrétně malých interferujících RNA (siRNA). V programu siRNA Wizard v3.1 jsme vybrali siRNA proti RECQ5 a v programu NCBI BLAST jsme ověřili, že tato siRNA není cílena proti oblasti RECQ5 mRNA, která by vykazovala homologii s jiným genem či sekvencí v lidském genomu. Jako druhý alternativní přístup jsme se rozhodli vyzkoušet tzv. esiRNA, (MISSION® esiRNA, Sigma-Aldrich). esiRNA je směs více siRNA, které jsou komplementární k různým místům cílové mRNA, což zajišťuje větší specifitu RNA interference. Zároveň je koncentrace jednotlivých siRNA ve směsi nízká, a tak je minimalizováno riziko vedlejších účinků.

Buňky linie HEK293 byly transfekovány siRNA nebo esiRNA proti RECQ5 (označené jako siRECQ5 a esiRECQ5, specifikace jsou uvedeny v kapitole 4. Materiál a metody, tabulka 4.1.5a). Jako kontrolní siRNA (siKont.) byla použita siRNA interferující s mRNA kódující luciferázu, která se v savčích buňkách nevyskytuje. Tato siRNA byla jako kontrola dále použita ve všech následných experimentech využívajících RNA interferenci. Z buněk sklizených 48 hodin po transfekci byly připraveny celkové buněčné lyzáty, které byly separovány pomocí SDS-PAGE. Proteiny byly dále přeneseny na membránu PVDF metodou western blot a hladiny proteinů RECQ5 a Lamin B, jenž sloužil jako kontrola nanášky, byly detekovány pomocí specifických protilátek.

Transfekce buněk HEK293 jak siRECQ5, tak esiRECQ5 vedla k výraznému snížení hladiny proteinu RECQ5 oproti buňkám transfekovaným kontrolní siRNA (viz obr. 5.1 A). V dalších experimentech jsme tedy využívali oba přístupy – siRECQ5 i esiRECQ5, které nám umožnily studovat buněčné fenotypy navozené deplecí proteinu RECQ5.

V rámci této práce jsme se zaměřili také na protein BRCA1, který je nejen zapojen do oprav poškozené DNA, ale také přispívá ke stabilizaci zastavených replikačních vidlic a k jejich restartu (Schlacher *et al.* 2012). Chtěli jsme zjistit, zda dochází ke vzájemnému ovlivňování proteinů RECQ5 a BRCA1 a zda jsou tyto proteiny zapojeny do stejných procesů. Abychom mohli sledovat změny v buňkách způsobené deplecí proteinu BRCA1, využili jsme opět RNA interferenci. Testovali jsme celkem tři různé siRNA cílené na mRNA kódující protein BRCA1 – siBRCA1 #1, siBRCA1 #2 (obě dle publikovaných zdrojů) a siBRCA1 #3 (dostupná v laboratoři; specifikace použitých siRNA viz tabulka 4.1.5a).



**Obr. 5.1: Snížení exprese RECQ5 a BRCA1 pomocí RNA interference, (A) RECQ5**, imunoblot, vzorky celkového buněčného lyzáátu buněk HEK293 transfekovaných siRECQ5 nebo esiRECQ5 o finální koncentraci 10 nM, nebo kontrolní siRNA (siKont.) o finální koncentraci 10 nM, vždy po dobu 48 hod., Lamin B – kontrola nanášky; **(B) BRCA1**, imunoblot, vzorky celkového buněčného lyzáátu HEK293 buněk transfekovaných siBRCA1 #1 či #2 o finální koncentraci 20 nM, siBRCA1 #3 o finální koncentraci 10nM, nebo kontrolní siRNA (siKont.) o finální koncentraci 10 nM, vždy po dobu 48 hod., Lamin B – kontrola nanášky.

Testování snížení exprese proteinu BRCA1 bylo provedeno obdobně jako v případě výše uvedeného snížení exprese proteinu RECQ5. Protein BRCA1 je relativně velký protein, jehož predikovaná velikost je 220 kDa, avšak gelem při SDS-PAGE putuje při 250 kDa. Při pilotních experimentech přenosu proteinu BRCA1 na membránu a jeho následné detekci se vyskytla celá řada problémů. Kromě optimalizace transferu na membránu jsme testovali řadu komerčně dostupných protilátek, než byla detekce BRCA1 úspěšná. Výsledný imunoblot (obr. 5.1 B) ukazuje dramatické snížení hladiny proteinu BRCA1 ve vzorcích buněk HEK293 transfekovaných siBRCA1 #1, siBRCA1 #2, nebo siBRCA1 #3 oproti buňkám

transfekovaným kontrolní siRNA. V následných experimentech jsme pro depleci proteinu BRCA1 v buňkách používali zejména siBRCA1 #1 (dále siBRCA1).

## **5.2 Vliv helikázy RECQ5 na funkci proteinů podílejících se na opravě poškozené DNA**

Cílem prvotních experimentů bylo zkoumat spojitost mezi helikázou RECQ5 a proteiny podílejícími se na reparaci DNA. Li *et al.* v roce 2011 ukázali, že deplece RECQ5 vede k akumulaci dvouřetězcových zlomů DNA vznikajících během replikace a že se tyto zlomy objevují v závislosti na probíhající transkripci (Li *et al.* 2011). V naší laboratoři bylo zjištěno, že helikáza RECQ5 asociuje s transkripčním komplexem v místech, kde probíhá replikace. Výsledky naší laboratoře spolu s daty prezentovanými ve článku Li *et al.* 2011 naznačovaly, že je helikáza RECQ5 zapojena do oprav replikačních vidlic po jejich kolizi s transkripčním aparátem (Urban *et al.* 2016).

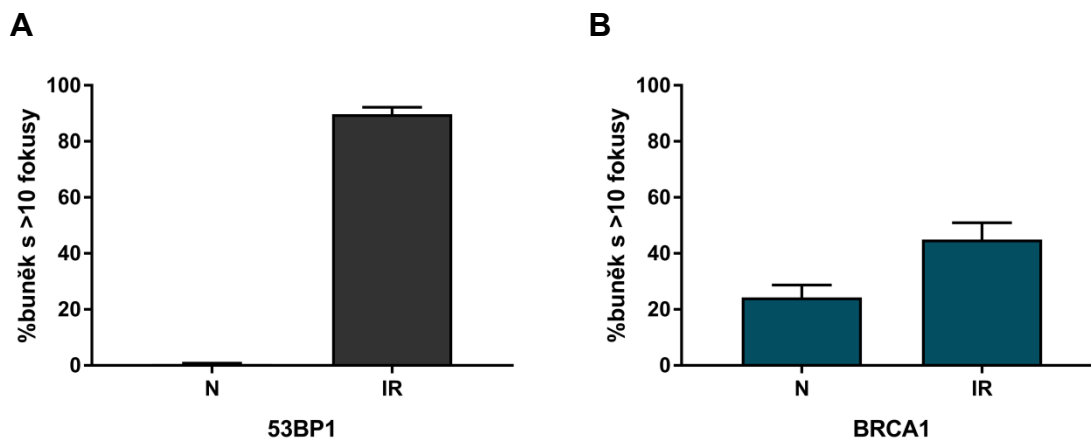
V rámci této diplomové práce bylo nejprve studováno, zda je helikáza RECQ5 zapojena do oprav replikačních vidlic po jejich srážce s transkripčním komplexem v procesu zahrnujícím i některý z proteinů, u něhož je známo, že se podílí na rozpoznávání či opravě poškozené DNA. Vybrali jsme proteiny 53BP1 a BRCA1, které jsou zapojeny v rozdílných mechanismech reparace dvouvláknových zlomů. Protein 53BP1 (*p53-binding protein 1*) vykazuje asociaci s poškozenou DNA a zahajuje opravu dvouřetězcových zlomů DNA pomocí nehomologního spojení zlomených konců DNA (Nakamura *et al.* 2006). Protein BRCA1 zajišťuje opravu dvouřetězcových zlomů DNA pomocí homologní rekombinace a je známo, že je zapojen do oprav zastavených replikačních vidlic (Scully *et al.* 1997; Schlacher *et al.* 2012). Již za standardních fyziologických podmínek lze v buňkách pozorovat akumulaci jak proteinu BRCA1, tak i proteinu 53BP1 ve formě ohnisek, tzv. fokusů. Množství a intenzita těchto fokusů však rapidně vzrůstá při podmínkách vyvolávajících poškození DNA (např. ionizující záření) (Chapman *et al.* 2012).

Schopnost proteinů 53BP1 a BRCA1 tvořit fokusy v místě poškození DNA v jádrech buněk jsme nejprve ověřili a kvantitativně analyzovali v našem systému za využití fluorescenčního mikroskopu a softwaru Analysis ScanR. Byly zkoumány neovlivněné buňky

linie U2OS a buňky ozářené gama zářením o intenzitě 2 Gy, které indukovalo poškození DNA. Dané proteiny byly ve fixovaných buňkách detekovány pomocí specifických protilátek a nepřímé imunofluorescence. Vzorky byly snímány v plně automatizovaném módu na fluorescenčním mikroskopu Olympus IX70 vybaveném zobrazovací platformou ScanR. Získané snímky byly analyzovány přidruženým softwarem (Analysis ScanR software). Jádra buněk byla definována na základě signálu DAPI a s pomocí softwaru (*spot detection modul*) v nich byly determinovány a kvantifikovány fokusy daného proteinu. Poté bylo stanoveno procentuální zastoupení buněk, u nichž byl počet fokusů daného proteinu v jádře větší než 10. Experiment byl opakován celkem třikrát.

V buňkách U2OS rostoucích za normálních podmínek jsme detekovali v průměru 2 fokusy proteinu 53BP1 na jádro, přičemž buněk, které měly více než 10 fokusů na jádro, bylo méně než jedno procento (0,6 % buněk, obr. 5.2 A; reprezentativní obrázky k následným experimentům jsou shrnuty v obr. 5.5). U buněk ozářených 2 Gy jsme pozorovali dramatický nárůst množství fokusů 53BP1, kdy 90 % buněk mělo více než 10 fokusů na jádro (obr. 5.2 A). Oproti nízkým počtům fokusů 53BP1 je přítomnost jaderných fokusů BRCA1 v asynchronní populaci U2OS buněk rostoucích za normálních podmínek výrazně častější, průměrný počet fokusů na jádro byl stanoven na 6. Detekovali jsme 24 % kontrolních buněk s více než 10 fokusy proteinu BRCA1. Počet buněk s takto vysokým počtem fokusů BRCA1 vzrostl po ozáření na 45 % (obr. 5.2 B). Přestože oba typy proteinových fokusů, 53BP1 i BRCA1, jsou indukovány ozářením, jejich rozdílné počty v kontrolních buňkách a míra indukce po ozáření naznačují, že operují v rozdílných mechanismech.

Hypoteticky můžeme usuzovat, že protein 53BP1 je výrazněji zapojen do rozpoznávání a opravy dvouřetězcových zlomů DNA navozených iradiací, zatímco BRCA1 se ve vyšší míře podílí na opravě poškození endogenního původu (např. poškození spojené s replikací DNA). Avšak abychom mohli určit, do jaké míry je tvorba fokusů BRCA1 nebo 53BP1 proteinů ovlivněna replikací a zda by se mohlo jednat o ohniska oprav replikačních vidlic, zaměřili jsme se na určení fáze buněčného cyklu, kdy k tvorbě těchto fokusů dochází.

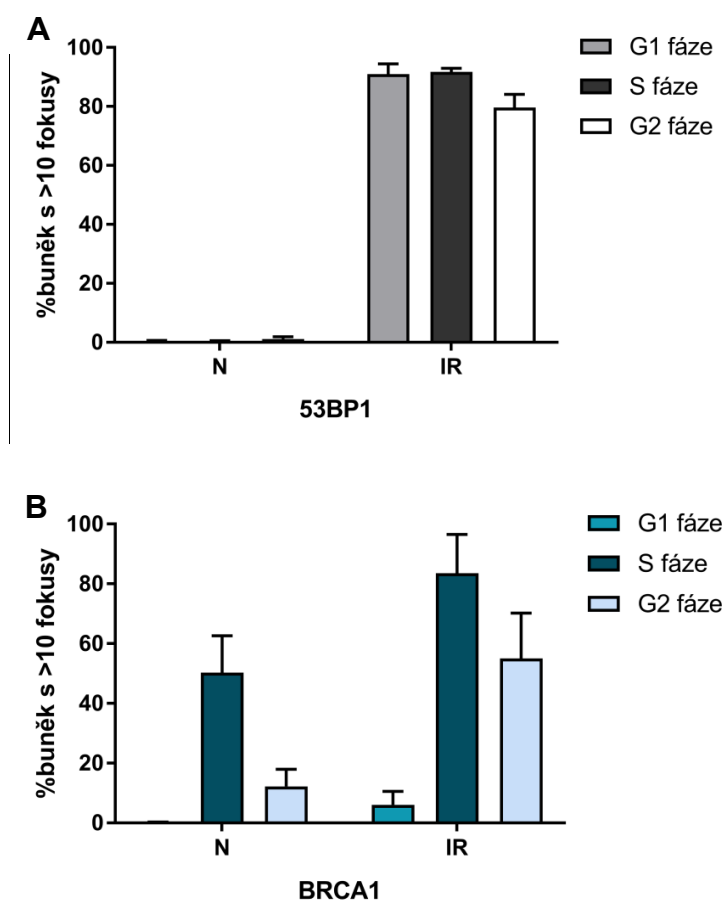


**Obr. 5.2: Vliv iradiace na formování fokusů proteinů 53BP1 a BRCA1 v jádrech buněk U2OS;** kvantitativní analýza fokusů proteinů **53BP1 (A)** a **BRCA1 (B)** v jádrech buněk U2OS značených nepřímou imunofluorescencí, provedená prostřednictvím softwaru přidruženém k fluorescenčnímu mikroskopu; výška sloupce ukazuje průměrné procentuální zastoupení buněk s více než 10 fokusy příslušného proteinu v jádře ze všech analyzovaných buněk; N – neovlivněné buňky, IR – ozářené buňky (záření o síle 2 Gy), chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.

K identifikaci fáze buněčného cyklu bylo využito značení nově syntetizované DNA pomocí analogu tymidinu EdU a tzv. click reakce (viz kapitoly 4.2.5 a 4.2.6). Do média buněčné kultury byl EdU o finální koncentraci 25  $\mu$ M přidán vždy 1 hodinu před fixací buněk. K inkorporaci EdU docházelo u právě replikujících, tedy S-fázních, buněk. Buňky byly na základě intenzity signálu DAPI (odrážející celkové množství DNA) a intenzity signálu EdU (pouze nově syntetizovaná DNA) v jádrech rozděleny na buňky v G1-fázi (nižší intenzita DAPI a minimální intenzita EdU), S-fázi (vzrůstající intenzita DAPI a EdU) a G2-fázi (maximální intenzita DAPI a minimální intenzita EdU). Zbylé podmínky byly zachovány a analýza byla provedena obdobně jako v předchozím experimentu. Procento buněk s více než 10 fokusy daného proteinu v jádře bylo u buněk jednotlivých fází cyklu stanoveno zvlášť. Experiment byl opakován třikrát.

Jen nepatrné množství buněk rostoucích za normálních podmínek mělo více než 10 fokusů 53BP1, a to ve všech studovaných fázích buněčného cyklu, což je v souladu s předchozími experimenty (G1-fáze: 0,4 %, S-fáze: 0,4 %, G2-fáze: 1,08 % buněk). Po ozáření se počet buněk s více než 10 fokusy 53BP1 výrazně zvýšil, a to srovnatelně v buňkách ve všech studovaných fázích buněčného cyklu (G1-fáze: 91 %, S-fáze: 92 %, G2-fáze: 80 % buněk, obr. 5.3 A). Míra tvorby fokusů 53BP1 po ozáření je tedy nezávislá na fázi buněčného cyklu, ve které se buňka nachází, a není ovlivněna probíhající replikací DNA. V případě

fokusu proteinu BRCA1 však detailní rozdělení buněk dle jejich buněčné fáze ukázalo, že za normálních podmínek mají více než 10 fokusů BRCA1 především buňky v S-fázi (50 % S-fázních buněk) a část buněk v G2-fázi (12 %) zatímco téměř žádné v G1-fázi (0,1 %). Fokusy tvořené v S-fázi pravděpodobně souvisí s úlohou proteinu BRCA1 v opravě replikačních vidlic (Scully *et al.* 1997; Schlacher *et al.* 2012). Po ozáření dochází k navýšení počtu buněk s více než 10 fokusy BRCA1 ve všech kategoriích (G1-fáze: 6 %, S-fáze: 84 %, G2-fáze 55 % buněk, obr. 5.3 B), přičemž nejvyššího procenta dosahují buňky v S-fázi. Tyto výsledky naznačují, že protein BRCA1 je zapojen do oprav poškození DNA endogenního původu generovaného v průběhu replikace i oprav replikačních vidlic zastavených na zlomech DNA vyvolaných iradiací.



**Obr. 5.3: Formování fokusů proteinů 53BP1 a BRCA1 v jednotlivých fázích buněčného cyklu u neovlivněných a ozářených buněk; kvantitativní analýza fokusů proteinů 53BP1 (A) a BRCA1 (B) v jádrech buněk U2OS značených nepřímou imunofluorescencí provedená prostřednictvím softwaru přidruženém k fluorescenčnímu mikroskopu; výška sloupce ukazuje průměrné procentuální zastoupení buněk s více než 10 fokusy příslušného proteinu u buněk v jednotlivých fázích cyklu, N – neovlivněné buňky, IR – ozářené buňky (2 Gy), chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.**

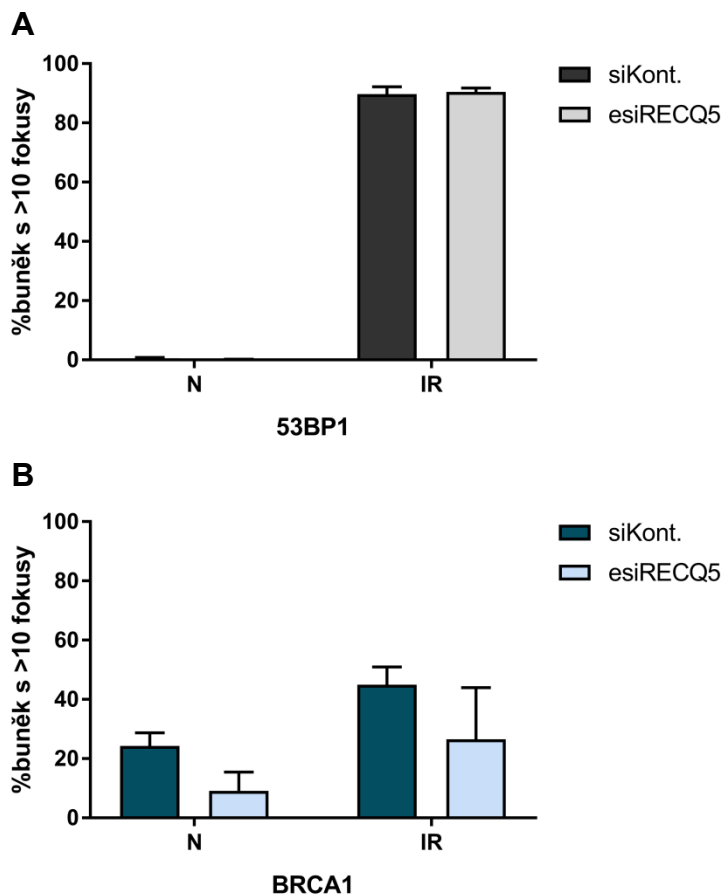
V buněčné linii U2OS, kde jsme experimentálně definovali počty fokusů proteinů 53BP1 a BRCA1 za normálních i stresových (ozáření) podmínek, jsme v dalších experimentech sledovali vliv snížené exprese RECQ5 na tvorbu těchto fokusů. Cílem bylo zjistit, zda existuje korelace mezi hladinou RECQ5 a tvořením fokusů proteinů 53BP1 a BRCA1 v buněčných jádrech.

Buňky U2OS byly transfekovány kontrolní siRNA, nebo esiRECQ5 po dobu 48 hodin a ponechány růst za normálních podmínek nebo byly ozářeny 2 Gy jednu hodinu před fixací a imunoznačením. Kvantitativní analýza mikroskopických dat probíhala stejně jako v předchozím experimentu. Experiment byl opakován třikrát.

Z výsledných grafů procentuálního zastoupení buněk s více než 10 fokusy daného proteinu v jádře (obr. 5.4) lze odečíst, že deplece RECQ5 má minimální vliv na formování fokusů 53BP1. U kultur rostoucích za normálních podmínek bylo v případě buněk transfekovaných kontrolní siRNA identifikováno 0,6 % buněk s více než 10 fokusy 53BP1, v případě buněk transfekovaných esiRECQ5 pak 0,2 %. Po ozáření bylo u buněk transfekovaných kontrolní siRNA pozorováno 90 % buněk s více než 10 fokusy 53BP1, stejné procento bylo identifikováno i u ozářených buněk transfekovaných esiRECQ5 (obr. 5.4 A). V jádrech neovlivněných buněk transfekovaných kontrolní siRNA, stejně tak v jádrech buněk rostoucích za normálních podmínek a transfekovaných esiRECQ5, byly pozorovány průměrně 2 fokusy 53BP1 na buněčné jádro.

Deplece RECQ5 naopak vedla k poklesu tvorby fokusů proteinu BRCA1 (obr. 5.4 B) u buněk rostoucích za normálních podmínek i těch ozářených. Zatímco v případě neovlivněných buněk transfekovaných kontrolní siRNA jsme detekovali 24 % buněk s více než 10 fokusy proteinu BRCA1, u buněk rostoucích za normálních podmínek a transfekovaných esiRECQ5 jich bylo pouze 9 %. Pozorovali jsme také snížení průměrného počtu BRCA1 fokusů na jádro při snížení hladiny proteinu RECQ5, a to na 3 fokusy na jádro (neozářené buňky). K poklesu formování fokusů proteinu BRCA1 došlo po snížení hladiny RECQ5 helicázy i v ozářených buňkách, konkrétně ze 45 % buněk s více než 10 fokusy u kultur transfekovaných kontrolní siRNA na 27 % buněk u kultur transfekovaných esiRECQ5. Dle článku Li *et. al.* deplece RECQ5 způsobuje nárůst hladiny dvouřetězcových zlomů DNA vzniklých během replikace. Na základě těchto dat se dalo předpokládat, že po depleci RECQ5 se zvýší poškození DNA a bude docházet k navýšení zapojení proteinů podílejících se na

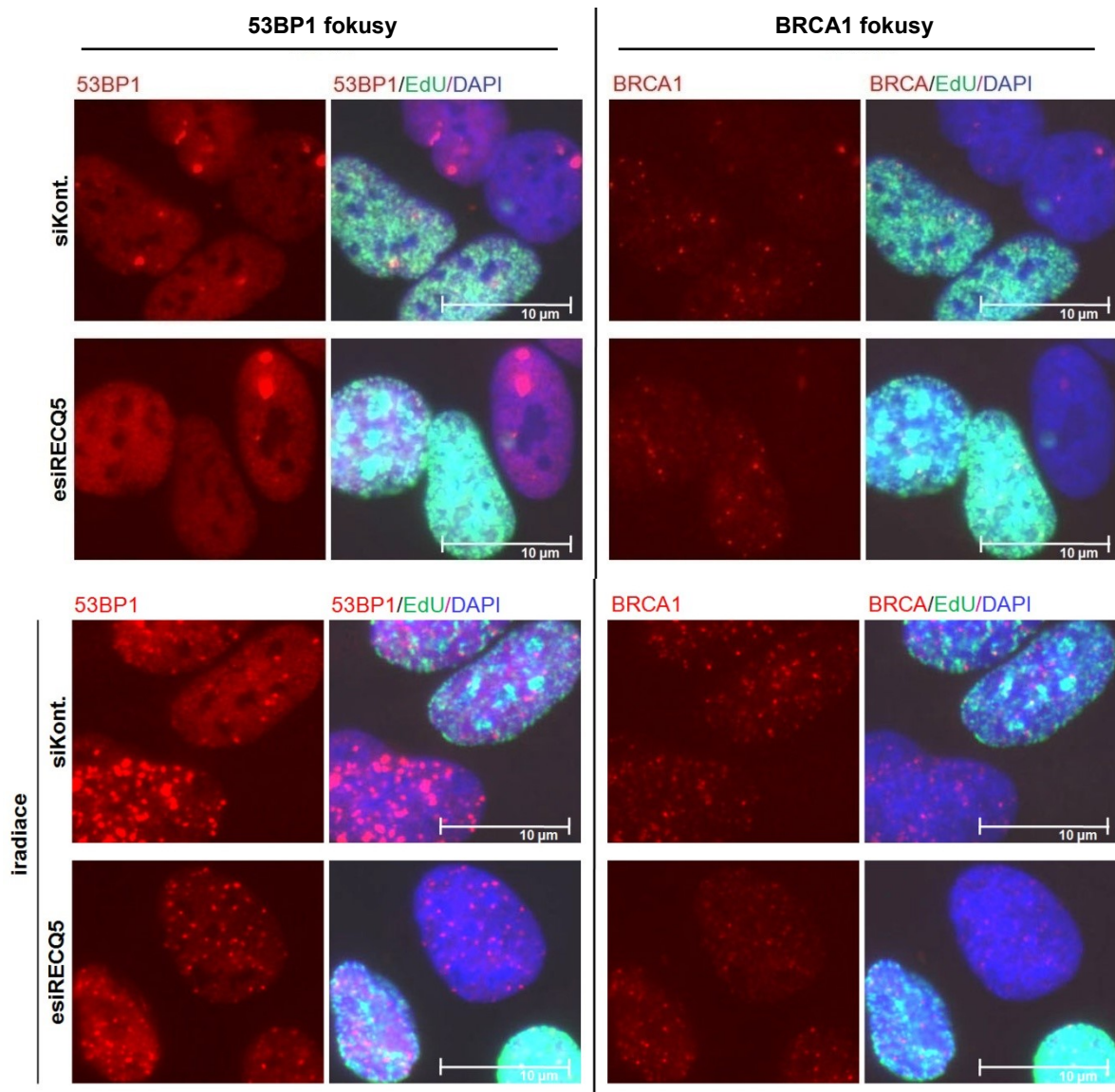
opravách zlomů DNA v místech poškození, tedy i proteinu BRCA1 (bude pozorováno více fokusů BRCA1). Naše výsledky ale ukazují, že snížená exprese RECQ5 vede ke snížení tvorby fokusů BRCA1. Což naznačuje, že tvorba fokusů BRCA1 je částečně závislá na přítomnosti RECQ5 helikázy. Jedním z možných vysvětlení tohoto pozorování je, že se protein RECQ5 při problémech s postupem replikační vidlice podílí na procesech předcházejících formaci fokusů proteinu BRCA1.



**Obr. 5.4: Vliv deplece helikázy RECQ5 na tvorbu fokusů proteinů podílejících se na opravě poškozené DNA, 53BP1 a BRCA1; kvantitativní analýza fokusů proteinů 53BP1 (A) a BRCA1 (B) v jádrech buněk U2OS značných nepřímou imunofluorescencí provedená prostřednictvím softwaru přidruženém k fluorescenčnímu mikroskopu; výška sloupce ukazuje průměrné procentuální zastoupení buněk s více než 10 fokusy příslušného proteinu u buněk transfekovaných kontrolní siRNA (siKont., o finální koncentraci 10 nM, po dobu 48 hodin), nebo esiRECQ5 (o finální koncentraci 10nM, po dobu 48 hod.), N – neovlivněné buňky, IR – ozářené buňky (záření 2 Gy), chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.**

Reprezentativní snímky k výše popsaným výsledkům jsou souborně ukázány na obr. 5.5. Tento obrázek poskytuje srovnání počtu fokusů proteinů 53BP1 a BRCA1 v buňkách U2OS s normální a sníženou expresí helikázy RECQ5, které rostly za normálních podmínek nebo byly vystaveny ozáření.

Tato data v souhrnu ukazují, že v buňkách vystavených ionizujícímu záření dochází k dramatickému nárůstu počtu jaderných fokusů proteinu 53BP1 i BRCA1 (zvýšení procenta buněk s více než 10 fokusy). Míra tvorby fokusů proteinu 53BP1 v odpovědi na ozáření nebyla závislá na fázi buněčného cyklu ani na přítomnosti proteinu RECQ5. Získaná data ukazují, že protein 53BP1, zprostředkovávající NHEJ, není pravděpodobně zapojen v procesu oprav endogenního poškození replikačních vidlic a operuje v mechanismech nezávislých na přítomnosti RECQ5. Výsledky dále ukazují, že počet fokusů BRCA1 je nejvyšší v jádrech replikujících buněk (při porovnání procenta buněk s více než 10 fokusy v S-fázních buňkách oproti buňkám v G1 a G2-fázi), a to v normální i ozářené kultuře. Deplece proteinu RECQ5 vede ke snížení počtu těchto fokusů. To je v souladu s naší hypotézou, podle které se helikáza RECQ5 podílí spolu s proteinem BRCA1 na opravě endogenního poškození vzniklého v průběhu replikace. Zda se jedná o endogenní poškození DNA vznikající v závislosti na probíhající transkripci, jsme zjišťovali v následujících experimentech.



**Obr. 5.5: Vliv RECQ5 helicázy na tvorbu fokusů proteinů 53BP1 a BRCA1 podílejících se na opravě poškozené DNA, snímky buněčných jader určených prostřednictvím inkorporace DAPI do DNA, buňky procházející S-fází jsou identifikovány pomocí EdU inkorporace do nově syntetizované DNA (25 μM, 1 hod.), fokusy proteinů 53BP1 a BRCA1 jsou značeny nepřímou imunofluorescencí, buňky U2OS byly transfekovány esiRECQ5 nebo kontrolní siRNA (siKont.) o finální koncentraci 10 nM (transfekce 48 hodin), část buněk (spodní část – iradiace) byla vystavena gama záření o síle 2 Gy.**

### **5.3 Vliv snížené exprese RECQ5 a inhibice transkripce na formování BRCA1 fokusů**

Cílem dalších experimentů bylo získat důkazy podporující naši hypotézu, podle které se proteiny BRCA1 a RECQ5 spolupodílí na opravách endogenního poškození. Respektive jsme chtěli dále zkoumat, zda jsou proteiny BRCA1 a RECQ5 zapojeny do stabilizace a oprav replikačních vidlic specificky po jejich kolizi s transkripčními komplexy.

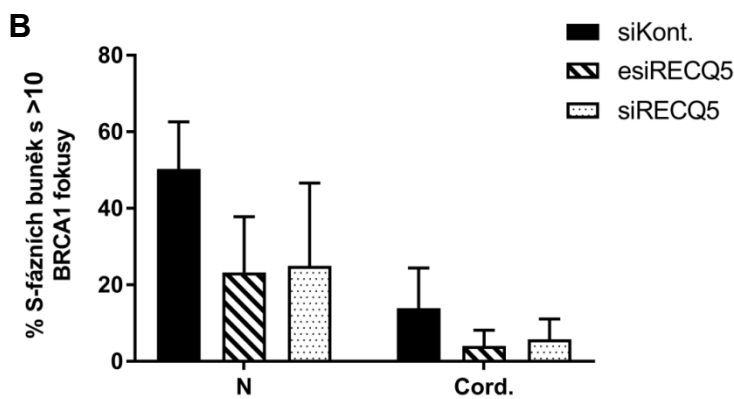
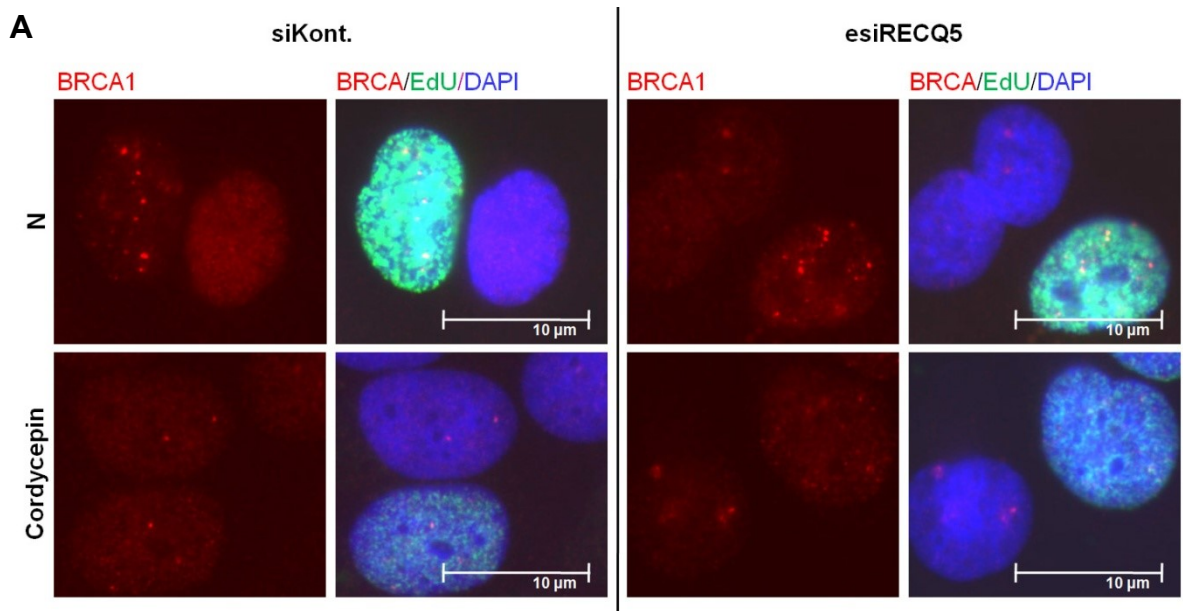
Za tímto účelem, jsme sledovali počty fokusů proteinu BRCA1 v buňkách U2OS s normální nebo se sníženou expresí proteinu RECQ5 rostoucích za normálních podmínek a za podmínek, kdy byla krátkodobě inhibována transkripce. Kvantitativní analýza formování fokusů BRCA1 v jádře byla provedena obdobně jako v předchozích experimentech. Buňky linie U2OS byly vystaveny působení kontrolní siRNA (kont. siRNA), siRECQ5, nebo esiRECQ5 po dobu 48 hodin. Na poslední 3 hodiny před fixací byl k části kontrolních buněk a buněk s depletovaným RECQ5 přidán inhibitor transkripce cordycepin o výsledné koncentraci 50  $\mu$ M. Cordycepin je derivátem adenosinu (3'-deoxyadenosin), který je inkorporován do nově vznikající RNA během transkripce místo adenosinu a zamezuje dalšímu prodlužování řetězce RNA. Transkripce je předčasně ukončena a transkripční aparát disociuje z DNA. Pro identifikaci S-fázních buněk byl k buňkám 1 hodinu před fixací přidán EdU ve výsledné koncentraci 25  $\mu$ M. Nepřímé imunofluorescenční značení, snímání a analýza obrazových dat byly provedeny stejně jako v předchozích experimentech. V tomto experimentu jsme se zaměřili pouze na buňky procházející S-fází (EdU pozitivní buňky), protože jak vyplynulo z předcházejících experimentů, k nejvyšší tvorbě fokusů BRCA1 dochází v průběhu replikace, a chtěli jsme ověřit, zda zastavení a uvolnění transkripčního aparátu, které teoreticky sníží četnost kolizí mezi replikačními a transkripčními komplexy, bude mít vliv na tvorbu fokusů BRCA1 v průběhu replikace. Pro jednotlivé podmínky bylo stanoveno procentuální zastoupení S-fázních buněk, u nichž byl počet fokusů proteinu BRCA1 v jádře větší než 10. Experiment byl opakován třikrát.

Při ovlivnění buněk U2OS cordycepinem jsme v jádrech buněk pozorovali pokles tvorby fokusů proteinu BRCA1 v porovnání s neovlivněnými buňkami (viz obr. 5.6 A). Kvantitativní analýza S-fázních buněk naše pozorování potvrdila a ukázala, že procento S-fázních buněk s více než 10 fokusy BRCA1 klesá po inhibici transkripce cordycepinem na

14 % z původních 50 % v neovlivněných buňkách (viz obr. 5.6 B). Tyto výsledky potvrzují hypotézu, že transkripce představuje blok pro postupující replikační vidlici a že disociace transkripčního komplexu z DNA vede ke snížení počtu zastavených replikačních vidlic, a tak i ke snížení počtu fokusů BRCA1 v průběhu replikace.

Dále jsme sledovali, jaký vliv bude mít na tvorbu BRCA1 fokusů v S-fázních buňkách s probíhající nebo inhibovanou transkripcí deplece proteinu RECQ5, který interaguje jak s transkripčním komplexem (RNA polymerázy I a II) (Islam *et al.* 2010; Kanagaraj *et al.* 2010; Urban *et al.* 2016), tak s replikačním aparátem (PCNA) (Kanagaraj *et al.* 2006). Deplece RECQ5 (navozená transfekcí buněk siRECQ5 nebo esiRECQ5) vedla k výraznému poklesu tvorby BRCA1 fokusů v jádrech S-fázních buněk U2OS při srovnání s buňkami transfekovanými kontrolní siRNA (obr. 5.6 A a B). Tato data jsou v souladu s výsledky přecházejících experimentů, podle kterých formování fokusů BRCA1 probíhá zejména během S-fáze (obr. 5.3 B a 5.5) a je částečně závislé na přítomnosti RECQ5 (obr. 5.4 B). Avšak u buněk, které byly transfekovány esiRECQ5 nebo siRECQ5 a zároveň byly ovlivněny cordycepinem, je pokles tvorby fokusů proteinu BRCA1 nejmarkantnější. U těchto buněk byla pozorováno pouze 4 % jader s více než 10 fokusy BRCA1 (esiRECQ5), respektive 6 % (siRECQ5). Přičemž buňky ovlivněné cordycepinem a transfekované kontrolní siRNA vykazovaly přibližně 14 % buněk s více než 10 fokusy BRCA1. Ke snížení procenta S-fázních buněk s více než 10 fokusy BRCA1 tedy dochází vlivem deplece proteinu RECQ5 i u buněk ovlivněných cordycepinem, tedy se zastavenými a uvolněnými transkripčními aparáty.

Předpokládáme, že zastavení a uvolnění transkripčního komplexu z DNA působením cordycepinu vede ke snížení počtu kolizí mezi replikačními a transkripčními komplexy, tudíž ke snížení počtu zastavených replikačních vidlic a k pozorovanému poklesu fokusů proteinu BRCA1 v průběhu replikace. Z toho vyvozujeme, že protein BRCA1 je pravděpodobně zapojen do oprav replikačních vidlic po jejich srážkách s transkripčním aparátem. Deplece proteinu RECQ5 vedla k dalšímu poklesu formování fokusů BRCA1, a to i v případě buněk se zastavenou transkripcí. Z toho vyvozujeme, že se protein BRCA1 společně s proteinem RECQ5 podílí na stabilizaci a opravě replikačních vidlic po jejich srážce s transkripčním komplexem.



**Obr. 5.6: Vliv snížené exprese RECQ5 a inhibice transkripce na formování BRCA1 fokusů,** (A) Fluorescenční snímky buněk U2OS, u kterých jsou jádra zvýrazněna pomocí vazby DAPI do DNA, přičemž buňky procházející S-fází jsou identifikovány prostřednictvím EdU inkorporace do nově syntetizované DNA (25μM, 1 hod.) a BRCA1 fokusy jsou nepřímo označeny specifickými protilátkami; buňky byly transfekovány esiRECQ5 nebo siRECQ5 o finální koncentraci 10 nM, nebo kontrolní siRNA (siKont.) o finální koncentraci 10 nM, část buněk byla ovlivněna cordycepinem (50 μM, 3 hod.), N – neovlivněné buňky; (B) kvantitativní analýza nepřímo značených fokusů proteinu BRCA1 provedená prostřednictvím softwaru přidruženém k fluorescenčnímu mikroskopu na základě snímků (A), výška sloupce ukazuje průměrné procentuální zastoupení S-fázních buněk s více než 10 BRCA1 fokusy, N – neovlivněné buňky, Cord. – cordycepin, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.

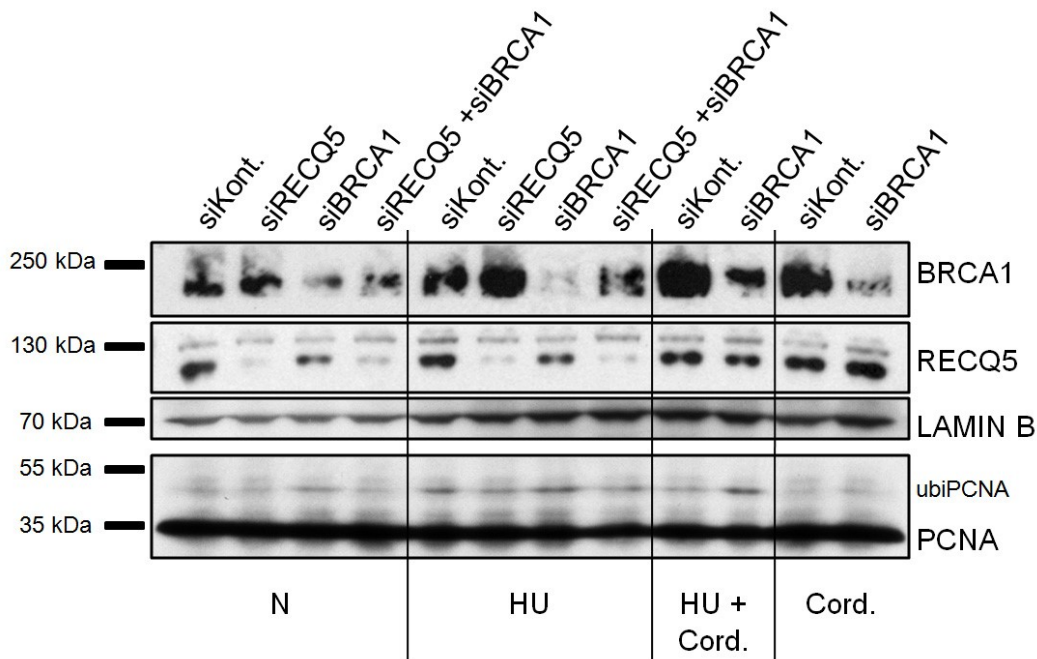
## 5.4 Vliv snížené exprese RECQ5 a inhibice transkripce na ubiquitinaci PCNA

V průběhu řešení diplomové práce bylo na kvasinkovém modelu *Saccharomyces cerevisiae* ukázáno, že po zastavení replikačních vidlic dochází v rámci znovuoobnovení replikace k uvolnění PCNA z opožďujícího se řetězce DNA a že tato disociace je částečně závislá na ubiquitinaci PCNA (Yu *et al.* 2014). Zda podobný mechanismus funguje i v případě replikačních komplexu zastavených při kolizi s transkripčním komplexem nebylo známo. Jelikož naše data ukazují na zásadní roli helicázy RECQ5 v řešení kolizí mezi transkripčními a replikačními komplexy, tedy v krocích nezbytných pro obnovení replikace, a navíc protein RECQ5 obsahuje funkční interakční doménu pro PCNA, domníváme se, že RECQ5 přispívá k odstranění PCNA ze zastavené replikační vidlice. Rozhodli jsme se proto prozkoumat, zda je úloha proteinů RECQ5 a BRCA1 spojena s procesem uvolňování PCNA ze zastavených replikačních vidlic. Studovali jsme vliv deplece proteinů RECQ5 a BRCA1 na ubiquitinaci PCNA a závislost tohoto procesu na transkripci.

Buňky linie HEK293 byly transfekovány buď jednotlivými siRNA – kontrolní siRNA (finální koncentrace 10 nM), siRECQ5, siBRCA1 (v obou případech o finální koncentraci 20 nM), nebo směsí siRNA – siRECQ5 a siBRCA1 (jednotlivé siRNA o finální koncentraci 10 nM) po dobu 48 hodin. U vybraných vzorků byla inhibována replikace přidáním hydroxyurey 16 hodin před sklízením buněk (a to o finální koncentraci 2 mM, po 32 hodinách od počátku transfekce). Hydroxyurea inhibuje enzym ribonukleotid-redukázu zajišťující redukci ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy. Deplece deoxyribonukleotidů pak vede k pozastavení replikačního aparátu na DNA. U některých vzorků buněk byla inhibována transkripce pomocí cordycepinu (50  $\mu$ M, 2 hodiny před sklízením buněk). A u dalších vzorků pak byla inhibována jak replikace (hydroxyurea, 2mM, 16 hodin před sklízením buněk), tak transkripce (50  $\mu$ M, 2 hodiny před sklízením). Všechny vzorky byly sklizeny najednou po 48 hodinách od počátku transfekce a byla z nich izolována chromatinová frakce (viz kapitola 4.2.7). Vzorky chromatinové frakce byly separovány pomocí SDS-PAGE. Protein PCNA migruje gelem ve dvou frakcích, pomaleji migrující frakce je tvořena ubiquitinovaným PCNA (zapříčiněno vyšší molekulovou hmotností modifikovaného PCNA) a rychleji migrující frakce

je tvořena nemodifikovaným PCNA. Proteiny byly následně přeneseny na membránu a detekovány specifickými protilátkami.

Ve výsledném imunoblotu jsme pozorovali změny v hladině ubiquitovaného PCNA u různých vzorků chromatinové frakce s jednotlivými siRNA či inhibitory replikace a transkripce (obr. 5.7). Na imunoblotu byla pomocí specifických protilátek potvrzena deplece proteinů RECQ5 a BRCA1. Lamin B sloužil jako kontrola nanášky. Jelikož rozdíly v hladinách ubiquitovaného PCNA byly v některých případech malé, rozhodli jsme se podrobit výsledky kvantifikaci, abychom se vyhnuli subjektivním interpretacím. Kvantifikace byla provedena na základě obrazové analýzy (denzitometrie) intenzity signálů ubiquitovaného PCNA a kontroly nanášky laminu B na snímku imunoblotu pomocí softwaru ImageJ. Výsledný imunoblot byl však zatížen technickými chybami, jak lze vidět na reprezentativním obrázku 5.7. Za prvé, přetrvávaly komplikace s transferem proteinu BRCA1 a jeho detekcí. Za druhé, intenzita signálu proteinu lamin B byla v případě vzorků neovlivněných buněk nižší než u buněk ovlivněných inhibitory transkripce a replikace, kde byla navíc výrazně vyšší intenzita pozadí. Tento problém se objevil, přestože koncentrace proteinů v použitých vzorcích chromatinové frakce byla měřena metodou dle Bradfordové a vzorky byly upraveny tak, aby na gel bylo nanášeno vždy stejné množství proteinů. Technické nedostatky imunoblotu, které mohly ovlivnit obrazovou a kvantitativní analýzu, byly zřejmě způsobeny chybami v přenosu proteinů na membránu. Bohužel se v rámci vypracování této diplomové práce nepodařilo získat kvalitnější imunoblot, všechna opakování experimentu byla zatížena různými technickými nedostatky. V této diplomové práci jsou interpretovány pouze výsledky na základě reprodukcibilně pozorovaných změn v ubiquitinaci PCNA, které byly ověřeny kolegy z laboratoře. Podkladem pro tyto výsledky je imunoblot na obr. 5.7 a jeho kvantifikace za prvé bez relativizace k nanášce (obr. 5.8 A) a za druhé tak, že intenzita ubiquitovaného PCNA byla relativizována dle kontroly nanášky (laminu B, obr. 5.8 B). Při obou způsobech vynesení jsou zásadní změny patrné.



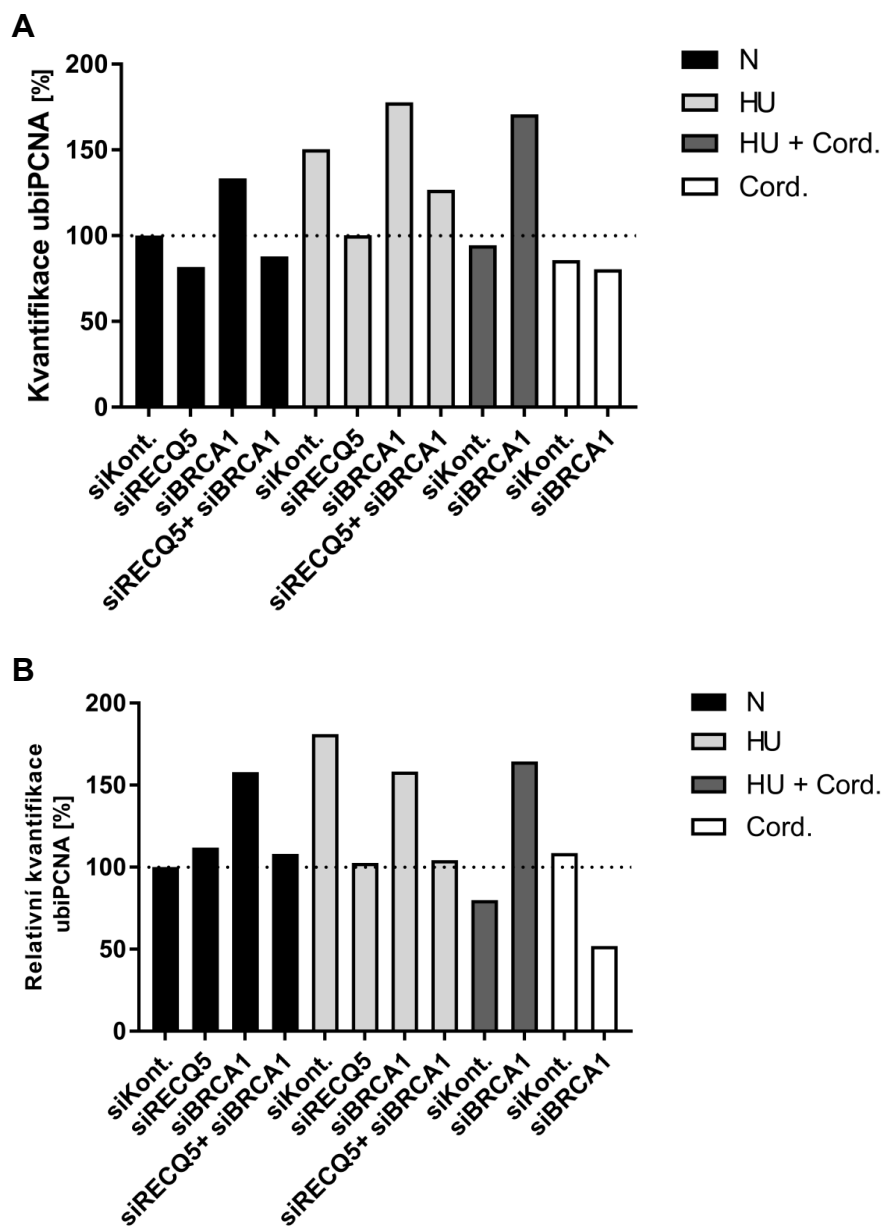
**Obr. 5.7: Vliv snížené exprese RECQ5 a inhibice transkripce na ubiquitinaci PCNA na chromatinu, reprezentativní snímek imunoblotu;** jedná se o vzorky chromatinové frakce buněk HEK293, které byly transfekovány siRECQ5 nebo siBRCA1 o finální koncentraci 20 nM (v případě kombinace siRECQ5 a siBRCA1 byla finální koncentrace jednotlivých siRNA 10 nM), popřípadě kontrolní siRNA o finální koncentraci 10 nM (siKont.), vždy po dobu 48 hod., některé kultury buněk byly ovlivněny buď hydroxyureou (HU, o finální koncentraci 2 mM, po dobu 16 hod.), nebo cordycepinem (Cord., 50  $\mu$ M, 2 hod.), popřípadě hydroxyureou (2 mM, 16 hod.) a cordycepinem zároveň (50  $\mu$ M, 2 hod.) – HU+Cord.; N – neovlivněné buňky, Lamin B – kontrola nanášky; ubiPCNA – ubiquitinované PCNA.

Dle výsledků relativní kvantifikace ubiquitinovaného PCNA na chromatinu (na základě snímku imunoblotu, graf na obrázku 5.8 B) dochází u neovlivněných buněk s depletovaným proteinem BRCA1 k nárůstu hladiny ubiquitinace PCNA při srovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami transfekovanými kontrolní siRNA. Hladina ubiquitinovaného PCNA při depleci proteinu BRCA1 vzrostla o 58 % (tedy na 158 %). U neovlivněných buněk se sníženou expresí proteinů BRCA1 a RECQ5 lze pak pozorovat pokles ubiquitinace PCNA oproti vzorku neovlivněných buněk s depletovaným proteinem BRCA1, a to na hladinu ubiquitinace PCNA u vzorků neovlivněných buněk s depletovaným proteinem RECQ5 (viz obr. 5.8 A a B). Výsledky naznačují, že deplece proteinu BRCA1 vede k hromadění ubiquitinovaného PCNA na chromatinu, tedy že uvolnění modifikovaného PCNA z chromatinu je pravděpodobně částečně závislé na proteinu BRCA1. U buněk, u kterých jsou současně depletovány proteiny RECQ5 a BRCA1, nedochází k výraznému

hromadění ubiquitinovaného PCNA na chromatinu (při srovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami), je tedy možné, že protein RECQ5 částečně podmiňuje proces ubiquitinace PCNA na chromatinu a v jeho nepřítomnosti je ubiquitinace nedostatečná. Vzhledem k tomu, že PCNA na chromatinu není při nedostatku RECQ5 dostatečně ubiquitinováno, nemá současná deplece BRCA1 další výrazný efekt (nedochází k nahromadění ubiquitinovaného PCNA tak, jako při pouhé depleci proteinu BRCA1).

Tyto závěry podporují data získaná analýzou chromatinové frakce buněk s inhibovanou replikací, tedy ovlivněných hydroxyureou. Buňky ovlivněné hydroxyureou a transfekované kontrolní siRNA vykazují dle grafu na obr. 5.8 B výrazné nabohacení ubiquitinace PCNA (o 81 %) při srovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami. U těchto buněk pravděpodobně narůstá počet zastavených replikačních vidlic a také dochází ke zvýšení frekvence kolizí mezi replikačním a transkripčním komplexem, což zapříčiňuje vyšší míru ubiquitinace a disociace PCNA z narušených replikačních vidlic. Deplece proteinu RECQ5 u buněk se zastavenou replikací (s hydroxyureou) vede k poklesu ubiquitinace PCNA téměř na úroveň ubiquitinace u kontrolních neovlivněných buněk (na 103 %, viz obr. 5.8 B). Stejný efekt u buněk se zastavenou replikací (ovlivněných hydroxyureou) způsobuje deplece proteinů RECQ5 a BRCA1. Což je v souladu s naší hypotézou, podle které RECQ5 z části podmiňuje ubiquitinaci PCNA u narušených replikačních vidlic, při depleci RECQ5 je tedy i v případě narušení replikace ubiquitinace PCNA na chromatinu nedostatečná. Takže se současné depletování proteinu BRCA1 při nedostatku proteinu RECQ5 již výrazně neprojeví (nedochází k nahromadění ubiquitinovaného PCNA na chromatinu jako při samotné depleci proteinu BRCA1).

Vzorek chromatinové frakce buněk se zastavenými replikačními vidlicemi a uvolněnými transkripčními komplexy (ovlivněných hydroxyureou a zároveň cordycepinem) transfekovaný kontrolní siRNA vykazuje nižší hladinu ubiquitinace PCNA než vzorek buněk ovlivněný pouze hydroxyureou, a dokonce nižší hladinu ubiquitinace než vzorek kontrolních neovlivněných buněk. Hladina ubiquitinace PCNA na chromatinu je zde výrazně nižší zřejmě kvůli zastavení transkripce, a tedy nižší frekvenci srážek mezi replikačním a transkripčním aparátem. Pokud však u buněk ovlivněných hydroxyureou a zároveň cordycepinem dojde k depleci BRCA1, hladina ubiquitinace stoupá, což podporuje naši hypotézu, dle které je do procesu uvolňování PCNA ze zastavených replikačních vidlic zahrnut protein BRCA1.



**Obr. 5.8: Vliv snížené exprese RECQ5 a inhibice transkripce na ubiquitinaci PCNA na chromatinu,**

**(A) kvantifikace ubiquitinovaného PCNA dle imunoblotu na obr. 5.7,** graf ukazuje výsledky kvantifikace intenzity signálu ubiquitinovaného PCNA, kde kontrola siKont. = 100 %;

**(B) relativní kvantifikace ubiquitinovaného PCNA dle imunoblotu na obr. 5.7;** intenzita signálu ubiquitinovaného PCNA byla kvantifikována a dále relativizována dle hladiny intenzity kontroly nanášky laminu B; kde kontrola siKont. = 100 %;

siKont. – vzorky transfekované kontrolní siRNA, siRECQ5 a siBRCA1 – vzorky transfekované siRECQ5, respektive siBRCA1, popřípadě kombinací (siRECQ5+siBRCA1), N – neovlivněné buňky, HU – vzorky ovlivněné hydroxyureou, HU + Cord. – vzorky ovlivněné hydroxyureou a cordycepinem, Cord. – vzorky ovlivněné cordycepinem.

Do jaké míry jsou dané procesy závislé na transkripci, nelze na základě výsledků prezentovaných v této diplomové práci s jistotou určit. Srovnáme-li grafy na obrázcích 5.8 A a B, vidíme, že mezi výsledky kvantifikace a relativní kvantifikace jsou v případě vzorků ovlivněných pouze cordycepinem značné rozdíly, zapříčiněné technickými nedostatky blotu.

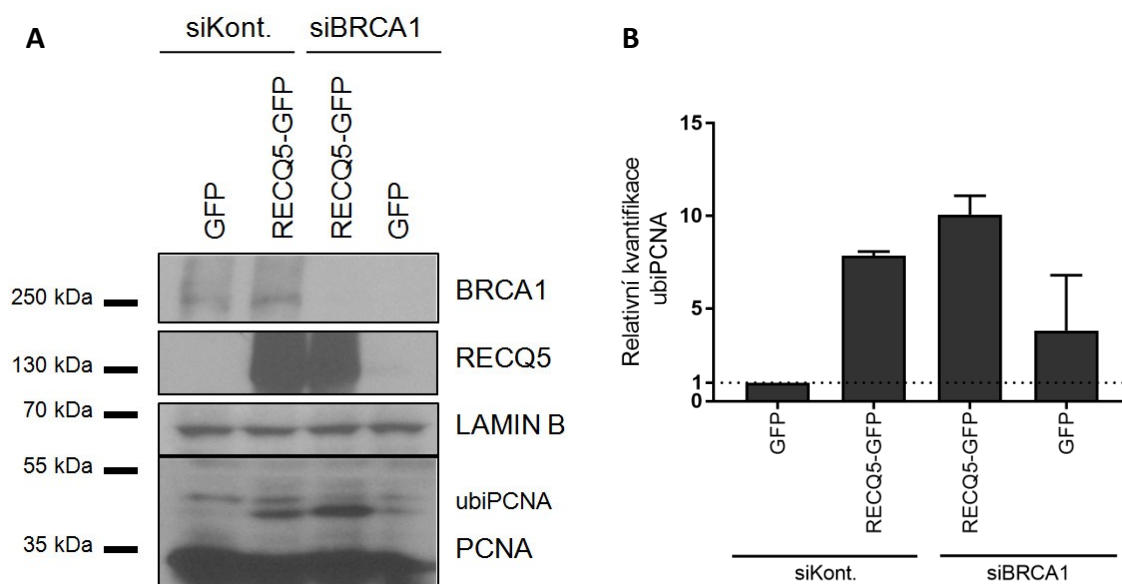
V laboratoři byl tento experiment několikrát zopakován a kolegové získali imunoblotty, u kterých byly nedostatky překonány a výsledky relativní kvantifikace jsou statisticky signifikantní. Tyto výsledky byly také publikovány (Urban *et al.* 2016). Dle těchto výsledků je protein RECQ5 zapojen v procesu ubiquitinace a uvolňování PCNA u aktivně transkribovaných genů. A protein BRCA1 se účastní následného restartu replikace.

## 5.5 Vliv zvýšené exprese RECQ5 na ubiquitinaci PCNA

Jsou-li závěry vzešlé z předchozích experimentů správné, tedy že deplece RECQ5 vede k narušení ubiquitinace PCNA na chromatinu, pak by navýšení exprese toho proteinu mělo mít opačný efekt. Výsledky předcházejících experimentů ukazovaly, že deplece proteinu BRCA1 vede k nabohacení ubiquitinovaného PCNA na chromatinu, tedy že se BRCA1 pravděpodobně podílí na procesu zahrnujícím uvolňování modifikovaného PCNA. Cílem následujícího experimentu bylo tyto hypotézy dále podpořit.

Buňky linie HEK293 byly transfekovány siRNA, a to buď kontrolní siRNA (siKont., finální koncentrace 10 nM), nebo siBRCA1 (o finální koncentraci 20 nM). Po 12 hodinách od počátku transfekce byly buňky transfekovány plazmidem GFP (kontrolní transfekce), nebo plazmidem RECQ5-GFP (podrobnější informace o plazmidech viz tabulka 4.1.5b). Jednotlivými plazmidy (2 µg) byly transfekovány jak buňky transfekované kontrolní siRNA, tak i siBRCA1. Všechny buňky byly sklizeny zároveň, 60 hodin po počátku transfekce buněk siRNA, tedy 48 hodin po transfekci plazmidem. Z jednotlivých buněčných vzorků byla izolována chromatinová frakce, která byla následně separována pomocí SDS-PAGE. Proteiny byly přeneseny na membránu a značeny specifickými protilátkami. Experiment byl zopakován třikrát. Výsledné imunoblotty byly opět podrobeny obrazové analýze intenzity signálů ubiquitinovaného PCNA a laminu B a dále relativní kvantifikaci (dle intenzity kontroly nanášky lamin B, program ImageJ). Tentokrát nebyly imunoblotty zatíženy technickými

chybami. Reprezentativní výsledný imunoblot lze vidět na obrázku 5.9 A a graf prezentující výsledky relativní kvantifikace na obr. 5.9 B. Nabohacení ubiquitinace PCNA není uvedeno v procentech, ale v poměrech ke kontrolnímu vzorku, kterým je vzorek buněk transfekovaný kontrolní siRNA a plazmidem GFP (siKont. + GFP).



**Obr. 5.9: Vliv zvýšené exprese RECQ5 na ubiquitinaci PCNA, (A) reprezentativní snímek imunoblotu, jedná se o vzorky chromatinové frakce buněk HEK293, které byly transfekovány buď siBRCA1 o finální koncentraci 20 nM, nebo kontrolní siRNA (siKont.) o finální koncentraci 10 nM, vždy po dobu 60 hod, dále byly buňky transfekovány buď plazmidem GFP, nebo RECQ5-GFP, a to vždy 2 µg plazmidu po dobu 48 hod., Lamin B – kontrola nanášky, ubiPCNA – ubiquitinované PCNA; (B) relativní kvantifikace nabohacení ubiPCNA, intenzita signálu ubiquitinovaného PCNA byla kvantifikována a dále relativizována dle intenzity signálu kontroly nanášky laminu B (celkem dle dvou imunoblotů, viz 5.9 A), kde kontrolní vzorek GFP+siKont. = 1, chybové značky ukazují směrodatnou odchylku.**

Zvýšená exprese RECQ5 u buněk transfekovaných kontrolní siRNA vede k mnohonásobnému navýšení ubiquitinace chromatinového PCNA při srovnání s kontrolním vzorkem buněk transfekovaných kontrolní siRNA a plazmidem GFP, intenzita signálu ubiquitinovaného PCNA je přibližně 8krát vyšší (viz výsledný imunoblot a graf relativní kvantifikace na základě jeho snímku, obr. 5.9). Toto navýšení je dále umocněno snížením exprese proteinu BRCA1, přibližně 10krát vyšší intenzita signálu ubiquitinovaného PCNA oproti kontrolnímu vzorku. Samotná deplece proteinu BRCA1 u buněk transfekovaných kontrolním plazmidem GFP vede k nabohacení ubiquitinace PCNA při srovnání s kontrolním

vzorkem (4krát). Toto nabohacení je však nižší ve srovnání s nabohacením u vzorků buněk transfekovaných RECQ-GFP a kontrolní siRNA, nebo siBRCA1.

Výsledky podporují hypotézu nastíněnou v předcházející části. Při zvýšení exprese proteinu RECQ5 dochází k navýšení ubiquitinace PCNA. Helikáza RECQ5 je tedy pravděpodobně zapojena do procesu podmiňující ubiquitinaci PCNA, tedy do procesu stabilizace narušených replikačních vidlic. Pokud dojde ke zvýšení exprese helikázy RECQ5 a zároveň depleci BRCA1, je ubiquitinace PCNA dále nabohacena. BRCA1 je tedy pravděpodobně zapojena do procesu následného uvolnění PCNA z chromatinu a restartu replikace. Toto bylo dále studováno a doplněno výsledky dalších experimentů (Urban *et al.* 2016).

## 6. DISKUZE

Významným faktorem narušujícím integritu genomu je tzv. replikační stres, tedy omezení progresu replikace DNA a případně následná destabilizace a kolaps replikačních vidlic, který může vést ke genezi poškození DNA. Jedním z činitelů narušujících průběh replikace je současně probíhající transkripce, která pro replikační aparát představuje překážku na DNA (Helmrich *et al.* 2006; Lin *et Pasero* 2012). Dojde-li ke střetu replikačního a transkripčního komplexu na DNA, je potřeba tyto kolize rozřešit a znovuobnovit oba základní procesy. I když bylo popsáno několik mechanismů zabraňujících potenciálním střetům mezi replikací a transkripcí (shrnuto v Helmrich *et al.* 2013 a Lin *et Pasero* 2012), mechanismy zajišťující řešení vlastních kolizí nejsou dostatečně objasněny. Bylo však pozorováno, že do procesu stabilizace a restartu replikačních vidlic, zastavených z různých příčin, jsou zapojeny helikázy a mezi nimi i lidská DNA helikáza RECQ5 (Li *et al.* 2011; Saponaro *et al.* 2014). Deplece proteinu RECQ5 v lidských buňkách vede k nahromadění dvouřetězcových zlomů DNA v průběhu replikace, přičemž akumulace těchto zlomů je závislá na probíhající transkripci (Li *et al.* 2011). Helikáza RECQ5 se podílí i na modulaci průběhu transkripce (Saponaro *et al.* 2014). Naše laboratoř a další ukázaly, že RECQ5 interaguje s RNA polymerázou II i I (Islam *et al.* 2010; Kanagaraj *et al.* 2010; Urban *et al.* 2016). V naší laboratoři bylo dále ukázáno, že protein RECQ5 asociuje s transkripčním komplexem v místech probíhající replikace (později publikováno Urban *et al.* 2016). Důležité bylo také pozorování, že deplece RECQ5 vede k chromozomálním translokacím v běžných fragilních místech (Saponaro *et al.* 2014), kde nevyhnutelně také dochází ke střetu replikace a transkripce (Helmrich *et al.* 2011). Kanagaraj *et al.* pozorovali, že helikáza RECQ5 interaguje také s proteinem PCNA replikačního komplexem v průběhu S-fáze i po zastavení replikačních vidlic (Kanagaraj *et al.* 2006). Tato data nás vedla k hypotéze, podle které je protein RECQ5 zapojen do řešení kolizí mezi transkripčním a replikačním komplexem.

Rozhodli jsme se zkoumat, zda se helikáza RECQ5 podílí na opravě replikačních vidlic po jejich kolizi s transkripčním komplexem v součinnosti s proteiny zapojenými do reparace poškozené DNA. Vybrali jsme proteiny BRCA1 a 53BP1, jež jsou zapojeny do rozdílných mechanismů oprav dvouřetězcových zlomů DNA, a to i z důvodu, že při depleci RECQ5 je pozorována akumulace těchto zlomů závislá na probíhající replikaci i transkripci (Li *et al.*

2011). Protein BRCA1 je zapojen do oprav zlomů DNA a zastavených replikačních vidlic skrze homologní rekombinaci (Scully *et al.* 1997; Schlacher *et al.* 2012), protein 53BP1 je zapojen do procesu nehomologního spojení konců zlomů DNA (Nakamura *et al.* 2006). Oba proteiny při opravách tvoří v buněčných jádrech fokusy (Chapman *et al.* 2012). Přestože byla role helikázy RECQ5 studována a popsána v mnoha publikacích (viz kapitola 2.3), její spojitost s proteiny BRCA1 a 53BP1 v místech interference replikace a transkripce nebyla doposud testována. Zjistili jsme, že protein BRCA1 je zapojen do oprav endogenního poškození generovaného v průběhu replikace a také do oprav poškození DNA vyvolaného ozářením buněk. K nejmarkantnějšímu nárůstu tvorby fokusů BRCA1 docházelo v S-fázi buněčného cyklu u neovlivněných buněk i buněk ozářených. Dále jsme pozorovali, že se protein 53BP1 podílí ve velké míře na opravě poškození DNA vyvolaného ozářením (po jeho působení dochází k výraznému nárůstu formování fokusů 53BP1 v jádrech buněk), a to bez ohledu na fázi buněčného cyklu. Na opravě endogenního poškození generovaného v S-fázi se protein 53BP1 podílí minimálně. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky Chapmana *et al.*, které ukázaly, že protein BRCA1 při průchodu S-fází nahrazuje protein 53BP1 ve fokusech oprav dvouřetězcových zlomů DNA navozených ozářením (Chapman *et al.* 2012). Vzhledem k tomu, že deplece proteinu RECQ5 vede k akumulaci dvouřetězcových zlomů DNA v průběhu replikace (Li *et al.* 2011), očekávali jsme, že deplece RECQ5 povede k výraznějšímu nabohacení fokusů proteinů zapojených do oprav těchto zlomů. V případě fokusů proteinu 53BP1 nebyla po depleci proteinu RECQ5 v lidských buňkách pozorována žádná viditelná změna v jejich tvorbě. To lze interpretovat tak, že protein 53BP1 není zapojen do opravných mechanismů v součinnosti s proteinem RECQ5. Ani při depleci proteinu RECQ5 nedocházelo ke zvýšené tvorbě fokusů proteinu BRCA1, právě naopak, docházelo k poklesu jejich formování. Na základě výše uvedených dat vyvozujeme, že se protein BRCA1 podílí na opravě poškození generovaného v průběhu replikace, při depleci RECQ5 je tvorba fokusů proteinu BRCA1 omezena a tím je narušena i funkce proteinu BRCA1 v těchto opravách.

Funkce proteinu BRCA1 v obnovení zastavených replikačních vidlic byla pozorována již dříve (Schlacher *et al.* 2012). Naše další experimenty ale ukázaly (viz kapitola 5.3), že formování fokusů proteinu BRCA1 v průběhu S-fáze je ovlivněno probíhající transkripcí. Při inhibici transkripce prostřednictvím cordycepinu, jenž uvolňuje transkripční aparát z DNA,

došlo k poklesu formování fokusů proteinu BRCA1 v průběhu S-fáze. Příčinou tohoto poklesu je zřejmě snížení frekvence kolizí mezi replikací a transkripcí, tedy nižší hladina zastavených replikačních vidlic vyžadujících opravu. Kolegové v laboratoři sledovali vliv zastavení transkripčního aparátu pomocí aktinomycinu D na formování fokusů BRCA1. Aktinomycin D se váže na rozvolněnou DNA v místě vazby iniciačního transkripčního komplexu a zabraňuje tak postupu komplexu a elongaci transkripce, přičemž transkripční komplex zůstává zastaven na DNA (Sobell 1985). Lze tedy předpokládat, že přestože obě látky (cordycepin i aktinomycin D) inhibují transkripci, důsledky jejich působení budou odlišné. Na rozdíl od působení cordycepinu nebude po působení aktinomycinu D počet kolizí replikační vidlice s transkripčním komplexem klesat (naopak poroste). V experimentu kolegů docházelo k výraznému nárůstu formování fokusů BRCA1 v průběhu S-fáze u buněk se zastavenými transkripčními aparáty (ovlivněných aktinomycinem D), což je zřejmě důsledek zvýšené frekvence kolizí mezi replikačním a transkripčním aparátem (Urban *et al.* 2016). Na základě dat prezentovaných v této práci a výsledků kolegů usuzujeme, že je protein BRCA1 zapojen do řešení zastavených replikačních vidlic po jejich kolizi s transkripčními komplexy, do jaké míry tak činní ve spolupráci s proteinem RECQ5 jsme zkoumali dále.

Depletujeme-li v buňkách protein RECQ5 za současné inhibice transkripce pomocí cordycepinu, dojde k výraznější redukci formování fokusů BRCA1 v průběhu replikace, než při pouhém inhibování transkripce cordycepinem (viz kapitola 5.3). Kolegové v laboratoři studovali vliv deplece proteinu RECQ5 na formování fokusů BRCA1 při současném zastavení transkripčního aparátu na DNA (vlivem aktinomycinu D, potenciálně vyšší frekvence kolizí). Pozorovali, že za těchto podmínek nedochází po depleci RECQ5 k poklesu tvorby fokusů BRCA1 (Urban *et al.* 2016). Z výsledků této diplomové práce nelze usoudit, zda dochází k přímé interakci mezi proteiny BRCA1 a RECQ5. V laboratoři ale byly provedeny další experimenty, které přímou interakci nepotvrdily (Urban *et al.* 2016). Výsledky této práce v kombinaci s výsledky získanými kolegy v laboratoři ukazují, že jsou proteiny BRCA1 a RECQ5 zapojeny do řešení zastavených replikačních vidlic po jejich kolizi s transkripčním komplexem. Dále usuzujeme, že funkce proteinu BRCA1 v opravách zastavených replikačních vidlic po jejich kolizi s transkripčním aparátem je částečně podmíněna činností helikázy RECQ5, avšak protein RECQ5 se nepodílí na asociaci proteinu BRCA1 do místa srážky. Při zvýšení frekvence kolizí replikačního a transkripčního komplexu (působením

aktinomycinu D) totiž protein BRCA1 v těchto kolizích operuje i při depleci helikázy RECQ5 v buňkách. Je možné, že se jedná o akumulaci opravných fokusů BRCA1, které stabilizují zastavenou replikační vidlici, avšak z důvodu absence proteinu RECQ5 nedochází k rozřešení kolize mezi replikačním a transkripčním komplexem. Tato možnost nebyla v rámci diplomové práce testována, ale výsledky kolegů z naší laboratoře tuto eventualitu podporují (Urban *et al.* 2016).

Roli proteinu RECQ5 v uvolňování PCNA ze zastavených replikačních vidlic po jejich kolizi s transkripčním aparátem jsme se rozhodli zkoumat na základě dřívějších studií, které ukázaly, že helikáza RECQ5 asociuje s proteinem PCNA (Kanagaraj *et al.* 2006), a také proto, že protein PCNA navázaný na opožděujícím se vlákně zastavených replikačních vidlic podléhá ubiquitinaci a uvolnění z DNA při obnově replikačních vidlic po jejich zastavení (u *S. cerevisiae*, Yu *et al.* 2014). Ukázali jsme (kapitola 5.4), že při působení replikačního stresu (zastavení replikačního aparátu na DNA pomocí hydroxyurey) dochází k akumulaci ubiquitínovaného PCNA na chromatinu. Příčinou nabohacení je pravděpodobně zahájení mechanismů obnovujících zastavené replikační vidlice, při němž dochází k modulaci replikačního komplexu zahrnujícího PCNA. Nabohacení ubiquitínovaného PCNA na chromatinu by mohlo také odrážet zvýšený počet kolizí, kdy se procesující transkripční komplex střetne se zastaveným replikačním aparátem. Vystavíme-li buňky replikačnímu stresu a současně inhibujeme transkripci, za uvolnění transkripčního aparátu z DNA pomocí cordycepinu, tedy snížíme četnost srážek mezi replikačním a transkripčním komplexem, jsou hladiny ubiquitínovaného PCNA srovnatelné (či dokonce mírně nižší) jako u neovlivněných buněk. Jinými slovy, při inhibici transkripce cordycepinem nedojde k hydroxyureou-indukovanému nárůstu hladiny ubiquitínovaného PCNA. Tato data naznačují, že pozorované nabohacení ubiquitínovaného PCNA na chromatinu odpovídá zvýšené frekvenci kolizí mezi replikačním a transkripčním komplexem. Dále jsme pozorovali, že působení replikačního stresu (při zachování transkripce) v buňkách se sníženou expresí proteinu RECQ5 nevede k nabohacení ubiquitínovaného PCNA na chromatinu. Data naznačují, že helikáza RECQ5 je zapojena do ubiquitinace PCNA zastavených replikačních vidlic. Tuto interpretaci potvrdily výsledky dalších zde prezentovaných experimentů, dle kterých nabohacení helikázy RECQ5 v buňkách vede k nabohacení ubiquitínovaného PCNA na chromatinu (viz kapitola 5.5).

Jelikož první výsledky naznačovaly, že se protein RECQ5 podílí na řešení zastavených replikačních vidlic po jejich kolizi s transkripčním komplexem v součinnosti s proteinem BRCA1 a že funkce helikázy RECQ5 podmiňuje ubiquitinaci PCNA v zastavených replikačních vidlicích, rozhodli jsme se studovat vliv hladiny proteinu BRCA1 v buňkách na ubiquitinaci PCNA. Námi získané výsledky (viz kapitola 5.4) ukazují, že deplece proteinu BRCA1 vede k nabožení hladiny ubiquitovaného PCNA na chromatinu, a to jak za normálních růstových podmínek, tak za působení replikačního stresu. Při depleci proteinu BRCA1 v buňkách a současné inhibici replikace (hydroxyureou indukovaný replikační stres) a transkripce (cordycepin) dochází k nabožení ubiquitovaného PCNA na chromatinu. Z těchto dat vyvozujeme, že se protein BRCA1 přímo neúčastní ubiquitinace PCNA, ale zastává funkci v následném restartu replikačních vidlic zastavených v důsledku různých příčin. Depletujeme-li v buňkách vedle proteinu BRCA1 také protein RECQ5, nedochází k výraznému nabožení ubiquitovaného PCNA na chromatinu tak, jak je tomu při samotné depleci proteinu BRCA1. Tento efekt jsme pozorovali jak u buněk rostoucích za normálních podmínek, tak u buněk vystavených replikačnímu stresu. Usuzujeme tedy, že funkce proteinu RECQ5 v ubiquitinaci PCNA částečně podmiňuje restart zastavených replikačních vidlic po jejich kolizi s transkripčním komplexem, přičemž tento restart je uskutečněn pomocí proteinu BRCA1. Tento předpoklad potvrzují i data získána v experimentu (kapitola 5.5), kdy zvýšená hladina ubiquitovaného proteinu PCNA na chromatinu způsobená ektopickou expresí RECQ5 byla ještě umocněna deplecí proteinu BRCA1.

Důležité je zde upozornit, že výsledky experimentů studujících vliv různých podmínek na ubiquitinaci PCNA byly získány prostřednictvím metody SDS-PAGE v kombinaci s imunoblotem, kdy jsme hladinu ubiquitovaného PCNA na chromatinu stanovovali pomocí protilátky proti PCNA a spoléhali na rozdílnou mobilitu ubiquitovaného a nemodifikovaného proteinu v gelu. Nad rámec této diplomové práce bylo kolegy pomocí protilátky specificky rozpoznávající PCNA protein ubiquitovaný na lysinu 164 ověřeno, že protein PCNA s omezenou mobilitou v gelu SDS-PAGE je modifikován ubiquitinací (Urban *et al.* 2016).

V souladu s našimi výsledky, Tian *et al.* v roce 2013 ukázali, že deplece proteinu BRCA1 neblokuje ubiquitinaci PCNA navozenou zastavením replikačních vidlic pomocí hydroxyurey. Dále pozorovali, že u buněk s depletovaným proteinem BRCA1 dochází při

vystavení buněk působení UV záření a dalším látkám blokujících replikaci skrze *crosslink* DNA (vytvoření neadekvátních vnitřetězcových a meziřetězcových můstků v DNA) k narušení ubiquitinace PCNA. Zjistili, že protein BRCA1 reguluje asociaci proteinu RAD18 do replikačních vidlic zastavených díky *crosslinku* DNA. Protein RAD18 má E3 ubiquitin-ligázovou aktivitu a v zastavených vidlic ubiquitínuje PCNA (Tian *et al.* 2013). Výsledky Tian *et al.* v kombinaci s našimi výsledky lze interpretovat tak, že po zastavení replikačních vidlic na *crosslinkované* DNA je snížena frekvence kolizí replikačních a transkripčních komplexů. Přičemž protein BRCA1 je zřejmě zapojen do ubiquitinace PCNA při obnovení vidlic zastavených v důsledku *crosslinku* DNA skrze asociaci s proteiny zapojenými v těchto specifických opravách. Předpokládáme tedy, že protein BRCA1 sice není zapojen do ubiquitinace PCNA replikačních vidlic, které jsou zastaveny v důsledku přímé inhibice replikace nebo v důsledku kolize replikačního a transkripčního komplexu, ale v těchto případech se účastní až následného restartu vidlic skrze homologní rekombinaci.

Přestože se nám podařilo identifikovat některé role helicázy RECQ5 v obnově replikačních vidlic po jejich kolizi s transkripčním aparátem, nebyl v této práci objasněn přesnější mechanismus, jakým protein RECQ5 k řešení této kolize přispívá. Bylo by potřeba dále studovat, jakým mechanismem zajišťuje helicáza RECQ5 ubiquitinaci proteinu PCNA a jeho odstraňování z chromatinu, zda takováto remodelace zastaveného replikačního komplexu umožní průchod RNA polymerázy, a tak umožní dokončení transkripce daného genu, a zároveň jaké další pochody vedou k obnově replikace DNA po střetu s transkripčním komplexem.

V průběhu vypracování této diplomové práce byly některé z těchto otázek zodpovězeny mými kolegy a naše laboratoř publikovala článek shrnující tyto a další výsledky, dle kterých je protein RECQ5 zapojen do ubiquitinace a uvolňování PCNA replikačních komplexů zastavených replikačních vidlic po jejich kolizi s transkripčním aparátem. Protein BRCA1 pak v koordinaci s činností proteinu RECQ5 zprostředkovává restart replikačních vidlic pomocí proteinu RAD51 a homologní rekombinace (Urban *et al.* 2016).

Mutace některých lidských helicáz rodiny RecQ jsou spojeny s vývinem závažných, život ohrožujících syndromů a onemocnění. I když u člověka protazím nebyl ukázán rozvoj onkologického onemocnění řízený primárně mutací RECQ5, absence tohoto proteinu u myši vede k vývinu různých typů rakovin (Hu *et al.* 2007). Vzhledem k tomu, že kolize mezi

replikačním a transkripčním aparátem mohou způsobovat závažné narušení genomové integrity a rozvoj rakoviny, je důležité lépe pochopit procesy, které vedou k těmto kolizím, a mechanismy jejich prevence a řešení. Tato práce přispěla k porozumění významu helikázy RECQ5 v řešení kolizí mezi replikací a transkripcí, tedy v zachování genomové stability v lidských buňkách.

## 7. SOUHRN

- Deplece helikázy RECQ5 v lidských buňkách nemá vliv na formování fokusů proteinu 53BP1, avšak vede k poklesu formování jaderných fokusů proteinu BRCA1, a to jak za normálních, tak i stresových podmínek (ionizující záření).
- K nejmarkantnější tvorbě fokusů proteinu BRCA1 dochází v průběhu S-fáze cyklu. Inhibice transkripce cordycepinem, který uvolňuje transkripční aparát z DNA, vede ke snížení formování fokusů proteinu BRCA1 v průběhu S-fáze (replikace).
- Při současné depleci proteinu RECQ5 a inhibici transkripce (za uvolnění transkripčního aparátu z DNA) dochází ještě k výraznějšímu poklesu formování fokusů proteinu BRCA1 v jádrech ve srovnání s hladinou tvorby jaderných fokusů BRCA1 po depleci proteinu RECQ5, nebo při inhibici transkripce.
- Protein BRCA1 se zřejmě podílí na opravě endogenního poškození generovaného v průběhu replikace při současně probíhající transkripci, přičemž zde pravděpodobně působí v součinnosti s proteinem RECQ5.
- Zastavení replikačních vidlic na DNA pomocí hydroxyurey vede k nahromadění ubiquitovaného PCNA na chromatinu, toto nahromadění je však výrazně redukováno při současném uvolnění transkripčního aparátu z DNA.
- Deplece proteinu BRCA1 v buňkách vede k nahromadění ubiquitovaného PCNA na chromatinu, a to jak u buněk neovlivněných, tak ještě výrazněji u buněk vystavených působení replikačního stresu (hydroxyurea). Toto nahromadění ubiquitovaného PCNA není pozorováno za současné deplece proteinů BRCA1 a RECQ5.
- Deplece proteinu RECQ5 v buňkách nezpůsobuje nahromadění ubiquitovaného PCNA na chromatinu v porovnání s buňkami s přirozenými hladinami RECQ5, a to ani při působení replikačního stresu. Avšak při nahromadění proteinu RECQ5 dochází k nahromadění ubiquitovaného PCNA na chromatinu.
- Usuzujeme, že helikáza RECQ5 a protein BRCA1 působí v místech kolizí mezi replikačním a transkripčním aparátem. Helikáza RECQ5 se zřejmě účastní ubiquitinace PCNA zastavených replikačních vidlic, protein BRCA1 je pak zapojen do restartu zastavených replikačních vidlic.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aguilera, A. & García-Muse, T. (2012): R Loops: From Transcription Byproducts to Threats to Genome Stability. *Molecular Cell* 46: 115–24.
- Aguilera, A. & Gómez-González, B. (2008): Genome Instability: A Mechanistic View of Its Causes and Consequences. *Nature Reviews. Genetics* 9: 204–17.
- Alzu, A., Bermejo, R., Begnis, M., Lucca, C., Piccini, D., Carotenuto, W., Saponaro, M., Brambati, A., Cocito, A., Foiani, M., & Liberi, G. (2012): Senataxin Associates with Replication Forks to Protect Fork Integrity across RNA-Polymerase-II-Transcribed Genes. *Cell* 151: 835–46.
- Atkinson, J., Gupta, M.K., Rudolph, C.J., Bell, H., Lloyd, R.G., & McGlynn, P. (2011): Localization of an Accessory Helicase at the Replisome Is Critical in Sustaining Efficient Genome Duplication. *Nucleic Acids Research* 39: 949–57.
- Aygün, O., Svejstrup, J., & 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: 8580–84.
- Aygün, O., Xu, X., Liu, Y., Takahashi, H., Kong, S.E., Conaway, R.C., Conaway, J.W., & Svejstrup, J.Q. (2009): Direct Inhibition of RNA Polymerase II Transcription by RECQL5. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 23197–203.
- Azvolinsky, A., Giresi, P.G., Lieb, J.D., & Zakian, V.A. (2009): Highly Transcribed RNA Polymerase II Genes Are Impediments to Replication Fork Progression in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Molecular Cell* 34: 722–34.
- Balakrishnan, L. & Bambara, R.A. (2013): Okazaki Fragment Metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5: 1–12.
- Barlow, J.H., Faryabi, R.B., Callén, E., Wong, N., Malhowski, A., Chen, H.T., Gutierrez-Cruz, G., Sun, H.W., McKinnon, P., Wright, G., Casellas, R., Robbiani, D.F., Staudt, L., Fernandez-Capetillo, O., & Nussenzweig, A. (2013): Identification of Early Replicating Fragile Sites That Contribute to Genome Instability. *Cell* 152: 620–32.
- Bernstein, K. A., Gangloff, S., & Rothstein, R. (2010): The RecQ DNA Helicases in DNA Repair. *Annual Review of Genetics* 44: 393–417.
- Boubakri, H., Langlois De Septenville, A., Viguera, E., & Né Dicitte Michel, B. (2009): The Helicases DinG, Rep and UvrD Cooperate to Promote Replication across Transcription Units in Vivo. *The EMBO Journal* 29: 145–57.
- Breier, A.M., Weier, H.-U.G., & Cozzarelli, N.R. (2005): Independence of Replisomes in *Escherichia Coli* Chromosomal Replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 3942–47.
- Brewer, B.J. & Fangman, W.L. (1988): A Replication Fork Barrier at the 3' End of Yeast Ribosomal RNA Genes. *Cell* 55: 637–43.
- Bruun, D., Folias, A., Akkari, Y., Cox, Y., Olson, S., & Moses, R. (2003): siRNA Depletion of BRCA1, but Not BRCA2, Causes Increased Genome Instability in Fanconi Anemia Cells. *DNA Repair* 2: 1007–13.
- Cadoret, J.-C., Meisch, F., Hassan-Zadeh, V., Luyten, I., Guillet, C., Duret, L., Quesneville, H., & Prioleau, M.-N. (2008): Genome-Wide Studies Highlight Indirect Links between Human Replication Origins and Gene Regulation. *PNAS* 105: 15837–42.
- Caestecker, K.W. & Van de Walle, G.R. (2013): The Role of BRCA1 in DNA Double-Strand

- Repair: Past and Present. *Experimental Cell Research* 319: 575–87.
- Cortez D., Wang Y., Qin J., & Elledge S.J. (2000): Requirement of ATM-Dependent Phosphorylation of Brcal in the DNA Damage Response to Double-Strand Breaks. *Science* 286: 1162–66.
- Dalgaard, J.Z., Eydmann, T., Koulintchenko, M., Sayrac, S., Vengrova, S., & Yamada-Inagawa, T. (2009): Random and Site-Specific Replication Termination. *Methods in Molecular Biology* 521: 35–53.
- Darzacq, X., Shav-Tal, Y., de Turris, V., Brody, Y., Shenoy, S.M., Phair, R.D., & Singer, R.H. (2007): In Vivo Dynamics of RNA Polymerase II Transcription. *Nat Struct Mol Biol* 14: 796–806.
- Donnell, M.O., Langston, L., & Stillman, B. (2013): Principles and Concepts of DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5: 1–14.
- Drolet, M. (2006): Growth Inhibition Mediated by Excess Negative Supercoiling: The Interplay between Transcription Elongation, R-Loop Formation and DNA Topology. *Molecular Microbiology* 59: 723–30.
- Ellis, N.A., Groden, J., Ye, T.Z., Straughen, J., Lennon, D.J., Ciocci, S., Proytcheva, M., & German, J. (1995): The Bloom's Syndrome Gene Product Is Homologous to RecQ Helicases. *Cell* 83: 655–66.
- Enemark, E.J. & Joshua-Tor, L. (2008): On Helicases and Other Motor Proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 18: 243–57.
- Epshtein, V., Toulmé, F., Rachid Rahmouni, A., Borukhov, S., & Nudler, E. (2003): Transcription through the Roadblocks: The Role of RNA Polymerase Cooperation. *The EMBO Journal* 22: 4719–27.
- Felipe-Abrio, I., Lafuente-Barquero, J., García-Rubio, M.L., & Aguilera, A. (2015): RNA Polymerase II Contributes to Preventing Transcription-Mediated Replication Fork Stalls. *The EMBO Journal* 34: 1–15.
- Frick, D.N. & Richardson, C.C. (2001): DNA Primases. *Annual Review of Biochemistry* 70: 39–80.
- Fu, Y. V., Yardimci, H., Long, D.T., Ho, V., Guainazzi, A., Bermudez, V.P., Hurwitz, J., Van Oijen, A., Schäfer, O.D., & Walter, J.C. (2011): Selective Bypass of a Lagging Strand Roadblock by the Eukaryotic Replicative DNA Helicase. *Cell* 146: 931–41.
- Gan, W., Guan, Z., Liu, J., Gui, T., Shen, K., Manley, J.L., & Li, X. (2011): R-Loop-Mediated Genomic Instability Is Caused by Impairment of Replication Fork Progression. *Genes and Development* 25: 2041–56.
- Garcia, P.L., Liu, Y., Jiricny, J., West, S.C., & Janscak, P. (2004): Human RECQ5beta, a Protein with DNA Helicase and Strand-Annealing Activities in a Single Polypeptide. *The EMBO Journal* 23: 2882–91.
- Gómez-González, B., García-Rubio, M., Bermejo, R., Gaillard, H., Shirahige, K., Marín, A., Foiani, M., & Aguilera, A. (2011): Genome-Wide Function of THO/TREX in Active Genes Prevents R-Loop-Dependent Replication Obstacles. *The EMBO Journal* 30: 3106–19.
- Gorski, J.J., Savage, K.I., Mulligan, J.M., Mcdade, S.S., Blayney, J.K., Ge, Z., & Harkin, D.P. (2011): Profiling of the BRCA1 Transcriptome through Microarray and ChIP-Chip Analysis. *Nucleic Acids Research* 39: 9536–48.
- Gottipati, P., Cassel, T.N., Savolainen, L., & Helleday, T. (2008): Transcription-Associated Recombination Is Dependent on Replication in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology* 28: 154–64.

- Guy, L. & Roten, C.A.H. (2004): Genometric Analyses of the Organization of Circular Chromosomes: A Universal Pressure Determines the Direction of Ribosomal RNA Genes Transcription Relative to Chromosome Replication. *Gene* 340: 45–52.
- El Hage, A., French, S.L., Beyer, A.L., & Tollervey, D. (2010): Loss of Topoisomerase I Leads to R-Loop-Mediated Transcriptional Blocks during Ribosomal RNA Synthesis. *Genes and Development* 24: 1546–58.
- Helmrich, A., Ballarino, M., Nudler, E., & Tora, L. (2013): Transcription-Replication Encounters, Consequences and Genomic Instability. *Nature Structural & Molecular Biology* 20: 412–18.
- Helmrich, A., Ballarino, M., & Tora, L. (2011): Collisions between Replication and Transcription Complexes Cause Common Fragile Site Instability at the Longest Human Genes. *Molecular Cell* 44: 966–77.
- Helmrich, A., Stout-Weider, K., Hermann, K., Schrock, E., & Heiden, T. (2006): Common Fragile Sites Are Conserved Features of Human and Mouse Chromosomes and Relate to Large Active Genes. *Genome Research* 16: 1222–30.
- Hiratani, I., Ryba, T., Itoh, M., Yokochi, T., Schwaiger, M., Chang, C.W., Lyou, Y., Townes, T.M., Schübeler, D., & Gilbert, D.M. (2008): Global Reorganization of Replication Domains during Embryonic Stem Cell Differentiation. *PLoS Biology* 6: 2220–36.
- Hiratani, I., Takebayashi, S., Ichiro, Lu, J., & Gilbert, D.M. (2009): Replication Timing and Transcriptional Control: Beyond Cause and Effect-Part II. *Current Opinion in Genetics and Development* 19: 142–49.
- Hu, Y., Raynard, S., Sehorn, M.G., Lu, X., Bussen, W., Zheng, L., Stark, J.M., Barnes, E.L., Chi, P., Jancsak, P., Jasin, M., Vogel, H., Sung, P., & Luo, G. (2007): RECQL5/Recql5 Helicase Regulates Homologous Recombination and Suppresses Tumor Formation via Disruption of Rad51 Presynaptic Filaments. *Genes and Development* 21: 3073–84.
- Huertas, P. & Aguilera, A. (2003): Cotranscriptionally Formed DNA:RNA Hybrids Mediate Transcription Elongation Impairment and Transcription-Associated Recombination. *Molecular Cell* 12: 711–21.
- Chapman, J.R., Sossick, A.J., Boulton, S.J., & Jackson, S.P. (2012): BRCA1-Associated Exclusion of 53BP1 from DNA Damage Sites Underlies Temporal Control of DNA Repair. *Journal of Cell Science* 125: 3529–34.
- Islam, M.N., Fox, D., Guo, R., Enomoto, T., & 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: 2460–72.
- Johnson, A. & O'Donnell, M. (2005): Cellular DNA Replicases: Components and Dynamics at the Replication Fork. *Annual Review of Biochemistry* 74: 283–315.
- Joukov, V., Chen, J., Fox, E.A., Green, J.B.A., & Livingston, D.M. (2001): Functional Communication between Endogenous BRCA1 and Its Partner, BARD1, during *Xenopus Laevis* Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 12078–83.
- Kaguni, J.M. (2011): Replication Initiation at the *Escherichia Coli* Chromosomal Origin. *Current Opinion in Chemical Biology* 15: 606–13.
- Kanagaraj, R., Huehn, D., MacKellar, A., Menigatti, M., Zheng, L., Urban, V., Shevelev, I., Greenleaf, A.L., & Jancsak, 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: 8131–40.
- Kanagaraj, R., Saydam, N., Garcia, P.L., Zheng, L., & Jancsak, P. (2006): Human RECQ5beta Helicase Promotes Strand Exchange on Synthetic DNA Structures Resembling a Stalled

- Replication Fork. *Nucleic Acids Research* 34: 5217–31.
- Kassube, S.A., Jinek, M., Fang, J., Tsutakawa, S., & Nogales, E. (2013): Structural Mimicry in Transcription Regulation of Human RNA Polymerase II by the DNA Helicase RECQL5. *Nat Struct Mol Biol.* 20: 892–99.
- Keszthelyi, A., Minchell, N., & Baxter, J. (2016): The Causes and Consequences of Topological Stress during DNA Replication. *Genes* 7: 134.
- Kitao, S., Ohsugi, I., Ichikawa, K., Goto, M., Furuichi, Y., & Shimamoto, A. (1998): Cloning of Two New Human Helicase Genes of the RecQ Family: Biological Significance of Multiple Species in Higher Eukaryotes. *Genomics* 54: 443–52.
- Koonin, E. V., Altschul, S.F., & Bork, P. (1996): BRCA1 Protein Products—functional Motifs. *Nature Genetics* 13: 266–68.
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessières P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Cordani JJ, D.A. (1997): The Complete Genome Sequence of the Gram-Positive Bacterium *Bacillus Subtilis*. *Nature* 390: 249–56.
- Li, M., Pokharel, S., Wang, J.-T., Xu, X., & Liu, Y. (2015): RECQ5-Dependent SUMOylation of DNA Topoisomerase I Prevents Transcription-Associated Genome Instability. *Nature Communications* 6: 6720.
- Li, M., Xu, X., & Liu, Y. (2011): The SET2-RPB1 Interaction Domain of Human RECQ5 Is Important for Transcription-Associated Genome Stability. *Molecular and Cellular Biology* 31: 2090–99.
- Li, X. & Manley, J.L. (2005): Inactivation of the SR Protein Splicing Factor ASF/SF2 Results in Genomic Instability. *Cell* 122: 365–78.
- Lin, Y.-L. & Pasero, P. (2012): Interference Between DNA Replication and Transcription as a Cause of Genomic Instability. *Current Genomics* 13: 65–73.
- Liu, B. & Alberts, B.M. (1995): Head-on Collision between a DNA Replication Apparatus and RNA Polymerase Transcription Complex. *Science* 267: 1131–37.
- Liu, B., Wong, M.L., & Alberts, B. (1994): A Transcribing RNA Polymerase Molecule Survives DNA Replication without Aborting Its Growing RNA Chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 10660–64.
- Lopez-Estraño, C., Schvartzman, J.B., Krimer, D.B., & Hernández, P. (1998): Co-Localization of Polar Replication Fork Barriers and rRNA Transcription Terminators in Mouse rDNA. *Journal of Molecular Biology* 277: 249–56.
- López-Estraño, C., Schvartzman, J.B., Krimer, D.B., & Hernández, P. (1999): Characterization of the Pea rDNA Replication Fork Barrier: Putative Cis-Acting and Trans-Acting Factors. *Plant Molecular Biology* 40: 99–110.
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., & Oda, M. (2010): Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How? *Annual Review of Biochemistry* 79: 89–130.
- Mazouzi, A., Velimezi, G., & Loizou, J.I. (2014): DNA Replication Stress: Causes, Resolution and Disease. *Experimental Cell Research* 29: 85–93.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., & Ding, W. (1994): A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science* 266: 66–71.
- Nakamura, K., Sakai, W., Kawamoto, T., Bree, R.T., Lowndes, N.F., Takeda, S., & Taniguchi, Y. (2006): Genetic Dissection of Vertebrate 53BP1: A Major Role in Non-Homologous

- End Joining of DNA Double Strand Breaks. *DNA Repair* 5: 741–49.
- Neylon, C., Kralicek, A. V., Hill, T.M., & Dixon, N.E. (2005): Replication Termination in *Escherichia Coli*: Structure and Antihelicase Activity of the Tus-Ter Complex. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69: 501–26.
- Nudler, E. (2012): RNA Polymerase Backtracking in Gene Regulation and Genome Instability. *Cell* 149: 1438–45.
- Ozeri-Galai, E., Lebofsky, R., Rahat, A., Bester, A.C., Bensimon, A., & Kerem, B. (2011): Failure of Origin Activation in Response to Fork Stalling Leads to Chromosomal Instability at Fragile Sites. *Molecular Cell* 43: 122–31.
- Petermann, E. & Helleday, T. (2010): Pathways of Mammalian Replication Fork Restart. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 11: 683–87.
- Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., & Helleday, T. (2010): Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. *Molecular Cell* 37: 492–502.
- Pomerantz, R.T. & Donnell, M.O. (2010): Direct Restart of a Replication Fork Stalled by a Head-On RNA Polymerase. *Science* 327: 590–92.
- Pomerantz, R.T. & O'Donnell, M. (2008): The Replisome Uses mRNA as a Primer after Colliding with RNA Polymerase. *Nature* 456: 762–66.
- Popuri, V., Tadokoro, T., Croteau, D.L., & Bohr, V. A. (2013): Human RECQL5: Guarding the Crossroads of DNA Replication and Transcription and Providing Backup Capability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 48: 289–99.
- Prado, F. & Aguilera, A. (2005): Impairment of Replication Fork Progression Mediates RNA polII Transcription-Associated Recombination. *The EMBO Journal* 24: 1267–76.
- Puranam, K.L. & Blackshear, P.J. (1994): Cloning and Characterization of RECQL, a Potential Human Homologue of the *Escherichia Coli* DNA Helicase RecQ. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 29838–45.
- Raghuraman, M.K., Winzeler, E.A., Collingwood, D., Hunt, S., Wodicka, L., Conway, A., Lockhart, D.J., Davis, R.W., Brewer, B.J., & Fangman, W.L. (2001): Replication Dynamics of the Yeast Genome. *Science (New York, N.Y.)* 294: 115–21.
- Ralf, C., Hickson, I.D., & Wu, L. (2006): The Bloom's Syndrome Helicase Can Promote the Regression of a Model Replication Fork. *Journal of Biological Chemistry* 281: 22839–46.
- Raveendranathan, M., Chattopadhyay, S., Bolon, Y.-T., Haworth, J., Clarke, D.J., & Bielinsky, A.-K. (2006): Genome-Wide Replication Profiles of S-Phase Checkpoint Mutants Reveal Fragile Sites in Yeast. *The EMBO Journal* 25: 3627–39.
- Ren, H., Dou, S.-X., Zhang, X.-D., Wang, P.-Y., Kanagaraj, R., Liu, J.-L., Janscak, P., Hu, J.-S., & Xi, X.G. (2008): The Zinc-Binding Motif of Human RECQ5beta Suppresses the Intrinsic Strand-Annealing Activity of Its DExH Helicase Domain and Is Essential for the Helicase Activity of the Enzyme. *The Biochemical Journal* 412: 425–33.
- Saeki, H. & Svejstrup, J.Q. (2009): Stability, Flexibility, and Dynamic Interactions of Colliding RNA Polymerase II Elongation Complexes. *Molecular Cell* 35: 191–205.
- Saintigny, Y., Delacôte, F., Varès, G., Petitot, F., Lambert, S., Averbeck, D., & Lopez, B.S. (2001): Characterization of Homologous Recombination Induced by Replication Inhibition in Mammalian Cells. *The EMBO Journal* 20: 3861–70.
- Saponaro, M., Kantidakis, T., Mitter, R., Kelly, G.P., Heron, M., Williams, H., Söding, J., Stewart, A., & Svejstrup, J.Q. (2014): RECQL5 Controls Transcript Elongation and Suppresses Genome Instability Associated with Transcription Stress. *Cell* 157: 1037–49.

- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., & Livingston, D.M. (1997): Association of BRCA1 with Rad51 in Mitotic and Meiotic Cells. *Cell* 88: 265–75.
- Shimamoto, A., Nishikawa, K., Kitao, S., & Furuichi, Y. (2000): Human RecQ5beta, a Large Isomer of RecQ5 DNA Helicase, Localizes in the Nucleoplasm and Interacts with Topoisomerases 3alpha and 3beta. *Nucleic Acids Research* 28: 1647–55.
- Schlacher, K., Wu, H., & Jasin, M. (2012): A Distinct Replication Fork Protection Pathway Connects Fanconi Anemia Tumor Suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell* 22: 106–16.
- Schwendener, S., Raynard, S., Paliwal, S., Cheng, A., Kanagaraj, R., Shevelev, I., Stark, J.M., Sung, P., & Janscak, P. (2010): Physical Interaction of RECQ5 Helicase with RAD51 Facilitates Its Anti-Recombinase Activity. *Journal of Biological Chemistry* 285: 15739–45.
- Sidorova, J.M., Li, N., Folch, A., & Monnat, R.J. (2008): The RecQ Helicase WRN Is Required for Normal Replication Fork Progression after DNA Damage or Replication Fork Arrest. *Cell Cycle* 7: 796–807.
- Sobell, H.M. (1985): Actinomycin and DNA Transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 5328–31.
- Speina, E., Dawut, L., Hedayati, M., Wang, Z.M., May, A., Schwendener, S., Janscak, P., Croteau, D.L., & Bohr, V.A. (2010): Human RECQL5 $\beta$  Stimulates Flap Endonuclease 1. *Nucleic Acids Research* 38: 2904–16.
- Srivatsan, A., Tehrani, A., MacAlpine, D.M., & Wang, J.D. (2010): Co-Orientation of Replication and Transcription Preserves Genome Integrity. *PLoS Genetics* 6.
- Starita, L.M., Horwitz, A.A., Keogh, M.C., Ishioka, C., Parvin, J.D., & Chiba, N. (2005): BRCA1/BARD1 Ubiquitinate Phosphorylated RNA Polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* 280: 24498–505.
- Stillman, B. (2005): Origin Recognition and the Chromosome Cycle. *FEBS letters* 579: 877–84.
- Sun, H., Bennett, R.J., & Maizels, N. (1999): The *Saccharomyces Cerevisiae* Sgs1 Helicase Efficiently Unwinds G-G Paired DNAs. *Nucleic Acids Research* 27: 1978–84.
- Tadokoro, T., Ramamoorthy, M., Popuri, V., May, A., Tian, J., Sykora, P., Rybanska, I., Wilson, D.M., Croteau, D.L., & Bohr, V. A. (2012): Human RECQL5 Participates in the Removal of Endogenous DNA Damage. *Molecular Biology of the Cell* 23: 4273–85.
- Tian, F., Sharma, S., Zou, J., Lin, S., Wang, B., Rezvani, K., & Wang, H. (2013): BRCA1 Promotes the Ubiquitination of PCNA and Recruitment of Translesion Polymerases in Response to Replication Blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 16283–16283.
- Tuduri, S., Crabbé, L., Conti, C., Tourrière, H., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., Pantesco, V., De Vos, J., Thomas, A., Theillet, C., Pommier, Y., Tazi, J., Coquelle, A., & Pasero, P. (2009): Topoisomerase I Suppresses Genomic Instability by Preventing Interference between Replication and Transcription. *Nature Cell Biology* 11: 1315–24.
- Urban, V., Dobrovolna, J., Hühn, D., Fryzelkova, J., Bartek, J., & Janscak, P. (2016): RECQ5 Helicase Promotes Resolution of Conflicts between Replication and Transcription in Human Cells. *The Journal of Cell Biology* 214: 401–15.
- Urban, V., Dobrovolna, J., & Janscak, P. (2016): Distinct Functions of Human RecQ Helicases during DNA Replication. *Biophysical Chemistry*: 1–7.
- Wahba, L., Amon, J.D., Koshland, D., & Vuica-Ross, M. (2011): RNase H and Multiple RNA

- Biogenesis Factors Cooperate to Prevent RNA:DNA Hybrids from Generating Genome Instability. *Molecular Cell* 44: 978–88.
- Wang, J.D., Berkmen, M.B., & Grossman, A.D. (2007): Genome-Wide Coorientation of Replication and Transcription Reduces Adverse Effects on Replication in *Bacillus Subtilis*. *PNAS* 104: 5608–13.
- Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S.J., & Qin, J. (2000): Recognition and Repair of Aberrant DNA Structures BASC , a Super Complex of BRCA1-Associated Proteins Involved in the Recognition and Repair of Aberrant DNA Structures. *Genes & Development* 14: 927–39.
- Wei, X., Samarabandu, J., Devdhar, R.S., Siegel, A. J., Acharya, R., & Berezney, R. (1998): Segregation of Transcription and Replication Sites into Higher Order Domains. *Science (New York, N.Y.)* 281: 1502–6.
- Wilson, T.E., Arlt, M.F., Park, S.H., Rajendran, S., Paulsen, M., Ljungman, M., & Glover, T.W.W. (2014): Large Transcription Units Unify Copy Number Variants and Common Fragile Sites Arising under Replication Stress. *Genome Research*: 25: 189–200
- Yu, C., Gan, H., Han, J., Zhou, Z.-X., Jia, S., Chabes, A., Farrugia, G., Ordog, T., & Zhang, Z. (2014): Strand-Specific Analysis Shows Protein Binding at Replication Forks and PCNA Unloading from Lagging Strands When Forks Stall. *Molecular Cell* 56: 551–63.
- Yu, C.E., Oshima, J., Fu, Y.H., Wijsman, E.M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., Martin, G.M., Mulligan, J., & Schellenberg, G.D. (1996): Positional Cloning of the Werner’s Syndrome Gene. *Science (New York, N.Y.)* 272: 258–62.
- Yunger, S., Rosenfeld, L., Garini, Y., Shav-Tal, Y., Tal, Y.S., & Shav-tal, Y. (2010): Single-Allele Analysis of Transcription Kinetics in Living Mammalian Cells. *Nature Methods* 7: 631–33.
- Zaratiegui, M., Castel, S.E., Irvine, D. V, Kloc, A., Ren, J., Li, F., de Castro, E., Marín, L., Chang, A.-Y., Goto, D., Cande, W.Z., Antequera, F., Arcangioli, B., & Martienssen, R.A. (2011): RNAi Promotes Heterochromatic Silencing through Replication-Coupled Release of RNA Pol II. *Nature* 479: 135–38.
- Zhang, J. & Powell, S.N. (2005): The Role of the BRCA1 Tumor Suppressor in DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular Cancer Research* 3: 531–39.
- Zhang, J., Willers, H., Feng, Z., Ghosh, J.C., Kim, S., Weaver, D.T., Chung, J.H., Powell, S.N., & Xia, F. (2004): Chk2 Phosphorylation of BRCA1 Regulates DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology* 24: 708–18.
- Zheng, L., Kanagaraj, R., Mihaljevic, B., Schwendener, S., Sartori, A.A., Gerrits, B., Shevelev, I., & Janscak, P. (2009): MRE11 Complex Links RECQ5 Helicase to Sites of DNA Damage. *Nucleic Acids Research* 37: 2645–57.