



STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

HELIKÁZA ROTHMUND-THOMSONOVA SYNDROMU
A JEJÍ DNA VAZEBNÉ PREFERENCE

ROTHMUND-THOMSON SYNDROME HELICASE AND ITS
DNA BINDING PREFERENCES

AUTOR Barbora Čechová
ŠKOLA Gymnázium Matyáše Lercha, Brno, Žižkova 55
KRAJ Jihomoravský
ŠKOLITEL doc. Mgr. Lumír Krejčí, Ph.D.
OBOR 04. Biologie

Prohlášení

Prohlašuji, že svou práci na téma Helikáza Rothmund-Thomsonova syndromu a její DNA vazebné preference jsem vypracovala samostatně pod vedením doc. Mgr. Lumíra Krejčího, Ph.D. a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce SOČ jsou shodné a nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne 3. 3. 2015

Podpis:



Masarykova univerzita v Brně

Lékařská fakulta

Laboratoř homologní rekombinace a opravy
DNA



Poděkování

Mé velké poděkování patří Mgr. Lumíru Krejčímu, Ph.D. za možnost vypracovat svou Středoškolskou odbornou činnost v Laboratoři homologní rekombinace a opravy DNA (LORD) a za poskytovaný feedback.

Dále bych chtěla poděkovat Bc. Haně Sedláčkové za bezmeznou trpělivost, množství času, který mi věnovala při vedení, za pomoc, když jsem se ocitla v nesnázích a hlavně za velmi osobní přístup. Můj další dík patří Mgr. Veronice Altmannové, Ph.D. za příjemné vyplnění volného času při čekání a vzorné přípravy na písemky z dějepisu. Poděkování patří také Ing. Daně Sedláčkové za korekturu češtiny v práci. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala zbytku vědeckého týmu LORD za příjemné prostředí a snahu mě trochu vykrmit.

Velké díky patří také Gymnáziu Matyáše Lercha, ředitelství školy za vstřícnost při vyřizování individuálního studijního plánu, jmenovitě pak třídnímu Mgr. Pavlu Ampapovi, Mgr. Martinu Krejčímu a Mgr. Renatě Řezníčkové.

Ráda bych také poděkovala mamce za vyvařování vynikajících obídků na univerzitu a Vítu Všianskému za to, že to se mnou vydržel, i když to občas dalo zabrat.

Tato práce byla provedena za finanční podpory Jihomoravského kraje.

ANOTACE

Tato práce vznikla jako soutěžní příspěvek do Středoškolské odborné činnosti. Jejím cílem bylo mapování DNA vazebných domén proteinu RECQ4, který zastává důležitou funkci během replikace a opravy poškozené DNA. I když byla publikována řada studií o proteinu RECQ4, jeho přesná funkce v metabolismu DNA zůstává dosud neobjasněna. Nicméně jeho role při udržování stability genetické informace je nepostradatelná, protože mutace v genu *RECQ4* jsou spojeny se třemi nevléčitelnými autosomálně recesivními onemocněními: Rothmund-Thomsonův syndrom (RTS), Baller-Geroldův syndrom a RAPADILINO. Mezi symptomy RTS patří červená kožní vyrážka (poikiloderma), malý vzrůst, předčasné stárnutí a predispozice k rakovině. Mapování DNA vazebných domén by mohlo pomoci při určování hlavní role proteinu RECQ4 v buněčných pochodech a zároveň přispět k pochopení molekulární podstaty RTS, což by mohl být první krůček k úspěšné léčbě.

Teoretická část se zaměřuje na popis RecQ helikáz, jejich známých proteinových interakcí a pravděpodobnou funkci v buňce s přihlédnutím na autosomálně recesivní onemocnění, která jsou spojena s poruchami syntézy těchto proteinů.

Cílem praktické části bylo mapování DNA vazebných domén proteinu RECQ4 na N-terminu pomocí biochemických *in vitro* esejí, přičemž tyto výsledky jsou součástí vědeckého článku v mezinárodním impaktovaném časopise DNA Repair.

Klíčová slova: RecQ helikázy, RECQ4, Rothmund-Thomsonův syndrom, oprava poškozené DNA

ANNOTATION

This work was created as a contribution to the SOČ competition. The main goal of my study was to map DNA binding domains of the RECQ4 protein. This protein has an essential function during DNA replication and DNA repair. Although there was a number of studies concerning the RECQ4 protein, its exact function in DNA metabolism remains still largely unknown. It is however without doubt that its role in maintaining stability of genetical information is crucial because mutations in the RECQ4 gene cause three untreatable autosomal recessive disorders: Rothmund-Thomson syndrome (RTS), Baller-Gerold syndrome and RAPADILINO. Symptoms of the RTS are mainly red rash, abnormally short growth, premature aging and predispositions toward cancer. DNA mapping of the binding domains could help in assessing the main role of RECQ4 in cellular metabolism and at the same time be a first step in curing the RTS.

The theoretical part of this study is concerned mainly with the description of RecQ helicases, their known protein-protein interactions and their probable role in cellular metabolism while also taking the autosomal recessive disorders linked to mutations in these proteins into consideration.

Goal of the experimental part of this work was mapping of the RECQ4 DNA binding domains on the N-terminal end using biochemical *in vitro* assays. Final results are a part of an article in DNA Repair journal, an international, impacted scientific journal.

Key words: RecQ helicases, RECQ4, Rothmund-Thomson syndrome, DNA repair

Obsah

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1. RECQ HELIKÁZY.....	11
2.1.1. <i>Struktura a biochemická aktivita RecQ helikáz</i>	13
2.1.2. <i>Funkce RecQ helikáz v metabolismu DNA</i>	14
2.2. RECQ4.....	21
2.2.1. <i>Biochemická charakterizace RECQ4</i>	21
2.2.2. <i>Syndromy spojené s mutacemi v RECQ4</i>	22
3. CÍLE PRÁCE	27
4. MATERIÁLY	28
4.1. CHEMIKÁLIE, ENZYMY	28
4.2. PUFRY A ROZTOKY	28
4.3. PLAZMIDY	29
4.4. MÉDIA	30
4.5. STANDARDY	30
4.6. KITY PRO PRÁCI S pDNA	30
4.7. BAKTERIÁLNÍ KMENY	31
4.8. PŘÍSTROJE	31
4.9. SOFTWARE	31
4.10. OLIGONUKLEOTIDY, DNA SUBSTRÁTY	31
5. METODY	32
5.1. AGARÓZOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	32
5.2. IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA.....	33
5.3. RESTRIKČNÍ ANALÝZA.....	33
5.4. LIGACE	33
5.5. BUNĚČNÁ TRANSFORMACE	34
5.6. PROTEINOVÁ EXPRESE	34
5.7. PURIFIKACE PROTEINŮ	34
5.8. LYZE BUŇKY A ULTRACENTRIFUGACE.....	34
5.9. CHROMATOGRAFICKÉ METODY	35
5.10. KONCENTROVÁNÍ PROTEINŮ	36
5.11. SDS-PAGE ELEKTROFORÉZA	37
5.12. WESTERN BLOT ANALÝZA	37
5.13. RETARDAČNÍ ANALÝZA (EMSA – ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY).....	38
5. VÝSLEDKY	39
5.1. KLONOVÁNÍ FRAGMENTU <i>RECQ4(269-400)</i> DO pCR-BLUNT II-TOPO VEKTORU	40
5.2. PŘÍPRAVA EXPRESNÍHO VEKTORU pMAL(TEV)- <i>RECQ4(269-400)</i>	41
5.3. EXPRESE FRAGMENTŮ <i>RECQ4</i>	42
5.4. PURIFIKACE FRAGMENTŮ <i>RECQ4</i>	43
5.5. DNA VAZEBNÁ AKTIVITA PURIFIKOVANÝCH FRAGMENTŮ <i>RECQ4</i>	46
5.5.1. <i>Srovnání afinity fragmentů k ssDNA</i>	46
5.5.2. <i>Srovnání afinity fragmentů RECQ4 k Hollidayově struktuře</i>	47
7. DISKUZE	49
8. ZÁVĚR	53
9. PŘÍNOS PRÁCE	54
10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55
10.1. SEZNAM POUŽITÝCH INTERNETOVÝCH ZDROJŮ	58
11. PŘÍLOHA	59

Seznam použitých zkratek

β-ME	β-merkapt ethanol
AMK	aminokyselina
AmpR	ampicilinová rezistence
APS	peroxidisíran amonný (angl. ammonium persulfáte)
ATP	adenosintrifosfát
BER	bázová excisní oprava (angl. base excision repair)
BGS	Baller-Geroldův syndrom
BS	Bloomův syndrom
BLM	Bloomova helikáza (RECQ2)
bp	párů bází (angl. base pairs)
BSA	hovězí sérový albumin (angl. bovine serum albumine)
CBB	lyzační pufr (angl. cell breakage buffer)
CV	objem kolony (angl. column volume)
dH ₂ O	deionizovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSB	dvouřetězcové zlomy (angl. double strand break)
dsDNA	dvouřetězcové vlákno DNA
DTT	dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethyléndiamintetraoctová
EMSA	retardační analýza (angl. electrophoretic mobility shift assay)
HR	homologní rekombinace
HJ	Hollidayova struktura (angl. Holliday junction)
HRDC	helikázová a Rnázová D C-terminální doména
IPTG	izopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid
KanR	kanamycinová rezistence
kbp	kilo párových bází
kDa	kilo Dalton
LB	Luria broth
MBP	maltózu vázající protein (angl. maltose binding protein)
mj.	mimo jiné
MMR	oprava nesprávného párování (angl. mismatch repair)
MRN	MRE11/RAD50/NBS1 komplex
NER	nukleotidová excisní oprava (angl. nukleotide excision repair)
NHEJ	nehomologní spojování konců (angl. nonhomologous end-joining)
NP40	Nonidet P40
pDNA	plazmidová DNA
PCR	polymerázová řetězová reakce
pH	vodíkový exponent
pI	izoelektrický bod
PMSF	fenylmethansulfonylfluorid
resp.	respektive

RPA	Replikační protein A
RQC	RecQ karboxy-terminal
RTS	Rothmund-Thomsonův syndrom
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza
ssDNA	jednořetězcové vlákno DNA
TEMED	N,N,N',N' – tetramethylethyléndiamin
UV	ultrafialová
WRN	Wernerova helikáza (RECQ3)
WS	Wernerův syndrom
wt	wild-type
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum</i> skupina A

1. Úvod

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) jako nositelka genetické informace je tou substancí, která stojí za úslovím „stejně plodí stejné“. Dědičná informace je zakódována v chemickém jazyce DNA a reprodukována ve všech buňkách našeho těla. Tento DNA-program je to, co řídí vývoj našich biochemických, anatomických, fyziologických a do jisté míry behaviorálních znaků [1]. Právě geny (kódující úseky DNA) nesou informaci pro syntézu nejrůznějších proteinů s celou škálou funkcí (stavební, transportní, katalytické, regulační, řídicí aj.), které jsou nesmírně důležité pro správný vývoj a fungování všech živých organismů.

DNA je však bohužel neustále poškozována působením různých faktorů, jak z vnějšího prostředí (např. ionizující záření, UV záření, toxické látky), ale také z vnitřního prostředí (např. produkty oxidativního metabolismu nebo při replikaci již poškozené DNA). Bylo prokázáno, že množství poškození v jedné buňce může dosáhnout až půl milionu za jeden den [2]. Tato poškození DNA, pokud nejsou opravena (nebo jsou opravena nesprávně), pak mohou způsobovat problémy při replikaci nebo transkripci DNA a vést k rozsáhlým chromozomovým změnám a potenciálně i vzniku rakoviny či jiných dědičných onemocnění (Tab. 1).

Nicméně během evoluce, prokaryotické stejně jako eukaryotické buňky vyvinuly rozsáhlé DNA opravné mechanismy pro opravu různých typů DNA poškození (Tab. 3) [2-5]. Celá řada genů (resp. proteinů) se podílí na správném průběhu opravných mechanismů poškozené DNA. Mutace v těchto genech pak mohou způsobit redukci nebo úplnou ztrátu funkce proteinu, což může být příčinou poruch DNA opravných mechanismů vedoucí ke genomové nestabilitě a vzniku velmi závažných onemocnění.

Onemocnění	Mutace	Projev
Cystická fibróza	Mutace v <i>CFTR</i> genu	Postižené žlázy s vnitřní sekrecí, respirační potíže.
Huntingtonova choroba	Zmnožení CAG tripletů	Degenerativní změny na mozku – motorické poruchy, progresivní demence.
Srpková anémie	Mutace v β globinovém řetězci	Zkroucení červených krvinek do srpkovité podoby, následuje ucpávání kapilár, zvětšení sleziny (snížená funkce).
Daltonismus	Mutace v genech <i>OPN1LW</i> , <i>OPN1MW</i> , <i>OPN1SW</i>	Schopnost rozeznat červenou a zelenou barvu chybí nebo je omezena.
Hereditární karcinom prsu a ovarií	Mutace v genu <i>BRCA1</i> a <i>BRCA2</i>	Rakovina prsu, vaječnicků, riziko vzniku dalších nádorů: např. žaludku nebo pankreatu.
Hemofilie	Mutace v genu kódujících faktor srážlivosti VIII a IX	Chorobná krvácivost – krevní výrony do svalů či kloubů.

Tabulka 1: Vybraná onemocnění spojená se změnami na genetické úrovni. [11]

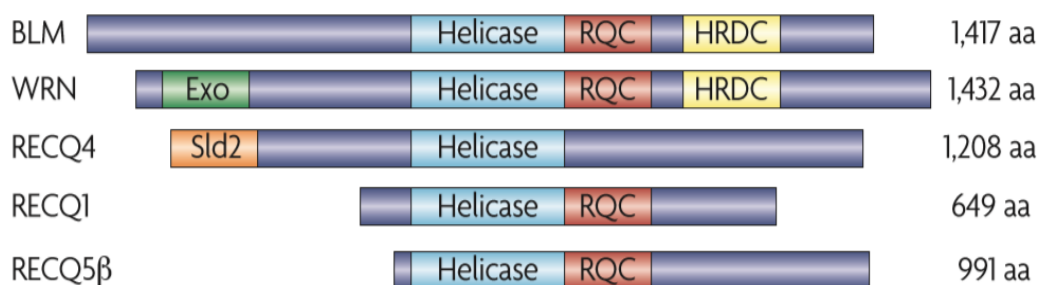
Dnešní rozsáhlý vědecký výzkum opravy poškozené DNA nám díky preciznímu pochopení opravných mechanismů (na molekulární úrovni) pomůže pochopit molekulární podstatu vzniku nádorových onemocnění a tím i zvýšit efektivnost dnešních protinádorových terapií a poskytnout nové cíle a nástroje v nádorové terapii.

2. Teoretická část

2. 1. RecQ helicázy

Helikázy se řadí mezi velmi důležité enzymy, které hrají rozhodující roli v metabolismu DNA. Díky schopnosti hydrolyzovat ATP se pohybují po vlákně dsDNA, rozrušují vodíkové vazby mezi komplementárními řetězci, a tím od sebe oddělují dva řetězce ssDNA. Správné rozpletení dvoušroubovice je klíčovým okamžikem v procesech buněčného života zahrnující replikaci, transkripci, rekombinaci a opravu poškozené DNA.

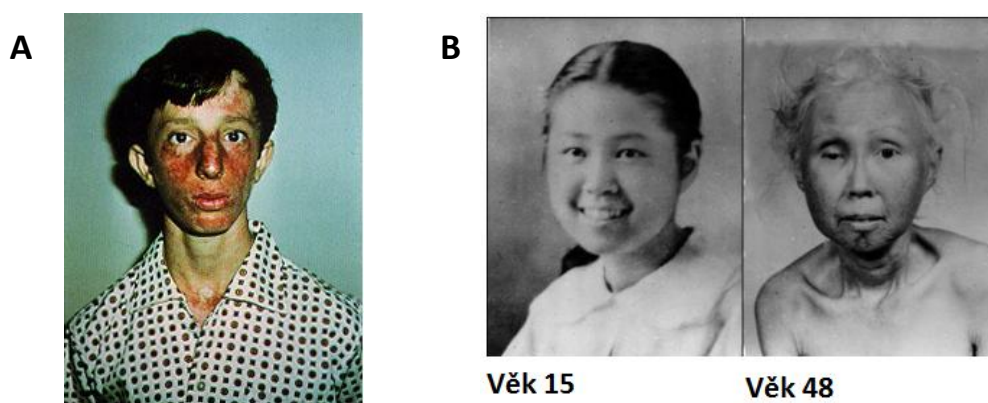
Jednu vysoce konzervovanou skupinu helicáz tvoří rodina RecQ helicáz, které jsou díky své nepostradatelné roli v mnoha procesech metabolismu DNA považovány za tzv. „ochránce“ genomu, protože se podílí na udržování stability genetické informace a zároveň potlačují vznik nádorového bujení [6-8]. Zatímco u bakterií a kvasinek byla identifikována pouze jedna RecQ helicáza, v lidských buňkách bylo objeveno dokonce pět RecQ homologních proteinů – RECQ1 [9, 10], BLM (RECQ2) [11], WRN (RECQ3) [12], RECQ4 (RTS) a RECQ5 [13](Obr. 1). Nepostradatelná biologická role RecQ helicáz je navíc potvrzena tím, že mutace v genech *BLM*, *WRN* a *RECQ4* jsou spojeny s velmi zákeřnými dědičnými onemocněními: Bloomovým (BS), Wernerovým (WS) a Rothmund-Thomsonovým syndromem (RTS). Tato genetická onemocnění jsou spojena s vyšší náchylností k rakovině, předčasným stárnutím a chromozomovou nestabilitou [14-16].



Obrázek 1: Grafické znázornění lidských RecQ helicáz – RECQ1, BLM, WRN, RECQ4 a RECQ5β. Světle modrá barva představuje konzervovanou helicázovou doménu. Červenou je znázorněna RQC doména a žlutě HRDC doména. Zeleně je u WRN zobrazena exonukleázová doména a oranžově je u RECQ4 vyobrazena Sld2 doména [8].

Onemocnění	Hlavní klinické znaky	Predispozice k rakovině
Bloomův syndrom	proporcionální malý vzrůst, imunodeficience, diabetes typ 2, mužská infertilita a ženská subfertilita, hyperpigmentace a hypopigmentace kůže, k slunci citlivá obličejová ¹ erythema	většina typů, leukémie, rakoviny kůže, prsu a tračnicku
Wernerův syndrom	různé znaky předčasného stárnutí: arterioskleróza, diabetes typ 2, osteoporóza, katarakt, šednutí a ztráta vlasů; retardace růstu v pubertě, kalcifikace měkké tkáně	převážně rakoviny mezenchymálního původu (měkká tkáň a jiné ² sarkomy), epiteliální sarkomy (³ melanomy)
Rothmund-Thomsonův syndrom	poikiloderma, skeletární abnormality, šedý zákal, řídnutí vlasů, dystrofické nehty a zuby	nejčastěji osteosarkoma, často v dětství

Tabulka 2: Klinické příznaky syndromů spojených s mutacemi v genech RecQ helikáz [8].



Obrázek 2: (A) Pacient postižený Bloomovým syndromem se znaky erythemy. (B) Pacientka s Wernerovým syndromem vykazující znaky předčasného stárnutí. [15,16]

¹ Erythema: zčervenání kůže z důvodů zvýšení krevního oběhu v povrchových vlasečnicích. [12]

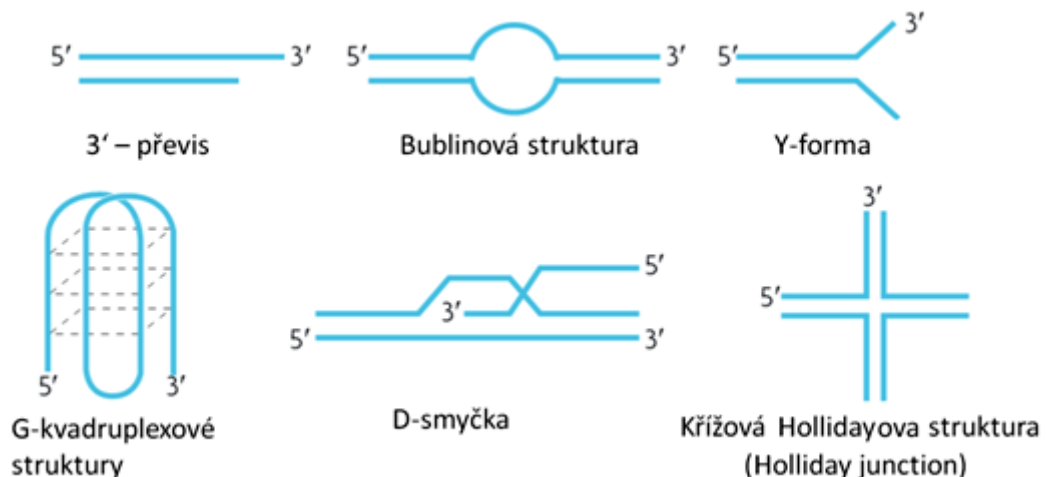
² Sarkom: zhoubný nádor pojivové tkáně. [13]

³ Melanom: zhoubný nádor melanocytů – pigmentových živočišných buněk. [14]

2.1.1. Struktura a biochemická aktivita RecQ helikáz

Jak ukazuje obrázek 1, podle experimentálních a bioinformatických analýz můžeme uvnitř polypeptidového řetězce RecQ helikáz rozlišit několik konzervovaných domén, které zároveň určují aktivitu jednotlivých proteinů. Hlavní domény RecQ helikáz jsou tři: helikázová, RecQ karboxy-terminální (RQC) a RNázová D C-terminální (HRDC) doména [17].

1. **Helikázová doména** s rozsahem 450 aminokyselin zahrnuje motiv pro vazbu ATP, který je hlavním energetickým zdrojem pro samotnou helikázovou aktivitu. BLM a WRN, které patří mezi nejvíce prostudované RecQ proteiny, umí rozvinout nejrůznější DNA struktury zahrnující 3'-převis, bublinové struktury, Y-formy, D-smyčky, křížovou Hollidayovu strukturu (HJ, Holliday junction) nebo G-kvadruplexové struktury (Obr. 3) [18-20].



Obrázek 3: Příklady DNA substrátů, které jsou schopny rozvinout RecQ helikázy [8].

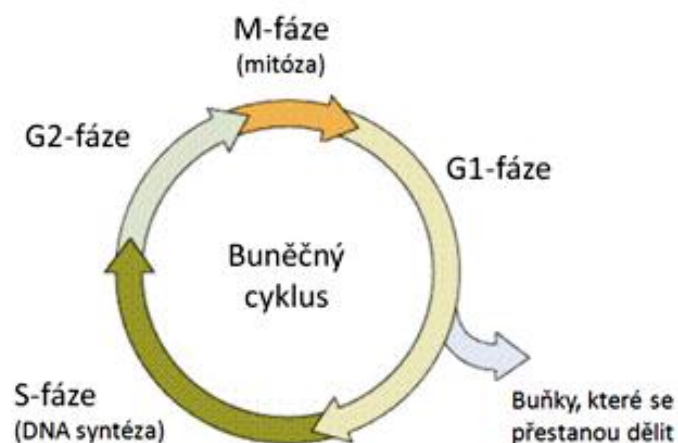
2. **RQC doména** je důležitá pro strukturní celistvost proteinu a také pro vazbu dvouřetězcové DNA [21, 22]. Tato doména bude mít také pravděpodobně roli při zprostředkování proteinových interakcí RecQ helikáz s jinými proteiny [23].
3. Poslední **HRDC doména** je nejméně konzervovaná, nicméně pomocí rentgenové krystalografie bylo zjištěno, že je důležitá pro vazbu jednořetězcové DNA. Domény RQC a HRDC, důležité pro vazbu k DNA, u některých členů RecQ helikázové rodiny chybějí, např. RECQ4 postrádá obě domény [24, 25].

Kromě výše popsaných domén se mohou RecQ helikázy mezi sebou lišit dalšími doménami, které mohou sdílet homologii s jinými proteiny a tím se liší i jejich vlastnosti a funkce v buňce. Příkladem může být WRN helikáza s exodoménou na N-konci, která zajišťuje exonukleázovou aktivitu WRN proteinu [26].

Lidské RecQ helikázy se vyznačují nejen klasickou helikázovou aktivitou, tedy schopností oddělovat od sebe dva řetězce DNA za přítomnosti ATP. Na druhou stranu vykazují také velmi silnou tzv. annealing aktivitu, tj. zprostředkovávat nasedání komplementárních jednořetězcových úseků DNA do výsledného duplexu [27].

2.1.2. Funkce RecQ helikáz v metabolismu DNA

Buněčný cyklus zahrnuje několik kroků (Obr. 4), z nichž každý musí být efektivně a časově dokončen než započne krok následující. Během S-fáze buněčného cyklu buňka musí precizně duplikovat své chromozomy, které pak následně musí velmi přesně rozdělit během M-fáze. Avšak během S-fáze se může vyskytnout několik překážek, které mohou nejen ovlivnit buněčný cyklus, ale také mohou vést v následující M-fázi k chromozomové nestabilitě, která bývá obvykle příčinou vzniku některých neurologických onemocnění nebo nádorového bujení [28].



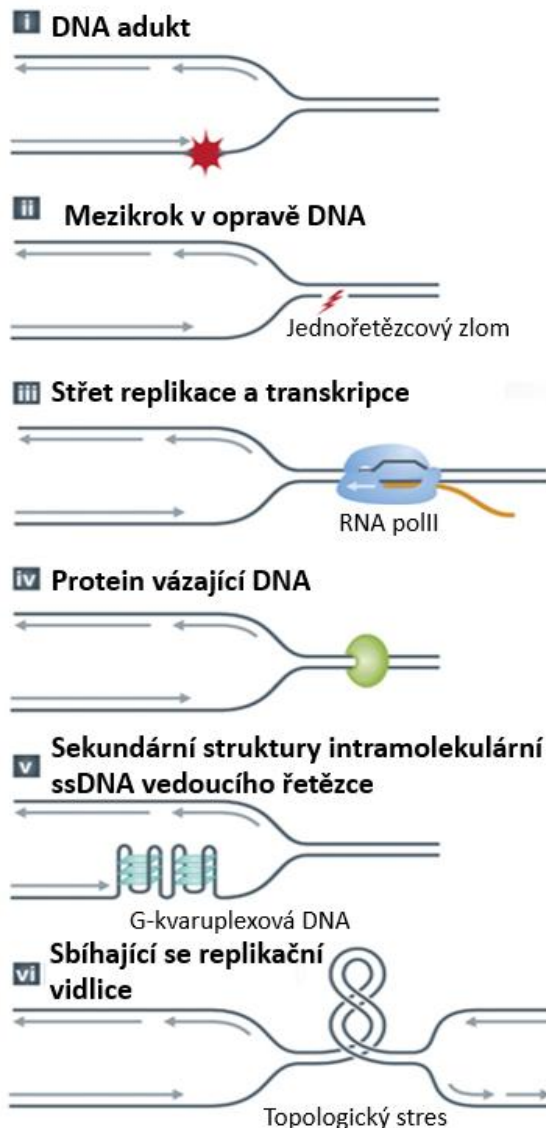
Obrázek 4: Buněčný cyklus. V dělicí se buňce se střídá mitotická fáze (M) s interfází, kde se buňka připravuje na samotné dělení. První je G1 fáze, po ní následuje S fáze, ve které jsou duplikovány chromozomy a poté G2 fáze. V mitóze už dochází k samotnému rozchodu dceřiných chromozomů, ke karyokinezi a cytokinezi. [17]

1.) Replikace DNA

Během replikace DNA se mohou vyskytnout překážky, které replikační mašinerie není schopná vyřešit, a proto dochází k předčasnému zastavení replikační vidlice [28, 29] (Obr. 5). Problémy replikační vidlice mohou být způsobeny těmito překážkami:

- **Adukty DNA**, tedy pozměněné nukleotidy (nukleosidy nebo báze). Příčinou vzniku aduktů jsou obvykle elektrofilní organické látky, které vstupují do organismu z vnějšího prostředí anebo vznikají jako reaktivní metabolické intermediáty, se schopností atakovat nukleofilní centra v nukleových kyselinách a tímto poškozovat genetickou informaci.
- **Jednořetězcové nebo dvouřetězcové zlomy**, které vznikají především po expozici ionizujícím zářením, UV zářením, genotoxickými chemikáliemi, ale také produkty vnitřního oxidativního metabolismu buňky.
- **Kovalentně vázaný protein na DNA**, který replikační helikáza není schopná odstranit. Problém může také způsobovat **setkání procesů replikace a transkripce**.
- Různé **intramolekulární sekundární struktury** ssDNA (např. G-quadruplex) ve vedoucím řetězci rovněž vedou k zastavení replikační vidlice.
- **Topologický stres**, kdy se potkají dvě proti sobě jdoucí replikační vidlice. Tento problém je často nevyhnutelný rys eukaryotické replikace, ve které je obousměrná replikace iniciována z více počátků replikace podél každého chromozomu.

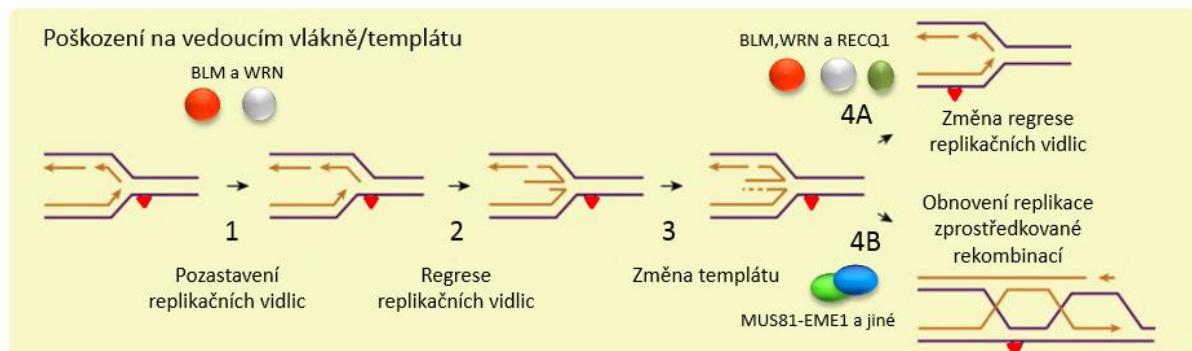
Překážky v replikaci DNA



Obrázek 5: Znázornění možných překážek bránících v replikaci DNA [28].

RecQ helikázy se na odstranění replikačních překážek podílí mnoha způsoby. Jedna z nejdůležitějších funkcí je restart zastavené replikační vidlice (Obr. 6). Výskyt poškození na vedoucím řetězci (DNA adukt) vede k zastavení replikační vidlice, avšak BLM a WRN podporují tzv. regresi replikační vidlice, což znamená oddělení nově nasyntetizovaných DNA vláken a jejich spojení, čímž vzniká čtyřcestná Hollidayova struktura (Obr. 3) [30, 31]. Vzniklá Hollidayova struktura pak může migrovat zpět za pomoci zejména RECQ1, BLM nebo WRN, a tím dochází k obnovení replikační vidlice [32-34]. Alternativně může být Hollidayova struktura rozštěpena strukturálně specifickými endonukleázami, což vede ke kolapsu

replikační vidlice, která pak musí být opravena pomocí procesu homologní rekombinace (viz níže) [35-37].



Obrázek 6: Schéma restartu zastavené replikační vidlice. (1) Zastavení replikační vidlice z důvodu poškození (červený trojúhelník) na vedoucím řetězci. (2) Regrese replikační vidlice – spojení nově nasyntetizovaných vláken a vznik Hollidayovy struktury (3). HJ struktura může pak migrovat zpět zejména prostřednictvím RecQ helikáz a zároveň dochází k obnovení replikační vidlice (4A). HJ struktura může být také alternativně rozštěpena pomocí strukturálně specifických endonukleáz, což vede ke kolapsu replikační vidlice, která je pak obnovena pomocí homologní rekombinace (4B) [37].

RecQ helikázy (zejména BLM a WRN) jsou schopné také díky své enzymatické aktivitě rozvíjet různé DNA struktury (G-quadruplexy, různé smyčky a vlásenky), které vznikají jako replikační „překážky“ vedoucího řetězce [38]. Navíc BLM také zastává důležitou úlohu při řešení topologického stresu, který vzniká při setkání dvou protichůdných replikačních vidlic. Přesná molekulární podstata je jen velmi málo objasněna, avšak důležitou roli při řešení tohoto problému hraje Bloomův komplex zahrnující BLM-TOPOIII α (DNA topoisomerase III α)-RMI1-RMI2 proteiny, které jsou schopny topologický stres uvolnit [39].

2.) DNA oprava

Jak bylo popsáno výše, DNA je neustále poškozována exogenním i endogenním působením, které způsobují mnoho různých typů poškození v DNA. V důsledku těchto rozdílných typů poškození (depurinace, deaminace, thyminové dimery, zlomy DNA aj.) se v průběhu evoluce vyvinula celá řada opravných mechanismů zodpovědná za jejich odstranění (Tab. 3). RecQ helikázy i zde zastávají mnoho úloh napříč téměř všemi mechanismy. Hlavní DNA opravné mechanismy tvoří:

Mechanismus opravy	Vznik poškození
Bázová excisní oprava (BER)	Abnormální DNA báze, jednoduché bázové adukty, jednořetězcové zlomy DNA vznikající při oxidativních poškozeních nebo při neúspěšné aktivitě topoizomerázy I (např. báze chemicky poškozené alkylací, deaminací nebo oxidací).
Nukleotidová excisní oprava (NER)	Poškození, která narušují helikální dvoušroubovici DNA, jako jsou rozměrné bázové adukty a fotoprodukty UV záření (př. thyminové dimery).
Homologní rekombinace (HR)	dvouřetězcové zlomy DNA, zastavené replikační vidlice
Nehomologní spojování konců (NHEJ)	dvouřetězcové zlomy DNA
Oprava nesprávného párování (MMR)	malé inserce, delece a nesprávné zařazení bazí během replikace a rekombinace.

Tabulka 3: Přehled základních mechanismů opravy DNA [2].

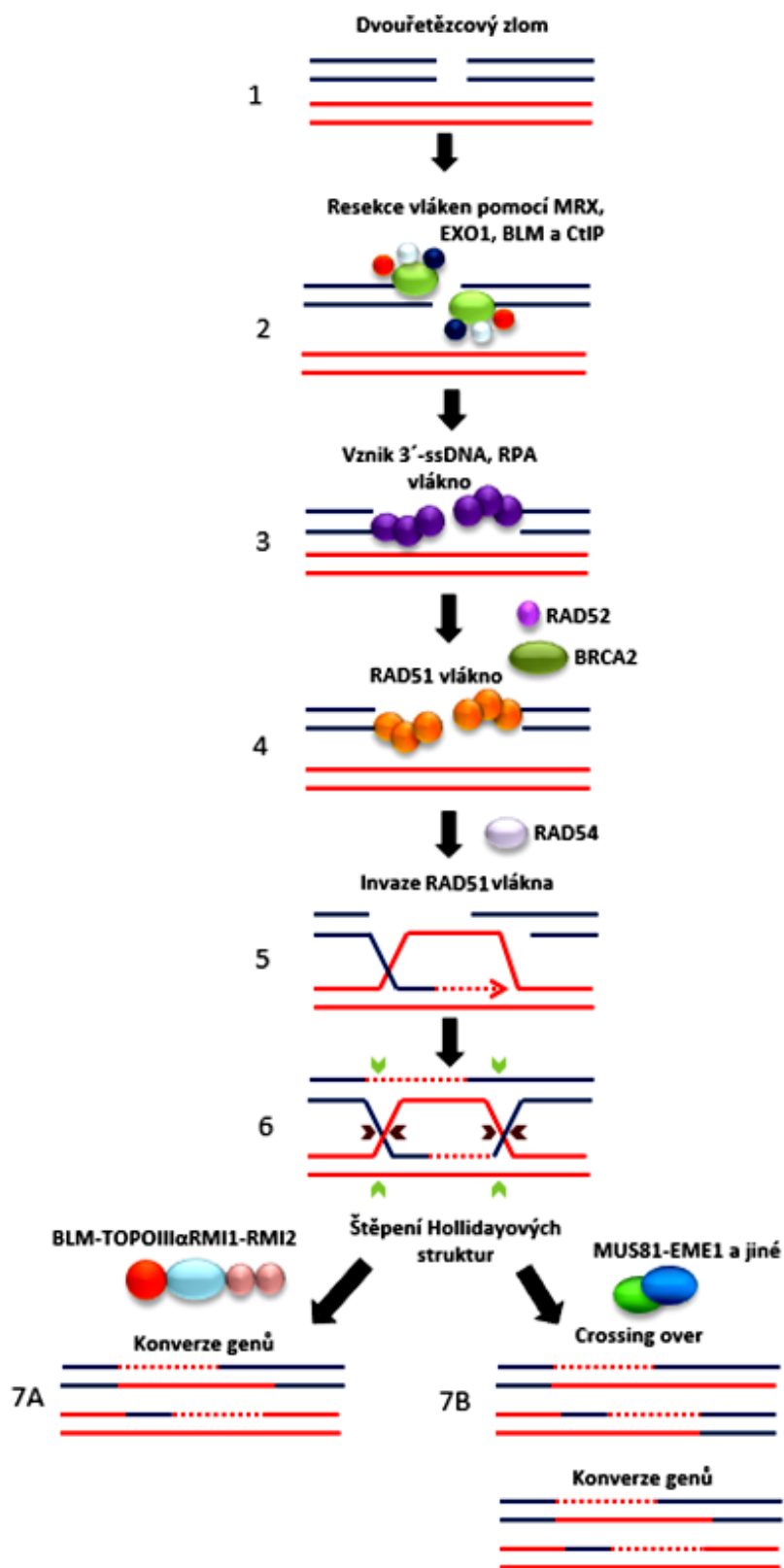
V rámci této práce se primárně zaměříme na mechanismus opravy dvouřetězcových zlomů (DSB) pomocí homologní rekombinace. Oprava dvouřetězcových zlomů je esenciální pro život buňky, protože neschopnost opravy DSB může způsobovat aneuploidii a genomovou nestabilitu vedoucí k rakovině nebo buněčné smrti.

Homologní rekombinace (HR)

HR je velmi precizní mechanismus zahrnující několik fází, kdy DSB je opraven na základě syntézy podle homologického úseku sesterské chromatidy nebo homologního chromozomu (Obr. 7). V první fázi HR jsou konce DSB podrobeny resekci za vzniku 3' jednořetězcového úseku DNA (ssDNA). 3' ssDNA vlákno je ihned po resekci pokryto proteinem RPA (replikační protein A), který zabraňuje vzniku sekundárním strukturám na ssDNA vlákne [40]. Následně dochází za pomoci rekombinačních mediátorů k výměně RPA za protein RAD51 a vzniku tzv. RAD51 presynaptického vlákna [41]. V druhé fázi HR je RAD51 presynaptické vlákno schopno vyhledat homologii za vzniku struktury zvané D-smyčka, ve které je pak donorová molekula DNA využita jako templát pro syntézu chybějící části [42]. Po DNA syntéze je nové vlákno zachyceno druhým koncem původního řetězce, což vede

ke vzniku dvojité Hollidayovi struktury. HJ struktura musí být rozložena, aby byla dokončena rekombinace a dvě molekuly DNA se mohly oddělit. HJ struktury mohou být tedy štěpeny strukturně specifickými endonukleázami (např. MUS81-EME1) nebo rozloženy pomocí kombinované aktivity helikáz a topoizomeráz [25, 37].

RecQ helikázy zastávají důležité regulační funkce v průběhu homologní rekombinace. V první fázi HR se BLM helikáza přímo účastní resekce konců dvouřetězcového zlomu za vzniku 3' ssDNA vlákna [43]. Několik studií prokázalo, že BLM, WRN a RECQ5 jsou schopny interagovat s proteinem RAD51 a vytlačovat jej z presynaptického vlákna, aby bylo zabráněno nevhodné nebo předčasné rekombinaci [44, 45]. V poslední fázi HR se BLM-TOPOIII α -RMI1-RMI2 komplex podílí na rozkladu dvojité Hollidayových struktur [25]. Navíc nepublikované výsledky z našeho laboratorního pracoviště ukazují, že i ostatní RecQ helikázy by se mohly podílet na zpracování HJ struktur a to spolu se strukturně specifickou endonukleázou MUS81-EME1.



Obrázek 7: Schéma homologní rekombinace pro opravu dvouřetězcových zlomů DNA na základě syntézy podle homologického úseku sesterské chromatidy nebo homologního chromozomu (1). V prvním kroku dochází k resekci vláken MRN (MRE11-RAD50-NBS1) komplexem (znázorněn jako zelené kuličky), společně s BLM komplexem (červené kuličky), EXO1 (bílé kuličky) a CtIP (tmavě

modré kuličky) (2). Vzniklý konec 3'-ssDNA převisu je obalen RPA proteinem (znázorněn fialově) (3). V dalším kroku je RPA nahrazeno RAD51 proteinem (oranžové kuličky) za vzniku nukleoproteinového vlákna (4), které je schopno vyhledat sekvenční homologii s pomocí RAD54 (5). Chybějící část DNA je dosyntetizována za následujícího vzniku dvojité HJ struktury (6), která může být rozložena buď (7A) pomocí BLM-TOPOIII α -RMI1-RMI2 komplexu (červeno-modro-růžová) vedoucí ke genové konverzi nebo (7B) endonukleázou MUS81-EME1 či jinými strukturně specifickými endonukleázami (modré a zelené kuličky) za vzniku jak crossovering overu tak genové konverze.

2.2. RECQ4

Gen lidské *RECQ4* helikázy byl identifikován v roce 1998 a lokalizován na dlouhém raménku (q) chromozomu 8 v pozici 24.3 [13]. Gen *RECQ4* je složen z 21 exonů a 13 intronů zahrnující 6 kbp genomické DNA [46]. Proteinový řetězec *RECQ4* je kódován 1208 aminokyselinami s molekulovou hmotností 133 kDa zahrnující ve svém centru vysoce konzervovanou helikázovou doménu typickou pro členy RecQ rodiny. Nicméně, ve srovnání s ostatními RecQ helikázami *RECQ4* postrádá RQC a HRDC domény zodpovědné primárně za vazbu k DNA (Obr. 1). Na druhou stranu N-terminální část *RECQ4* vykazuje vysokou homologii s proteinem Sld2, který je velmi důležitý pro začátek DNA replikace u kvasinek. Předpokládá se, že tato Sld2 doména by mohla určovat roli *RECQ4* v průběhu replikace DNA v lidských buňkách [8]. C-terminální část *RECQ4* nebyla dosud bohužel řádně charakterizována.

2.2.1. Biochemická charakterizace *RECQ4*

Při první biochemické charakterizaci *RECQ4* nebyla pozorována žádná helikázová aktivita tohoto proteinu *in vitro* [27]. Později bylo prokázáno, že *RECQ4* vlastní helikázovou aktivitu, která je velmi nízká a substrátově specifická (tj. *RECQ4* je schopen rozvíjet pouze krátké DNA vidlice s délkou komplementární části pouze 11 bp) [47]. Kromě helikázové aktivity se *RECQ4* protein vyznačuje také velmi silnou schopností nasedání komplementárních úseku ssDNA do dvoušroubovice [27].

N-terminální část *RECQ4* přímo interaguje s proteinem MCM10, který zprostředkovává spojení *RECQ4* s MCM2-7. MCM2-7 komplex zastává úlohu hlavní

helikázy rozplétající dsDNA při DNA replikaci a tím se RECQ4 stává nedílnou součástí MCM replikačního helikázového komplexu účastnícího se DNA replikace v lidských buňkách [48]. Další publikace pak ukazují, že RECQ4 má také nepostradatelnou roli při opravě poškozené DNA. Protein RECQ4 by se mohl pravděpodobně podílet na správném průběhu NER, a to zejména díky interakci s proteinem XPA (*Xeroderma pigmentosum* skupina A) [49]. Navíc, bylo prokázáno, že protein RECQ4 by mohl mít funkci při udržování telomer, které fungují také jako mechanická ochrana na koncích lineárních eukaryotických chromozomů [50]. Další studie pak naznačují, že RECQ4 se akumuluje v mitochondriích a fyzicky interaguje s proteinem p53 - významným tumorovým supresorem [51]. Je také velmi pravděpodobné, že RECQ4 by mohl mít úlohu při opravě DSB pomocí HR, protože interaguje s proteinem RAD51 - klíčovým faktorem HR [52].

I navzdory mnoha studiím a publikacím o RECQ4, zůstává tento protein nejméně charakterizovaným členem RecQ rodiny. Stále není jasné, jaká je jeho přesná role a jaký je mechanismus jeho funkce v metabolismu DNA. Navíc, pochopení jeho funkce při replikaci a opravě poškozené DNA je nezbytně důležité pro potenciální objasnění molekulární podstaty syndromů, které vznikají díky mutacím v jeho genu. Mutace v genu *RECQ4* jsou spojeny se třemi velmi zákeřnými dědičnými onemocněními: syndromem RAPADILINO, Rothmund-Thomsonovým syndromem a Baller-Geroldovým syndromem.

2.2.2. Syndromy spojené s mutacemi v *RECQ4*

A) Rothmund-Thomsonův syndrom (RTS)

RTS je ⁴autosomálně recesivní onemocnění s charakteristickou červenou vyrážkou (poikiloderma) a různorodými klinickými projevy zahrnující malý vzrůst, šedý zákal, kosterní defekty a abnormality. Mezi těžší projevy syndromu pak patří předčasné stárnutí a predispozice k rakovině kostí (osteosarkoma) [53].

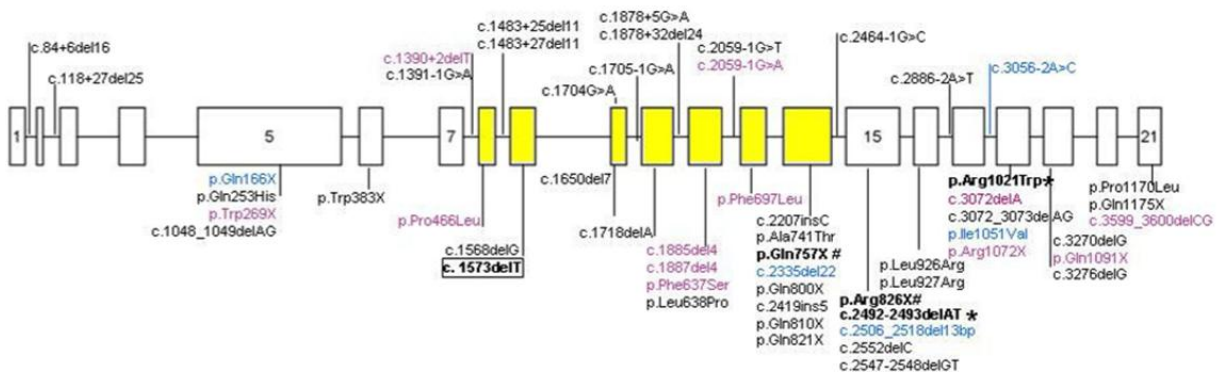
RTS byl poprvé popsán již v roce 1969 německým oftalmologem Augustem von Rothmunden, který sledoval pacienty s poikilodermou, růstovou retardací a rapidně postupujícím šedým zákalem (Obr. 8) [54]. V roce 1936 britský dermatolog Matthew Sydney Thomson informoval o třech pacientech s poikilodermou, růstovou retardací a skeletárními

⁴ Autosomálně recesivní onemocnění : v buňce musí být přítomny dvě recesivní alely abnormálního genu, aby se projevila nemoc. [18]

defekty, bez známky šedého zákalu [55]. Název Rothmund-Thomsonův syndrom poprvé použil Dr. William Taylor v roce 1957 k popsání skupiny pacientů s výše zmíněnými klinickými příznaky [53]. Mutace v genu *RECQ4* byly prokázány u 40-66 % pacientů (Obr. 9 a 10) [56]. Při zkoumání spojitosti mezi osteosarkomou a mutacemi *RECQ4* genu, bylo prokázáno, že 100 % pacientů má alespoň jednu zkracující (nonsense) mutaci [53].

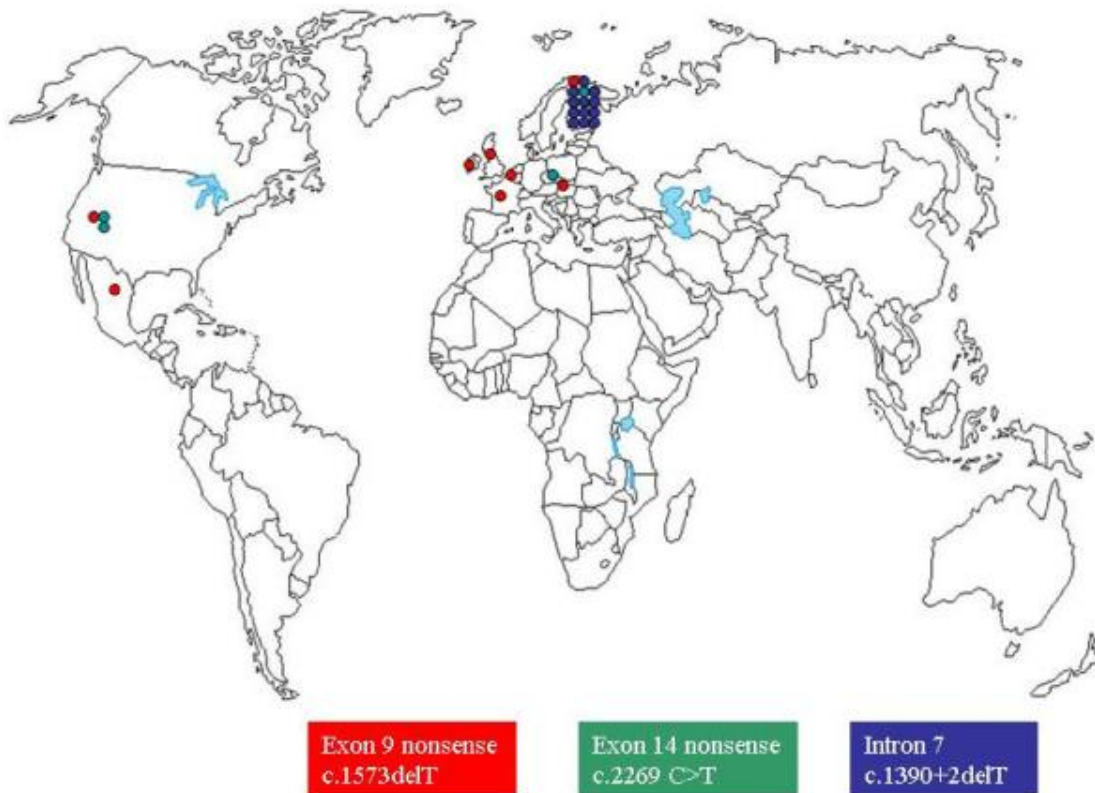


Obrázek 8: Fotografie pacientů s Rothmund-Thomsonovým syndromem spojeným s poikilodermou (A,B,C,D,F), řídnutím vlasů (B) nebo skeletárními abnormalitami (F a G) [53].



Obrázek 9: Mapa známých mutací *RECQ4* u RTS (černá), RAPADILINO (růžová) a BGS (modrá) pacientů. Exony jsou znázorněny jako obdélníky, introny jako čáry propojující exony. Žlutá barva znázorňuje exony kódující helikázovou doménu *RECQ4*, delece intronů mutace nestřihových míst jsou

popsány nad mapou *RECQ4*, zatímco mutace posunující čtecí rámec, mutace se změnou AMK sekvence a mutace vedoucí ke vzniku STOP kodonů jsou seskupeny pod grafickým znázorněním *RECQ4* genu. Tlustě vyznačené znázorňují mutace RTS sdílené s BGS (*), RTS s RAPADILINO (#) a v rámečku je mutace společná všem třem syndromům [53].



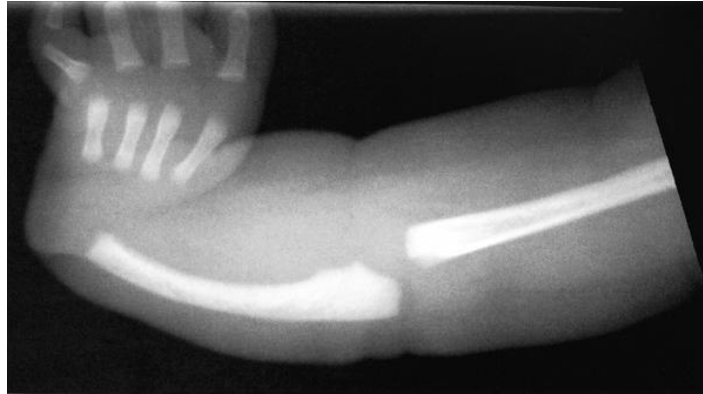
Obrázek 10: Geografické rozmístění opakujících se mutací v genu *RECQ4* [53].

RTS je vzácné onemocnění, v roce 2010 bylo v lékařských publikacích popsáno průměrně 300 případů tohoto syndromu. Avšak díky širokému klinickému spektru příznaků je velmi obtížné RTS diagnostikovat.

B) RAPADILINO syndrom

RAPADILINO (= znaky charakterizujících toto onemocnění: RAdial hypo-/aplasia (radiální hypoplazie/aplzie), PAtellae hypo-/aplasia (patelární hypoplazie/aplzie) and cleft or highly arched PAlate (rozštěp nebo vysoké patro), DIarrhoea (průjem) and DIslocated joints (dislokované klouby), Little size (malý vzrůst) and Limb malformation (malformace končetin), NOse slender (útlý nos) and NOrmal intelligence (normální inteligence) syndrom byl poprvé popsán v roce 1989 Kääriäinen et al [57]. Pacienti trpící tímto syndromem

vykazují společné znaky s RTS pacienty, a to poruchy růstu, deformace kostí, hlavně špatný vývoj kostí v předloktí a palce (Obr. 11). Na rozdíl od RTS pacientů poikiloderma se u RAPADILINO pacientů nevyskytuje. Nejvíce RAPADILINO pacientů bylo identifikováno ve Finsku (15 případů), s menším počtem případů se pak můžeme setkat v jiných populacích [56, 58].



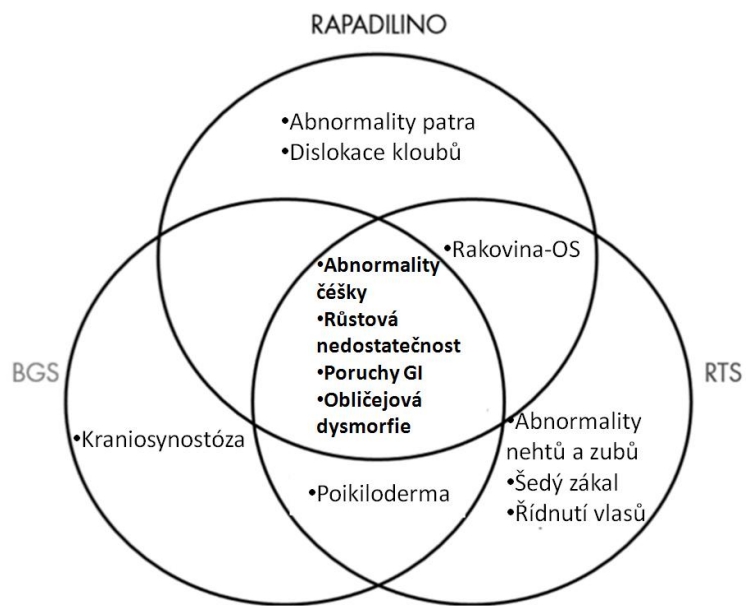
Obrázek 11: Rentgenový snímek ruky s radiální aplazií, typickou pro RAPADILINO syndrom [19].

C) Baller-Geroldův syndrom

BGS byl poprvé popsán Ballerem a Gerold informoval o prvních pacientech s ⁵radiální hypoplazií spojenou s ⁶kraniosynostózou. BGS má mnoho znaků překrývajících se s RAPADILINO a RTS syndromem (Obr. 12), nicméně se nevyznačuje poikilodermou ani zvýšeným rizikem osteosarkomy. Na rozdíl od ostatních RECQ4 syndromů lidé s BGS trpí kraniosynostózou ve spojení s radiální aplazií [59].

⁵ Radiální aplázie: nedovyvinutý nebo částečně vyvinutý kostěný základ vřetení kosti. [110]

⁶ Kraniosynostóza: předčasný uzávěr a osifikace lebečních švů. Vede k zmenšení prostoru pro rozvíjející se mozek kraniosostenóze. Postižen je jeden nebo více švů, při nerovnoměrném srůstu dochází k deformacím lebky. [111]



Obrázek 12: Vennův diagram zobrazující symptomy syndromů spojených s mutacemi v RECQ4 [59].

3. Cíle práce

Znalost funkce jednotlivých proteinů, jejichž informace je zakódována v jednotlivých genech, představuje důležitou podmínku pro správné pochopení buněčných pochodů. Tento základní výzkum pak může být prvním důležitým krůčkem k úspěšné léčbě pacientů s onemocněními (Tab. 1) způsobené genetickými změnami, které vedou k redukci nebo úplné ztrátě důležité funkce proteinu.

RECQ4 protein je nejméně charakterizovaný člen RecQ helikázové rodiny. I když postrádá obě RQC a HRDC domény zodpovědné u ostatních RecQ helikáz primárně za vazbu DNA, předběžné výsledky z našeho laboratorního pracoviště ukázaly, že v proteinu RECQ4 by se mohlo nacházet několik DNA vazebných oblastí (domén). Hlavním cílem této práce proto bylo **zmapovat DNA vazebné domény v N-terminální části RECQ4 helikázy a zjistit preference k různým DNA substrátům**. Protože u RECQ4 není dosud určena žádná specifická vlastnost v buněčných pochodech a existuje nesčetné množství rolí tohoto proteinu v opravě DNA, replikaci a embryogenezi, mohlo by toto mapování pomoci objasnit jeho hlavní funkci v lidském organismu.

K dosažení tohoto cíle bylo nutné:

- naklonovat vybrané úseky genu *RECQ4* do expresních vektorů,
- exprimovat je v bakteriální kultuře,
- purifikovat exprimované proteiny,
- stanovit samotné interakce mezi jednotlivými fragmenty RECQ4 a DNA.

Osobním cílem při tvorbě této práce bylo naučit se jednotlivé biochemické a molekulárně biologické metody, které by rozšířily mé dovednosti. Dalším úkolem bylo seznámení se s vědeckou prací – plánováním projektu, prováděním jednotlivých pokusů, vyhodnocováním i prezentací výsledků, prací s literaturou a schopností diskuze. Tyto dovednosti by mi mohly pomoci při řešení dalších úkolů, studiu i v budoucím vědeckém povolání.

4. Materiály

4.1. Chemikálie, enzymy

Applichem	β -merkптоethanol, 2-propanol, kyselina octová, akrylamid 4K, peroxidisíran amonný (APS), aprotinin, benzamidin hydrochlorid, bis-akrylamid, kyselina boritá, bromfenolová modř, Coomassie Brilliant Blue, chlorid sodný, D(+) sacharóza, hydrogenfosfát didraselný, dithiothreitol (DTT), ethanol, ethyléndiamintetraoctová kyselina (EDTA), glycerol, glycin, imidazol, isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), leupeptin, maltóza, methanol, Nonidet 40 (NP40), OrangeG, fenylmethansulfonylfluorid (PMSF), chlorid draselný, N,N,N',N'-tetramethylethyléndiamin (TEMED), Tris, Tris-HCl, Tris-ultrapure, trypton, kvasinkový extrakt
Fermentas	10x T4-ligační pufr, T4-ligáza
Fluka	agar
GE Healthcare	MonoQ, MonoS
New England	Amylose Resin High Flow, 10x NEB3 pufr,
Biolabs	restrikční endonukleázy: <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI
Nippon	Midori Green DNA fluorescenční barvivo
Genetics	
Serva	agaróza, tetramethylethyléndiamin (TEMED), dodecylsulfát sodný (SDS), ethanol (pro molekulární biologii)
Sigma-Aldrich	ampicilin sodná sůl, hovězí sérový albumin (BSA), His-Select® kanamycin A monosulfát, chymostatin

4.2. Pufry a roztoky

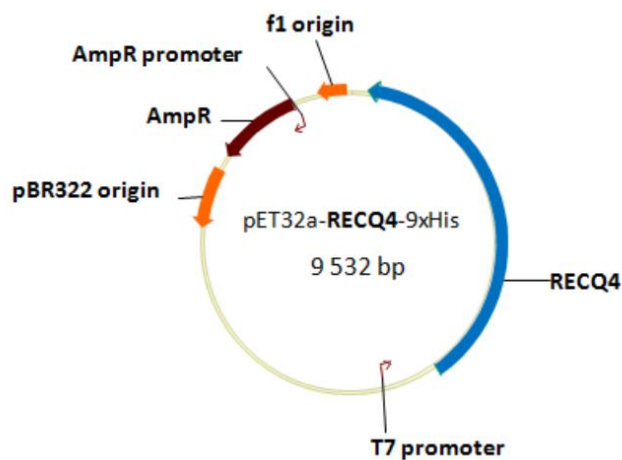
30% akrylamid	30% akrylamid; 0,8% bis-akrylamid
Barvicí roztok (Coomassie)	40% methanol, 20% kyselina octová; 0,32% Coomassie Brilliant Blue
Lyzační pufr (CBB)	100 mM Tris-HCl, 20% sacharóza, 4 mM EDTA (pH 7,5)
5x D (EMSA pufr)	150 mM Tris (pH 7,5), 5 mM DTT, 500 mM KCl, 25 mM MgCl ₂ , 500 μ g/ml BSA
Odbarvovací roztok (Destain)	40% methanol, 20% kyselina octová
2x K pufr	40 mM K ₂ HPO ₄ , 20% glycerol, 1 mM EDTA (pH 7,5)
6x DNA Loading buffer (6x LB)	10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,12% OrangeG, 60% glycerol, 60 mM EDTA
10x PBS	1.37 M NaCl, 26 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 17 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
Směs proteázových inhibitorů (PI)	aprotinin, benzamidin, chymostatin, leupeptin, pepstatin, všechny 5 μ g/ml
Resuspendační pufr	3 M Tris-HCl (pH 8,8)
10% roztok na separační gel	resuspendační pufr, 10% akrylamid, 0,1% SDS, 0,09% APS, 0,015% TEMED

12% roztok na separační gel	resuspendační pufr, 12% akrylamid, 0,1% SDS, 0,09% APS, 0,015% TEMED
10x SDS pufr	0,25 M Tris-HCl, 0,192 M glycin, 2% SDS
2x SDS Laemmli pufr	125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 10% β -ME, 20% glycerol, 0,004% bromfenolová modř
Pufr pro zaostřovací gel	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
3,75% roztok na zaostřovací gel	pufr pro zaostřovací gel, 3,75% akrylamid, 0,08% SDS, 0,071% APS, 0,036% TEMED
10x TBE	900 mM Tris-ultrapure, 90 mM kyselina trihydrogenboritá, 2 mM EDTA (pH 8)
7,5% nativní TBE gel	1x TBE, 7,5% akrylamid, 0,15% APS, 0,015% TEMED

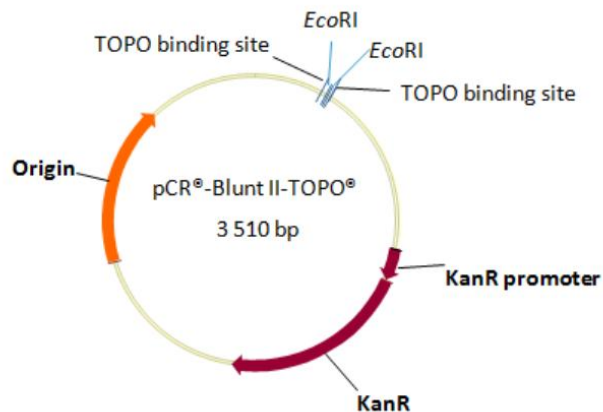
4.3. Plazmidy

- A) pET32a-RECQ4-9xHis
- B) pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] (*Invitrogen*)
- C) pMAL-c2x = pMAL(TEV) (*New England Biolabs*)

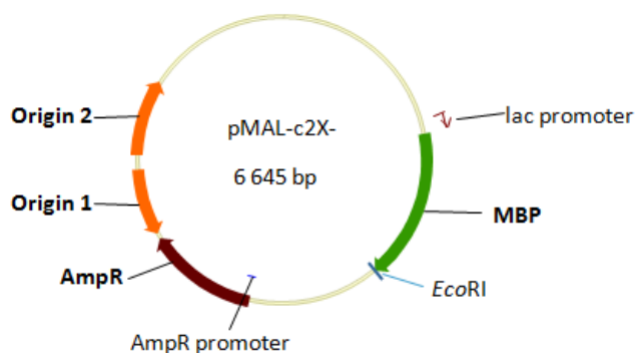
A)



B)



C)



Obrázek 13: Znárodnění plazmidů použitých při klonování. A) pET32a-RECQ4-9xHis použitý jako výchozí krok při klonování. B) pCR-Blunt II-TOPO důležitý pro ligaci produktů z PCR a C) pMAL-c2x – expresní vektor. Modrá šipka znázorňuje kódující sekvenci RECQ4wt. Zeleně je zobrazen MBP (= maltose binding protein – maltózu vázající protein), který má svou úlohu při zvýšení solubility proteinu během následné purifikace. Malou červenou šipkou je znázorněn lac, T7 a ampicilinový promotor, který iniciuje transkripci genu. Hnědá šipka pak ukazuje gen pro ampicilinovou a růžová pro kanamycinovou rezistenci a oranžová počátek replikace.

4.4. Média

LB médium	1% trypton, 0.5% kvasinkový extrakt, 1% NaCl 2% trypton, 0.5% kvasinkový extrakt, 10 mM NaCl,
SOC médium	20 mM glukóza, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ .6H ₂ O (pH 7.2)
LB médium pro misky	1% trypton, 0.5% kvasinkový extrakt, 1% NaCl, 2% agar
2xTY	2% trypton, 1% kvasinkový extrakt, 0.5% NaCl

4.5. Standardy

- GeneRuler™ 1kb DNA Ladder; molekulární hmotnosti – 250, 500, 750, **1000**, 1500, 2000, 2500, **3000**, 3500, 4000, 5000, **6000**, 8000 a 10000 bp (*Fermentas*)
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder; molekulární hmotnosti 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130, 250 kDa) (*Fermentas*)

4.6. Kity pro práci s pDNA

- Zero Blunt® TOPO® Cloning Kit (*Invitrogen*)
- Nucleo Spin® Plasmid Kit (*Macherey-Nagel*)
- Gel Extraction Kit (*Macherey-Nagel*)

4.7. Bakteriální kmeny

- *E. coli* DH5 α (*E. coli* fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17)
- *E. coli* BL21(DE3)pLysS (*E. coli* F $^{-}$, ompT, hsdSB (rB $^{-}$, mB $^{-}$), dcm, gal, λ (DE3), pLysS, Cmr)

4.8. Přístroje

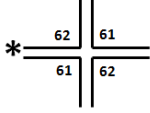
- Analytická váha (*BOECO Germany*)
- Centrifugy:
 - MiniSpin F-45-12-11 (*Eppendorf*)
 - Spectrafuge 24D (*Labnet*)
 - Rotina 380R (*Hettich*)
 - Rotanta 460R (*Hettich*)
 - Avanti™ J-26 XPI (*Beckman Coulter*)
 - Optima™-100 XP Ultracentrifuge (*Beckman Coulter*)
- Horizontální elektroforetická jednotka: SCIE-PLAS HU10 (*KRD*)
- Image reader: FLA-9000 (*FujiFilm*)
- Sonikátor: Ultrasonic Processor UP200S (*Hilscher Ultrasound Technology*)
- Cirkulátor vody: Refrigerated and heating circulator F12 - ED (*Julabo*)
- Transiluminátor bílého světla: TW26 (*UVP*)
- Vortex: Vortex - Genie 2
- MS1 Minishaker (*IKA*)
- Zařízení na sušení gelů: Gel Dryer 583 (*BioRad*)
- Zdroj elektrického napětí: 300 (*Labnet*)
- Třepačky: GFL 3020 (*GFL*), GFL 3015 (*GFL*)
- Inkubátory: innova 43R (*New Brunswick scientific*)
- NB - 205 (*n - Biotek, KRD*)
- Termoblok: EL - 02 (*Major Science*)
- Termostat: Mini Incubator 230V (*Labnet*)
- FPLC zařízení: ÄKTA FPLC (*GE Healthcare*)

4.9. Software

- BioCapt MW
- Vector NTI
- Chromas Sequence Viewer
- UNICORN 5.10
- Microsoft Word 2013
- Microsoft Excel 2013
- GIMP 2.8
- Multigauge V3.2
- Imagereader

4.10. Oligonukleotidy, DNA substráty

DNA substráty pro retardační analýzu připravila Mgr. María Victoria Marini Palomeque, Ph.D., oligonukleotidy pro PCR navrhovala Bc. Hana Sedláčková.

Název	Využití primeru	Sekvence (5'-3')	Délka (nt)
pR139*	HJ 	GACGCTGCCGAATTCTACCAAGTGCCTTGCTAG GACATCTTTGCCACCTGCAGGTTACCC	61
pR140		TGGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCC ATCTGTTGTAATCGTCAAGCTTTATGCCGTT	62
pR141		GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAAATGTCCT AGCAAGGCACTGGTAGAATTCGGCAGCGTC	61
pR142		GAACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAGA TGGACATTTTTGCCACCTGCAGGTTACCC	62
pR27*	ssDNA	AGCTACCATGCCTGCACGAATTAAGCAATTCGT AATCATGGTCATAGCT	49
pR2001	RECQ4(269-400)FOR	AAGGAATTCTGGGAGAGCCCCGCACAGGTCCA	32
pR577	RECQ4(269-400)REV	ATTGAATTCTTAGTGGTGGTGTGATGATGGT GATGGTGTGGTTGTGACTGTGGCACC	60

Tabulka 4: Seznam použitých primerů. Hvězdička znázorňuje primer značený fluorescenční značkou.

5. Metody

5.1. Agarózová gelová elektroforéza

Agarózová gelová elektroforéza je jednoduchá metoda, která slouží k identifikaci a separaci různých DNA fragmentů podle jejich molekulární hmotnosti. Agarózový gel je tvořen sítí z přečištěného polysacharidu agarózy v patřičném pufru (1x TAE nebo 1x TBE). Rychlost pohybu jednotlivých fragmentů DNA pak závisí nejen na jejich molekulární hmotnosti, ale také na hustotě gelu.

K přípravě agarózového gelu byla použita agaróza o koncentraci 0,8% a 1x TBE pufr. Tato směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě a následně ochlazená na teplotu přibližně 50 °C. Poté bylo k ochlazené směsi přidáno fluorescenční barvivo Midori green (3 µl/100 ml), které slouží k vizualizaci DNA fragmentů v gelu. Nakonec byla směs nalita do aparatury pro horizontální elektroforézy a pomocí hřebenu byly vytvořeny jamky v gelu. K vzorkům DNA byl přidán 6x LB pufr a po ztuhnutí gelu byly takto připravené vzorky nanášeny do jednotlivých jamek. Do první jamky byl obvykle nanášen 1 kbp DNA standard podle kterého je možné porovnávat velikosti jednotlivých fragmentů v gelu. Samotná elektroforéza probíhala při konstantním napětí 5 V/cm po dobu 45 minut.

5.2. Izolace plazmidové DNA

Pro izolaci plazmidové DNA bylo použito 2-5 ml bakteriální kultury. Plazmidová DNA byla izolována pomocí komerčního kitu Nucleospin Plasmid (dle protokolu výrobce). Izolovaná pDNA byla poté ověřena na agarózovém gelu a koncentrace stanovena pomocí měření absorpance při vlnové délce 260 nm na přístroji NanoDrop.

5.3. Restrikční analýza

Restrikční enzymy štěpí DNA na sekvenčně specifickém restrikčním místě, typickém pro danou restriktázu (Obr. 14). Pomocí této metody může být do plazmidů (vektorů) klonována DNA (inzerť) našeho zájmu. Navíc pomocí restrikční analýzy může být také ověřena správnost ligace, tedy zda vektorová DNA obsahuje inzerť a v jaké orientaci se nachází.



Obrázek 14: Schématický obrázek štěpení DNA pomocí restriktáz použitých při experimentech.

Reakční směs obvykle obsahuje 5 µg pDNA, 5 U restrikčního enzymu (1 U je definována jako množství enzymu schopné rozštěpit 1 µg DNA), příslušný pufr a sterilní dH₂O (finální objem reakce byl 20 µl). Celá směs byla inkubována 2 h při 37 °C a poté analyzována agarózovou gelovou elektroforézou.

5.4. Ligace

Vektor a inzerť, které mají být spolu ligovány, musí být nejprve štěpeny vhodnými restrikčními endonukleázami, pomocí nichž se vytvoří sekvenčně komplementární (tzv. lepivé) konce na vektoru i inzerťu. Ligační směs se skládá ze štěpeného vektoru a DNA inzerťu v molárním poměru 1:3, 1x T4 DNA ligázový pufr obsahující ATP (potřebný zdroj energie pro aktivitu ligázy), 1 U T4 DNA ligázu a sterilní dH₂O (finální objem reakce 20 µl). Ligační reakce byla inkubována přes noc při konstantní teplotě 16 °C a poté byla T4 DNA ligáza deaktivována po dobu 15 minut při 65 °C.

5.5. Buněčná transformace

Transformace je proces, který umožňuje vstup plazmidové DNA do bakterií. Kompetentní buňky *E. coli* (DH5 α nebo BL21(DE3)plysS) byly inkubovány se 100 ng plazmidové DNA při 4 °C po dobu 30 minut, poté byl proveden teplotní šok, při kterém byly buňky umístěny na 90 s do termobloku s teplotou 42 °C. Pak bylo k bakteriální suspenzi přidáno 500 μ l SOB média a následovala regenerace buněk při 37 °C po dobu 1 hodiny. Po regeneraci byla suspenze centrifugována 90 s při 10000x g, vzniklý pelet byl resuspendován ve 20 μ l sterilní dH₂O, nanesen na Petriho misku s LB médiem a příslušným antibiotikem (0,1 mg/ml ampicilinu nebo kanamycinu) a inkubován při 37 °C přes noc.

5.6. Proteinová exprese

Expresní vektor obsahoval jednak naklonovaný gen našeho zájmu, ale také regulovatelný promotor (lac promotor), díky němuž se po přidání indukčního činidla (IPTG) spustí silná transkripce genu s následnou translací vedoucí k syntéze cílového proteinu.

Jedna kolonie buněk byla odebrána z Petriho misky a zaočkována do 2x TY tekutého média s příslušným antibiotikem a inkubována přes noc při 37 °C za stálého krouživého míchání. Další den byla bakteriální kultura 100x naředěna do čerstvého 2x TY média, kde opět rostla za stálého míchání při 37 °C, dokud optická hustota (OD₆₀₀) kultury dosáhla 0,6-0,8. Indukce exprese cílového proteinu byla spuštěna pomocí 0,1 mM IPTG a bakteriální kultura byla inkubována přes noc při 16 °C. Poté byly buňky od média odděleny centrifugací při 5500x g, 4 °C po dobu 10 minut a nakonec byl bakteriální pelet uchován při -80 °C.

5.7. Purifikace proteinů

Purifikace proteinů zahrnuje sérii kroků, které umožňují izolaci cílového proteinu z buněčného proteomu. Jednotlivé kroky purifikace závisí na vlastnostech izolovaného proteinu. Purifikace proteinů je důležitá zejména pro charakterizaci jeho struktury, funkce a zprostředkovaných interakcí.

5.8. Lyze buňky a ultracentrifugace

Bakteriální pelet byl resuspendován v lyzačním pufu (CBB), který obsahoval KCl (jehož koncentrace závisí na solubilitě proteinu), 0,01% NP40, 1 mM β -ME, směs,

proteázových inhibitorů (aprotinin, chymostatin, leupeptin, pepstatin A a benzamidin hydrochlorid – každý 5 mg/ml) a PMSF (5 mg/ml). Buňky byly rozrušeny ultrazvukovou sonikací (ve 4 cyklech po 5 minutách s 2 minutovou pauzou po každém cyklu). Proces sonikace probíhal na ledu, aby se zabránilo k nadměrnému zahřívání sonikované směsi, což by mohlo vést k denaturaci proteinů. Buněčný lyzát byl pak rozdělen ultracentrifugací (100000x g, 4 °C, 1 h) na nesolubilní pelet (buněčné stěny, membrány, orgány atd.) a solubilní supernatant, ve kterém je přítomen i cílový protein.

5.9. Chromatografické metody

1) Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je založena na reverzibilní (vratné) interakci mezi speciálním štítkem, který je připojen na cílový protein, a specifickým ligandem vázaným na agarózové kuličky.

Při purifikaci proteinů s polyhistidinovým (9xHis) štítkem byly jako chromatografické médium použity niklové kuličky od firmy Sigma-Aldrich (His-Select® Nickel Affinity Gel). Vazebná kapacita niklových kuliček je 10 mg proteinu/1 ml chromatografického média, proto se objem niklových kuliček volí v závislosti na koncentraci proteinu v supernatantu. Nejprve byly niklové kuličky promyty 10ti objemy kolony (column volume, CV) K pufrům obsahujícím KCl, 0.01% NP40 a 1 mM β -ME. Směs kuliček a ultracentrifugovaného supernatantu byla inkubována za stálého otáčení při 4 °C přes noc. Poté byly kuličky s navázaným proteinem naneseny na kolonu a promyty opět 10ti CV pufru K obsahujícím KCl, 0.01% NP40, 1 mM β -ME a 10 mM imidazol k vymytí nespecificky navázaných proteinů. Eluce cílového proteinu byla prováděna pomocí zvyšující se koncentrace imidazolu (150-1000 mM) v K pufru, který kompetitivně vytěsňuje navázaný protein přes His-štítek z chromatografické matrice. Jednotlivé frakce byly pak analyzovány na SDS-PAGE.

Pro purifikaci proteinů s MBP (maltose binding protein) byly použity amylozové kuličky od firmy NEB (Amylose Resin High Flow) jako chromatografické médium. Purifikační protokol je velmi podobný jako v případě niklové chromatografie s výjimkou níže uvedených odlišností. Vybrané frakce po niklové chromatografii byly inkubovány s promytými amylozovými kuličkami 1 hodinu za stálého otáčení ve 4 °C. Eluci proteinů s MBP afinitním

štítkem byla provedena K pufrem obsahujícím 10 mM maltózu. Frakce obsahující eluovaný protein byly analyzovány na SDS-PAGE.

2) Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie separuje proteiny dle jejich povrchového náboje závislejícím na hodnotě pH. V případě, že je pH vyšší než pI proteinu, protein má negativní náboj a je schopen reverzibilně vázat kladně nabitou matici. Pokud je pH stejné nebo nižší pI proteinu, má protein pozitivní náboj nebo je neutrální, pak ztrácí schopnost se vázat k pozitivně nabitou matici a dochází k vymytí z kolony.

	Vyměňované ionty	Matrix	Funkční skupiny
MonoS	Kation	polystyren/divinyl benzen	methyl sulfonát
MonoQ	Anion	polystyren/divinyl benzen	kvartérní amoniová sůl

Tabulka 5: Vlastnosti kolon použitých při iontově výměnné chromatografii.

Nejprve byla kolona naplněná příslušným chromatografickým médiem připojena k ÄKTA systému a promyta 10ti CV pufrem K obsahujícím KCl (koncentrace závisí na vlastnostech proteinového vzorku), 0.01% NP40 a 1 mM β -ME. Následně byl na kolonu nanesen vzorek proteinu a kolona byla opět promyta 10ti CV pufrem K, který byl rovněž použit při ekvilibraci. Protein vázaný na matici byl eluován 10ti CV pufrem K s lineárním gradientem iontové síly (100-1000 mM KCl). Frakce obsahující eluovaný protein byly analyzovány na SDS-PAGE.

5.10. Koncentrování proteinů

Purifikované proteiny byly zakoncentrovány s využitím Vivaspinu s maticí vybranou podle velikosti purifikovaného proteinu. Zakoncentrovaný protein byl rozdělen na menší frakce, které pak byly zmrazeny v kapalném dusíku a uchovány při -80 °C. Koncentrace purifikovaného proteinu byla stanovena za pomoci SDS-PAGE elektroforézy v porovnání s proteinovým standardem (BSA).

5.11. SDS-PAGE elektroforéza

SDS-PAGE (Sodium dodecylsulphate – polyacrylamide gel electrophoresis) je založená na schopnosti zdenaturovaných proteinů putovat polyakrylamidovým gelem, a tím dojde k rozdělení polypeptidových řetězců dle jejich molekulové hmotnosti. Pro SDS-PAGE jsou používány gely, které se skládají ze dvou různých gelových vrstev s rozdílným procentem akrylamidu. Základní část gelu se skládá z roztoku pro separační gel, který byl nalit mezi dvě skla, a poté se přidává směs butanol/dH₂O sloužící k zarovnání povrchu gelu. Po polymerizaci gelu byl butanol odstraněn a na separační gel byl nalit roztok pro koncentrující gel a vložen hřebínek pro vytvoření jamek pro nanášení vzorků.

Připravený gel je potom vložen do elektroforetické aparatury naplněné 1x SDS pufrém. K proteinovým vzorkům je přidán 2x SDS Leammli pufr (obvykle v poměru 1:1), poté jsou vzorky povařeny, aby byla zajištěna jejich denaturace a udělení záporného náboje. Vzorky jsou pak postupně nanášeny do jamek gelu společně s proteinovým hmotnostním standardem. Po nanesení vzorků na gel byla elektroforetická aparatura připojena ke zdroji napětí a elektroforéza probíhala při konstantním napětí 215 V po dobu 45 minut. Po ukončení elektroforézy byl gel barven v barvicím roztoku za neustálého míchání asi 20 minut a následně přenesen do odbarvovacího roztoku. Odbarvený gel byl nakonec sušen ve vakuu na filtračním papíře.

5.12. Western Blot analýza

Při Western Blot analýze se vycházelo z rozpoznání proteinu pomocí protilátek specifických na protein nebo štítek připojený k proteinu, a tím k potvrzení přítomnosti proteinu v dané směsi. V prvním kroku byla provedena SDS-PAGE elektroforéza (viz výše). Poté byly vzorky přeneseny elektroforézou ve speciálně navržených blotovacích jednotkách na nitrocelulóзовou membránu, která má schopnost vázat tyto proteiny. Aby se zabránilo nespecifickému navázání protilátek na místa na membráně, byla membrána blokována 5% sušeným mlékem v 1x PBS pufru obsahujícím 0,01% Tween po dobu 45 min. Poté byly přidány protilátky (anti-His) a membrána byla inkubována po dobu 2 h při laboratorní teplotě. Poté byla membrána 4x promyta pufrém 1x PBS obsahujícím 0,01% Tween po dobu 5 minut a nakonec vyvolána roztokem obsahujícím 1x PBS, obsahujícím 0,3 mg/ml NQC (4-chloro-1-naftol) a 0,06% H₂O₂.

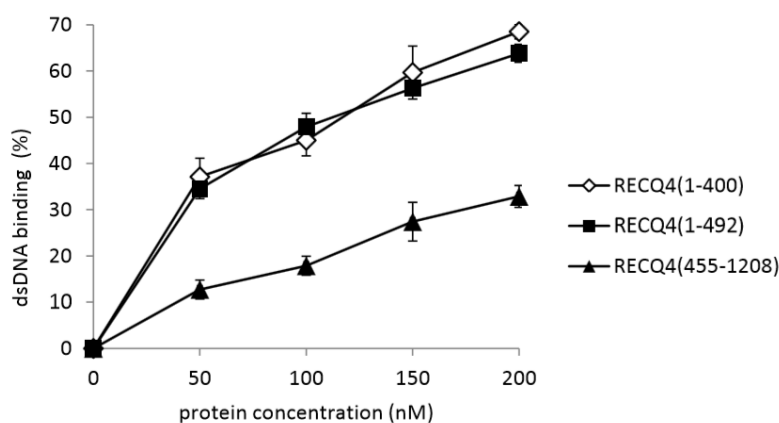
5.13. Retardační analýza (EMSA – Electrophoretic mobility shift assay)

Retardační analýza je metoda využívaná ke studiu DNA-protein interakcí. Princip metody spočívá v tom, že komplex DNA-protein putuje v nativním gelu mnohem pomaleji než samotná volná DNA.

Reakční směs obsahovala reakční pufr D, fluorescenčně značený DNA substrát (3 nM), protein se zvyšující se koncentrací a dH₂O doplněnou do výsledného objemu 10 µl. Reakční směsi byly inkubovány 20 minut při 37 °C. Po inkubaci byly k reakci přidány 2 µl 6x LB pufru a vzorky byly ihned nanесeny na 6% nebo 7,5% nativní polyakrylamidový gel v 0,5x TBE pufru. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 101 V po dobu 45 minut. Nakonec byl gel naskenován pomocí skeneru Image Reader FLA-9000 a kvantifikován pomocí software MultiGauge V3.2.

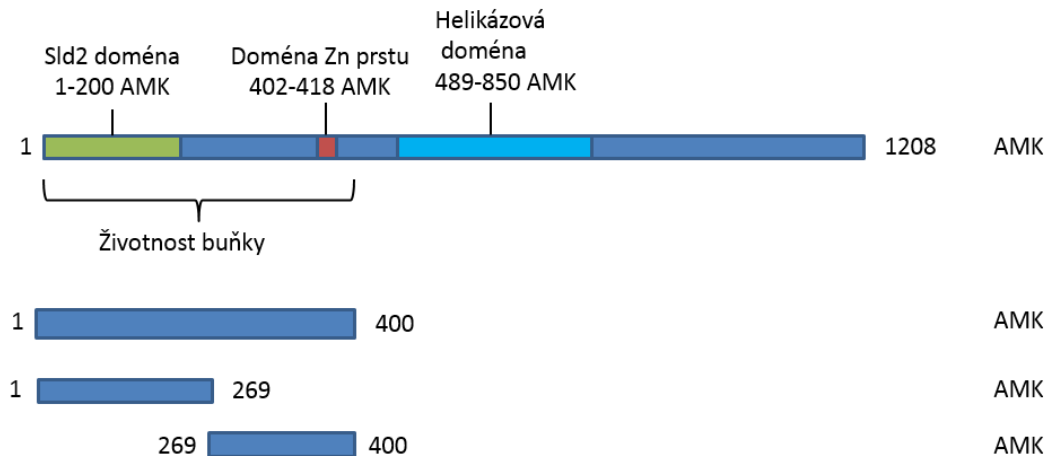
5. Výsledky

V roce 2006 byla poprvé purifikována plná verze proteinu RECQ4 a popsána jeho schopnost vázat ssDNA, přestože ve srovnání s ostatními lidskými RecQ proteiny postrádá HRDC a RQC domény pokládané především za DNA vazebné domény RecQ helikáz [27]. Laboratoř Dr. Krejčího poté pokračovala v mapování DNA vazebných domén RECQ4 a bylo zjištěno, že N-terminální část proteinu RECQ4 obsahuje další domény, které by mohly mít hlavní podíl na vazbě celého proteinu RECQ4 k DNA. Jak zobrazuje graf (Obr. 15) N-terminální fragmenty RECQ4 (1-400) a (1-492) byly schopny při koncentraci 200 nM vyvázat téměř 70 % dsDNA substrátu, zatímco C-terminální fragment RECQ4(455-1208), nesoucí konzervovanou helikázovou doménu, byl schopen vyvázat přibližně 30 % dsDNA substrátu.



Obrázek 15: N-terminus RECQ4 váže dsDNA efektivněji než C-terminus. Srovnání DNA vazebné schopnosti fragmentů RECQ4(1-400), RECQ4(1-492) a RECQ4(455-1208) pomocí retardační analýzy se zvyšující se koncentrací proteinu (50, 100, 150 a 200 nM) a 3 nM fluorescenčně značené dsDNA, inkubace 20 min. při 37 °C. (Sedlackova et al., viz příloha)

Na základě těchto výsledků bylo cílem této práce charakterizovat DNA vazebné domény v N-terminální části proteinu RECQ4. Abychom mohli tuto část proteinu důkladně zmapovat a charakterizovat, byly vytvořeny následující zkrácené verze proteinu RECQ4 (Obr. 16).



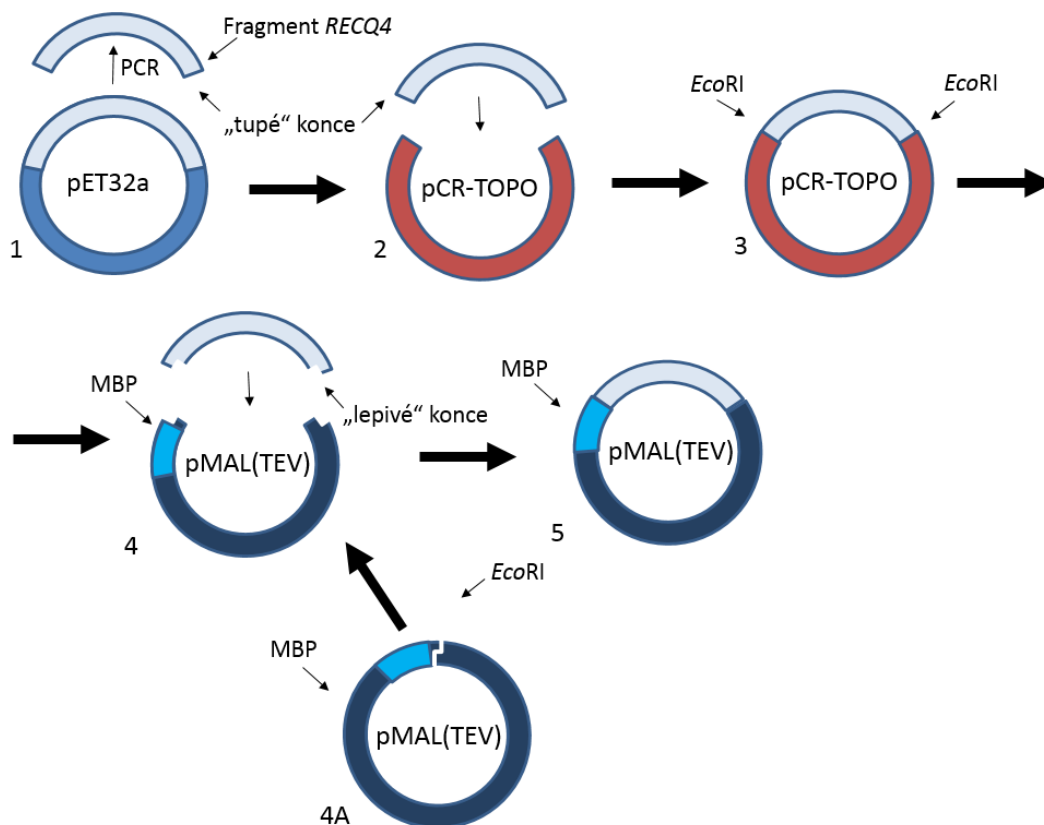
Obrázek 16: Přehled jednotlivých fragmentů RECQ4 a RECQ4wt se znázorněním funkčních domén.

Ve své práci jsem se zabývala charakterizací fragmentů:

- RECQ4(269-400) - klonování z pCR-Blunt II-TOPO vektoru do expresního vektoru pMAL(TEV), exprese, purifikace a retardační analýza.
- RECQ4(1-269) - exprese, purifikace a retardační analýza.
- RECQ4(1-400) - purifikace a retardační analýza. Tento fragment byl použit pro srovnání vazebných schopností s fragmenty 1-269 a 269-400.

5.1. Klonování fragmentu *RECQ4(269-400)* do pCR-Blunt II-TOPO vektoru

Klonování všech fragmentů RECQ4 bylo provedeno dle jednotného protokolu (Obr. 17). Nejprve byla provedena PCR, při které byl amplifikován DNA fragment *RECQ4(269-400)* pomocí příslušných primerů (Tab. 4) a templátové DNA (vektor pET32a-RECQ4wt) (Obr. 17). Výsledný amplifikovaný fragment *RECQ4(269-400)* byl nejprve ligován do komerčního pCR-Blunt II-TOPO vektoru. Správnost výsledného vektoru pCR-Blunt II-TOPO-RECQ4(269-400) byla ověřena restriční analýzou pomocí enzymu *EcoRI* a sekvenováním.

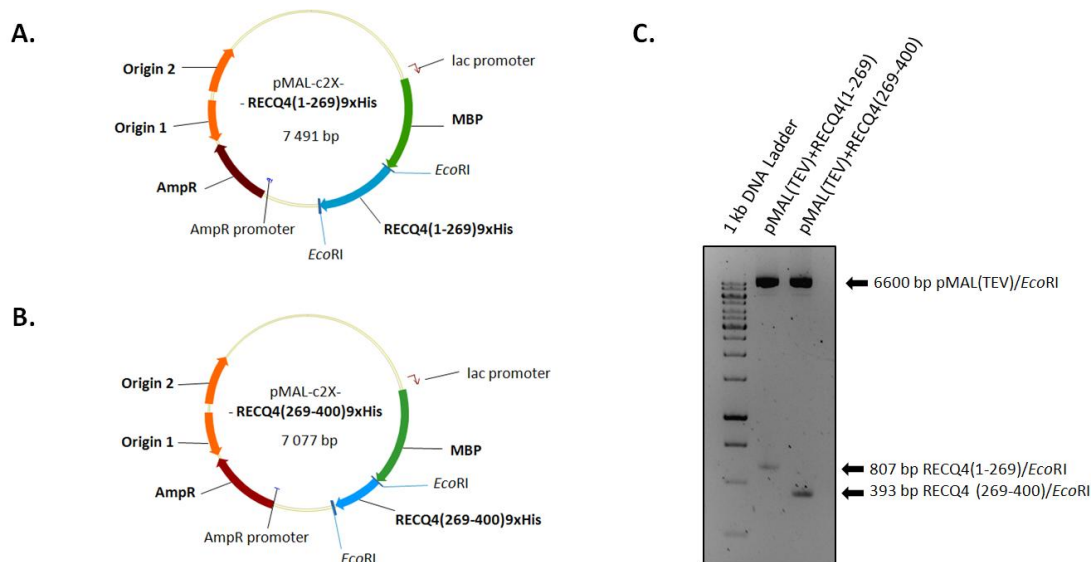


Obrázek 17: Schéma klonování fragmentu genu *RECQ4* do expresního vektoru. První krok představuje amplifikaci DNA fragmentu *RECQ4* (inzeru) za pomoci PCR (1). Inzert z PCR byl poté ligován do pCR-Blunt II-TOPO vektoru (2). Následovalo vyštěpení DNA kódující fragment *RECQ4* z pCR-Blunt II-TOPO vektoru za pomoci restriktivní endonukleázy *EcoRI* (3) a ligace do předem připraveného (*EcoRI* štěpeného, 4A) expresního vektoru pMAL(TEV) (4).

5.2. Příprava expresního vektoru pMAL(TEV)-RECQ4(269-400)

V prvním kroku bylo nutné namnožit plazmidovou DNA obou vektorů pMAL(TEV) a pCR-Blunt II-TOPO-RECQ4(269-400) v bakteriálních buňkách *E. coli* DH5 α . Plazmidová DNA byla pak z bakterií izolována komerčním kitem. Následně byly vektory pMAL(TEV) a pCR-Blunt II-TOPO-RECQ4(269-400) štěpeny restriktivní endonukleázou *EcoRI*. Po štěpení byly reakce separovány v agarózovém gelu, ze kterého byly izolovány štěpený pMAL(TEV)/*EcoRI* a RECQ4(269-400)/*EcoRI* pomocí komerčního kitu. U expresního vektoru pMAL(TEV)/*EcoRI* byla provedena jeho defosforylace pomocí fosfatázy, aby bylo zabráněno opětovnému spojení jeho konců při ligaci s inzertem. Nakonec byla provedena ligace

pMAL(TEV)/*EcoRI* a RECQ4(269-400)/*EcoRI* a správnost reakce byla ověřena restriční analýzou (Obr. 18) a proteinovou expresí (viz následující kapitola). Výsledný konstrukt, který byl použit pro proteinovou expresi, obsahoval MBP na N-konci a 9x His štítek na C-konci pro zvýšení solubility proteinu při purifikaci.

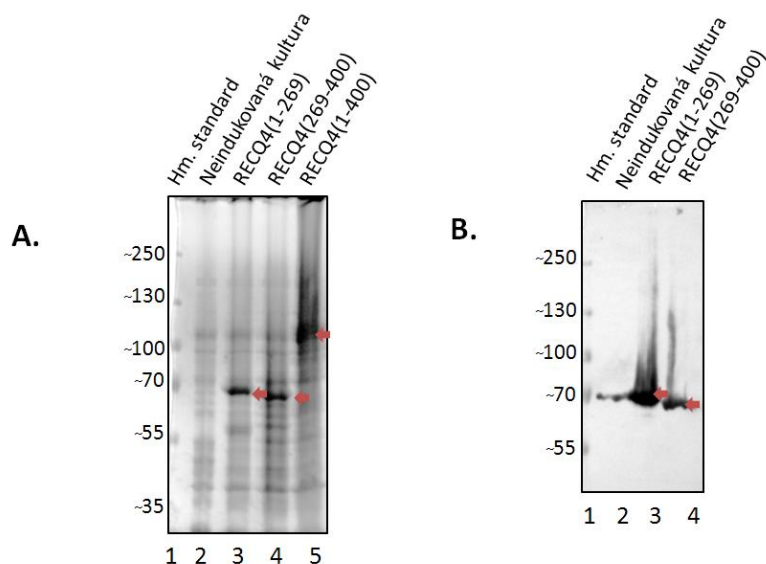


Obrázek 18: Mapa expresních vektorů RECQ4(1-269) (A) a RECQ4(269-400) (B). Světle modrá šipka znázorňuje kódující sekvenci jednotlivých RECQ4 fragmentů. Zeleně je zobrazena oblast kódující MBP (= maltose binding protein – maltózu vázající protein), který zvyšuje solubilitu proteinu při jeho následné purifikaci. Malou červenou šipkou je znázorněn lac promotor, který iniciuje transkripci genu. Hnědá šipka pak ukazuje gen pro ampicilinovou rezistenci a oranžová počátek replikace. (C) Kontrolní restriční štěpení pMAL(TEV) expresních vektorů ligovaných s genem kódujícím uvedené fragmenty RECQ4 proteinu. Štěpení probíhalo při 37 °C po dobu 1,5 h, vzorky byly separovány na 1% gelu v 1x TBE.

5.3. Expres fragmentů RECQ4

Expresní vektory byly transformovány do kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3)plysS. Buněčná kultura rostla při 37 °C přes noc v médiu 2x TY s ampicilinem (v poměru 1:1000). Dalšího dne byla kultura naředěna 100x do čerstvého 2x TY média a inkubována při teplotě 37 °C až do dosáhnutí optické hustoty (OD_{600}) přibližně 0,6-0,8. Expres proteinu byla iniciována přidáním 0,1 mM IPTG a buněčná kultura byla inkubována přes noc při 16 °C. Poté byly buňky centrifugovány (5500x g, 4°C, 10 min) a buněčný pelet byl

zmražen na -80 °C. Expres jednotlivých fragmentů byla analyzována pomocí SDS-PAGE a Western Blotu (Obr. 19). Tato analýza jednoznačně potvrzuje správnost klonování a možnost purifikace jednotlivých fragmentů RECQ4.



Obrázek 19: (A) SDS-PAGE elektroforéza (10% SDS gel) buněčných lyzátů exprimujících fragmenty RECQ4. Pozice 1: hmotnostní standard. Pozice 2: Neindukovaná (bez IPTG) buněčná kultura buněk BL21(DE3)plysS sloužící jako kontrola. Buněčný lyzát (indukovaný IPTG) s exprimovaným proteinem RECQ4(1-269) (pozice 3), RECQ4(269-400) (pozice 4) a RECQ4(1-400) (pozice 5). Červenou šipkou je vyznačena pozice exprese jednotlivých fragmentů RECQ4. (B) Western-blot analýza exprimovaných fragmentů s anti-His protilátkami na nitrocelulóзовé membráně z SDS gelu (A).

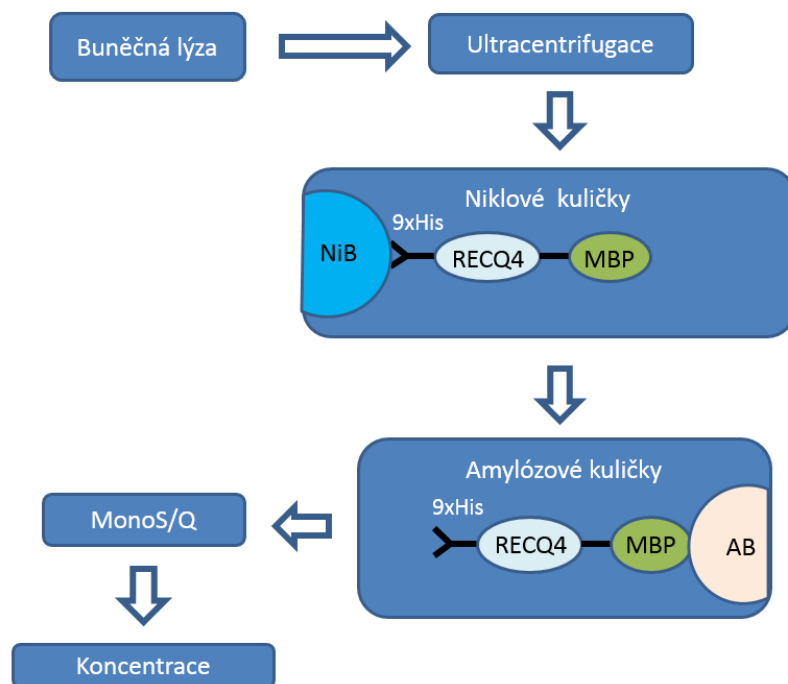
Fragment	Molekulová hmotnost (kDa)	Izoelektrický bod (pI)
MBP-RECQ4(1-269)-9xHis	73	6,68
MBP-RECQ4(1-400)-9xHis	88	8,98
MBP-RECQ4(269-400)-9xHis	58	7,77

Tabulka 6: Přehled purifikovaných fragmentů RECQ4 , jejich molekulová hmotnost a izoelektrický bod.

5.4. Purifikace fragmentů RECQ4

Purifikace fragmentů RECQ4 byla provedena podle jednotného protokolu pouze s menšími obměnami z důvodu rozdílných fyzikálně chemických vlastností jednotlivých

fragmentů (Obr. 20). Buněčný pelet (15,1 g u RECQ4 (1-269); 20 g u RECQ4(269-400) a 25 g u RECQ4(1-400)) byl resuspendován v lyzačním pufru CBB obsahujícího 200 mM KCl, 0,01% NP40, 1 mM β -ME, PMSF a směs proteázových inhibitorů. Byly použity 3 ml lyzačního pufru na 1 g buněčného peletu a následně byly buňky lyzovány sonikací (v cyklech po 5 minutách).



Obrázek 20: Schematické znázornění purifikačního protokolu fragmentů RECQ4.

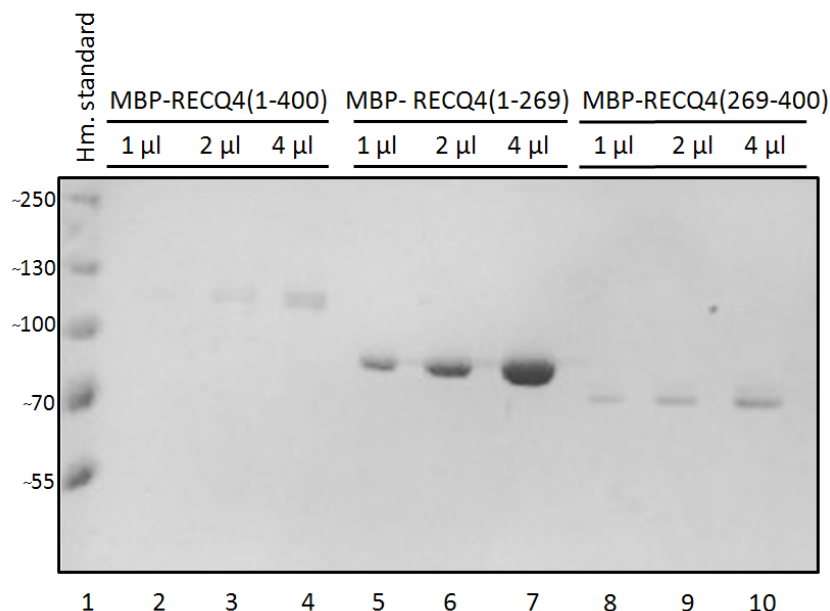
Po sonikaci byl výsledný buněčný lyzáát přečištěn ultracentrifugací (100 000x g, 4 °C, 1 h), kdy došlo k oddělení nesolubilního peletu od supernatantu, který byl poté ještě přefiltrován přes 0,45 μ m filtr. Přefiltrovaný supernatant obsahující cílový protein byl inkubován přes noc za stálého otáčení při 4 °C s niklovými kuličkami (k nimž se RECQ4 protein váže pomocí 9x His štítku na C-konci), které byly předtím promyty K puftrem obsahujícím 150 mM KCl, 0,01% NP40 a 1 mM β -ME. Niklové kuličky s navázaným proteinem byly pak naneseny na plastovou kolonu a promyty 20 ml K puftrem obsahujícím 10 mM imidazol, aby byly odstraněny nespecificky navázané proteiny. RECQ4 fragmenty byly eluovány v 1 ml frakcích puftrem K se zvyšující se koncentrací imidazolu (150, 300, 500, 1000 mM). Jednotlivé frakce byly poté analyzovány na SDS-PAGE.

Frakce s proteinem RECQ4 eluovaným v rozsahu 150-300 mM imidazolu byly následně inkubovány s amylozovými kuličkami (promytými K puftrem), k nimž má afinitu MBP

štítek připojený na N-konci proteinu RECQ4. Po inkubaci byla provedena eluce navázaných proteinů přidáním 1 ml pufru K s 10 mM maltózou. Jednotlivé frakce byly poté analyzovány na SDS-PAGE.

Frakce obsahující eluovaný protein RECQ4 z amylozových kuliček byly přečištěny na koloně MonoS/MonoQ, která byla nejprve připojena k ÄKTA systému a promyta 10ti CV pufru K obsahujícím 100 mM KCl, 0.01% NP40 a 1 mM β -ME. Frakce obsahující MBP-RECQ4(1-269)-9xHis byly separovány na 0,5ml MonoQ koloně, MBP-RECQ4(1-400)-9xHis a MBP-RECQ4(269-400)-9xHis frakce na MonoS koloně. Následně byla kolona promyta 10ti CV pufrům K a poté byly navázané fragmenty RECQ4 eluovány 10ml gradientem 100-1000 mM KCl. Frakce obsahující eluovaný protein byly analyzovány na SDS-PAGE.

Nakonec byly proteiny zakonzentrovány pomocí Vivaspinu a po menších objemech zmraženy na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další analýzy. Čistota purifikovaných fragmentů byla ověřena pomocí SDS-PAGE a koncentrace určena podle proteinového standardu. U RECQ4(1-269) byla koncentrace stanovena na $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, u fragmentu RECQ4(269-400) na $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a u fragmentu RECQ4(1-400) na $0,7\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Obr. 21).



Obrázek 21: Purifikované fragmenty RECQ4 naneseny na 12% SDS gelu. Pozice 1: hmotnostní standard. Purifikované fragmenty RECQ4 byly smíchány s 2xSDS Laemmli pufrům v poměru 1:9

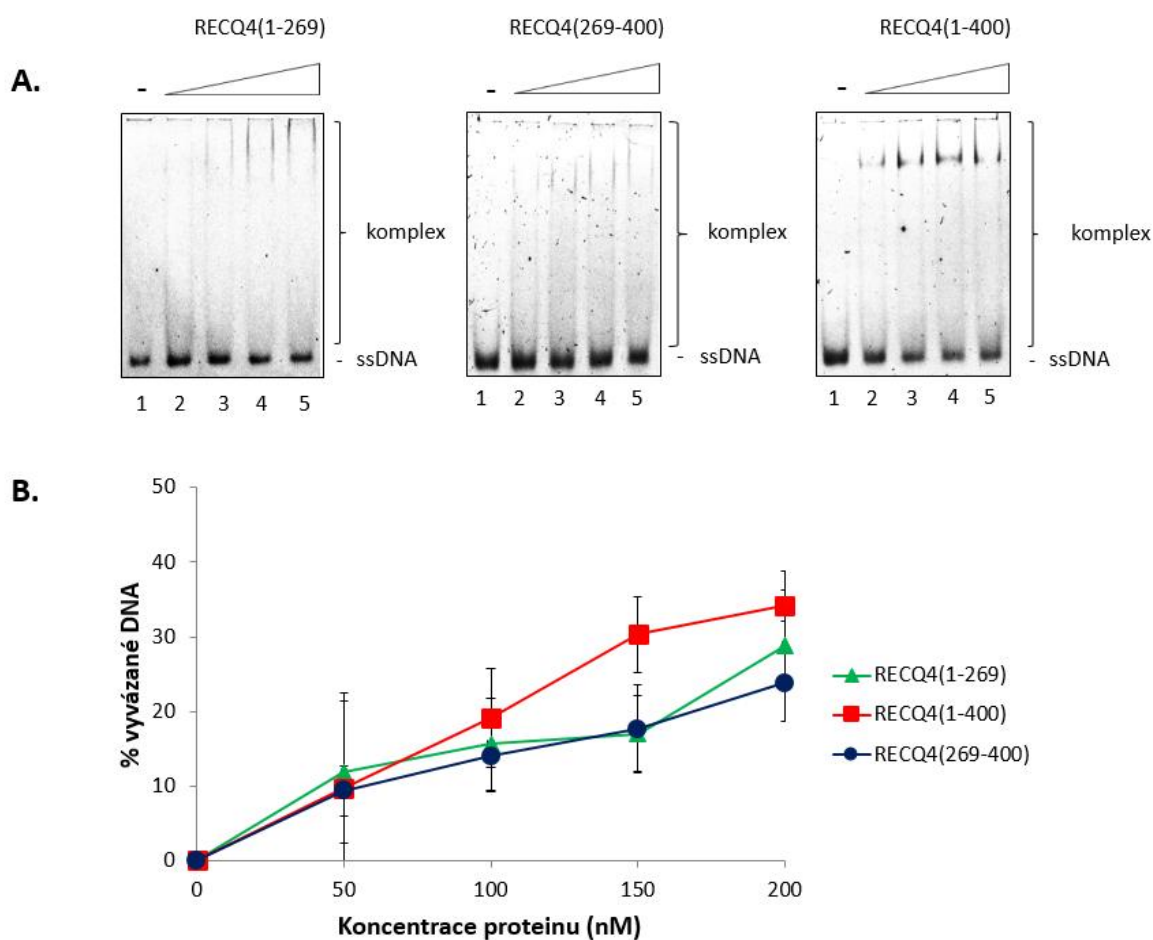
a naneseny na gel v množství 1, 2 a 4 μ l. Pozice 2-4: MBP-RECQ4(1-400), Pozice 5-7: MBP-RECQ4(1-269), Pozice 8-9: MBP-RECQ4(269-400).

5.5. DNA vazebná aktivita purifikovaných fragmentů RECQ4

Z předchozích laboratorních výsledků bylo zjištěno, že RECQ4 je schopen vázat jak ssDNA, tak velmi specificky i Hollidayovu strukturu. K porovnání vazebných vlastností purifikovaných fragmentů RECQ4 byla využita retardační analýza. Rostoucí koncentrace fragmentů RECQ4 (1-269) a (269-400) byly inkubovány s ssDNA nebo HJ strukturou (3 nM) a následně separovány na nativní gelové elektroforéze. Nativní gely byly poté skenovány a vazba RECQ4(1-269) a RECQ4(269-400) k uvedeným DNA substrátům byla kvantifikována pomocí softwaru MultiGauge a porovnána s DNA vazebnými schopnosti fragmentu RECQ4(1-400). Pro reprodukovatelnost výsledků byly retardační analýzy provedeny pro každý fragment proteinu RECQ4 ve třech nezávislých experimentech.

5.5.1. Srovnání afinity fragmentů k ssDNA

Nejprve byly sledovány schopnosti jednotlivých fragmentů RECQ4 vázat ssDNA. Zvyšující se koncentrace (50, 100, 150 a 200 nM) proteinů RECQ4(1-269), RECQ4(269-400) a RECQ4(1-400) byly inkubovány s FITC-ssDNA po dobu 20 min při 37 °C a pak byly jednotlivé reakce analyzovány (jak bylo popsáno výše). Analýza ukázala, že fragment RECQ4(1-400) je schopen vázat ssDNA nejvíce, avšak v porovnání s ostatními fragmenty není tato afinita obzvláště výrazná. Při koncentraci 200 nM RECQ4(1-400) byl schopen vyvázat 30 % ssDNA, RECQ4(1-269) průměrně 25 % ssDNA a RECQ4(269-400) asi 20 % (Obr. 22). Všechny tyto fragmenty RECQ4 byly schopny vázat ssDNA přibližně se stejnou afinitou.



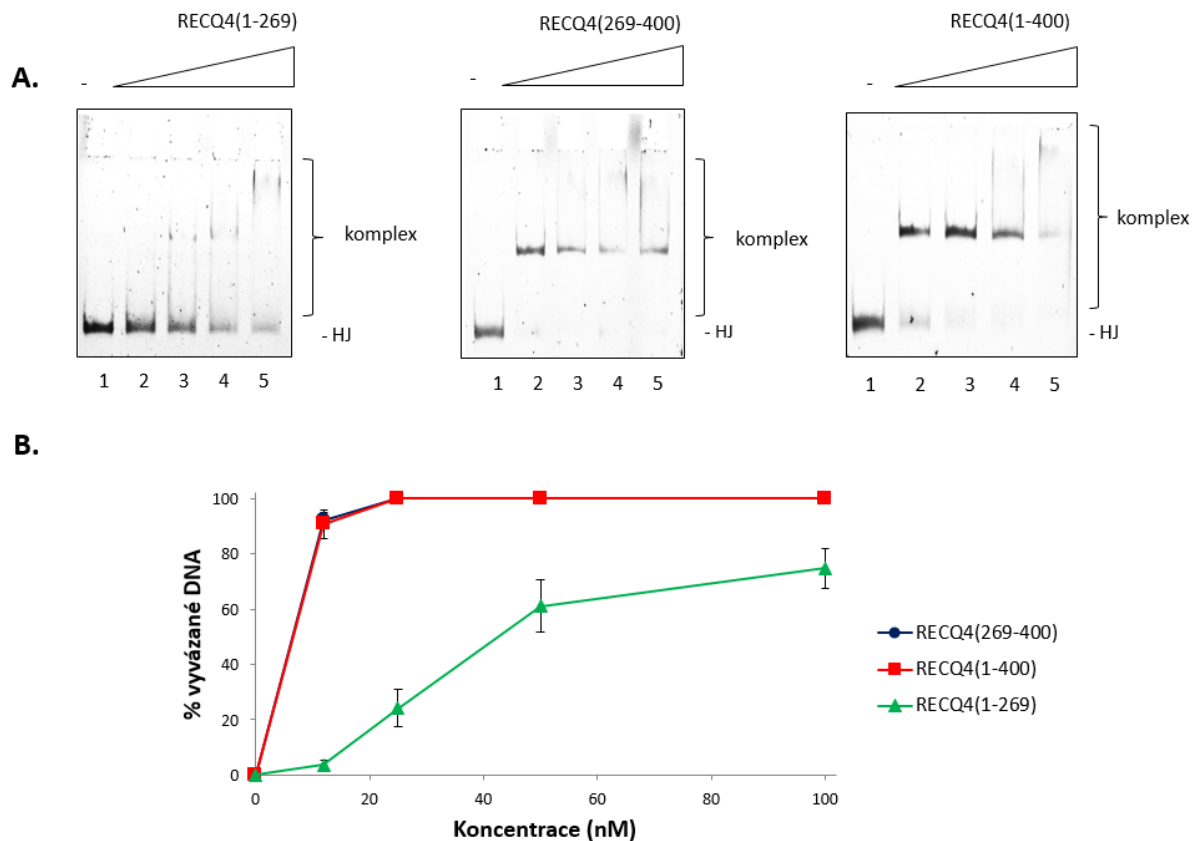
Obrázek 22: DNA vazebná afinita fragmentů RECQ(1-269), RECQ4(269-400) a RECQ4(1-400) k ssDNA. (A) RECQ4 fragmenty (50, 100, 150 a 200 nM, linie 2-5) byly inkubovány s 3 nM fluorescenčně značeným ssDNA substrátem při 37 °C po dobu 20 minut. (B) Kvantifikace DNA vazebné afinity fragmentů RECQ4 k ssDNA ± směrodatná odchylka; spočítáno na základě 3 nezávislých experimentů.

5.5.2. Srovnání afinity fragmentů RECQ4 k Hollidayově struktuře

Zvyšující se koncentrace (12, 25, 50 a 100 nM) fragmentů RECQ4(1-269), RECQ4(269-400) a RECQ4(1-400) byly inkubovány s fluorescenčně značeným HJ substrátem po dobu 20 min při 37 °C a jednotlivé reakce byly analyzovány (viz výše). Jak vyplývá z Obr. 22 a 23, všechny fragmenty RECQ4 mají vyšší afinitu k HJ substrátu než k ssDNA. Navíc bylo stanoveno, že RECQ4(1-400) a (269-400) vykazují velmi podobnou afinitu k tomuto substrátu. Při 12 nM koncentraci proteinu byly oba fragmenty schopny vyvázat téměř 90 % HJ substrátu a při 25 nM byl již všechen HJ substrát v komplexu s danými fragmenty RECQ4 (Obr. 23). Nicméně analýza ukázala, že fragment RECQ4(1-269) má sice podobnou afinitu

k ssDNA, ale k HJ je výrazně nižší než u ostatních RECQ4 fragmentů. Kvantifikace výsledků jasně ukazuje, že vazba tohoto fragmentu k HJ je při koncentraci 12 nM asi 9x nižší v porovnání s fragmenty (1-400) a (269-400) (Obr. 23).

Výsledky tedy demonstrují, že v N-terminální části proteinu RECQ4 se nacházejí dvě DNA vazebné domény, první v oblasti 1-269 AMK a druhá specifická pro vazbu k HJ v oblasti 269-400 AMK.

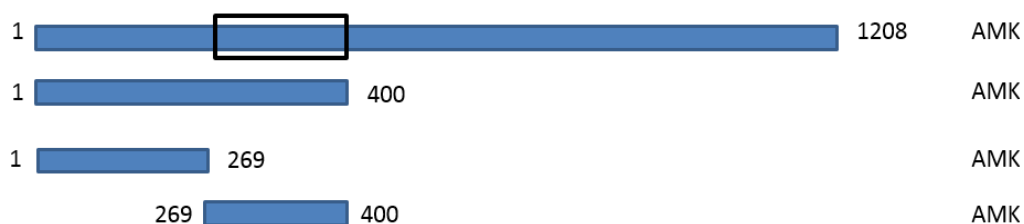


Obrázek 23: DNA vazebná afinita fragmentů RECQ(1-269), RECQ4(269-400) a RECQ4(1-400) k HJ. (A) RECQ4 fragmenty (12, 25, 50 a 100 nM, linie 2-5) byly inkubovány 20 minut s 3 nM fluorescenčně značeným HJ substrátem při 37 °C. (B) Kvantifikace DNA vazebné afinity fragmentů RECQ4 k HJ ± směrodatná odchylka; spočítáno na základě 3 nezávislých experimentů.

7. Diskuze

RecQ helikázy zastávají důležité funkce v replikačních a DNA opraných procesech a jsou esenciální pro udržování stability genetické informace. Cílem tohoto projektu bylo mapování DNA vazebných domén helikázy Rothmund-Thomsonova syndromu (RECQ4), která je v současné době nejméně prostudovaným členem RecQ rodiny. Přestože HRDC a RQC domény, které jsou zodpovědné primárně za vazbu ostatních RecQ helikáz k DNA, u proteinu RECQ4 nejsou přítomny. Nicméně zdá se, že u RECQ4 se vyvinuly v N-terminální části specifické DNA vazebné domény k zprostředkování molekulární funkce tohoto proteinu.

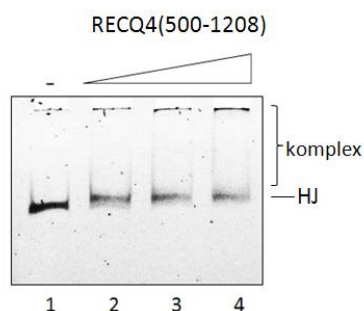
Výsledky této práce ukazují, že RECQ4 obsahuje několik DNA vazebných domén. Bylo zjištěno, že jedna DNA vazebná doména se nachází v oblasti 1-269. V laboratoři Dr. Krejčího pak byla tato doména detailněji mapována a její pozice byla blíže určena v rozsahu 90-189 (viz příloha). Další DNA vazebná doména proteinu RECQ4, specifická pro křížovou Hollidayovu strukturu, byla pozorována v oblasti aminokyselin 269-400. Doména byla pak opět podrobněji vymezena na oblast 322-400 (viz příloha).



Obrázek 24: Vymezení oblasti RECQ4 proteinu, která s největší pravděpodobností zodpovídá za vazbu Hollidayovy struktury. Pod RECQ4 v celé délce jsou znázorněny fragmenty, se kterými bylo provedeno mapování.

Pomocí bioinformatických analýz byly v RECQ4 identifikovány místa, které by mohly být zodpovědné za DNA vazbu [60]. V oblasti 402-418 byl identifikován motiv zinkového prstu, který bývá obecně považován za motiv zodpovědný za vazbu k DNA. Naše data však ukázala, že motiv zinkového prstu s největší pravděpodobností nebude zodpovědný za vazbu RECQ4 k DNA, jelikož fragment RECQ4(1-400) neobsahující Zn motiv váže dsDNA se stejnou afinitou jako fragment RECQ4(1-492) obsahující Zn motiv (Obr. 15). Přesná funkce Zn motivu, tak zůstává v RECQ4 dosud neobjasněna. Další motiv zodpovědný za DNA vazbu byl podle bioinformatické analýzy určen do oblasti 986-1030. Tato oblast byla dokonce vyhodnocena

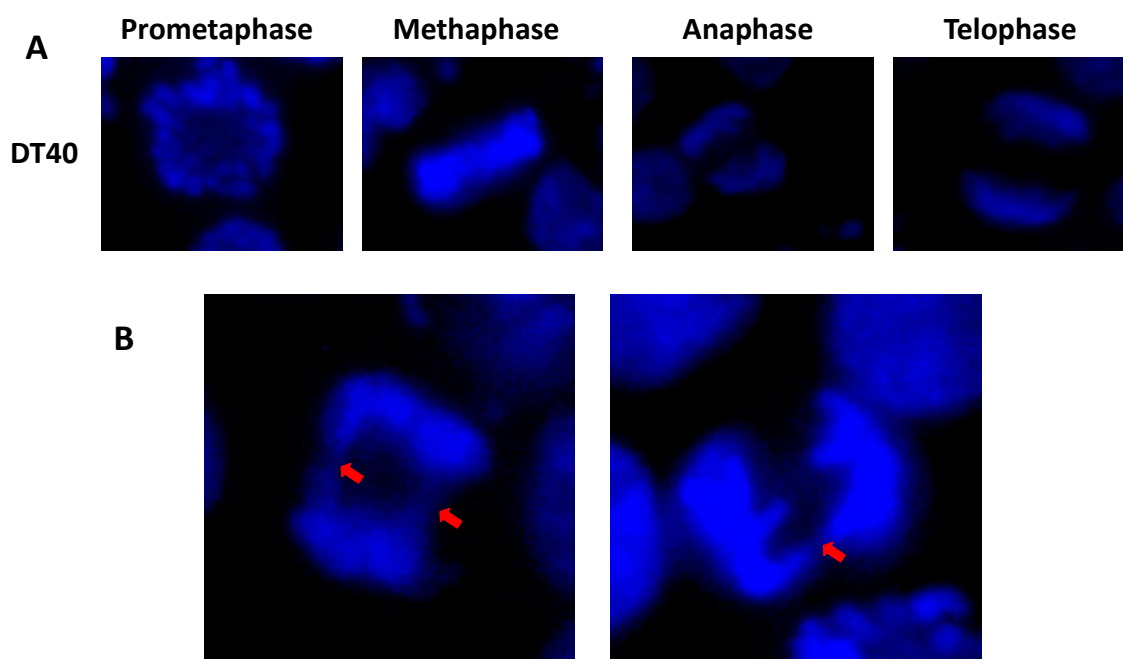
jako potenciální RQC doména v proteinu RECQ4. Proto jsem se rozhodla vyzkoušet, zda fragment RECQ4(500-1208) (protein purifikovala H. Sedláčková) je schopen interagovat s DNA pomocí retardační analýzy (Obr. 25). Experiment potvrdil, že RECQ4(500-1208) je schopen vázat DNA, což by mohlo naznačovat přítomnost RQC domény. Nicméně, pro bližší určení a potvrzení přítomnosti RQC domény je nutné další mapování.



Obrázek 25: Obrázek DNA vazebné afinity fragmentu RECQ4(500-1208) k HJ. Fragment RECQ4 (25, 50 a 100 nM, linie 2-4) byl inkubován s 3 nM fluorescenčně značeným HJ substrátem při 37 °C po dobu 20 min.

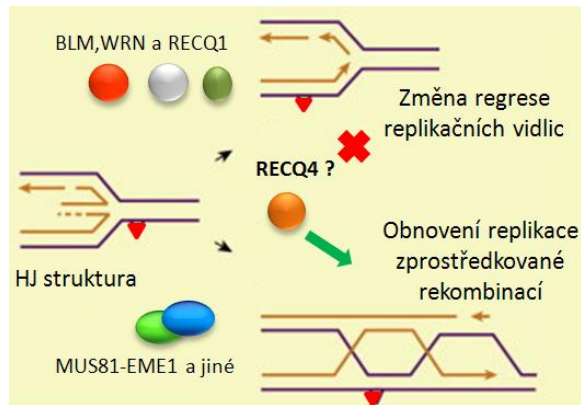
Překvapivě námi zmapovaná doména 322-400 vykazovala při retardační analýze velmi silnou afinitu k HJ struktuře, a to až 9x větší než doména v oblasti 90-189. Navíc fragment RECQ4 obsahující pouze tuto doménu (322-400) má srovnatelnou afinitu s plnou verzí proteinu. Hollidayova struktura je typickým meziproduktem procesů replikace a opravy DNA (rekombinace) a během těchto procesů musí být správně rozložena/rozštěpena pomocí Bloomova komplexu nebo strukturně specifických endonukleáz. Pokud by HJ struktura a jiné meziprodukty nebyly během S-fáze správně rozloženy, mohlo by to vést ke vzniku tzv. ⁷anafázových můstků (Obr. 26), které pak mohou způsobit chromozomovou nestabilitu, což bývá obvykle příčinou vzniku některých neurologických onemocnění nebo rakovinného bujení. V roce 2013 I. D. Hickson a jeho spolupracovníci publikovali, že strukturně specifická endonukleáza MUS81-EME1 se přímo podílí právě na štěpení nerozložených replikačních DNA meziproduktů vznikajících v S-fázi a tím zabezpečuje správné rozdělení sesterských chromatid během mitózy [61].

⁷ Anafázové můstky (anaphase bridges) jsou DNA struktury vznikající v anafázi a lokalizovány mezi dvěma nekompletně separovanými sesterskými chromatidami.



Obrázek 26: Segregace chromozomů v M-fázi buněčného cyklu (kuřecí buňky DT40 barvené DAPI). (A) Reprezentativní obrázky zobrazující průběh normální mitózy. (B) Abnormální struktury (znázorněny červenou šipkou) vznikající během anafáze znesnadňující správnou segregaci chromozomů. (Obrázky poskytla H. Sedláčková)

Vysoká afinita RECQ4 k HJ substrátu oproti jiným (jako ssDNA) by mohla naznačovat její úlohu ve zpracování HJ struktury. Díky nízké helikázové a ATPázové aktivitě RECQ4 pravděpodobně nebude schopen HJ strukturu přímo rozplétat jako například BLM helikáza. RECQ4 může spíše rozpoznávat HJ strukturu, popřípadě ji stabilizovat nebo cílit do toho místa ostatní proteiny podílející se na zpracování tohoto replikačního a rekombinačního meziprojektu. To podporují i nedávno publikované výsledky, které ukazují, že RECQ4 je schopen interagovat s helikázou BLM. Při funkční analýze této interakce bylo zjištěno, že RECQ4 zabraňuje BLM helikáze HJ strukturu rozložit [62]. Navíc nepublikované výsledky z laboratoře Dr. Krejčího ukazují, že RECQ4 interaguje a stimuluje aktivitu strukturně specifické endonukleázy MUS81-EME1, která štěpí HJ strukturu (Obr. 27). RECQ4 by tak mohl být klíčový protein, který rozhoduje o tom, jak bude HJ struktura v S-fázi buněčného cyklu zpracována (Obr. 27) a spolu endonukleázou MUS81-EME1 předcházet vzniku anafázových můstků, a tím se podílet na správném rozdělení chromozomů během mitózy.



Obrázek 27: Potenciální začlenění RECQ4 ve zpracování HJ struktury vznikající ve finální fázi opravy zastavené replikační vidlice. RECQ4 potlačuje aktivitu BLM rozplétat HJ a stimuluje aktivitu MUS81-EME1, která má schopnost štěpit HJ strukturu.

Nicméně pro pochopení molekulárního mechanismu RECQ4 v metabolismu DNA jsou nezbytně nutné další experimenty. Díky tomu, že se nám podařilo zmapovat relativně malé oblasti DNA vazebných domén uvnitř proteinu RECQ4, bude předmětem našeho dalšího studia detailnější mapování těchto domén na aminokyselinové úrovni a jejich *in vivo* charakterizace. Vzhledem k tomu, že purifikace fragmentů RECQ4 je relativně snadná, rozhodli jsme se navíc prozkoumat jeho terciární strukturu, která dosud nebyla stanovena, a zároveň sledovat interakce RECQ4 s DNA pomocí NMR spektroskopie. A samozřejmě také další mapování a hledání nových interakčních partnerů RECQ4. Zmapování DNA vazebných domén RECQ4 k různým DNA substrátům nám může napovědět o hlavní roli RECQ4 v lidském organismu a pomoci pochopit molekulární podstatu tak zákeřného onemocnění jako je RTS. Navíc podle nedávných studií RecQ helikázy představují velmi slibné potenciální cíle v antirakovinné terapii [63], proto je jejich detailní biochemická charakterizace pro další klinický výzkum a aplikace nesmírně důležitá.

8. Závěr

Díky celé škále funkcí jsou RecQ helikázy v metabolismu DNA nepostradatelné a jistě si právem zaslouží označení „multifunkční ochránci“ genomu. V naší práci jsme se zaměřili na helikázu RECQ4 s cílem zmapovat její DNA vazebné domény, a tím přispět k objasnění její role při replikaci a DNA opravných mechanismech.

Naše dosažené výsledky ukazují, že RECQ4 protein obsahuje několik DNA vazebných domén. Dvě domény jsou lokalizovány v N-terminální části a jedna doména v C-terminální části. Navíc DNA vazebná doména v oblasti 322-400 vykazuje vysokou afinitu k Hollidayově struktuře. Právě kvůli vysoké afinitě k HJ struktuře by se RECQ4 mohl i navzdory tomu, že postrádá konzervovanou HRDC doménu, podílet na zpracování těchto složitých a potenciálně velmi toxických replikačních a rekombinačních meziproductů, jejichž správné zpracování má pro život buňky zásadní význam.

Výsledky této práce nám mohou pomoci při hledání molekulárního mechanismu RECQ4 v metabolismu DNA a poslouží jako výchozí kroky k dalšímu *in vitro* a *in vivo* studiu. Důležitost základního výzkumu RECQ4 je podpořena i tím, že mutace genu *RECQ4* vedou ke vzniku zkrácených verzí proteinu a jsou spojeny dokonce se třemi závažnými onemocněními (Rothmund-Thomsonův syndrom, RAPADILINO a Baller-Geroldův syndrom) znemožňující běžný život. Nicméně charakterizace molekulárního vlivu těchto mutací není známa. Doufáme, že výsledky této práce by mohly být prvním krůčkem ke správnému pochopení této helikázy v buněčných pochodech a zároveň spolu s dalšími vědeckými objevy pak budou přispívat k úspěšnému léčení syndromů s nedostatkem tohoto proteinu.

9. Přínos práce

Výsledky této práce jsou součástí vědeckého článku v mezinárodním impaktovaném časopise DNA Repair, který prošel zahraniční evaluací a je v současnosti připraven k tisku (viz příloha).

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786415000567>

Navíc abychom rozšířili povědomí o rodině RecQ helikáz mezi širokou veřejnost a nastínili nutnost pochopení molekulární podstaty syndromů, rozhodli jsme se zveřejnit upravenou verzi teoretické práce na českou wikipedii, a tím ji rozšířit o dvě hesla: RecQ helikázy a RECQ4 protein.

- http://cs.wikipedia.org/wiki/RecQ_helik%C3%A1zy
- <http://cs.wikipedia.org/wiki/RECQ4>

Během této práce jsem se naučila ovládat řadu biochemických a molekulárně biologických metod, navrhnout experimenty, provádět je a následně vyhodnocovat. Neméně důležité pro mě bylo naučit se zpracovávat vědeckou literaturu a sepsat samotnou vědeckou práci. Já sama se domnívám, že tato Středoškolská odborná činnost mě velmi obohatila a pomůže mi v budoucnu v mém profesním růstu.

10. Seznam použité literatury

- 1 Campbell NA. Biologie. In: Reece JB ed.ed. Brno: Computer Press 2008: 1332
- 2 Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009, 461: 1071-1078
- 3 Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001, 411: 366-374
- 4 Hoeijmakers JH. DNA repair mechanisms. *Maturitas* 2001, 38: 17-22; discussion 22-13
- 5 Bohr VA. Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. *Trends Biochem Sci* 2008, 33: 609-620
- 6 Nakayama H, Nakayama K, Nakayama R, Irino N, Nakayama Y, Hanawalt PC. Isolation and genetic characterization of a thymineless death-resistant mutant of *Escherichia coli* K12: identification of a new mutation (*recQ1*) that blocks the RecF recombination pathway. *Mol Gen Genet* 1984, 195: 474-480
- 7 Mohaghegh P, Hickson ID. DNA helicase deficiencies associated with cancer predisposition and premature ageing disorders. *Hum Mol Genet* 2001, 10: 741-746
- 8 Chu WK, Hickson ID. RecQ helicases: multifunctional genome caretakers. *Nat Rev Cancer* 2009, 9: 644-654
- 9 Puranam KL, Blackshear PJ. Cloning and characterization of RECQL, a potential human homologue of the *Escherichia coli* DNA helicase RecQ. *J Biol Chem* 1994, 269: 29838-29845
- 10 Seki M, Miyazawa H, Tada S, Yanagisawa J, Yamaoka T, Hoshino S, Ozawa K, *et al.* Molecular cloning of cDNA encoding human DNA helicase Q1 which has homology to *Escherichia coli* Rec Q helicase and localization of the gene at chromosome 12p12. *Nucleic Acids Res* 1994, 22: 4566-4573
- 11 Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocci S, Proytcheva M, *et al.* The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 1995, 83: 655-666
- 12 Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, *et al.* Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 1996, 272: 258-262
- 13 Kitao S, Ohsugi I, Ichikawa K, Goto M, Furuichi Y, Shimamoto A. Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: biological significance of multiple species in higher eukaryotes. *Genomics* 1998, 54: 443-452
- 14 Ellis NA, German J. Molecular genetics of Bloom's syndrome. *Hum Mol Genet* 1996, 5 Spec No: 1457-1463
- 15 Yu CE, Oshima J, Wijsman EM, Nakura J, Miki T, Piussan C, Matthews S, *et al.* Mutations in the consensus helicase domains of the Werner syndrome gene. *Werner's Syndrome Collaborative Group. Am J Hum Genet* 1997, 60: 330-341
- 16 Kitao S, Shimamoto A, Goto M, Miller RW, Smithson WA, Lindor NM, Furuichi Y. Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nat Genet* 1999, 22: 82-84
- 17 Bernstein DA, Keck JL. Domain mapping of *Escherichia coli* RecQ defines the roles of conserved N- and C-terminal regions in the RecQ family. *Nucleic Acids Res* 2003, 31: 2778-2785
- 18 Suzuki N, Shimamoto A, Imamura O, Kuromitsu J, Kitao S, Goto M, Furuichi Y. DNA helicase activity in Werner's syndrome gene product synthesized in a baculovirus system. *Nucleic Acids Res* 1997, 25: 2973-2978
- 19 Karow JK, Chakraverty RK, Hickson ID. The Bloom's syndrome gene product is a 3'-5' DNA helicase. *J Biol Chem* 1997, 272: 30611-30614
- 20 Neff NF, Ellis NA, Ye TZ, Noonan J, Huang K, Sanz M, Proytcheva M. The DNA helicase activity of BLM is necessary for the correction of the genomic instability of bloom syndrome cells. *Mol Biol Cell* 1999, 10: 665-676

- 21 Guo RB, Rigolet P, Zargarian L, Fermandjian S, Xi XG. Structural and functional characterizations reveal the importance of a zinc binding domain in Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res* 2005, 33: 3109-3124
- 22 Bennett RJ, Keck JL. Structure and function of RecQ DNA helicases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2004, 39: 79-97
- 23 Lee JW, Harrigan J, Opresko PL, Bohr VA. Pathways and functions of the Werner syndrome protein. *Mech Ageing Dev* 2005, 126: 79-86
- 24 Bernstein DA, Keck JL. Conferring substrate specificity to DNA helicases: role of the RecQ HRDC domain. *Structure* 2005, 13: 1173-1182
- 25 Wu L, Chan KL, Ralf C, Bernstein DA, Garcia PL, Bohr VA, Vindigni A, *et al.* The HRDC domain of BLM is required for the dissolution of double Holliday junctions. *EMBO J* 2005, 24: 2679-2687
- 26 Mushegian AR, Bassett DE, Boguski MS, Bork P, Koonin EV. Positionally cloned human disease genes: patterns of evolutionary conservation and functional motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94: 5831-5836
- 27 Macris MA, Krejci L, Bussen W, Shimamoto A, Sung P. Biochemical characterization of the RECQ4 protein, mutated in Rothmund-Thomson syndrome. *DNA Repair (Amst)* 2006, 5: 172-180
- 28 Mankouri HW, Huttner D, Hickson ID. How unfinished business from S-phase affects mitosis and beyond. *EMBO J* 2013, 32: 2661-2671
- 29 Lambert S, Carr AM. Impediments to replication fork movement: stabilisation, reactivation and genome instability. *Chromosoma* 2013, 122: 33-45
- 30 Ralf C, Hickson ID, Wu L. The Bloom's syndrome helicase can promote the regression of a model replication fork. *J Biol Chem* 2006, 281: 22839-22846
- 31 Machwe A, Xiao L, Groden J, Orren DK. The Werner and Bloom syndrome proteins catalyze regression of a model replication fork. *Biochemistry* 2006, 45: 13939-13946
- 32 LeRoy G, Carroll R, Kyin S, Seki M, Cole MD. Identification of RecQL1 as a Holliday junction processing enzyme in human cell lines. *Nucleic Acids Res* 2005, 33: 6251-6257
- 33 Karow JK, Constantinou A, Li JL, West SC, Hickson ID. The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97: 6504-6508
- 34 Constantinou A, Tarsounas M, Karow JK, Brosh RM, Bohr VA, Hickson ID, West SC. Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest. *EMBO Rep* 2000, 1: 80-84
- 35 Boddy MN, Gaillard PH, McDonald WH, Shanahan P, Yates JR, Russell P. Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell* 2001, 107: 537-548
- 36 Ip SC, Rass U, Blanco MG, Flynn HR, Skehel JM, West SC. Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* 2008, 456: 357-361
- 37 Sarbajna S, West SC. Holliday junction processing enzymes as guardians of genome stability. *Trends Biochem Sci* 2014, 39: 409-419
- 38 Bachrati CZ, Borts RH, Hickson ID. Mobile D-loops are a preferred substrate for the Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res* 2006, 34: 2269-2279
- 39 Suski C, Marians KJ. Resolution of converging replication forks by RecQ and topoisomerase III. *Mol Cell* 2008, 30: 779-789
- 40 Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 2003, 300: 1542-1548
- 41 Esashi F, Christ N, Gannon J, Liu Y, Hunt T, Jasin M, West SC. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* 2005, 434: 598-604
- 42 Ceballos SJ, Heyer WD. Functions of the Snf2/Swi2 family Rad54 motor protein in homologous recombination. *Biochim Biophys Acta* 2011, 1809: 509-523

- 43 Nimonkar AV, Ozsoy AZ, Genschel J, Modrich P, Kowalczykowski SC. Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105: 16906-16911
- 44 Wu L, Davies SL, Levitt NC, Hickson ID. Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51. *J Biol Chem* 2001, 276: 19375-19381
- 45 Hu Y, Raynard S, Sehorn MG, Lu X, Bussen W, Zheng L, Stark JM, *et al.* RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. *Genes Dev* 2007, 21: 3073-3084
- 46 Kitao S, Lindor NM, Shiratori M, Furuichi Y, Shimamoto A. Rothmund-thomson syndrome responsible gene, RECQL4: genomic structure and products. *Genomics* 1999, 61: 268-276
- 47 Suzuki T, Kohno T, Ishimi Y. DNA helicase activity in purified human RECQL4 protein. *J Biochem* 2009, 146: 327-335
- 48 Xu X, Rochette PJ, Feyissa EA, Su TV, Liu Y. MCM10 mediates RECQ4 association with MCM2-7 helicase complex during DNA replication. *EMBO J* 2009, 28: 3005-3014
- 49 Fan W, Luo J. RecQ4 facilitates UV light-induced DNA damage repair through interaction with nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A (XPA). *J Biol Chem* 2008, 283: 29037-29044
- 50 Ghosh AK, Rossi ML, Singh DK, Dunn C, Ramamoorthy M, Croteau DL, Liu Y, *et al.* RECQL4, the protein mutated in Rothmund-Thomson syndrome, functions in telomere maintenance. *J Biol Chem* 2012, 287: 196-209
- 51 Sengupta S, Shimamoto A, Koshiji M, Pedoux R, Rusin M, Spillare EA, Shen JC, *et al.* Tumor suppressor p53 represses transcription of RECQ4 helicase. *Oncogene* 2005, 24: 1738-1748
- 52 Petkovic M, Dietschy T, Freire R, Jiao R, Stajlar I. The human Rothmund-Thomson syndrome gene product, RECQL4, localizes to distinct nuclear foci that coincide with proteins involved in the maintenance of genome stability. *J Cell Sci* 2005, 118: 4261-4269
- 53 Larizza L, Roversi G, Volpi L. Rothmund-Thomson syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2010, 5: 2
- 54 Rothmund Av. Über Cataracten in Verbindung mit einer eigenthümlichen Hautdegeneration. ed.: *Arch.Ophthalmol.* 1868: 159-182
- 55 Thomson MS. A hitherto undescribed familial disease. ed.: *Br. J. Dermatol.* 1923: 455-462
- 56 Siitonen HA, Sotkasiira J, Biervliet M, Benmansour A, Capri Y, Cormier-Daire V, Crandall B, *et al.* The mutation spectrum in RECQL4 diseases. *Eur J Hum Genet* 2009, 17: 151-158
- 57 Kääriäinen H, Ryöppy S, Norio R. RAPADILINO syndrome with radial and patellar aplasia/hypoplasia as main manifestations. *Am J Med Genet* 1989, 33: 346-351
- 58 Siitonen HA, Kopra O, Kääriäinen H, Haravuori H, Winter RM, Säämänen AM, Peltonen L, *et al.* Molecular defect of RAPADILINO syndrome expands the phenotype spectrum of RECQL4 diseases. *Hum Mol Genet* 2003, 12: 2837-2844
- 59 Van Maldergem L, Siitonen HA, Jalkh N, Chouery E, De Roy M, Delague V, Muenke M, *et al.* Revisiting the craniosynostosis-radial ray hypoplasia association: Baller-Gerold syndrome caused by mutations in the RECQL4 gene. *J Med Genet* 2006, 43: 148-152
- 60 Marino F, Vindigni A, Onesti S. Bioinformatic analysis of RecQ4 helicases reveals the presence of a RQC domain and a Zn knuckle. *Biophys Chem* 2013, 177-178: 34-39
- 61 Ying S, Minocherhomji S, Chan KL, Palmal-Pallag T, Chu WK, Wass T, Mankouri HW, *et al.* MUS81 promotes common fragile site expression. *Nat Cell Biol* 2013, 15: 1001-1007
- 62 Singh DK, Popuri V, Kulikowicz T, Shevelev I, Ghosh AK, Ramamoorthy M, Rossi ML, *et al.* The human RecQ helicases BLM and RECQL4 cooperate to preserve genome stability. *Nucleic Acids Res* 2012, 40: 6632-6648
- 63 Gupta R, Brosh RM. Helicases as prospective targets for anti-cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2008, 8: 390-401

10.1. Seznam použitých internetových zdrojů

11 <http://genetika.wz.cz/choroby.htm>

12 <http://en.wikipedia.org/wiki/Erythema>

13 <http://en.wikipedia.org/wiki/Sarcoma>

14 <http://en.wikipedia.org/wiki/Melanoma>

15 <http://www.hxbenefit.com/wp-content/uploads/2013/01/Bloom-Syndrome-Picture.jpg>

16 <http://wilsongen677s10.weebly.com/uploads/3/6/1/9/3619127/9425334.jpg?388>

17 <http://www2.estrellamountain.edu/faculty/farabee/BIOBK/cellcycle.gif>

18 <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002052.htm>

19 <http://www.nature.com/eye/journal/v17/n4/images/6700312f1.jpg>

110 <http://www.perfectclinic.cz/vrozene-vady-ruky>

111 <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/kraniosynostoza>

11. Příloha