



STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

**ÚLOHA PROTEINU WRNIP1 PŘI UDRŽOVÁNÍ
GENOMOVÉ STABILITY**

JIŘÍ DOSEDĚL

Prostějov, 2018

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

ÚLOHA PROTEINU WRNIP1 PŘI UDRŽOVÁNÍ GENOMOVÉ STABILITY

THE ROLE OF PROTEIN WRNIP1 IN MAINTENANCE OF GENOME STABILITY

Autor: Jiří Doseděl

Škola: Reálné gymnázium a základní škola města Prostějova,
Studentská ul. 2, Studentská 4/2, 796 01 Prostějov

Kraj: Olomoucký

Konzultanti: doc. Mgr. Lumír Krejčí, Ph.D. a Karina Movsesjan

Prostějov, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně pod vedením doc. Mgr. Lumíra Krejčího, Ph.D. a Kariny Movsesjan a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

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

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

V Prostějově dne 26.3.2018

.....

Poděkování



Zde bych rád zejména poděkoval mému školiteli doc. Mgr. Lumíru Krejčímu, Ph.D. za to, že mi dal šanci pracovat v úžasné Laboratoři homologní rekombinace a opravy DNA (LORD), za snahu neustále posouvat můj projekt co nejdál a za to, že pro mě byl velkou motivací.

Obdobně děkuji i mé druhé školitelce Karině Movsesjan za její podnětné rady, podporu a že pro mě byla obrovským zdrojem inspirace a také za to, že mi pomohla se do labu vůbec dostat, zaškolila mě a za to, kolik mě toho naučila.

Také musím poděkovat holkám z nejlepšího kanclu na MU za vytvoření oázy klidu, porozumění a kontaktu s normálním světem; a nakonec všem LORDům dohromady za vytvoření příjemného pracovního prostředí a spoustu skvělých zážitků.

Děkuji také řediteli mého Reálného gymnázia, RNDr. Ing. Rostislavu Halašovi, za vyřízení individuálního vzdělávacího plánu, mé třídní učitelce, Mgr. Radce Mikešové, za podporu a koordinaci mě a mých povinností vůči škole, Mgr. Evě Osinové za její obdiv a korekturu češtiny v práci, a také ostatním učitelům, kteří ke mně byli tolerantní při doplňování klasifikace.



Díky patří též Nadaci Unipetrol za poskytnutí stipendia a masivní propagaci.

Děkuji také celé mé rodině, ale především mým rodičům za obrovskou podporu, pochopení a za společně strávené chvíle.

Připíjím na Vás!

Anotace

Replikace buněčné DNA je esenciální pro správný průběh buněčného cyklu. Naše buňky jsou však neustále vystavovány exogenním a endogenním zdrojům replikačního stresu, který může vést ke genomické nestabilitě a k rozvoji nádorových onemocnění. Jedním z klíčových faktorů podílejících se na stabilizaci replikační vidlice je protein WRNIP1. WRNIP1 je interakčním partnerem WRN helicázy. Mutace v genu kódujícím WRN způsobuje Wernerův syndrom, což je autosomální recesivní onemocnění způsobující předčasné stárnutí. Avšak přesná úloha WRNIP1 při DNA replikaci zůstává nejasná. V této práci byl odhalen mechanismus, kterým se WRNIP1 podílí na restartování zastavené replikační vidlice, kde WRNIP1 nasedá na revertovanou replikační vidlici a stimuluje polymerázovou extenzi pomocí destabilizace RAD51 vlákna. Tím WRNIP1 umožňuje restartování DNA replikace a brání kolapsu replikační vidlice a prohloubení replikačního stresu. Tato práce tedy přispívá k porozumění úloze proteinu WRNIP1 a mechanismu, kterým se podílí na udržování genomové stability buněk.

Klíčová slova

Odpověď na replikační stres; replikace DNA; udržení genomové stability; WRNIP1

Annotation

Replication of cellular DNA is essential for the proper cell cycle progression. Our cells are constantly exposed to exogenous and endogenous sources of replication stress which can lead to genome instability and development of tumour diseases. One of the crucial factors that participate in stabilizing replication fork is WRNIP1 protein. WRNIP1 is WRN helicase interaction partner. Mutation in WRN gene is responsible for Werner syndrome which is autosomal recessive disease causing premature aging. However, role of WRNIP1 during DNA replication remains elusive. This work uncovers a mechanism by which WRNIP1 mediates restart of stalled replication forks where WRNIP1 associates with reversed replication fork and stimulates polymerase extension by destabilization of RAD51 filament. Thereby WRNIP1 enables DNA replication restart and prevents replication fork collapse and replication stress. This work thus contributes to understanding of the role of WRNIP1 protein and the mechanism by which it participates in maintaining genome stability.

Keywords

Replication stress response; DNA replication; maintenance of genome stability; WRNIP1

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
ÚVOD.....	11
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1.1 REPLIKACE BUNĚČNÉ DNA.....	12
1.2 ODPOVĚĎ ORGANISMU NA REPLIKAČNÍ STRES.....	16
1.3 WRNIP1.....	24
2 CÍLE PRÁCE.....	26
3 METODY A MATERIÁLY.....	27
3.1 MATERIÁLY.....	27
3.2 METODY.....	37
3.2.1 <i>Transformace buněk</i>	37
3.2.2 <i>Kultivace buněk a exprese proteinů WRNIP1 a RAD51</i>	37
3.2.3 <i>Purifikace WRNIP1</i>	38
3.2.3.1 <i>Buněčná lýze</i>	38
3.2.3.2 <i>Afinitní kapalinová chromatografie</i>	38
3.2.4 <i>Kontrola nukleázové kontaminace WRNIP1</i>	39
3.2.5 <i>Purifikace RAD51</i>	39
3.2.5.1 <i>Buněčná lýze</i>	39
3.2.5.2 <i>Aminoprecipitace</i>	39
3.2.5.3 <i>Rychlá proteinová kapalinová chromatografie (FPLC)</i>	39
3.2.6 <i>Koncentrování proteinu RAD51</i>	40
3.2.7 <i>Izolace plasmidové DNA</i>	40
3.2.8 <i>Sekvencování DNA</i>	40
3.2.9 <i>Gelová elektroforéza</i>	40
3.2.9.1 <i>Elektroforéza na SDS-polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)</i>	41
3.2.9.2 <i>Elektroforéza na nativním polyakrylamidovém gelu</i>	41
3.2.9.3 <i>Elektroforéza na agarózovém gelu</i>	41
3.2.9.4 <i>Elektroforéza na denaturačním polyakrylamidovém gelu</i>	42
3.2.10 <i>Pull-down analýza</i>	42
3.2.11 <i>EMSA – analýza vazby na DNA</i>	42
3.2.12 <i>EMSA – vliv WRNIP1 na RAD51</i>	43
3.2.13 <i>Analýza polymerázové extenze</i>	43

4	VÝSLEDKY	44
4.1	TRANSFORMACE, EXPRESE A PURIFIKACE	44
4.1.1	<i>Stanovení koncentrace proteinu</i>	<i>44</i>
4.2	DNA VAZEBNÁ AFINITA WRNIP1	45
4.3	INTERAKCE WRNIP1 S RAD51	46
4.3.1	<i>Pull down analýza</i>	<i>46</i>
4.3.2	<i>EMSA – interakce WRNIP1 s RAD51</i>	<i>47</i>
4.3.3	<i>EMSA – vliv ATP hydrolýzy na funkční interakci.....</i>	<i>47</i>
4.3.4	<i>EMSA – analýza potřeby ATP hydrolýzy pro WRNIP1 nebo RAD51</i>	<i>48</i>
4.4	STIMULACE TAQ POLYMERÁZY	49
5	DISKUZE.....	51
5.1	ÚLOHA PROTEINU WRNIP1 PŘI OCHRANĚ ZATAVENÉ REPLIKAČNÍ VIDLICE	51
5.2	NAVAZUJÍCÍ STUDIE.....	54
6	ZÁVĚR.....	56
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	57
8	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	64
9	PŘÍLOHY	65
9.1	KONTROLA NUKLEÁZOVÉ KONTAMINCE	65
9.2	PURIFIKACE PROTEINU RAD51	66
9.3	OPTIMALIZACE POLYMERÁZOVÉ EXTENZE.....	67

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMP – ampicilin

AMP-PNP – adenyl-imidofosfát

APS – peroxodisíran sodný (z angl. amonium persulfate)

ATP – adenosin trifosfát (z angl. adenosin triphosphate)

BIR – -replikace indukovaná zlomem (z angl. break-induced replication)

BLM – Bloomova helikáza (z angl. Bloom syndrome protein)1

BOD1L – protein 1 podobný proteinu 1 biorientace chromozomů při buněčném dělení (z angl. biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like 1)

BRCA2 – protein náchylnosti k rakovině prsu typ 2 (z angl. breast cancer type 2 susceptibility protein)

BSA – hovězí sérový albumin (z angl. bovine serine albumin)

CAM – chloramfenikol

CBB – lyzační pufr (z angl. cell breaking buffer)

dH₂O – destilovaná voda

DNA – deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)

ssDNA – jednořetězcová DNA (z angl. single strand DNA)

dsDNA – dvouřetězcová DNA (z angl. double strand DNA)

DNA2 – DNA replikační ATP-dependentní helikáza/nukleáza DNA2

dNTP – deoxyribonukleotid trifosfát (z angl. deoxyribonucleotide triphosphate)

DSBR – oprava dvouřetězcových zlomů pomocí HR (z angl. double-strand break repair)

DTT – dithiotreitol

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)

EMSA – metoda elektromobilitního posunu (z angl. electromobility shift assay)

EME1 –endonukleáza EME1

EXO1 – exonukleáza 1

FAN1 – nukleáza asociovaná se skupinou Fanconiho anémie (z angl. Fanconi-associated nuclease 1)

FANCD2 –protein D2 skupiny Fanconiho anémie (z angl. Fanconi anemia group D2 protein)

FANCI – protein I skupiny Fanconiho anémie (z angl. Fanconi anemia group I protein)

FBH1 – F-box DNA helikáza 1

GST –glutathion-S-transferáza

GTH – glutathion

HR – homologní rekombinace

HLTF – transkripční faktor podobný helikáze (z angl. helicase-like transcription factor)

HU – hydroxyurea

IPTG – isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid

Mgs1 – protein pro údržbu genomové stability 1 (z angl. maintenance of genome stability 1)

Mms2 – MMS senzitivní protein 2 (z angl. methyl methansulfonate sensitivity 2)

MRE11 – protein meiotické rekombinace 11 (z ang. meiotic recombination 11)

MRN – komplex MRE11-RAD50-NBS1

MUS81– MMS a UV senzitivní protein 81 (z angl. MMS and UV sensitive 81)

NBS1 – nibrin

NP40 – nonidet P40

PARP – poly [ADP-ribóza] polymeráza 1

PCNA – nukleární antigen buněčné proliferace (z angl. proliferating cell nuclear antigen)

PI – směs proteinázových inhibitorů

PIP – PCNA protein interakční doména (z angl. PCNA interacting protein)

PK – proteináza K

PML – promyleocytická leukémie

PMSF – fenylmethansulfonylfluorid (z angl. Phenylmethane sulfonyl fluoride)

pol δ – polymeráza δ

PrimPol – primáza-DNA polymeráza

PTIP – protein interagující s PAX 1 (z angl. PAX-interacting protein 1)

RAD no. – protein radiační sensitivity (z angl. radiation sensitive), no. reprezentuje jednociferné nebo dvouciferné číslo

RAD51C – RAD51 paralog C

RECQ – helikázy vyvinuté z rekombinačního proteinu Q (z angl. recombination protein Q)

REV1 –protein zabraňující reverzi 1 (z angl. reversionless 1)

REV3 – protein zabraňující reverzi 3 (z angl. reversionless 3)

RFC – replikační faktor C

RNA – ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)

RPA – replikační protein A

RPM – rotace za minutu (z angl. rotates per minute)

SCF – komplex SKP-Cullin-(F-box) obsahující protein

SDS – dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecylsulfate)

SDS-PAGE – elektroforéza na SDS polyakrylamidovém gelu (z angl. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

SDSA –spojování vláken závislé na syntéze (z angl. synthesis-dependent strand annealing)

Sgs1 – supresor pomalého růstu 1 (z angl. slow growth suppressor)

SMARCAL1 – protein 1 podobný podskupině A SWI/SNF příbuzných, s matrixem asociovaných, aktin dependentních regulátorů chromatinu (z angl. SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1)

Srs2 –supresor RAD6 (z angl. suppressor of Rad Six)

SSB –protein vázající jednovláknovou DNA (single strand binding protein)

SUMO – malý modifikátor podobný ubikvitinu (small ubiquitin-like modifier)

TEMED – tetramethylethylendiamin

TLS – translézní syntéza

TS –výměna templátů (z angl. template switch)

Ub – ubikvitin

Ubc13 – E2 ubikvitin konjugační enzym 13 (z angl. ubiquitin conjugating protein 13)

UBZ – zinkový prst vázající ubikvitin (z angl. ubiquitin binding zinc-finger)

UV – ultrafialové záření

UVC – ultrafialové záření typu C

WHIP –interakční partner Wernerovy helikázy (z angl. Werner helicase interacting partner)

WRN – Wernerova helikáza

WRNIP1 –interakční protein 1 Wernerovy helikázy (z angl. Werner helicase interacting protein 1), název pro WHIP podle standardní nomenklatury

WT –divoký kmen (z angl. wild type)

XRCC3 – (z angl. X-Ray repair cross-complementing protein 3), paralog RAD51

ZRANB3 – zinkový prst a RAN vázající doménu obsahující protein 3 (z angl. zinc finger RAN-binding domain-containing protein 3)

γ -H2AX – fosforylovaný protein X H2A histonové skupiny

ÚVOD

Pro úspěšné buněčné dělení je nezbytné zdvojit s co největší přesností buněčnou deoxyribonukleovou kyselinu, (DNA), která je nositelkou genetické informace a řídí vývoj, stavbu a funkci celého organismu. Za zdvojení DNA je zodpovědný replisom – komplex proteinů replikační mašinerie, který je zodpovědný za separaci vláken DNA a syntézu komplementárních vláken.

Buňky jsou neustále vystavovány exogenním i endogenním zdrojům poškozujícím DNA, v důsledku čehož může během DNA replikace docházet ke zpomalení, či dokonce k zastavení postupu replikační vidlice. Z tohoto důvodu si buňky jako odpověď na tento replikační stres vytvořily několik drah, které umožňují stabilizaci a progresi replikační vidlice, přičemž tyto dráhy musí být navíc přesně regulovány.

Jedním z proteinů nezbytných pro regulaci a stabilizaci replikační vidlice je Werner helicase interacting protein 1 (WRNIP1). Jeho absence vede k degradaci a kolapsu zastavené replikační vidlice, extenzivnímu DNA poškození a chromozomálním aberacím [1], a tím potenciálně i ke vzniku a rozvoji nádorových onemocnění. Mechanismus, kterým WRNIP1 brání nukleolytickému štěpení a udržuje genomovou stabilitu, však dosud nebyl zcela objasněn.

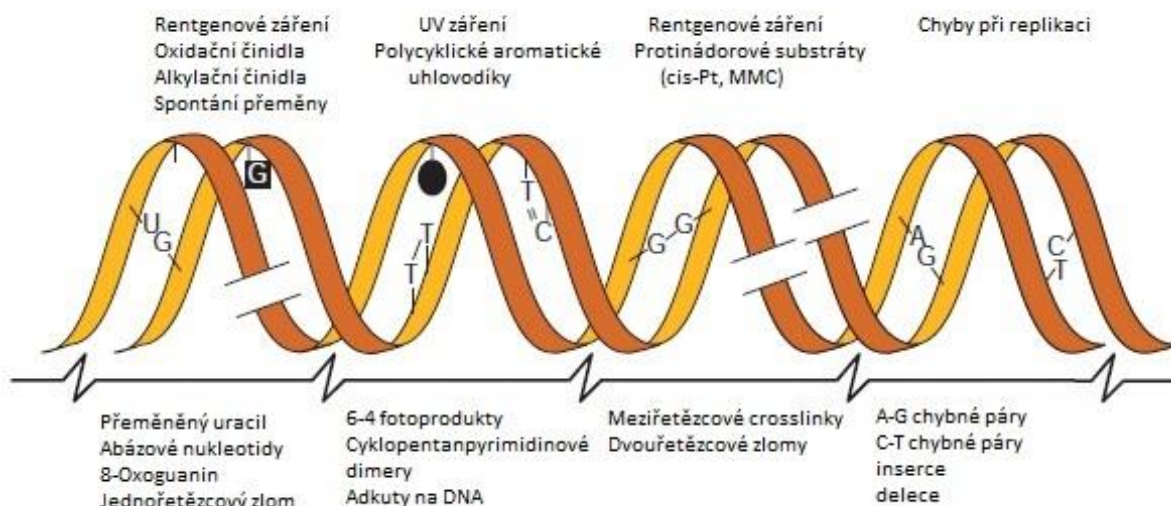
Tato práce se zabývá zkoumáním DNA vazebných preferencí WRNIP1 a jeho interakcí s proteinem RAD51. Pomocí biochemické analýzy se podařilo odhalit funkční význam interakce těchto proteinů. WRNIP1 stimuluje disociaci RAD51 podjednotek z DNA a narušuje jeho nukleoproteinový filament. Tím WRNIP1 umožňuje obnovit syntézu DNA na zastavené replikační vidlici a restart DNA replikace. Předložená práce tedy odhaluje mechanismus, kterým se WRNIP1 může podílet na ochraně před replikačním stresem a na udržování stability genomu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Replikace buněčné DNA

DNA je jakožto nositelka genetické informace nejdůležitější biomolekulou. Je tvořena opakujícími se jednotkami – nukleotidy, které se skládají z báze, cukru a fosfátového zbytku. Těmito bázemi jsou cytosin, guanin, adenin a thymin. Buňky uchovávají svou genetickou informaci ve dvoušroubovici neboli duplexu DNA, kde jsou jednotlivá vlákna spojena vodíkovými můstky. Úseky DNA, které kódují RNA nebo proteiny, se nazývají geny. Tyto úseky jsou přepisovány do RNA, kterou kódují. Pokud se jedná o gen kódující protein, pak je přepsaná RNA ještě překódována do sekvence aminokyselin. Pro buňky je životně důležité vyhnout se případnému poškození těchto úseků DNA. Pokud dojde k poškození genů, mohou buňky vytvořit neúplný, nefunkční, nebo dokonce potenciálně nebezpečný protein, nebo RNA [2].

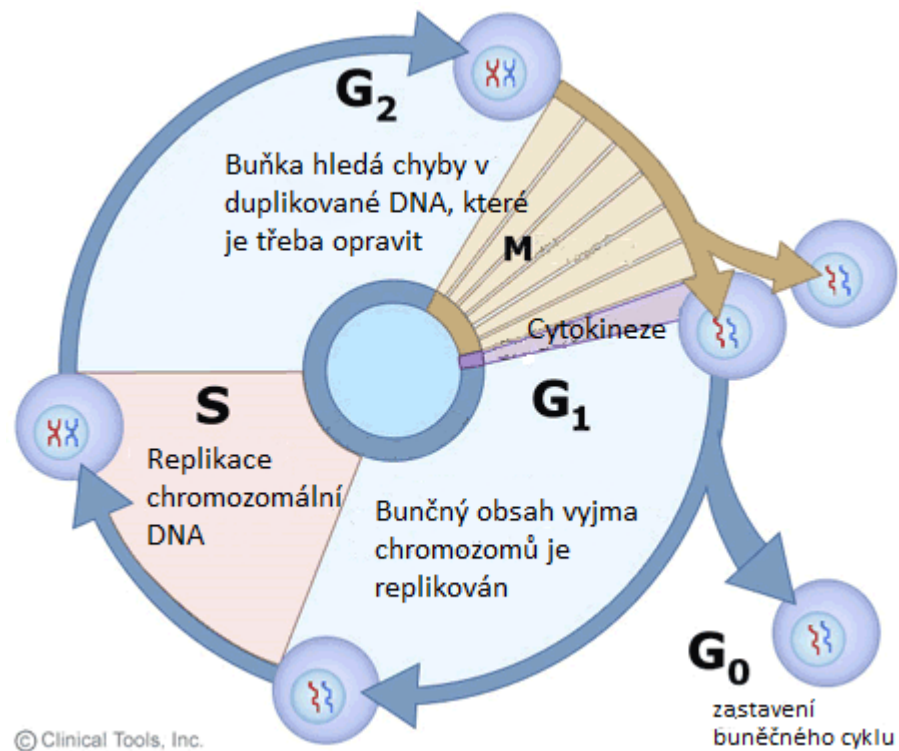
Lidská DNA je neustále vystavována poškozujícím vlivům (obr. 1), které mohou být exogenní, nebo endogenní. Mezi exogenní vlivy patří UV a ionizující záření a genotoxické chemikálie (např. polycyklické aromatické uhlovodíky) a mezi endogenní vlivy řadíme produkty metabolismu, zejména reaktivní formy kyslíku (např. superoxidové anionty). Nicméně během evoluce se vyvinula celá řada DNA opravných drah, které jsou poškozenou DNA schopny opravit [3].



Obr.1: Schéma možných lézí DNA. Převzato a upraveno [3]

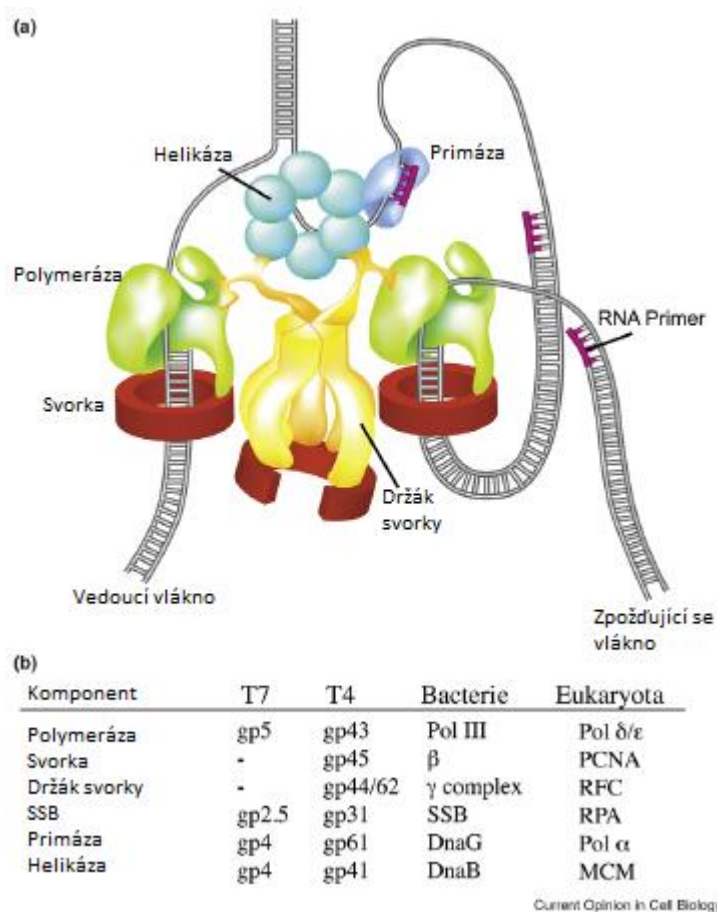
Nejrizikovější je poškození DNA při replikaci. Replikace probíhá během tzv. S-fáze neboli syntetické fáze buněčného cyklu (obr. 2), kterým buňka prochází při každém buněčném dělení [4].

Pro iniciaci replikace je důležitý replikační počátek, jichž je na eukaryotickém chromozomu mnoho. Jedná se o sekvenci bohatou na A-T nukleotidové páry, kterou rozpozná a naváže na sebe komplex iniciačních proteinů. Kvůli vzniklému pnutí se vlákna na replikačním počátku separují. Na ty nasednou helikázy, následované primázami a poté celým replisomem. Tento proces nazýváme vzplanutí replikačního počátku. Vzniklé replikační vidlice se zastavují až tehdy, když dokončí syntézu chromozomu, nebo když se střetnou s jinou replikační vidlicí. Kromě těchto fyziologických jevů může být vidlice zastavena i nečekanými překážkami jako například DNA adukty, či intermediáty opravných drah [4, 5].



Obr. 2: Schéma buněčného cyklu. Převzato a upraveno[6]

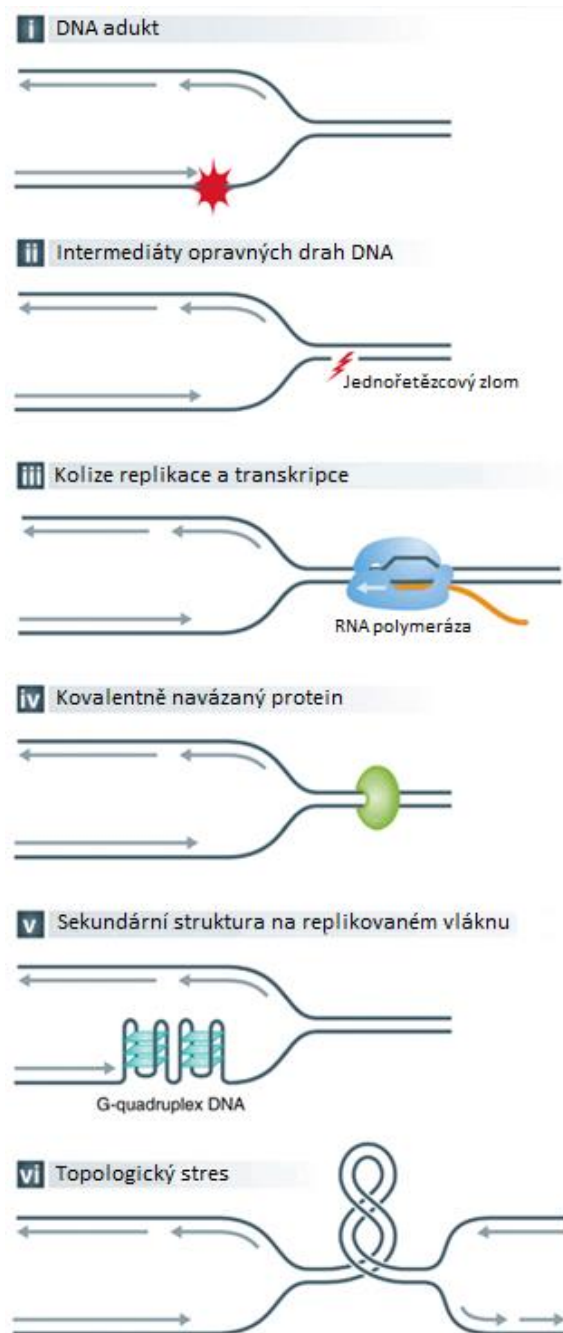
Napříč druhy se liší proteiny, které jsou součástí replisomu, avšak základní struktura a funkce jeho komponent je stejná (obr. 3). Replikační polymerázy stabilizuje na rozhraní jednovláknové DNA (ssDNA) a duplexu svorka a obě svorky drží pohromadě svorkový držák. Helikáza přitom posouvá rozpletenou DNA směrem k polymerázám. Na zpoždujícím se vlákně přitom primáza syntetizuje nové primery pro polymerázu zpoždujícího se vlákna, kterou je u eukaryot polymeráza δ . Protein vázající ssDNA chrání ještě syntetizovanou ssDNA, přičemž nebrání polymeráze v extenzi. Poněvadž replikační polymerázy mají procesivitu ve směru 5'→3', dochází na zpoždujícím se vlákně k vytvoření smyčky, na které jsou syntetizovány Okazakiho fragmenty. Tento jev vyžaduje recyklaci polymerázy. Po dokončení syntézy Okazakiho fragmentu a kolizi polymerázy s předchozím primerem dochází k uvolnění svorky, poté držák naváže novou svorku, která se naváže na následující primer, a polymeráza, jež na ni nasedne, začne znovu syntézu [7].



Obr.3: Struktura replisomu a jeho komponenty napříč druhy. Převzato a upraveno[7]

Progrese replikační vidlice může být zpomalena, nebo zastavena jak endogenními, tak exogenními vlivy. Mezi endogenní vlivy patří **topologický stres**, který vzniká při rozplétání DNA duplexu. K topologickému stresu může dojít také tehdy, setkají-li se dvě protichůdné replikační vidlice, ale vzniklý stres je za normálních podmínek uvolněn pomocí topoisomeráz. Další endogenní překážkou může být kolize **transkripční a replikační mašinerie**. Tuto překážku řeší RNA nukleázy nebo RNA helikázy. Mezi další problémy, které mohou způsobit zastavení replikační vidlice a případně její kolaps, řadíme sekundární DNA struktury (např. G4-kvadruplexy). Největším problémem je poškozená **DNA, kovalentně navázané proteiny na DNA, meziproducty DNA opravných drah**, kterými jsou zlomy řetězců DNA a **DNA adukty**, tedy pozměněné báze, či nukleotidy. Tyto překážky mohou být vytvořeny UV či ionizujícím zářením, polycyklickými aromatickými uhlovodíky, oxidanty nebo produkty metabolismu buňky[5, 8, 9].

Kromě těchto fyzických překážek replikace DNA může dojít ke zpomalení replikační vidlice **deplecí buněčných deoxynukleosid trifosfátů (dNTPs)**. Ty jsou stavebními jednotkami pro tvorbu nových vláken DNA. Nedostatek dNTPs může způsobit zastavení progresu replikační vidlice, případně i její kolaps. Pokud nedosyntetizovaný chromozom přetrvává do M fáze buněčného cyklu, může představovat překážku pro segregaci sesterských chromatid. Mezi látky způsobující depleci dNTPs patří například hydroxyurea (HU), která inhibuje produkci dNTPs [5, 10].



Obr. 4: Shrnutí překážek progresu replikační vidlice. Převzato a upraveno [5]

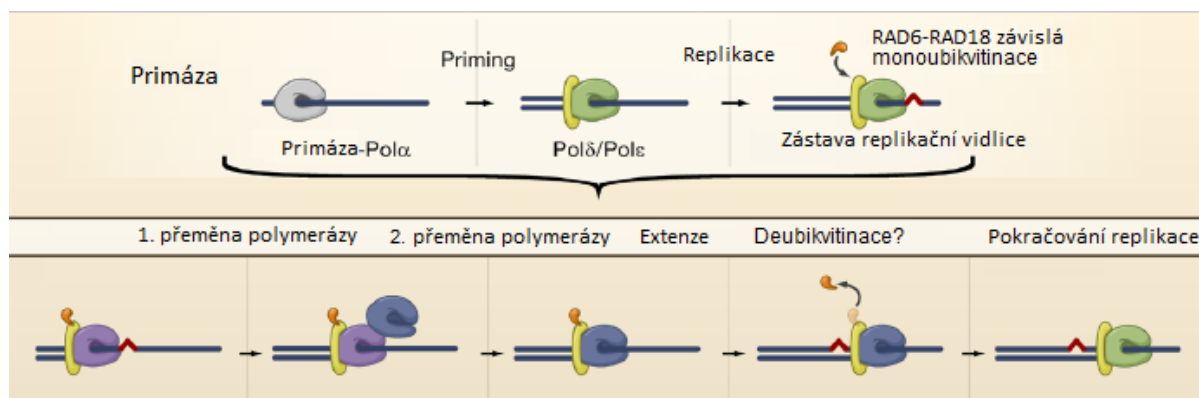
1.2 Odpověď organismu na replikační stres

Replikační stres je definován jako přechodné zpomalení nebo zastavení replikační vidlice jako odpověď na překážky v její progresi. Pokud se poškození DNA vyskytne na zpoždujícím se vlákně replikační vidlice, může dojít k obejití, kdy zůstane část Okazakiho fragmentu nesyntetizovaná, nicméně syntéza dalšího již pokračuje standardně. V genomu tak zůstane na zpoždujícím se se vlákně region ssDNA o velikosti menší než 400 bází. Poškození je následně opraveno a chybějící DNA je syntetizována postreplikačně. Avšak vyskytne-li se poškození na vedoucím vlákně, představuje absolutní blok, při kterém dochází k zástavě postupu replikační vidlice [11].

Zastavení replikační vidlice může aktivovat nové replikační počátky, které jsou u eukaryot tzv. spící a umožní dokončení replikace z opačné strany. V regionech, kde tyto spící počátky chybí, je však potřeba zastavené vidlice restartovat, jinak dochází k nedokončení replikace DNA a k ohrožení genomické stability buněk [12].

Prvním způsobem odpovědi na replikační stres je **translézní syntéza**. Při té je na zastaveném replisomu replikační polymeráza ϵ vyměněna za tzv. translézní polymerázu. Tyto polymerázy se vyznačují tím, že v místě poškození dokáží inkorporovat správnou nebo špatnou bázi naproti poškozenému nukleotidu, a tím lézi překlenout. Buňky si vyvinuly tento mechanismus proto, aby nedocházelo k dlouhým časovým úsekům, během nichž by byla replikační vidlice zastavena, což by mohlo vést k jejímu kolapsu, a to i za cenu vzniku mutací v genomu. Klíčovou úlohu v této dráze má PCNA (z angl. proliferating cell nuclear antigen), jenž je eukaryotickou svorkou, která je na DNA navázána RFC komplexem a interaguje s ním přes konzervovaný motiv zvaný PIP (PCNA interacting protein) box. PCNA je při kontaktu s poškozením kovalentně modifikována připojením signálního proteinu ubikvitinu na konzervovaný lysin 164. Tato monoubikvitinace má za následek disociaci replikační polymerázy a navázání translézní polymerázy.

Translézní polymerázy η , ι a Rev1 mohou být samy o sobě monoubikvitinovány; tato modifikace může buď indukovat jejich výměnu za jinou translézní polymerázu, kdy jedna polymeráza vloží nukleotid naproti poškození a druhá nasyntetizuje několik nukleotidů za ní, anebo může monoubikvitinace zablokovat interakci polymerázy s monoubikvitinovaným PCNA a indukovat tím její disociaci [13].



Obr. 5: Schéma Translézní syntézy. Převzato a upraveno [13]

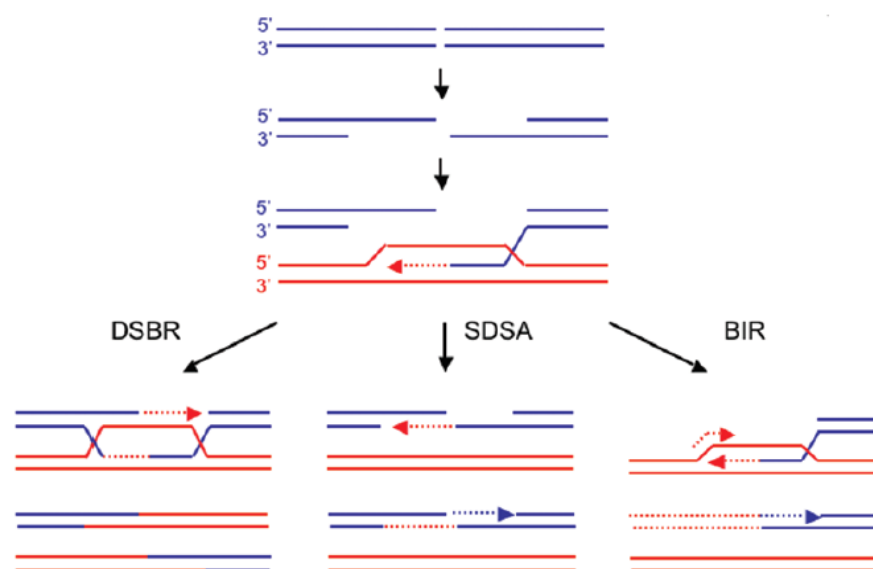
Pokud je zastavena replikační polymeráza, dochází k ubikvitinaci PCNA, výměně za translézních polymerázy, extenzi za lézi, možné deubikvitinaci, výměně translézní polymerázy zpět za replikační a pokračování v extenzi.

Na TLS může mít vliv i konjugace SUMO (small ubiquitin-like modifier) peptidu, který podobně jako ubikvitin modifikuje lysin 164. V kvasinkách tato modifikace rekrutuje Srs2 helikázu, která je antagonistou Rad51-dependentní homologní rekombinaci (HR). Tím je dosaženo opravení klasických a replikačně-asociovaných DSBs pomocí mechanismů nezávislých na HR [14].

Druhým způsobem, jak se buňky mohou vypořádat se zastavením replikační vidlice je **repriming**. Klíčovým enzymem pro repriming je PrimPol (z angl. primase/polymerase), který obnovuje syntézu DNA za poškozením. Tato dráha za sebou nechává mezeru s poškozením, která musí být dosyntetizována po replikaci. Tím nedochází ke zpomalení replikační vidlice, ale ke vzniku nadměrného množství ssDNA mezer, jež může vést k chromozomálním aberacím [13, 15].

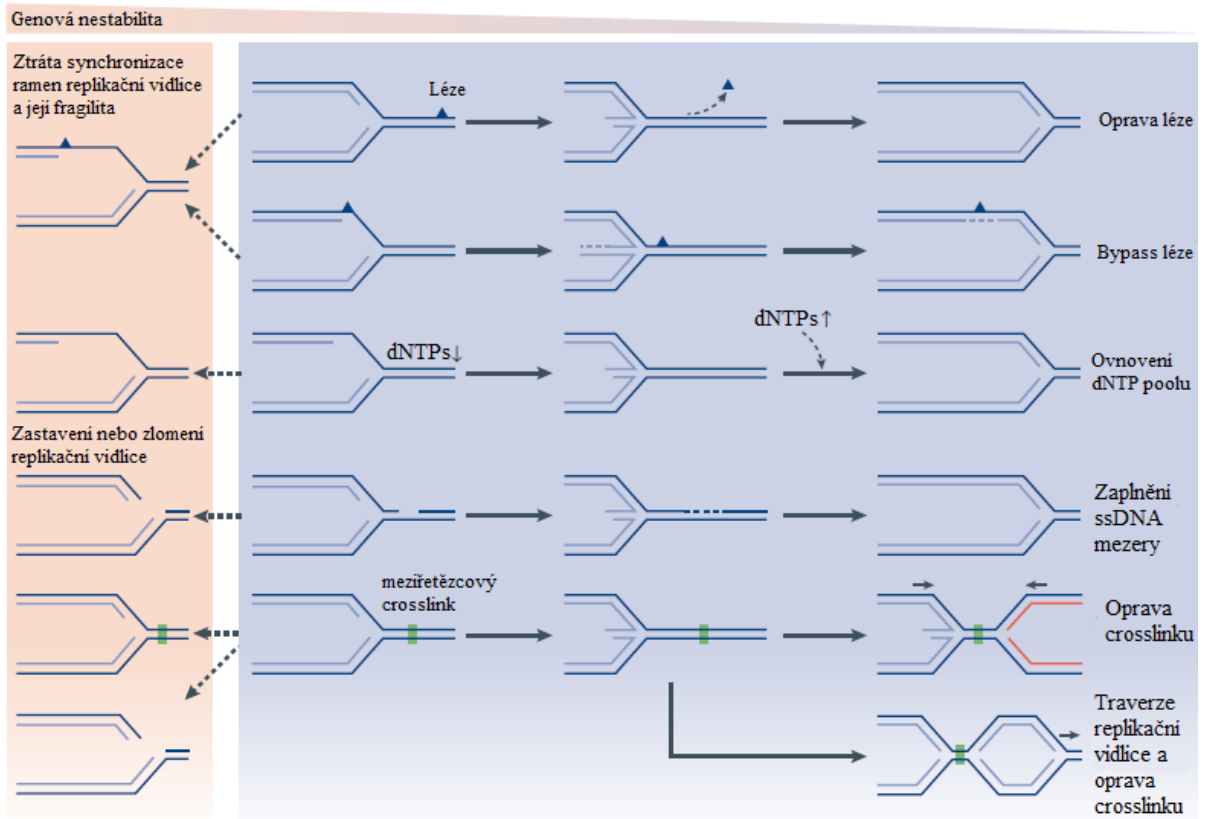
Vzniklá jednořetězcová mezera může být následně opravena buď translézní syntézou, jejíž průběh je stejný jako při zastavení replikační vidlice (viz výše), nebo může být mezera alternativně opravena výměnou templátu (TS). Ta je indukována polyubikvitinací, při níž je PCNA kovalentně modifikována řetězem složeným z několika spojených jednotek ubikvitinu. Za tuto modifikaci jsou odpovědné proteiny RAD6, RAD18 a na rozdíl od TLS také UBC13 a MMS2 a SHRP nebo HLTF. Polyubikvitinovaná PCNA pak stimuluje opravu chybějícího úseku pomocí HR, při níž se na zablokovaném vznikajícím vlákně nebo na paretálním řetězci utvoří RAD51 vlákno, které vyhledá homologii na sesterské chromatidě, a podle níž je následně syntetizován chybějící úsek pomocí DSBR (z angl. double-strand break repair) nebo SDSA (z angl. synthesis-dependent strand annealing) (obr. 6) [12, 16].

Třetím způsobem odpovědi na replikační stres je **replikace indukovaná zlomem (BIR, z angl. break-induced replication)**. Dochází k němu tehdy, když se na vedoucím vlákně replikační vidlice vyskytne jednořetězcový zlom, který přetrvává až do srážky s replikační mašinérií, čímž dojde ke vzniku jednostranného dvouřetězcového zlomu (DSB, z angl. double-strand break). Může k němu dojít také zlomením vidlice při delší prodlevě před restartem vidlice, nebo pokud se restartu nepodaří dosáhnout jinou dráhou odpovědi na replikační stres. BIR je jednou z variací homologní rekombinace, při níž je 5' konec nukleoliticky degradován, a RAD51 vytvoří na 3' převisu pravotočivý presynaptický filament, který vyhledá homologii na sesterské chromatidě, vytvoří se D-smyčka a dochází k extenzi obou vláken užívajících D-smyčku, jež se pohybuje spolu s replisomem, jako templát. Tímto způsobem může být replikován celý zbytek chromozomu. Na rozdíl od jiné variace homologní rekombinace, jež se nazývá spojování vláken závislé na syntéze (SDSA, z angl. synthesis-dependent strand annealing), využívá BIR syntézu vedoucího i zpozd'ujícího se ramene, zatímco SDSA využívá pouze syntézu ramene vedoucího (obr. 6). Stejně jako u ostatních variací homologní rekombinace dochází ke ztrátě heterozygosity, pokud je organismus polymorfní a pokud proběhne mezi sesterskými alelami. Kolaps a zlomení replikační vidlice je hlavním zdrojem genomové nestability vedoucí ke karcinogenezi. Proto buňky přednostně volí ostatní dráhy restartu vidlice. [11, 17, 18].



Obr. 6: Schéma replikace indukované zlomem (BIR) v porovnání s ostatními variacemi HR. Převzato [17]

Poslední a nejdynamičtější odpovědí na replikační stres je **reverze replikační vidlice**. Pohled na tuto dráhu se v průběhu let výrazně změnil. Dříve se uvažovalo, že se jedná o patologický důsledek zastavení replikace. Nyní se na reverzi replikační vidlice nahlíží jako na univerzální odpověď organismu na všechny druhy replikačního stresu, při níž dává přechodná regrese replikační vidlice buňkám prostor k řešení problému. Všechna poškození a vliv reverze zastavené replikační vidlice jsou přehledně shrnuta na obr. 7 [19–21].



Obr. 7: Shrnutí vlivu reverze replikační vidlice na jednotlivé druhy replikačního stresu. Převzato a upraveno [20]

Proces reverze replikační vidlice se skládá z odvíjení dceřiných vláken DNA, spojení mateřských vláken a spojení dceřiných vláken, které formují regresované rameno (Obr. 8) [20].

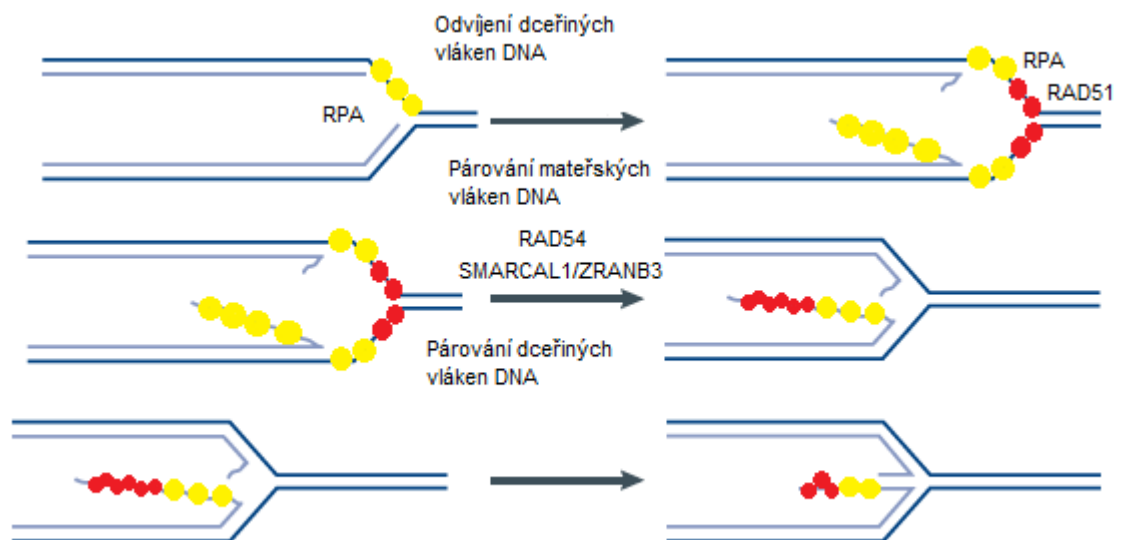
Replikační vidlice může revertovat pomocí několika mechanismů. Při zastavení replikační vidlice dochází nejprve k částečnému nahrazení RPA, který váže ssDNA mezeru na vedoucím rameni replikační vidlice, rekombinázou RAD51, která katalyzuje nasedání mateřských vláken replikační vidlice [22]. RAD51 může v procesu reverze kooperovat s translokázou RAD54 [23].

Dalším proteinem katalyzujícím reverzi je SMARCAL1, který páruje mateřská vlákna v krocích po zhruba 15 bázích, přičemž mezi jednotlivými kroky dochází k pauzám. Kromě toho má schopnost po odstranění příčiny replikačního stresu katalyzovat obnovení normální replikační vidlice [24]. Aby nedocházelo k extenzivní reverzi, která vede ke kolapsu replikační vidlice, je aktivita SMARCAL1 regulována fosforylací [25]. Důležitost stabilizace replikační vidlice je zdůrazněna tím, že mutace v SMARCAL1 způsobuje Schimkeho imunodeficienci - onemocnění, charakterizované slabým imunitním systémem, malým vzrůstem v důsledku zplstňování kostí a selháním ledvin [26, 27].

Stejně jako SMARCAL1 dokáže i ZRANB3 katalyzovat jak regresi zastavené replikační vidlice, tak její obnovení, avšak vykazuje odlišnou substrátovou preferenci [24]. Navíc má ZRANB3 ATP-dependentní endonukleázovou aktivitu s preferencí k DNA duplexům s rozvětvenými konci, které napodobují replikační vidlice s mezerou na jednom z ramen [28]. Revertovanou replikační vidlici může restartovat i helikáza RECQ1. Na rozdíl od SMARCAL1 a ZRANB3 ale nedokáže katalyzovat její reverzi [29].

Dalším proteinem, který dokáže revertovat replikační vidlici je HLTF[30]. Kromě toho je jedním ze dvou sekvenčních i funkčních homologů RAD5, který funguje jako E3 ligáza a je klíčový pro polyubikvitinaci rezidua K164 PCNA[31]. Jak spolu tyto dvě funkce souvisí při záchraně zastavených replikačních vidlic není prozatím jasné.

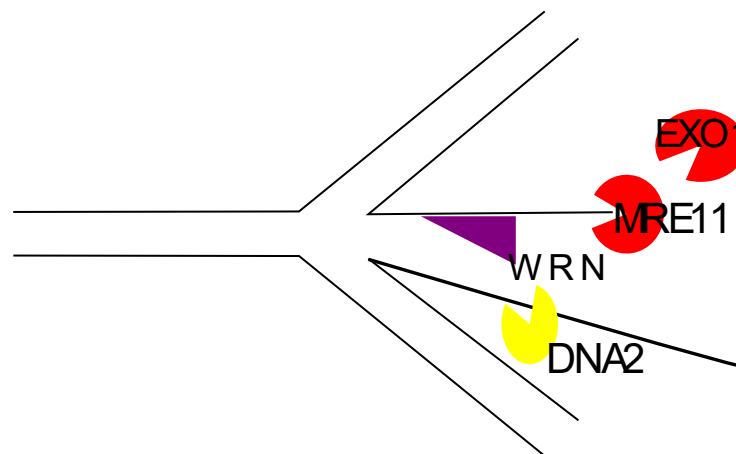
Další helikázou, která dokáže revertovat zastavenou replikační vidlici, je FBH1 (F-box DNA helikáza 1) [32]. Zároveň je díky svému F-boxu součástí SCF proteinového komplexu, ve kterém dokáže ubikvitinovat RAD51 a přispívat k jeho disociaci z DNA. Tím může buňky chránit před hyper-rekombinací a důsledky špatně navázaných RAD51 nukleoproteinových vláken [33]. I samotná FBH1 může být ubikvitinována a tato modifikace vyřadí její interakci s RAD51. FBH1 je zároveň schopna odvíjet dceřiné zpoždující se vlákno DNA u zastavené replikační vidlice a tato funkce není ubikvitinací nijak ovlivněna [34].



Obr. 8: Proces reverze zastavené replikační vidlice. Převzato a upraveno [20]

Poslední výzkumy ukazují, že translokázy SMARCAL1, ZRANB2 a HLTF reverzí replikační vidlice vytvářejí vhodný substrát pro MRE11 nukleolytickou degradaci. (obr. 9) [35]. Stejně tak i EXO1 degraduje zastavené replikační vidlice a spolupracuje s MRE11 [36, 37]. Předpokládá se, že MRE11 iniciuje resekci nově vzniklé DNA a až poté se na ni může navázat EXO1, která pokračuje v extenzivní resekci DNA [38].

Nukleáza DNA2 dokáže též degradovat nově vzniklé vlákno DNA. Na rozdíl od výše zmíněných nukleáz má 5'→3' procesivitu a degraduje tedy nově vzniklé zpoždující se vlákno revertované replikační vidlice. K tomu jí napomáhá helikáza WRN, která rozplétá duplex regresovaného ramene [39].



Obr. 9: Schéma nukleolytické degradace revertované replikační vidlice

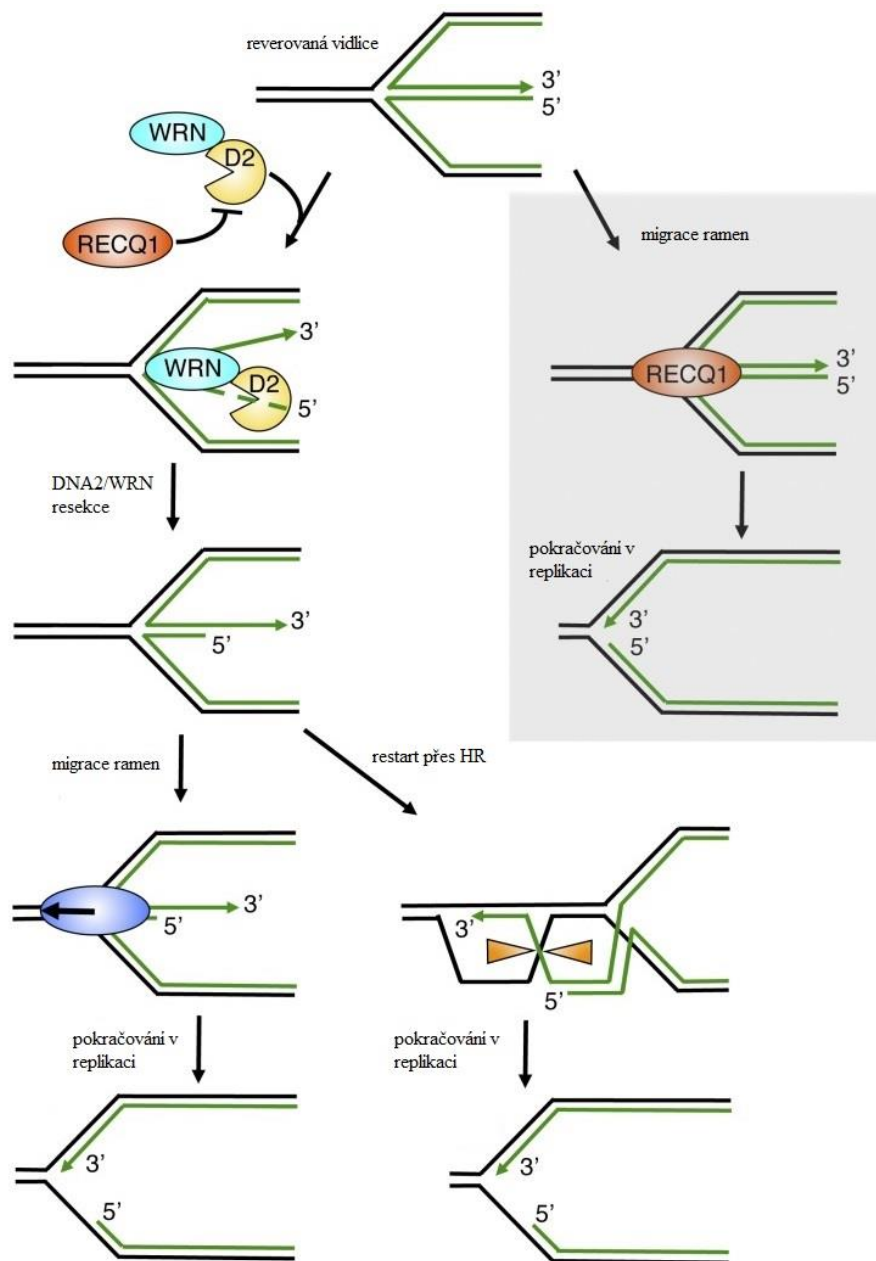
Degradaci revertované vidlice brání vytvoření RAD51 vlákna, avšak samotná RAD51 nedokáže poskytnout replikačním vidlicím dostatečnou ochranu, neboť k vytvoření nukleoproteinového vlákna potřebuje BRCA2, jehož mutace jsou asociovány s rakovinou prsu a vaječníků [37, 40]. Na ochraně vidlice se podílí i RAD51 paralogy (RAD51C a XRCC3), které mají vysokou sekvenční podobnost s RAD51 a stabilizují vzniklé RAD51 vlákno [41]. Dalším protekčním faktorem je komplex FANCI a FAND2, který 5' konec RAD51 filamentu stabilizuje. Navázání na nově vzniklou DNA tohoto komplexu je podmíněno monoubikvitinací jeho podjednotek. Mutace ve FANC genech způsobují Fanconiho anémii, což je dědičné onemocnění projevující se selháním kostní dřeně [42].

Helikázou, která napomáhá nukleolytické degradaci tím, že rozrušuje RAD51 filamenta, je FBH1. Tato funkce zabraňuje v buňkách nechtěné hyperrekombinaci. Na revertované replikační vidlici však tato funkce může mít za následek degradaci a kolaps replikační vidlice [43]. Před tímto scénářem brání buňku kromě výše zmíněných proteinů také nově popsany protein BOD1L, který RAD51 filament po jeho nasednutí stabilizuje a potlačuje helikázovou aktivitu FBH1 a BLM, čímž napomáhá udržení genomové stability [44].

Posledním krokem k zachování genomové stability je restart replikační vidlice po odstranění replikačního stresu. Jedním ze způsobů restartu je **BIR**, k té dochází při endonukleolytickém štěpení MUS81, která se vyskytuje v komplexu s EME1. MUS81 vykazuje silnou preferenci vůči revertovaným vidlicím, u nichž bylo vedoucí vlákno na regresovaném rameni degradováno, a také k zastaveným replikačním vidlicím, u kterých nově vzniklá DNA dosahuje až k místu, ve kterém je na úrovni mateřského vlákna DNA, ale regresované rameno u těchto vidlic chybí, nebo bylo degradováno [45].

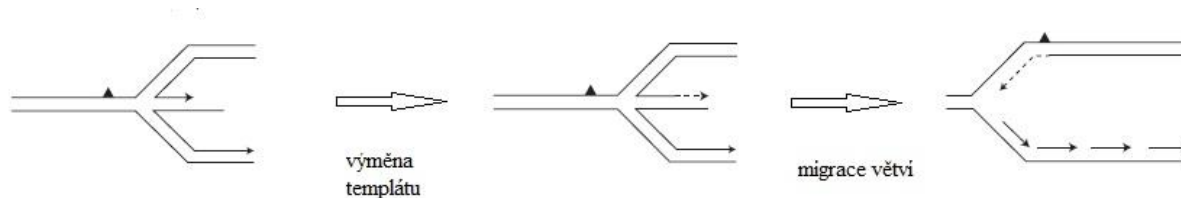
Další způsob restartu je pomocí **HR na replikační vidlici**. V tomto případě dochází ke kontrolované resekcí zpoždujícího se vlákna na regresovaném rameni revertované replikační vidlice proteiny WRN a DNA2 (obr. 10). Extenzivní degradaci přitom brání RECQ1 helikáza, avšak tato funkce není závislá na její helikázové aktivitě. Tímto se vytvoří 3' převis, na který se může navázat RAD51 [39]. RAD51 dokáže vyhledat homologii v duplexu mateřské DNA, tím zanořit řetězce zpátky do parentálních vláken a replikace tak může pokračovat dále [41].

Alternativně může být 3' převis rozpoznán a restartován faktory se schopností migrace ramen [39]. Tímto faktorem by mohl být například zmíněný SMARCAL1, který má schopnost migrací ramen restartovat revertovanou replikační vidlici s delším vedoucím ramenem regresovaného ramene, tedy onoho 3' převisu na regresovaném rameni [24].



Obr. 10: Srovnání DNA2/WRN a RECQ1 restartu replikační vidlice. Převzato a upraveno [39]

Posledním a nejméně popsaným způsobem restartu je **dosyntetizování vedoucího vlákna** na regresovaném rameni podle zpozdujícího se vlákna (obr.11). V tomto případě polymeráza nasedá na volný 3' konec přesahu, který může posloužit jako primer, a syntetizuje chybějící část řetězce. Po restartování vidlice nasedne nově syntetizovaný region zpět na parentální řetězec, a tím překlene lézi [46]. Přesný mechanismus syntézy na revertované vidlici ani regulace jednotlivých drah restartu však dosud nebyly objasněny [11].



Obr. 11: Schéma restartu způsobem výměny templátu. Převzato a upraveno [11]

1.3 WRNIP1

Protein WRNIP1 byl původně popsán v roce 2001 jako interakční partner WRN a pojmenován WHIP (Werner helicase interacting protein) [47].

Bylo zjištěno, že podporuje DNA syntézu částečně stimulací procesivity polymerázy δ , ale především stimulací její iniciační frekvence. Hydrolyza ATP tuto funkci zčásti potlačuje. Toto by bylo možné vysvětlit tím, že WRNIP1 reguluje míru stimulace na koncích DNA, protože konce dvouřetězcové DNA stimulují ATPázovou aktivitu WRNIP1. Zároveň se předpokládá, že WRNIP1 ovlivňuje aktivitu polymerázy δ v komplexu s WRN [48].

WRNIP1 také fyzicky interaguje s lidskou RAD18 a interferuje s komplexem 3' převisu - RAD 18 nebo vidlice - RAD18. Zároveň RAD18 zlepšuje vazbu WRNIP1 na tyto substráty [49]. WRNIP1 váže preferenčně polyubikvitinové řetězce podobným způsobem jako RAD18 pomocí své UBZ domény. Při vystavení buněk ultrafialovému záření typu C (UVC), topotekanu a HU, které způsobují zastavení replikační vidlice, dochází k významnému navýšení proteinu navázaného na chromatin, což indikuje důležitou roli při replikaci. Souhrnně tyto výsledky naznačují, že RAD18 a ubikvitinovaná PCNA specificky rekrutují WRNIP1 na zastavené replikační vidlice [50, 51].

Deplece WRNIP1 významně zvýšila počet zastavených replikačních vidlic a snížila počet restartovaných vidlic při depleci dNTP poolů po vystavení buněk HU. Zároveň díky ní docházelo k nukleolytické degradaci zastavených vidlic. K resekcí zastavených replikačních vidlic dochází jak v buňkách s depletovanou WRNIP1, tak RAD51. Při simultánní depleci nedochází k navýšení resekce, avšak pro ochranu regresovaného ramene je potřebná přítomnost obou proteinů. Z tohoto důvodu dochází k chromozomálním aberacím, genomové nestabilitě a buněčné smrti. Při depleci FBH1 však překvapivě dochází k záchraně vidlice. Při zastavení replikační vidlice v buňkách exprimujících mutantní WRNIP1 T294A defektní při hydrolyze ATP nedocházelo k chromozomálním aberacím tak jako v buňkách, kde byl WRNIP1 depletován. Tuto skutečnost lze vysvětlit tím, že WRNIP1 stabilizuje RAD51 filament na revertované replikační vidlici proti MRE11 exonukleolytickému štěpení [1].

Defekt v aktivitě WRN proteinu je asociován s dědičným onemocněním zvaným Wernerův syndrom, který je charakterizován předčasným stárnutím a zvýšenou senzitivitou vůči methyl-methansulfonátu (MMS), což je chemikálie způsobující poškození DNA. Buňky exprimující defektní kvasinkový homolog WRN, Sgs1, a zároveň defektní kvasinkový homolog Mgs1 vykazovaly zvýšenou úmrtnost, ale oproti buňkám s Wernerovým syndromem zmírněnou senzitivitu vůči MMS [47]. Další studie tohoto double mutanta ukázaly, že v buňkách dochází k zastavení buněčného cyklu v G2 fázi a ke zvýšení rekombinace mezi sesterskými chromatidami [52].

Mgs1 je vysoce konzervovaný kvasinkový homolog WRNIP1, který je důležitý pro udržování genomové stability a který může hrát důležitou roli při udržení správné topologie DNA[53]. Mgs1 je synteticky letální s Rad18 při sumoylaci PCNA. To znamená, že pokud je vyřazena dráha obsahující Mgs1 a zároveň dráha obsahující Rad18, která je zodpovědná za monoubikvitinaci PCNA a rekrutování translézních polymeráz, tak dochází k buněčné smrti. Nadměrná exprese Mgs1 v buňkách afektovaných replikačním stresem vede k inhibici Rad18 dependentní TLS [54].

Všechny tyto výzkumy naznačují, že WRNIP1/Mgs1 je součástí dosud nezmapované opravné dráhy, která při zastavení progresu replikační vidlice potlačuje příčinu replikačního stresu a restartuje zastavené replikační vidlice. Lze očekávat, že tato dráha je nezávislá na translézní syntéze a homologní rekombinaci a že je buňkami oproti těmto dvěma drahám preferovaná.

2 CÍLE PRÁCE

Replikační stres může způsobit zastavení replikační vidlice a nekompletní chromozomy mohou přetrvat až do mitotické fáze buněčného cyklu. Následkem replikačního stresu může být nukleolytická degradace replikační vidlice, chromozomální aberace, ztráta genomové stability a tím i vznik nádorových onemocnění.

Navzdory důležitosti proteinu WRNIP1 při zachování genomové stability a ochraně buněk před extenzivním replikačním stresem zůstává jeho úloha při DNA replikaci a odpovědi na replikační stres stále nejasná.

Tato práce si proto klade za cíl odhalit za pomoci biochemických metod, jakým mechanismem se protein WRNIP1 podílí na stabilizaci a restartu zastavené replikační vidlice, na ochraně před replikačním stresem a na udržování genomové stability buněk.

K dosažení tohoto cíle bylo zapotřebí:

- exprimovat a purifikovat WRNIP1,
- charakterizovat vazby proteinu WRNIP1 na DNA a zjistit jeho preferenci vůči fyziologickým DNA substrátům,
- ověřit interakci WRNIP1 s hlavní lidskou rekombinázou RAD51 a charakterizovat její vliv,
- testovat vliv WRNIP1 na aktivitu DNA polymerázy.

3 METODY A MATERIÁLY

3.1 Materiály

Chemikálie

Aplichem	akrylamid 4K, ampicillin (sodná sůl), aprotinin, bis-akrylamid, bromfenolová modř, Coomassie Brilliant Blue R-250dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄), dithiotreitol (DTT), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), ethanol, fenylmethansulfonylfluorid (PMSF), formamid, glutaraldehyd, glycerol, chlorid draselný, chlorid hořečnatý, chlorid manganatý tetrahydrát, chlorid sodný, chlorid vápenatý dihydrát, chymostatin, Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG), kyselina boritá, kyselina octová, leupeptin, methanol, β-merkptoethanol (β-ME), Nonidet P40 (NP40), Orange G, pepstatin, peroxodisíran amonný (APS), proteinasa K, síran amonný, N,N,N',N' – tetramethylethylendiamin (TEMED), Tris, Tris-HCl, Tris-ultračistý, kvasinkový extrakt, trypton
Fermentas	deoxyadenosintrifosfát (dATP), deoxycytidintrifosfát (dCTP), deoxyguanosintrifosfát (dGTP), deoxythymidintrifosfát (dTTP)
Fluka	Agar
GE Healthcare	glutathion-sefaróza, HAP (5 ml), MonoQ (1ml), Q Sepharose Fast Flow
Thermofisher	žebřík Pierce™ Unstained Protein MW Marker o rozsahu 14.4 – 116 kDa
Serva	agaróza, dodecylsíran sodný (SDS)
Sigma-Aldrich	ampicillin (sodná sůl) (AMP), chloramfenikol (CAM), chymostatin, močovina bioultra pro molekulární biologii, hovězí sérový albumin (bovine serum albumin – BSA), glutaraldehyd

Pufry a roztoky

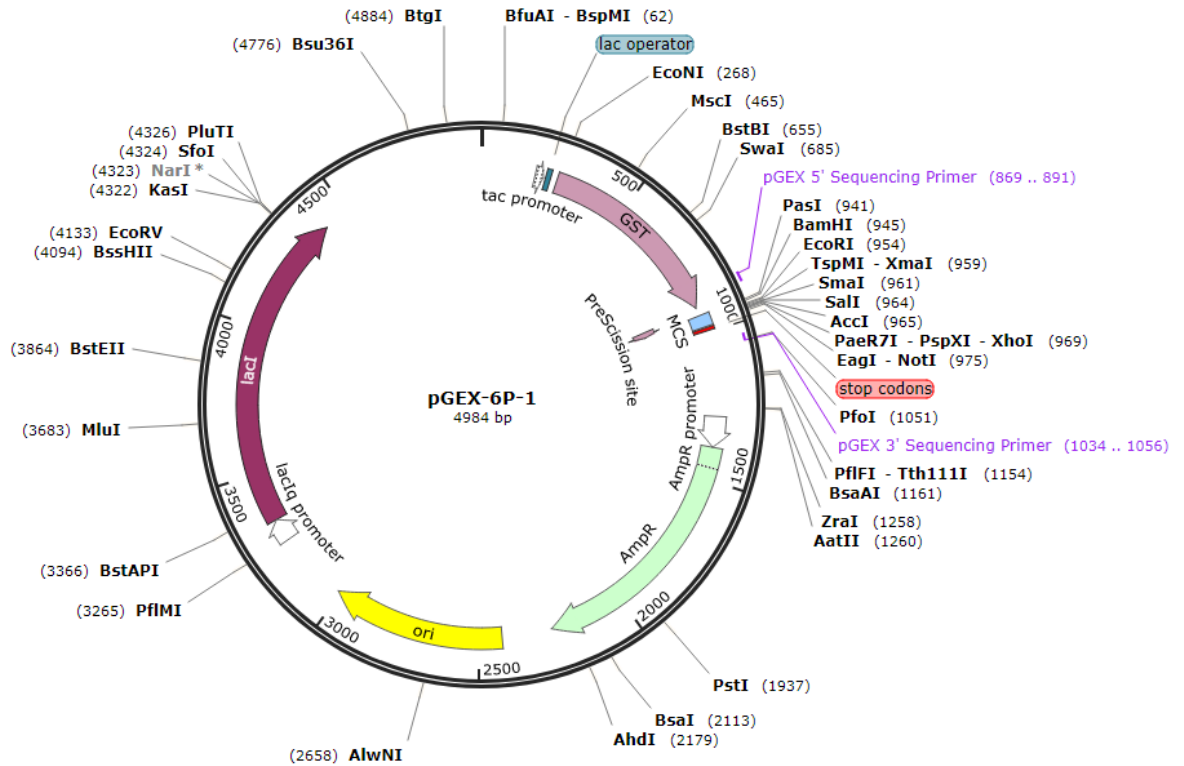
30% akrylamid	30% akrylamid, 0,8% bis-akrylamid
rozbíjecí pufr CBB (cell breakage buffer)	100 mM Tris-HCl, 20% sacharóza, 4 mM EDTA, pH 7,5

barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue	40% methanol, 20% kyselina octová, 0,32% Coomassie Brilliant Blue
6x DNA nanášecí pufr (6x LB)	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,12% Orange G, 60% glycerol, 60 mM EDTA
2x denaturační pufr	99,5% formamid, 0,004% bromfenolová modř
1M HAP pufr	1 M KH ₂ PO ₄ , 25 mM Tris-HCl, 8,7% glycerol, 0,5 mM EDTA, pH 7,4
2x K pufr	40 mM K ₂ HPO ₄ , 20% glycerol, 1 mM EDTA, pH 7.5
odbarvovací pufr	40% methanol, 20% kyselina octová
2x SDS Laemmliho pufr	125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 10% β-ME, 20% glycerol, 0,004% bromfenolová modř
směs proteázových inhibitorů (4x PI)	5 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml chymostatin, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml pepstatin A
směs dNTPs	10 µM dATP, 10 µM dCTP, 10 µM dGTP, 10 µM dTTP
2x T pufr	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 20% glycerol, 1 mM EDTA, pH 7,5
10x TAE	900 mM Tris-ultračistý, 90 mM kyselina octová, 2mM EDTA, pH 8
10x TBE	900 mM Tris-ultračistý, 90 mM kyselina boritá, 2mM EDTA, pH 8
12% rozlišující SDS-polyakrylamidový gel	3M Tris-HCl, 12% akrylamid, 0,1% SDS, 0,09% APS, 0,015% TEMED
3,75% koncentrující SDS-polyakrylamidový gel	0,5M Tris-HCl, 3,75% akrylamid, 0,08% SDS, 0,09% APS, 0,015% TEMED

10% nativní polyakrylamidový gel	1xTBE, 10% akrylamid, 0,15% APS, 0,015% TEMED
12% denaturační polyakrylamidový gel	1xTBE, 12% akrylamid, 0,15% APS, 0,015% TEMED, 6M močovina
0,8% agarózový gel	0,8% agaróza, 1xTAE
5xBB pufr	50mM Tris (pH = 7,5), 50mM KCl, 5mM DTT
DB pufr	1xT, 50 μ M KCl, 0,1% NP40, 1 mM DTT
denaturační směs	0,5%
LB médium	1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl
LB médium (misky)	1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, 2% agar
2x TY médium	2% trypton, 1% kvasničný extrakt, 0,5% NaCl

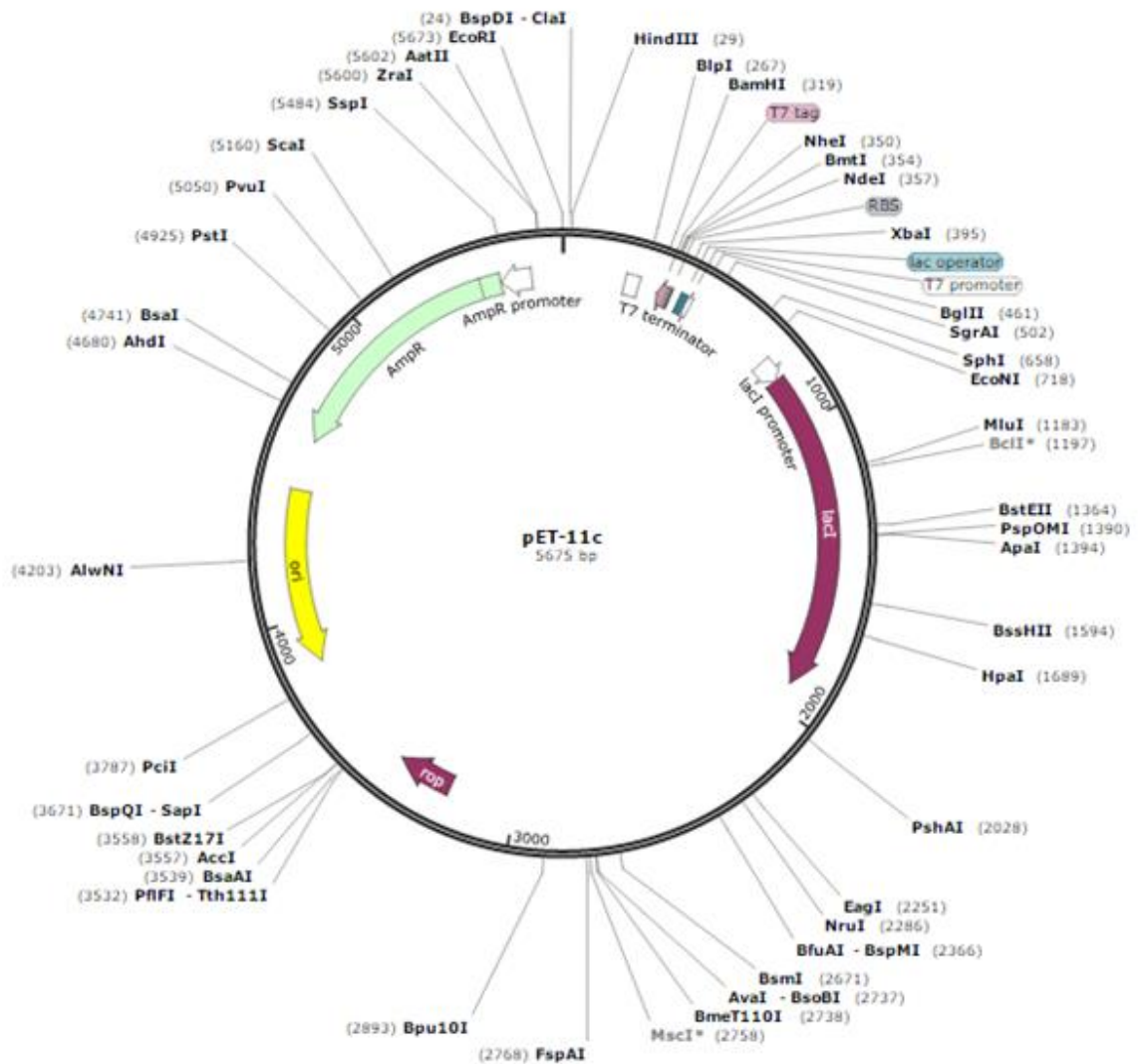
Plasmidy

A) pLK2497 – vektor pGEX-6P-1 nesoucí gen kódující lidský WRNIP1, který byl naší laboratoří poskytnut Dr. Burkowiczem



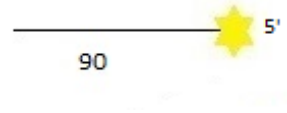

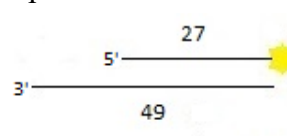
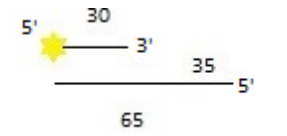
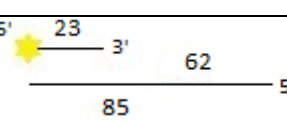
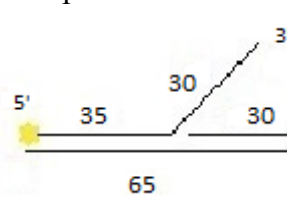
Obr. 12: Mapa expresního vektoru pGEX-6P-1. Převzato z [55]

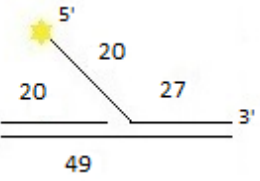
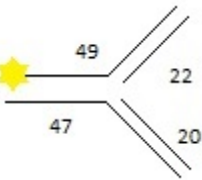
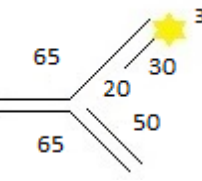
B) pLK986 – vektor pET-11c nesoucí gen kódující lidskou RAD51

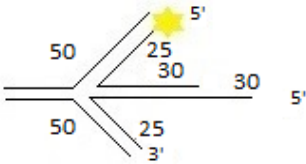


Obr. 13: Mapa expresního vektoru pET-11c. Převzato z [56]

Oligonukleotidy a DNA substráty

Název + nákres	Složeno z	Sekvence 5'→3'	Tvůrce
ssDNA 	pR 231	AAATCAATCTAAAGTATATATG AGTAAACTTGGTCTGACAGTTAC CAATGCTTAATCAGTGAGGCAC CTATCTCAGCGATCTGTCTATTT	Mgr. Veronika Altmannová, Ph. D.
dsDNA 	pR 27	AGCTACCATGCCTGCACGAATT AAGCAATTCG TAATCATGGTCATAGCT	Mgr. Veronika Altmannová, Ph. D.
	pR 28	AGCTATGACCATGATTACGAATT GCTTAATTC GTGCAGGCATGGTAGCT	
3' převis 	pR3023	TGCTTAATTCGTGCAGGCATGGT AGCT	Karina Movsesjan
	pR216	AGCTACCATGCCTGCACGAATT AAGCAATTCGTAATCATGGTCAT AGCT	
5' převis (35) 	pR3109	CAACGTCATAGACGATTACATT GCTACATG	Karina Movsesjan
	pR3110	TGCCGAATTCTACCAGTGCCAGT GATGGACATCTTCATGTAGCAAT GTAATCGTCTATGACGTTG	
	pR3202	GCTTCCTACTTTACTTTATGTTC	Karina Movsesjan
	pR3210	TAAAGGATATAAAGTATTCTGT AAATTATCATGGAGCCTCTGGTT CATCCCGTGT CATATCAGAACAT AAAGTAAAGTAGGAAGC	
3' flap 	pR3268	TGCCGAATTCTACCAGTGCCAGT GATGGACATCTTCATGTAGCAAT GTAATCGTCTATGACGTTG	Karina Movsesjan
	pR3269	GTCCATCACTGGCACTGGTAGA ATTCGGCA	
	pR3270	CAACGTCATAGACGATTACATT GCTACATGAAGATAGCGGACTT TCGGTCAACCACAATTCCCCA	

<p>5' flap</p> 	pR27	AGCTACCATGCCTGCACGAATT AAGCAATTCGTAATCATGGTCAT AGCT	Mgr. María Victoria Marini Palomeque, Ph. D.
pR29	AGCTATGACCATGATTACGAATT GCTTGGAATCCTGACGAACTGT AG		
pR62	CTACAGTTCGTCAGGATTCC		
<p>Replikační vidlice</p> 	pR26	AATTCGTGCAGGCATGGTAGCT	Mgr. María Victoria Marini Palomeque, Ph. D.
pR27	AGCTACCATGCCTGCACGAATT AAGCAATTCGTAATCATGGTCAT AGCT		
pR29	AGCTATGACCATGATTACGAATT GCTTGGAATCCTGACGAACTGT AG		
pR62	CTACAGTTCGTCAGGATTCC		
<p>Replikační vidlice s ssDNA mezerou na vedoucím ramenu</p> 	pR3109	CAACGTCATAGACGATTACATT GCTACATG	Karina Movsesjan
pR3110	TGCCGAATTCTACCAGTGCCAGT GATGGACATC TTCATGTAGCAATGTAATCGTCT ATGACGTTG		
pR3111	CCTTAGTCAGTGTACTTGCTGGA GCTATGACCA TGATTACGAATTGCTTGTGGTAG AATTCGGCA		
pR3112	CAAGCAATTCGTAATCATGGTC ATAGCTCCAG CAAGTACACTGACTAAGG		

Revertovaná replikační vidlice 	pR3073	TGGGTCAACGTGGGCAAAGATGT CCTAGCAATG TAATCGTCTATGACGTT	Karina Movsesjan
	pR3074	TGCCGAATTCTACCAGTGCCAGT GATGGACATC TTTGCCCACGTTGACCC	
	pR3139	CAACGTCATAGACGATTACATTG CTTCATGGA GCTGTCTAGAGGATCCGATCTTC	
	pR3266	AATCAAAGACTCAGAGTTTAGGC GTACAATGT CCTGAAGATCGGATCCTCTAGAC AGCTCCATG ATCACTGGCACTGGTAGAATTCG GCA	

Bakteriální kmeny

<i>Bakteriální kmen</i>	<i>Rezistence</i>	<i>Zdroj</i>
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	-	Novagen
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)-pLysS	CAM	Novagen
<i>E. coli</i> DH5 α	-	Invitrogen

Proteiny

Proteiny WRNIP1 a RAD51 byly purifikovány podle postupu popsáno níže. RAD51 K133R (80 μ M) používaný v práci byl poskytnut Karinou Movsesjan. Taq polymeráza (400 ng/ μ l) byla purifikována Dr. Melitou Chavdarovou. GST (20 μ g/ μ l) byl purifikován Dr. Maríí Victoria Marini Palomeque.

Přístroje

Analytická váha (BOECO Germany)

Centrifugy:

- MiniSpin F-45-12-11 (Eppendorf)
- Spectrafuge 24D (Labnet)
- Rotina 380R (Hettich)
- Rotanta 460R (Hettich)
- AvantiTM J-26-XPI (Beckman Coulter)
- OptimaTM – 100 XP Ultracentrifuge (Beckman Coulter)

FPLC ÄKTA FPLC (GE Healthcare)

Indukční plotýnka CT18/15 (Rommelsbacher Germany)

Inkubované třepačky:

- Thermomixer Confort (Eppendorf)
- Innova 43R (New Brunswick Scientific)
- NB-205 (N-Biotek, KLRD)

Laboratorní předvážky ACB plus-300 (ADAM)

Magnetická míchačka Variomag MONO (ThermoScientific)

Peristaltická pumpa P-1 (Amersham Biosciences)

pH-metr CyberScan 510 PC (ChromServis s.r.o.)

Skenery:

- FLA-9000 Starion (Fujifilm)
- Carestream Gel Logic 212 Pro (Carestream Health)

Sonikátor Ultrasonic Processor UP200S (Hielscher Ultrasound Technology)

Spektrofotometr: S-30 (BOECO Germany)

Termoblok Genius Dry Bath Incubator, MD series (Major Science)

Termostat Miniincubator 230 V (Labnet)

Transiluminátor bílého světla UVP TW-26 (UVP)

Třepačka GLF 3015

Vertikální elektroforetická jednotka SE206 (Hofer)

Zdroj napětí pro elektroforézu:

- Enduro™ 300 (Labnet)
- Consort EV233 (Consort)

Kity

GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich)

Vivaspin® 30 kDa MWCO (GE Healthcare)

Software

SnapGene® Viewer 4.1

Microsoft Office 2016

Unicorn 5.10

Inkscape

Fujifilm Image Reader

Fujifilm Multi Gauge

Carestream Molecular Imaging Software Standard Edition 5.3.2.

Malování (verze 1703)

3.2 Metody

3.2.1 Transformace buněk

Za účelem amplifikace plasmidu pro expresi WRNIP1 proteinu byly ke 100 μ l DH5 α buněk rozmražených na ledu přidány 2 μ l plasmidu pGEX 6P-1 nesoucího gen pro lidský WRNIP1. Směs byla ponechána 20 minut na ledu. Následoval tepelný šok na 42 °C po dobu 90 sekund a směs byla na 2 minuty znovu přenesena na led. Poté byl přidán 1 ml LB média a směs byla inkubována na 1 hodinu v třepačce na 37°C. Buněčná kultura byla poté nanesena na misku s LB médiem s přidavkem 0,1 mg/ml AMP a inkubována na 37 °C přes noc.

Pro proteinovou expresi WRNIP1, byly podle stejného protokolu transformovány buňky BL21(DE3).

Pro proteinovou expresi RAD51 proběhla transformace podle stejného protokolu, ale ke 100 μ l Rosseta(DE3)pLysS buněk rozmražených na ledu byly přidány 2 μ l plasmidu pET-11C nesoucího gen pro lidský RAD51. Poté byla buněčná kultura nanesena na misku s LB médiem s přidavkem 0,1 mg/ml AMP a 0,1 mg/ml CAM a inkubována na 37 °C přes noc.

3.2.2 Kultivace buněk a exprese proteinů WRNIP1 a RAD51

Několik kolonií z transformace BL21(DE3) buněk bylo sterilní špičkou pipety přeneseno do 240 ml LB média s přidavkem 0,1 mg/ml AMP a kultura byla inkubována přes noc na 37 °C v třepačce. Další den byly buňky zaočkovány do 12 l 2xTY média s přidavkem 0,1 mg/ml AMP a inkubovány v třepačce na 37 °C, dokud optická hustota při 600 nm (OD 600) nedosáhla hodnoty 0,7. Poté byl přidán k indukci exprese 1 M IPTG v objemovém poměru 1:1000 a inkubace pokračovala na 16 °C přes noc. Kultura byla centrifugována při 5500 RPM a 4 °C a vzniklý pelet (40 g) byl zamražen při -80°C.

Kultivace buněk Rosetta(DE3)pLysS a exprese proteinu RAD51 probíhala podle stejného protokolu, ale média obsahovala přidavek 0,1 mg/ml AMP a 0,1 mg/ml CAM. Při expresi proteinu byly buňky inkubovány na 37 °C po dobu 3 hodin.

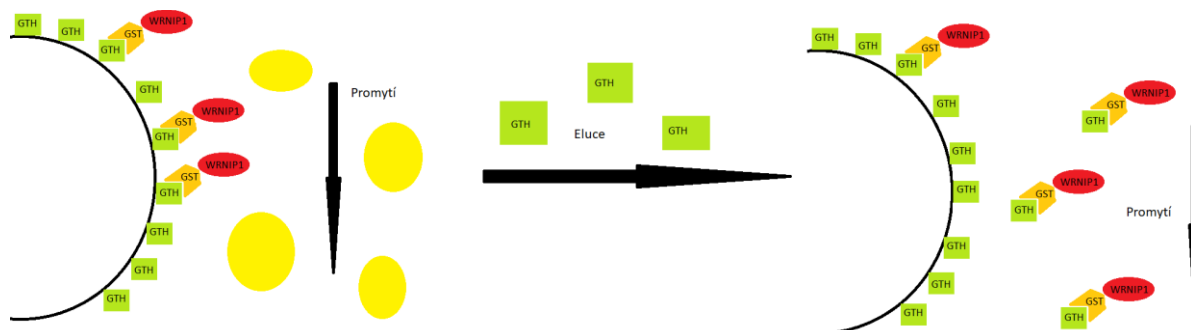
3.2.3 Purifikace WRNIP1

3.2.3.1 Buněčná lýze

Pelet BL21(DE3) s vektorem pGEX 6P-1 nesoucí gen pro WRNIP1 byl rozsuspendován ve 200 ml rozbíjecího pufru (CBB) obsahujícího 1 M KCl, 1 mM PMSF, 200 μ l 4xproteázových inhibitory (4xPI), 0,1% NP40 a 1 mM DTT. Směs byla míchána při 4 °C na magnetické míchačce 20 minut. Buňky byly drženy na ledu a třikrát sonikovány po 10minutových intervalech prokládaných 10minutovými intervaly míchání na magnetické míchačce. Lyzát byl ultracentrifugován při 35 000 RPM při 4 °C. Supernatant byl odebrán a použit pro afinitní kapalinovou chromatografii.

3.2.3.2 Afinitní kapalinová chromatografie

Protein WRNIP1 byl purifikován pomocí afinitní kapalinové chromatografie. Principem této metody je specifická interakce GST tagu s GTH-sefarózou. Během inkubace supernatantu se sefarózou se GST-WRNIP1 naváže na GTH. Po nanesení na kolonu nenavázaný protein proteče a navázaný GST-WRNIP1 se eluuje pomocí pufru s obsahem glutathionu.



Obr. 14: Schéma afinitní kapalinové chromatografie pomocí GTH-sefarózy

Supernatant (200 ml) byl inkubován přes noc na 4 °C s 0,6 ml sefarózové matrice pokryté glutathionem (GTH-sefaróza). Směs byla nanesena na plastovou kolonu s filtrem a následně promyta po malých množstvích pufrům T+600 (1xT; 600 mM KCl; 0,1% NP40; 1 mM DTT) o celkovém objemu 5 ml. Protein byl eluován 2 x 2 ml pufru T+600 s přídatkem GTH (5–100 mM GTH) vždy po malých objemech pro jednu koncentraci GTH. Při nejvyšší koncentraci GTH byla matrice inkubována přes noc na 4 °C a poté následovala eluce. Frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

Frakce obsahující WRNIP1 byla rozdělena do jednotlivých alikvotů o různých objemech, které byly zamrazeny na – 80 °C. Koncentrace byla stanovena pomocí SDS-PAGE vůči titračnímu standardu BSA v množstvích 0,5 μ g, 1 μ g a 2 μ g (obr. 15 C).

3.2.4 Kontrola nukleázové kontaminace WRNIP1

Fluorescenčně značený ssDNA oligonukleotid (10 nM) byl v přítomnosti 1x BB pufru obsahujícího 2 μ M ATP, 2 μ M MgCl₂, 2 μ M CaCl₂ a 2 μ M MnCl₂ inkubován s 1000 nM WRNIP1 na 37 °C po dobu 20 minut. Do kontrolní reakce byl namísto WRNIP1 přidán pufr T + 600 + 100 mM GTH. Poté byly do roztoku přidány 2 μ l směsi 10% SDS a PK (1 : 1) a inkubace pokračovala po dobu 20 minut na 37 °C. Reakce byla analyzována pomocí elektroforézy na nativním polyakrylamidovém gelu (Příloha 1).

3.2.5 Purifikace RAD51

3.2.5.1 Buněčná lýze

Pelet Rosetta(DE3)pLysS s vektorem pET-11C nesoucí gen pro RAD51 byl rozsuspendován ve 200 ml pufru CBB obsahujícího 1M KCl, 1mM PMSF, 200 μ l 4xproteázových inhibitorů (4xPI), 0,1% NP40 a 1mM DTT. Lýze probíhala stejně jako u WRNIP1.

3.2.5.2 Aminoprecipitace

Ke 200 ml supernatantu bylo za stálého míchání na magnetické míchačce při 4 °C přidáno 0,242 g/ml síranu amonného. Tímto krokem došlo k vysrážení několika proteinů, mezi nimiž je i RAD51. Směs byla 7x centrifugována při 11 000 RPM a 4 °C po 10 minutách a pokaždé byl dekantován a odpipetován supernatant. Po 4. stočení byl pelet zamražen na -80 °C po dobu 1 hodiny pro maximální uvolnění supernatantu.

3.2.5.3 Rychlá proteinová kapalinová chromatografie (FPLC)

Rychlá proteinová kapalinová chromatografie (z angl. fast protein liquid chromatography – FPLC) představuje díky malému průměru stacionárních fází ideální způsob separace proteinů. Pro purifikaci RAD51 byly použity iontově-výměnné a afinitní kolony. Při iontově-výměnné chromatografii se na kladně nabitou matici naváží záporně nabité proteiny, které se eluují zvyšujícím se gradientem NaCl. Mezi iontově-výměnné kolony patří Q-SepharoseTM Fast Flow kolona a MonoQ kolona. Afinitní kolona je HAP kolona s hydroxyapatitovou maticí, ze které se navázané proteiny eluují fosfáty.

Pelet z aminoprecipitace byl rozsuspendován ve 400 ml K pufru (1xK + 0,1 % NP40 + 1 mM DTT) a nanesen na Q SepharoseTM Fast Flow kolonu, která byla promyta 350 ml K+100 mM KCl. RAD51 byl poté eluován gradientem 5 – 65 % K + 1000 mM KCl. Frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Frakce, které obsahovaly RAD51, byly spojeny dohromady a naneseny na hydroxyapatitovou kolonu (HAP) o objemu 5 ml, která byla promyta 50 ml T + 100 mM KCl. Protein byl eluován gradientem 10 – 65 % HAP pufru (1xT; 1M dihydroxyfosforečnan draselný; 0,1 % NP40; 1 mM DTT). Frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Frakce obsahující RAD51 byly spojeny dohromady a dialyzovány 1 hodinu proti T + 100 mM KCl. Vzorek byl nanesen na ekvilibrovanou MonoQ kolonu o objemu 1 ml a protein byl eluován gradientem 15 – 65 % T + 100 – 1000 mM KCl. Frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

3.2.6 Koncentrování proteinu RAD51

Frakce z MonoQ obsahující RAD51 byly spojeny dohromady a koncentrovány pomocí Vivaspin® 30 kDa MWCO kitu, propouštějícím proteiny do velikosti 30 kDa (RAD51 má 37 kDa). Protein byl rozdělen do alikvotů a zamražen na -80 °C. Výsledná koncentrace byla stanovena pomocí SDS-PAGE vůči titračnímu standardu BSA v množstvích 0,5 µg, 1 µg a 2 µg (Příloha 2 B).

3.2.7 Izolace plasmidové DNA

Kolonie DH5α obsahující pGEX 6P-1 s WRNIP1 genem byly zaočkovány do 5 ml LB média s přidaným ampicilinem v koncentraci 0,1 mg/ml média a kultura byla inkubována přes noc. Z ní byl purifikován plasmid za pomoci GenEluteTM HP Plasmid Miniprep kitu.

3.2.8 Sekvencování DNA

Sekvence genu pro WRNIP1 ve vektoru pGEX 6P-1 byla analyzována prostřednictvím služby Mix2seq poskytované firmou Eurofins. Výsledky byly zobrazeny v programu SnapGene Viewer.

3.2.9 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza umožňuje rozdělit fluorescenčně značenou DNA, proteiny a protein-DNA komplexy. Vzorky se nanosí do jamek a putují v elektrickém poli od kladného pólu k zápornému. Vzorky putují na základě svého náboje a molekulové hmotnosti nebo v případě SDS-PAGE pouze podle hmotnosti. Elektroforézy byly pouštěny za konstantního napětí, popřípadě výkonu.

3.2.9.1 Elektroforéza na SDS-polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

SDS-PAGE byla využita k separaci proteinů a stanovení jejich koncentrace. Gely se skládaly ze dvou částí: koncentrující (stacking) a rozlišující (resolving). Ve společném základu obou částí je obsažen dodecylsírán sodný (SDS), akrylamid a dH_2O , která doplňuje směs na požadovaný objem. Koncentrující část obsahuje 3,75% akrylamid a rozlišovací část 12% akrylamid. K takovému základu je přidán 15% peroxodisíran amonný (APS), který zajišťuje tuhnutí směsi, což bylo katalyzováno přidáním N,N,N',N'-tetramethylethylen-diaminu (TEMED).

Do vytvořených jamek koncentrující části byly nanесeny vzorky a po zapnutí zdroje došlo ke srovnání celého objemu vzorku do jedné úrovně, tak aby všechny vzorky do rozlišovací části gelu vpuťovaly ve stejné výšce. Vzorky byly před nanесením do jamek zředěny v objemovém poměru 1 : 1 2x Laemmliho pufrem, vařeny po dobu 5 minut a zcentrifugovány. Elektroforéza probíhala při pokojové teplotě za konstantního napětí 215 V po dobu 37 minut. Poté byl gel přenesen do barvicího roztoku Coomassie Brilliant Blue a barvení probíhalo po dobu 5 minut. Poté byl gel přemístěn do odbarvovacího roztoku (Destain) a zůstal zde do doby, než byla vymyta barva, která nebyla navázána na peptidy.

3.2.9.2 Elektroforéza na nativním polyakrylamidovém gelu

Směs pro nativní PAGE gel obsahovala 1xTBE, 13% akrylamid a dH_2O doplňující požadovaný objem směsi. Tuhnutí gelu bylo iniciováno přidáním TEMED k směsi obsahující 15% APS. Vzorky byly před nanесením do jamek zředěny v objemovém poměru 5 : 1 nanášecím pufrem s Orange G. Elektroforéza byla prováděna při 4 °C při konstantním napětí 100 V po dobu 60 minut. Výsledky byly vizualizovány pomocí Fujifilm FLA-9000 skeneru.

3.2.9.3 Elektroforéza na agarózovém gelu

Gel byl připraven rozpuštěním agarózy v 1xTAE v hmotnostním poměru 8 : 1000 a vložením směsi do mikrovlnné trouby na plný výkon, dokud nedošlo ke kompletnímu rozpuštění agarózy. Vzorky byly před nanесením do jamek zředěny v objemovém poměru 5 : 1 nanášecím pufrem s Orange G. Elektroforéza byla prováděna při 4 °C při konstantním napětí 70 V po dobu 50 minut. Výsledky byly vizualizovány pomocí Fujifilm FLA-9000 skeneru.

3.2.9.4 Elektroforéza na denaturačním polyakrylamidovém gelu

Směs pro denaturační gel, na kterém lze vizualizovat jednotlivé fragmenty DNA, obsahovala 12% akrylamid, 1xTBE, 6 M močovinu a dH₂O do požadovaného objemu. Tuhnutí gelu bylo iniciováno přidáním TEMED ke směsi obsahující 15% APS. Vzorky byly před nanesením do jamek zředěny v objemovém poměru 1 : 1 2x denaturačním pufrům (formamid s bromfenolovou modří). Elektroforéza byla prováděna při pokojové teplotě při konstantním výkonu 28 W po dobu 50 minut. Výsledky byly vizualizovány pomocí Fujifilm FLA-9000 skeneru.

3.2.10 Pull-down analýza

Principem této metody byla interakce purifikovaného GST-WRNIP1 s GTH-sefarózou, podobně jako v případě purifikace. RAD51 by poté měla přes svou interakci s WRNIP1 zůstat navázaná na GTH-sefarózu.

20 μ l GTH-sefarózy bylo při 4 °C inkubováno s GST-WRNIP1 (výsledné množství 40 μ mol = 4 μ g) po dobu 20 minut. Jako kontrolní reakce byla inkubována za stejných podmínek GTH-sefaróza s GST (výsledné množství 770 μ mol = 4 μ g). K reakcím bylo přidáno 110 μ mol = 4 μ g RAD51 a inkubace pokračovala při 4 °C po dobu 20 minut. Reakce byly při 4 °C a 13 300 RPM centrifugovány a kapalná frakce byla odebrána (frakce S – supernatant). Pevná frakce byla rozsuspendována v 20 μ l T + 100 mM KCl. Následovala centrifugace při 4 °C a 13 300 RPM a kapalná frakce byla odebrána (frakce W – z angl. wash). Pevná frakce tvoří frakci B (z angl. beads). Jednotlivé frakce byly separovány pomocí SDS-PAGE při pokojové teplotě a konstantním napětí 215 V (obr. 17 A).

3.2.11 EMSA – analýza vazby na DNA

Metoda elektromobilitního posunu využívá faktu, že při elektroforéze putuje samotný DNA substrát rychleji než protein-DNA komplex. Základ reakční směsi tvořil 1xBB pufr, 2 μ M MgCl₂, 2 μ M ATP, 20 nM fluorescenčně značený DNA substrát, jehož schéma je vyznačeno nad konkrétním gelem, a dH₂O, která doplňovala objem do 5 μ l. K tomuto množství byl přidán WRNIP1 ve výsledných koncentracích 250, 500 a 1000 nM. Zásobní koncentrace WRNIP1 byla 2 μ M. Do kontrolní reakce byl namísto 5 μ l WRNIP1 přidán pufr T + 600 mM KCl + 100 mM GTH. Směs byla inkubována na 37 °C po dobu 15 minut. Poté byl do směsi přidán 1 μ l 0,1% glutaraldehydu, který komplex stabilizuje, a inkubace pokračovala 5 minut při 37 °C. Směs byla analyzována pomocí elektroforézy na 0,8% agarózovém gelu (1xTAE; 70 V; 50 min; 4 °C) (obr. 16).

3.2.12 EMSA – vliv WRNIP1 na RAD51

Reakce probíhala za stejných podmínek jako vazba WRNIP1 na DNA s 20 nM fluorescenčně značeným ssDNA oligonukleotidem (90 nt). RAD51 (1 μ l) byl přidán do výsledné koncentrace 1 μ M a směs byla inkubována na 37 °C na 5 minut. V kontrolních reakcích byl místo RAD51 přidáván DB pufr. Poté byl přidán WRNIP1 do výsledné koncentrace 1 μ M a směs byla inkubována při 37 °C na 15 minut. Zásobní koncentrace WRNIP1 byla 2 μ M. Zásobní koncentrace RAD51 byla 10 μ M. Následně byl do směsi přidán 1 μ l 0,1% glutaraldehydu, který komplex stabilizuje, a inkubace pokračovala 5 minut při 37 °C. Směs byla analyzována pomocí elektroforézy na 0,8% agarózovém gelu (1xTAE; 70 V; 50 min; 4 °C) (obr. 17 B).

V případě analýzy vlivu ATP hydrolyzy (obr. 17 C) byl do části reakcí přidán nehydrolyzovatelný analog ATP (AMP-PNP) do výsledné koncentrace 2 μ M. Pro rozlišení vlivu ATP hydrolyzy u obou proteinů (obr. 17 D) byl v části reakcí použit RAD51 K133R mutant, který je schopný vázat ATP, ale není schopný jej hydrolyzovat.

3.2.13 Analýza polymerázové extenze

Základ reakční směsi tvořil 10 mM Tris (pH=7.5), 1 mM DTT, 2 μ M MgCl₂, 2 μ M ATP, 20 nM fluorescenčně značený 5'převís (62 nt), směs dNTPs (1 μ M každý), 1 μ g BSA a dH₂O, která doplňovala objem do 4 μ l. Následně byl přidán 1 μ l RAD51 do výsledné koncentrace 1 μ M, případně DB pufr v kontrolních reakcích a směs byla inkubována při 37 °C po dobu 5 minut. Poté bylo přidáno 5 μ l WRNIP1 o výsledné koncentraci 125, 250, 500 a 1000 nM, případně T+ 600 mM KCl + 100 mM GTH v kontrolní reakci. Následně byl přidán 1 μ l Taq polymerázy a inkubace pokračovala 20 minut při 37° C. Pro zastavení reakce a deproteinizaci bylo přidáno 2.5 μ l směsi SDS a PK (v poměru 1 : 1). Reakce byla analyzována pomocí elektroforézy na denaturačním gelu (obr. 18 B).

4 VÝSLEDKY

Vzhledem k tomu, že dosud nebyla sestavena kompletní mapa proteinu (obr. 15 A) z domén analyzovaných porovnáním sekvencí a publikovaných ve vědeckých časopisech, bylo nutno začít právě jejím sestavením. Sekvenční analýzou provedenou Kawabem byly zjištěny UBZ (ubiquitin binding zinc finger) doména, konzervované motivy Walker A a Walker B, které vážou a hydrolyzují ATP a GTP [57], se nachází na pozicích 270-279, resp. 329-332 a domény Sensor1 a Sensor2, které napomáhají hydrolyze ATP a GTP [58], na pozicích 353-362, resp. 439-447[47]. Dále byly zjištěny 2 leucinové zipy, které zajišťují oligomerizaci proteinu [59] na pozicích 519-533 a 604-655, se kterými pracoval Nomura [60].

4.1 Transformace, exprese a purifikace

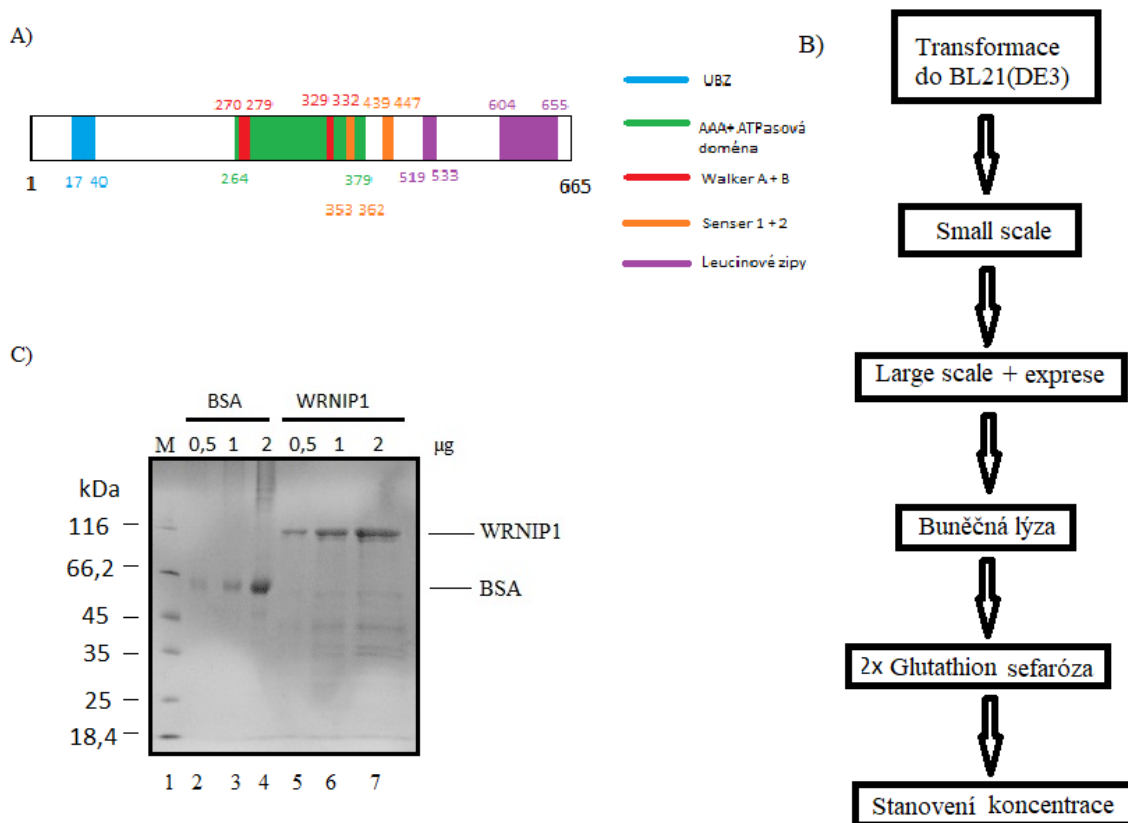
Pro expresi WRNIP1 byl použit expresní vektor obsahující gen pro WRNIP1 jako fúzi s GST. Tento konstrukt byl naší laboratoři poskytnut Dr. Petrem Burkoviczem (Hungarian Academy of Science).

Expresní vektor byl transformován do buněk kmene BL21(DE3), které byly rozprostřeny na misku s LB médiem s přídavkem AMP. Vzniklé kolonie byly zaočkovány do TY a exprese byla indukována 1mM IPTG. Protein purifikovaný za použití GTH sefarózy byl použit pro všechny následující experimenty.

4.1.1 Stanovení koncentrace proteinu

Purifikovaný protein byl analyzován pomocí SDS-PAGE. Ačkoliv má GST-WRNIP1 teoretickou velikost 97,3 kDa, oproti této putuje na gelu ve velikosti odpovídající 116 kDa. To může být způsobeno perzistentními sekundárními strukturami proteinu. Přibližná koncentrace byla stanovena porovnáním WRNIP1 s titračním standardem BSA o známé koncentraci (obr. 14 C).

Koncentrace WRNIP1 byla stanovena 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, čemuž odpovídá 2 μM .



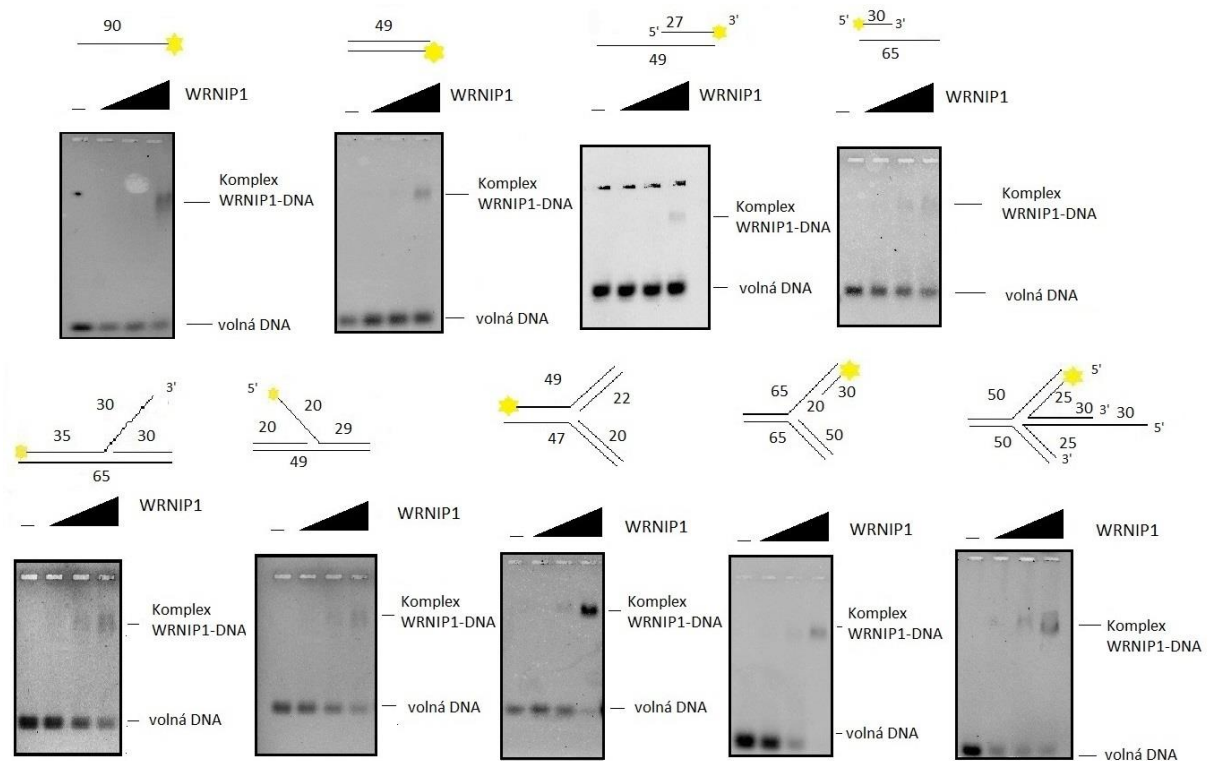
Obr. 15: Mapa a schéma purifikace WRNIP1
 A) Mapa WRNIP1 s vyznačenými funkčními doménami
 B) Schéma purifikace WRNIP1
 C) Porovnání koncentrace WRNIP1 a BSA

4.2 DNA vazebná afinita WRNIP1

Jelikož se WRNIP1 podobně jako jeho kvasinkový homolog Mgs1 váže na DNA [49, 61], jako první byla stanovena DNA vazebná aktivita purifikovaného WRNIP1. Testování DNA vazebné preference může napovědět, při jaké situaci během replikace DNA dochází k vazbě WRNIP1 na DNA. Bylo proto použito několik typů replikačních vidlic, k jejichž vzniku by mohlo dojít při replikaci DNA nebo při odpovědi na replikační stres.

Schopnost proteinu vázat DNA byla analyzována metodou EMSA. Použity byly fluorescenčně značené rozdílné substráty a byly inkubovány s rostoucí koncentrací WRNIP1 v rozsahu 250 – 1000 nM (obr. 15). Zatímco WRNIP1 váže všechny substráty při nejvyšší testované koncentraci 1000 nM, již při nízké koncentraci výrazně vyvazuje především strukturu revertované replikační vidlice, ke které má největší afinitu. Navíc v porovnání se symetrickou replikační vidlicí vykazuje WRNIP1 výrazně větší afinitu ke struktuře replikační vidlice s mezerou na vedoucím rameni.

Tento výsledek tedy zdůrazňuje úlohu WRNIP1 na pozastavené a revertované replikační vidlici, které se často vyskytují při replikačním stresu.



Obr. 16: DNA vazebná afinita proteinu WRNIP1
 Porovnání DNA vazebné aktivity proteinu WRNIP1 v koncentracích 250, 500 a 1000 nM vůči různým fyziologicky se vyskytujícím substrátům pomocí metody elektromobilního posunu.

4.3 Interakce WRNIP1 s RAD51

V lidských buňkách WRNIP1 imunoprecipituje s hlavní lidskou rekombinázou RAD51. Zároveň při depleci WRNIP1 dochází k nukleolytické degradaci zastavených replikačních vidlic. Nicméně při inhibici nebo depleci RAD51 však WRNIP1 nedokáže sám zastavenou replikační vidlici chránit. Z těchto dat by se tedy dalo usuzovat, že WRNIP1 stabilizuje RAD51 na zastavené vidlici [1].

Pro pochopení mechanismu, jakým WRNIP1 přispívá k udržení genomové stability je tedy klíčové analyzovat způsob, jakým interaguje s RAD51, popřípadě jak pozměňuje RAD51 vlákno, které se vytváří na regresovaném rameni revertované replikační vidlice.

4.3.1 Pull down analýza

Pro stanovení interakce WRNIP1 s RAD51 byla využita pull down analýza, při níž dochází k interakci mezi glutathionem (GTH) a GST tagem WRNIP1. Po přidání RAD51 a následném promytí zůstává RAD51 navázaný na kuličkách přes protein, se kterým interaguje.

GST-WRNIP1 (2 μ g) byl inkubován na s GTH kuličkami. Svým GST (glutathion-S-transferázou) tagem se na kuličky kovalentně naváže. Jako kontrolní reakce byla s GTH kuličkami inkubovaná samotná, purifikovaná GST. Poté byla přidána RAD51 (2 μ g) a po inkubaci byly směsi centrifugovány a byl odebrán supernatant (frakce S). Poté byly směsi promyty puřem a byla odebrána frakce W. Samotné kuličky, které zbyly na dně zkumavky, tvoří frakci B. Všechny frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 17 A).

Na gelu je vidět, že v reakci, do které byl přidán WRNIP1, se na GTH kuličky navázala jak část WRNIP1 proteinu, tak i část RAD51 (frakce B). Část WRNIP1 a RAD51 se přitom buď nenavázala, anebo se vymyla (frakce S a W), což je způsobeno tím, že proteinů bylo přidáno víc, než jaká je kapacita matrice. V kontrolní reakci je vidět, že se všechen GST navázal na kuličky, zatímco RAD51 zůstal v supernatantu. Z toho experimentu tedy vyplývá, že za daných podmínek WRNIP1 specificky interaguje s RAD51.

4.3.2 EMSA – interakce WRNIP1 s RAD51

Pomocí EMSA metody monitorujeme schopnost proteinu vázat DNA tím, že protein-DNA komplexy mají větší molekulární hmotnost, a proto putují pomaleji než samotná DNA. Pro zjištění vlivu WRNIP1 na RAD51 vlákno, byl fluorescenčně značený oligonukleotid (2 nM) inkubován s RAD51 (1000 nM) a poté byl přidán WRNIP1 v rostoucích koncentracích v rozsahu 125–1000 nM. Komplexy byly analyzovány na agarózovém gelu (Obr. 17 B).

Je vidět, že vůči komplexu RAD51 (obr. 17 B, jamka 2) dochází po přidání WRNIP1 k destabilizaci RAD51 vlákna. Tento efekt se stupňuje se zvyšující se koncentrací (obr. 17 B, jamky 2 – 5). V nejvyšší koncentraci WRNIP1 je již dokonce vidět jasně definovaný komplex, který odpovídá putování WRNIP1-DNA komplexu při použití stejného oligonukleotidu (obr. 17 B, jamka 6). Je možné, že WRNIP1 zpříčiní odpadávání části RAD51 a na místo, na kterém byl RAD51 navázán, se váže WRNIP1. Zároveň lze tvrdit, že WRNIP1 selektivně disociuje RAD51 z DNA. Pro ověření, zda je WRNIP1 asociovaný s RAD51-DNA komplexem, byla provedena tzv. super shift-EMSA s přidáním monoklonálních protilátek proti WRNIP1. Při titraci protilátek vůči WRNIP1 proteinu nebyl na gelu vidět signifikantní posun (data nezahrnuta). K ověření tohoto vlivu však bude zapotřebí provést další experimenty.

4.3.3 EMSA – vliv ATP hydrolýzy na funkční interakci

Pro odhalení mechanismu, kterým WRNIP1 destabilizuje RAD51 nukleoproteinové vlákno, byl testován vliv ATP hydrolýzy RAD51 proteinu. ATP hraje klíčovou roli při regulaci RAD51 vlákna, jelikož se váže mezi interakční rozhraní jednotlivých RAD51 podjednotek. Pokud dochází k hydrolýze ATP, jsou krajní podjednotky uvolněny a odpadávají tak z DNA. WRNIP1 by tedy mohl destabilizovat RAD51 vlákno právě stimulací ATP hydrolýzy.

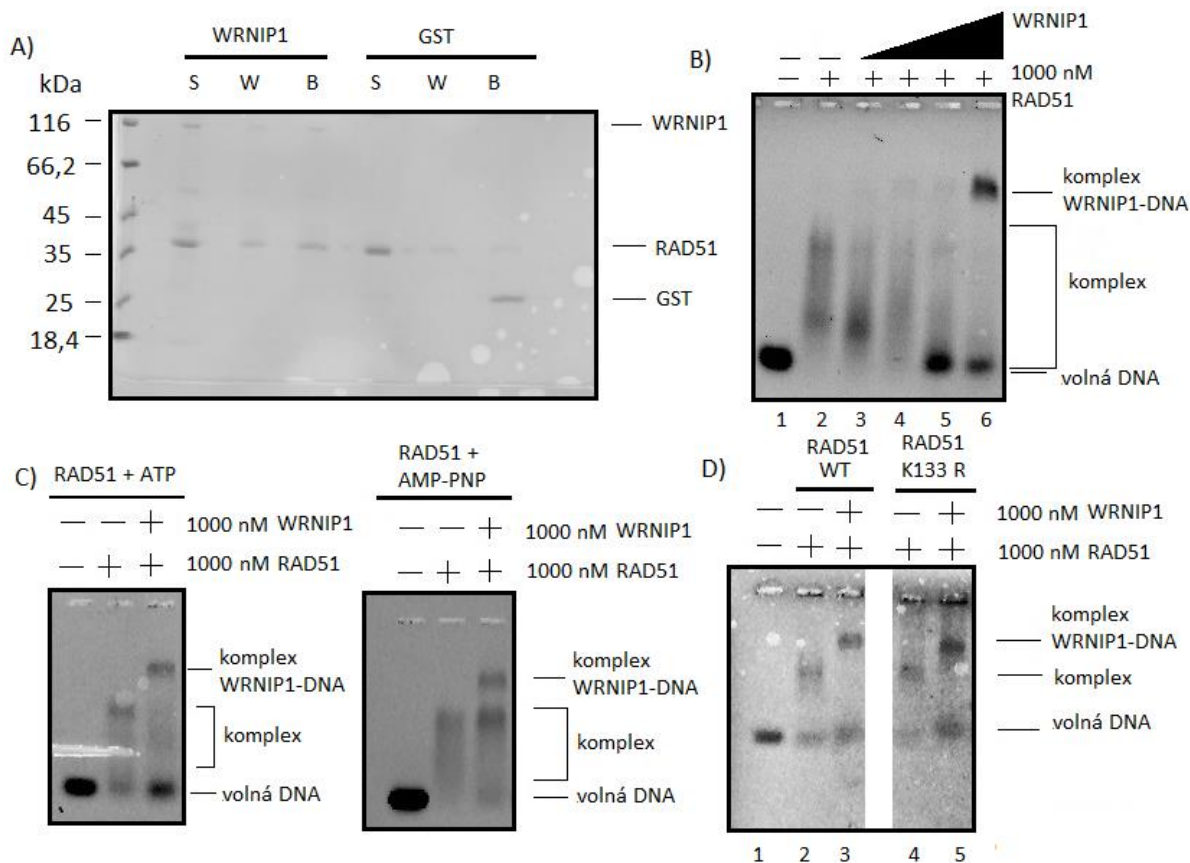
K ověření této hypotézy byl jako kofaktor namísto ATP použit nehydrolyzovatelný analog ATP, AMP-PNP. K RAD51 (1000 nM) nukleoproteinovému komplexu vytvořenému na ssDNA (2 nM) v přítomnosti hořčičných iontů a ATP nebo AMP-PNP byl přidáván WRNIP1 (1000 nM) a komplexy byly analyzovány na agarózovém gelu.

V souladu s předchozími výsledky zabránění ATP hydrolýzy částečně stabilizovalo samotný RAD51 komplex na DNA (obr. 17 C, porovnání jamek 2 a 5) [62]. Překvapivě dokázalo použití AMP-PNP téměř plně zabránit WRNIP1-zprostředkované disociaci RAD51 z DNA. Tyto výsledky naznačují, že ATP hydrolýza je nezbytná pro destabilizaci RAD51 nukleoproteinového vlákna.

4.3.4 EMSA – analýza potřeby ATP hydrolýzy pro WRNIP1 nebo RAD51

Aby bylo možné zjistit, zda je pro destabilizaci RAD51 vlákna esenciální schopnost ATP hydrolýzy WRNIP1 nebo RAD51, byla ssDNA (2 nM) inkubována v přítomnosti hořčičných iontů a ATP s RAD51 divokého kmene (WT) (1000 nM), respektive mutantu K133R (1000 nM), který má zaměněný lysin na pozici 133 za arginin a je schopen ATP vázat, ale nikoliv hydrolyzovat (obr. 17 D).

Z porovnání jamek 2 a 4 na obrázku 17 D je patrné, že RAD51 K133R je schopen vázat ssDNA stejně jako RAD51 WT a zároveň odpadává stejným způsobem jako RAD51 WT (jamky 3 a 5). Stejně tak vazba WRNIP1 (1000 nM) na DNA nebyla ovlivněna přítomností RAD51 WT nebo K133R mutantu. Tato data tedy naznačují, že hydrolýza ATP proteinem WRNIP1 je esenciální pro destabilizaci RAD51 vlákna.



Obr. 17: Interakce WRNIP1 s RAD 51

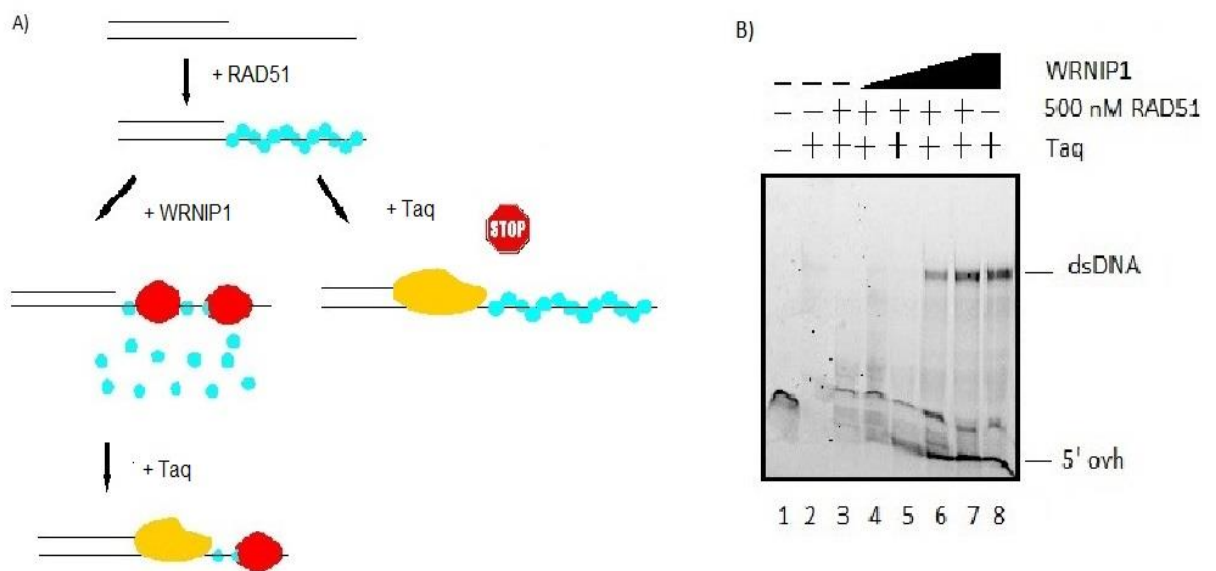
- A) Pull-down analýza interakce mezi WRNIP1 a RAD51 za použití GST kuliček
 B) Vliv zvyšující se koncentrace WRNIP1 (125, 250, 500 a 1000 nM) na RAD51 filament
 C) Porovnání vlivu WRNIP1 na RAD51 filament v přítomnosti ATP a AMP-PNP
 D) Porovnání vlivu WRNIP1 na RAD51 WT a RAD51 K133R v přítomnosti ATP

4.4 Stimulace Taq polymerázy

Z výše popsanych výsledků vyplývá, že WRNIP1 destabilizuje RAD51 nukleoproteinové vlákno. Zároveň však odborná literatura dokládá, že se WRNIP1 podílí na ochraně vidlic před degradací. Pro pochopení toho, jakým mechanismem WRNIP1 chrání replikační vidlice, byla navržena a otestována hypotéza, zdali WRNIP1 disociuje RAD51 vlákna na regresovaném rameni replikační vidlice, a tím umožňuje syntetizovat zbývající úsek DNA a zároveň chránit zastavenou replikační vidlici před degradací.

Pro ověření této hypotézy byl navržen experiment, který je schematicky znázorněn na obr. 18 A. Nejprve byl ověřen vliv RAD51 nukleoproteinového vlákna na extenzi polymerázy tak, že na 5' převisu byl předinkubován RAD51 protein a poté byla přidána bakteriální Taq polymeráza, která by měla DNA dosyntetizovat do konce převisu. Po deproteinizaci reakce byla délka DNA analyzována na denaturačním gelu. Podle očekávání inhiboval RAD51 protein extenzi DNA polymerázy (Příloha 3 B). Poté byl testován vliv WRNIP1, který byl přidán po vytvoření RAD51 filamentu na DNA, a následně byla přidána polymeráza.

Z gelu na obrázku 18 B je patrné, že zatímco samotný RAD51 protein (500 nM) polymerázovou extenzi z větší části inhibuje, přídavek WRNIP1 už při nejnižší koncentraci stimuluje extenzi polymerázy i v přítomnosti RAD51 (jamka 4). WRNIP1 stimuluje polymerázu v rostoucí koncentrační závislosti v rozsahu 125 – 1000 nM (jamky 3 – 7). Navíc lze v nejvyšší koncentraci dokonce pozorovat větší množství plně syntetizované dsDNA (jamka 7) než při přidání samotné Taq polymerázy (jamka 2). Tento efekt vidíme i při nejvyšší koncentraci samotného WRNIP1 (jamka 8). WRNIP1 tedy destabilizuje RAD51 vlákno, a tím umožňuje odstranit překážku, kterou RAD51 pro polymerázu představuje. Zároveň se zdá, že také stimuluje aktivitu samotné polymerázy.



Obr. 18: Stimulace Taq polymerázy

A) Schematické znázornění experimentu.

B) Výsledek analýzy vlivu WRNIP1 na Taq polymerázu. 5'převís je při přidání WRNIP1 v rostoucí koncentrační závislosti (125, 250, 500 a 1000 nM) dosyntetizován na dsDNA.

5 DISKUZE

5.1 Úloha proteinu WRNIP1 při ochraně zatavené replikační vidlice

Navzdory zásadní úloze proteinu WRNIP1 při ochraně genomové stability a stabilizaci replikační vidlice, se jedná o velmi málo popsany protein a jeho přesná role při DNA replikaci zůstávala nejasná.

Tato práce charakterizovala pomocí biochemické analýzy DNA vazebnou afinitu WRNIP1 a odhalila preference vůči substrátům zastavené a revertované replikační vidlice. Z porovnání DNA vazebné aktivity WRNIP1 je vidět preference WRNIP1 k replikační vidlici a revertované replikační vidlici (obr. 16), což koresponduje s předchozími výzkumy [49]. Zároveň je vidět, že při použití nehydrolyzovatelného analogu ATP, AMP-PNP, nedošlo k žádnému signifikantnímu narušení tvorby WRNIP1-DNA komplexu, avšak při absenci hořčičných iontů společně s ATP a jeho analogy nebyla pozorována žádná vazba (obr. 17 C a nezahrnutá data).

Dále byla popsána přímá interakce WRNIP1 s centrální lidskou rekombinázou RAD51 a její funkční význam: WRNIP1 destabilizuje RAD51 nukleoproteinové vlákno a stimuluje disociaci RAD51 z DNA (obr. 17 B, D). V přítomnosti ATP komplex RAD51-DNA s WRNIP1 přestává být jasně definovaný a dochází ke změně jeho putování na gelu. Tento jev může být způsoben buď schopností WRNIP1 disociovat RAD51 po celé délce vlákna, nebo vytvořením společného vlákna, které se skládá částečně z RAD51 a částečně z WRNIP1. Tuto skutečnost se ale zatím nepodařilo ověřit.

Již dříve bylo dokázáno, že deplece WRNIP1 vede k rozsáhlé nukleolytické degradaci téměř na stejné úrovni jako inhibice proteinu RAD51 [1].

Pomocí rekonstituce polymerázové extenze byl odhalen mechanismus, kterým může WRNIP1 replikační vidlici stabilizovat. Analýza polymerázové extenze ukazuje, že WRNIP1 podporuje syntézu DNA přes RAD51 vlákno (obr. 18 B). Destabilizace RAD51 pro uvolnění cesty polymerázy by mohla být klíčová pro restart vidlice pomocí této dráhy, protože mé výsledky ukazují, že RAD51 představuje blok pro polymerázovou syntézu.

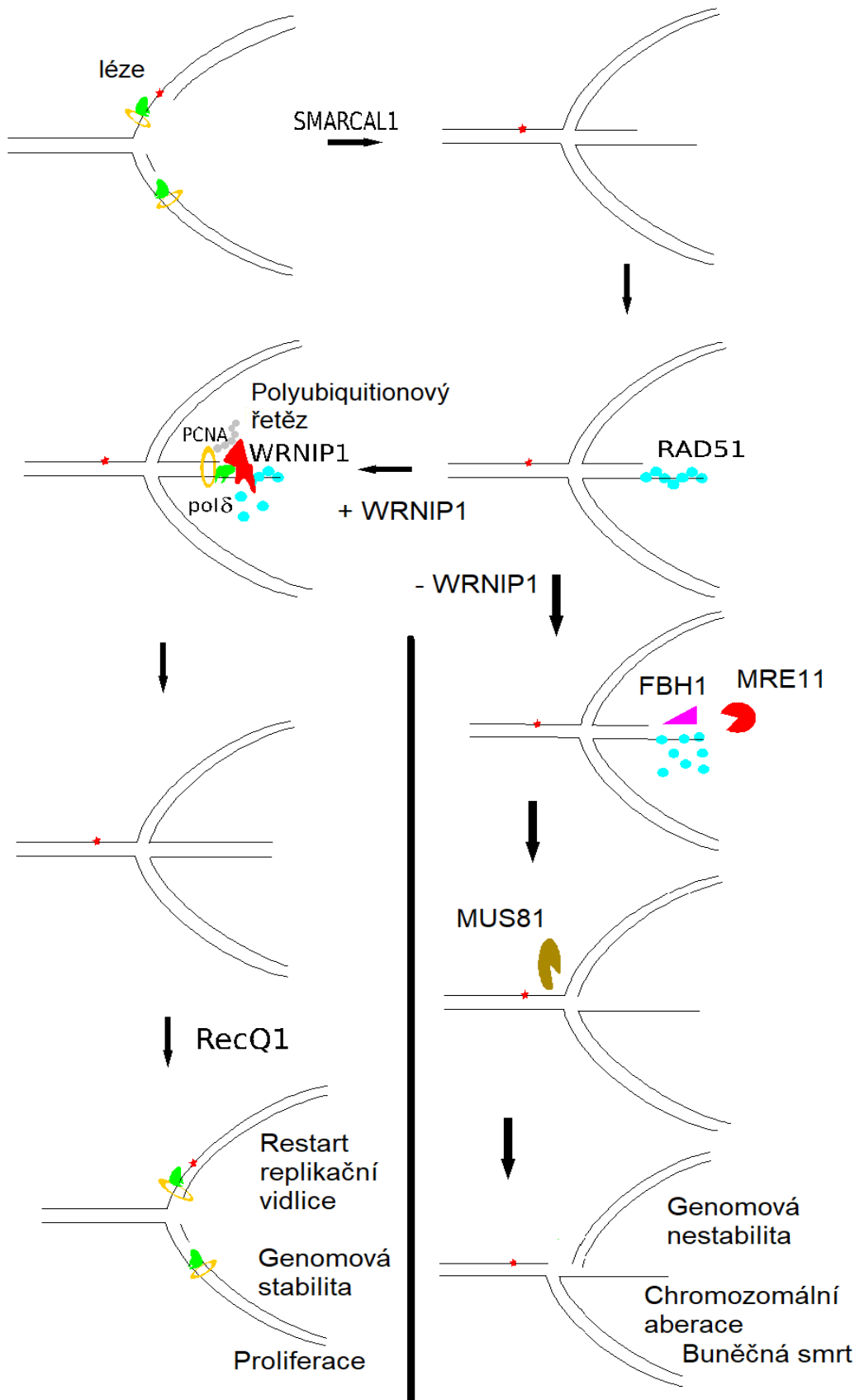
Dalším faktem, který může zvýraznit stimulaci syntézy DNA přes RAD51 vlákno, je přímá interakce proteinu WRNIP1 s DNA polymerázou δ [63] a stimulace její iniciační frekvence [48]. Navíc bylo uveřejněno několik studií, které demonstrují, že WRNIP1 váže ubikvitin svou UBZ doménou, přičemž preferenčně váže polyubikvitinové řetězce navázané na PCNA [50, 51, 60]. Tyto výzkumy naznačují, že polyubikvitinace PCNA je zodpovědná za rekrutování WRNIP1 na zastavené replikační vidlici, kde stimuluje aktivitu polymerázy δ a pomáhá jí překonat inhibici RAD51 proteinem, který ale současně chrání DNA před degradací.

Společně s předchozími poznatky můžeme navrhnout model restartu zastavené replikační vidlice podporovaného proteinem WRNIP1 (obr. 19). Při zastavení replikace a vytvoření ssDNA mezery na vedoucím rameni replikační vidlice dochází k její reverzi. Jelikož je ale revertovaná replikační vidlice náchylná k degradaci nukleázami MRE11 a EXO1, musí být stabilizována RAD51 vláknem. Vytvořené RAD51 vlákno však může později zároveň znemožňovat restartování vidlice. K tomu je zapotřebí PCNA, která nasedá na dsDNA–ssDNA rozhraní regresovaného ramene a je následně ubikvitinována. Polyubikvitinace PCNA pak rekrutuje nejen polymerázu, ale i WRNIP1 a pomocí přímé interakce může putovat spolu s polymerázou a disociovat RAD51 podjednotky. Tím nejenže uvolňuje cestu polymeráze, ale zároveň nedochází k MRE11 degradaci, poněvadž k destabilizaci RAD51 dochází pouze v blízkosti polymerázy.

V tomto případě lze předpokládat, že syntézu bude provádět polymeráza δ , u které WRNIP1 stimuluje její iniciační frekvenci [48]. Přesto však není vyloučeno, že i jiná polymeráza syntetizuje chybějící část ramene.

Po dosyntetizování regresovaného ramene je potřeba replikační vidlici restartovat. Proteinů, které mají tuto schopnost, je mnoho, kupříkladu SMARCAL1, RAD54 nebo RECQ1, u níž byla popsána schopnost restartovat revertovanou vidlici se stejně dlouhými vlákny na regresovaném rameni [22, 29]. Přesto však nelze vyloučit, že se na restartu podílí jiné proteiny a že restart může být kombinovanou akcí více proteinů.

Mechanismus, kterým se buňky rozhodují, kterou drahou na replikační stres odpoví a který způsob restartu využijí, je prozatím velmi neprobádané téma a záleží na mnoha okolnostech, jako je typ poškození, kontext dráhy v rámci buňky nebo dostupnost proteinů, které působí v jednotlivých drahách. Model template switch dráhy je potřeba ještě dále testovat, ale může představovat efektivní odpověď na replikační stres a jeho objasnění je důležité pro pochopení mechanismu, kterým buňky zabraňují vzniku nestability genomu.



Obr. 19: Model mechanismu restartu replikační vidlice podporovaného WRNIP1.

5.2 Navazující studie

Zatímco tato práce odhaluje detailní mechanismus, kterým se WRNIP1 může podílet na ochraně buněk před replikačním stresem, a propojuje zdánlivě rozdílné úlohy WRNIP1 v ucelený model, nicméně nadále zůstává mnoho otázek nejasných. Skutečnosti demonstrováné v této studii a navržený model bude potřeba v budoucnu dále testovat.

Pro správné pochopení mechanismu podpory restartu prostřednictvím WRNIP1 je nezbytné zopakovat experimenty s lidskou PCNA a lidskou polymerázou. Dále by bylo vhodné ověřit vliv mono-, či polyubikvitinace PCNA. Pro tento účel je možno *in vitro* modifikovat PCNA, ideální by však bylo experiment navrhnout i s použitím E1, E2 a E3 enzymů. Zajímavé by bylo také otestovat interakce dalších polymeráz s WRNIP1. Dalším potenciálním experimentem může být sledování vlivu WRNIP1 při degradaci RAD51 vlákna, popřípadě revertované replikační vidlice prostřednictvím MRE11. Také je potřeba ověřit, zdali WRNIP1 též přímo neovlivňuje stabilitu RAD51 vlákna v přítomnosti FBH1, popřípadě komplexu SCF^{FBH1}, například pomocí inhibice ubikvitinace RAD51. Tím by mohl WRNIP1 regulovat například načasování disociace RAD51 z DNA. Finálním experimentem by mohla být rekonstrukce stimulace polymerázové extenze přes RAD51 vlákno prostřednictvím WRNIP1 s použitím lidských proteinů v přítomnosti FBH1, MRE11 a PCNA.

Dále by bylo velmi důležité stanovit efekt jednotlivých mutací proteinu WRNIP1 na jeho funkci. Pro ověření předpokladu, že syntéza přes RAD51 vlákno prostřednictvím WRNIP1 je závislá na hydrolýze ATP by se jednalo o záměnu threoninu na pozici 294 za alanin (T→A), která způsobuje ztrátu schopnosti ATP hydrolýzy [71]. Pro ověření hypotézy, že WRNIP1 je specificky lokalizovaný v místě ssDNA-dsDNA přechodu, kde je lokalizovaná PCNA a polymeráza by bylo potřeba zaměnit kyselinu asparagovou na pozici 37 za alanin (D→A), která způsobuje ztrátu schopnosti vázat ubikvitin[50].

Bylo by prospěšné ověřit model také *ex vivo*. Na revertované replikační vidlici působí mnoho faktorů, které spolu interagují, přičemž některé faktory nemusely být dosud vůbec popsány. Při použití lidských buněk by byly do výsledků všechny tyto faktory zahrnuty, a výsledky by tak byly přesnější. V tomto případě by mohlo být složitější odlišit funkce jednotlivých proteinů. Efekt na extenzi na stresované replikační vidlice by mohl být sledován díky vystavení deoxyuridinu s inkorporovaným jodem, chlorem nebo bromem. Následně by bylo možné vizualizovat nově syntetizovanou DNA pomocí fluorescenční mikroskopie [40]. Kolokalizaci s jednotlivými polymerázami nebo modifikovanou PCNA by bylo možné vizualizovat pomocí protilátek proti jednotlivým proteinům.

Obdobně by mohly být buňky po depleci endogenního WRNIP1 komplementovány mutantními WRNIP1 proteiny pomocí vložení jejich expresních plasmidů. Tím by bylo možné rozhodnout, jestli je pro tuto dráhu esenciální schopnost hydrolyzovat ATP a vázat ubikvitin. V neposlední řadě by *ex vivo* bylo možné použít různé příčiny replikačního stresu a rozhodnout tak, na který druh příčiny v rámci popsané odpovědní dráhy WRNIP1 působí.

Tato práce představuje nový náhled na roli WRNIP1, čímž přispívá k odhalení úlohy jednotlivých faktorů v drahách, kterými buňky odpovídají na příčiny replikačního stresu, a představuje též potenciál při vývoji cílené terapeutické léčby. Inhibicí klíčových proteinů v BRCA2-deficientních buňkách, ve kterých není RAD51 tímto proteinem stabilizován, čímž vzniká prostor pro extenzivní nukleolytickou degradaci, by v této dráze bylo možné podpořit restart prostřednictvím BIR, což by samo o sobě, ale hlavně v kontextu nefunkční opravy DNA zvýšilo riziko genomové nestability a buněčné smrti. Kromě toho je v tomto případě esenciální aktivita MUS81, bez níž dochází k selhání restartu replikační vidlice, zastavení buněčného cyklu a následně k buněčné smrti [64].

6 ZÁVĚR

Replikace buněčné DNA je jedním z nejdůležitějších procesů, které jsou zodpovědné za vývoj a chod celého organismu. Avšak DNA replikace je zároveň jedním z největších zdrojů nestability genomu, jelikož DNA musí při replikaci čelit mnoha překážkám a je pod neustálou hrozbou poškození. V případě, že není umožněna správná a včasná odpověď na zastavení replikační vidlice, dochází k jejímu kolapsu, replikačnímu stresu a poškození DNA, které může vyústit v maligní transformaci [12].

Mezi proteiny, jež se účastní odpovědi na replikační stres, patří WRNIP1, který chrání replikační vidlici před poškozením [1]. Dosud však nebylo zcela jasné, jakým způsobem se WRNIP1 na tomto procesu podílí. V této práci byl odhalen možný mechanismus, kterým WRNIP1 stabilizuje zastavenou replikační vidlici, zprostředkovává její restart a brání zvýšení úrovně replikačního stresu.

V práci byla jednak popsána DNA vazebná preference WRNIP1 proteinu vůči fyziologicky se vyskytujícím substrátům, jednak byl odhalen mechanistický význam interakce proteinu WRNIP1 s RAD51. Navzdory předpokladu, že WRNIP1 stabilizuje RAD51, a tím chrání DNA před degradací, bylo dokázáno, že protein WRNIP1 je schopen disociovat protein RAD51 navázaný na jednořetězcovou DNA a že tato destabilizace je pravděpodobně závislá na hydrolyze ATP proteinem WRNIP1. Dále byl také otestován biologický význam této funkce WRNIP1. Díky rekonstituci polymerázové extenze se podařilo dokázat, že WRNIP1 podporuje syntézu přes RAD51, který je pro polymerázu obvykle překážkou. Tato dráha by mohla být pro buňky efektivním nástrojem, jak se vypořádat s překážkami při DNA replikaci.

Závěrem lze říci, že tato práce odhaluje dosud nepopsanou úlohu WRNIP1 při ochraně buněk před replikačním stresem, a přispívá tak k pochopení mechanismů udržování stability genomu.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LEUZZI, Giuseppe, Veronica MARABITTI, Pietro PICHIERRI a Annapaola FRANCHITTO. WRNIP1 protects stalled forks from degradation and promotes fork restart after replication stress. *The EMBO journal* [online]. 2016, **35**(13), 1437–1451. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.15252/emboj.201593265
- [2] KLAUS–HEINRICH, Koolman Jan, Röhm. *Barevný atlas biochemie - Překlad 4. vydání*. B.m.: Grada Publishing a.s., 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [3] HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* [online]. 2001, **411**(6835), 366–374. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35077232
- [4] ALBERTS, Bruce. *Molecular Biology of the Cell*. Sixth. New York: Garland Science, 2015. ISBN 978-0-8153-4464-3.
- [5] MANKOURI, Hocine W., Diana HUTTNER a Ian D. HICKSON. How unfinished business from S-phase affects mitosis and beyond. *The EMBO Journal* [online]. 2013, **32**(20), 2661–2671. ISSN 0261-4189, 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1038/emboj.2013.211
- [6] SNG8. *The Cell Cycle, Mitosis and Meiosis — University of Leicester* [online]. [vid. 2017-11-23]. Dostupné z: <https://www2.le.ac.uk/projects/vgec/highereducation/topics/cellcycle-mitosis-meiosis>
- [7] YAO, Nina Y a Mike O'DONNELL. Replisome structure and conformational dynamics underlie fork progression past obstacles. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2009, **21**(3), Nucleus and gene expression, 336–343. ISSN 0955-0674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2009.02.008
- [8] KESZTHELYI, Andrea, Nicola E. MINCHELL a Jonathan BAXTER. The Causes and Consequences of Topological Stress during DNA Replication. *Genes* [online]. 2016, **7**(12). ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes7120134
- [9] HSIANG, Y. H., M. G. LIHOU a L. F. LIU. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Research*. 1989, **49**(18), 5077–5082. ISSN 0008-5472.
- [10] POLI, Jérôme, Olga TSAPONINA, Laure CRABBÉ, Andrea KESZTHELYI, Véronique PANTESCO, Andrei CHABES, Armelle LENGRONNE a Philippe PASERO. dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *The EMBO Journal* [online]. 2012, **31**(4), 883–894. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1038/emboj.2011.470
- [11] YEELES, Joseph T. P., Jérôme POLI, Kenneth J. MARIANS a Philippe PASERO. Rescuing Stalled or Damaged Replication Forks. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2013, **5**(5), a012815. ISSN , 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a012815

- [12] BERTI, Matteo a Alessandro VINDIGNI. Replication stress: getting back on track. *Nature structural & molecular biology* [online]. 2016, **23**(2), 103–109. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb.3163
- [13] MOLDOVAN, George-Lucian, Boris PFANDER a Stefan JENTSCH. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* [online]. 2007, **129**(4), 665–679. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2007.05.003
- [14] GALI, Himabindu, Szilvia JUHASZ, Monika MOROCZ, Ildiko HAJDU, Karoly FATYOL, Valeria SZUKACSOV, Peter BURKOVICS a Lajos HARACSKA. Role of SUMO modification of human PCNA at stalled replication fork. *Nucleic Acids Research* [online]. 2012, **40**(13), 6049–6059. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gks256
- [15] KOBAYASHI, Kaori, Thomas A. GUILLIAM, Masataka TSUDA, Junpei YAMAMOTO, Laura J. BAILEY, Shigenori IWAI, Shunichi TAKEDA, Aidan J. DOHERTY a Kouji HIROTA. Repriming by PrimPol is critical for DNA replication restart downstream of lesions and chain-terminating nucleosides. *Cell Cycle* [online]. 2016, **15**(15), 1997–2008. ISSN 1538-4101. Dostupné z: doi:10.1080/15384101.2016.1191711
- [16] BRANZEI, Dana. Ubiquitin family modifications and template switching. *FEBS Letters* [online]. 2011, **585**(18), 2810–2817. ISSN 1873-3468. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2011.04.053
- [17] LLORENTE, Bertrand, Catherine E. SMITH a Lorraine S. SYMINGTON. Break-induced replication: What is it and what is it for? *Cell Cycle* [online]. 2008, **7**(7), 859–864. ISSN 1538-4101. Dostupné z: doi:10.4161/cc.7.7.5613
- [18] AGUILERA, Andrés a Belén GÓMEZ-GONZÁLEZ. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews. Genetics* [online]. 2008, **9**(3), 204–217. ISSN 1471-0064. Dostupné z: doi:10.1038/nrg2268
- [19] SOGO, José M., Massimo LOPES a Marco FOIANI. Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2002, **297**(5581), 599–602. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1074023
- [20] NEELSEN, Kai J. a Massimo LOPES. Replication fork reversal in eukaryotes: from dead end to dynamic response. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* [online]. 2015, **16**(4), 207–220. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3935
- [21] CECCALDI, Raphael, Prabha SARANGI a Alan D. D'ANDREA. The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* [online]. 2016, **17**(6), 337–349. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm.2016.48
- [22] ZELLWEGER, Ralph, Damian DALCHER, Karun MUTREJA, Matteo BERTI, Jonas A. SCHMID, Raquel HERRADOR, Alessandro VINDIGNI a Massimo LOPES. Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2015, **208**(5), 563–579. ISSN 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.201406099

- [23] BUGREEV, Dmitry V., Matthew J. ROSSI a Alexander V. MAZIN. Cooperation of RAD51 and RAD54 in regression of a model replication fork. *Nucleic Acids Research* [online]. 2011, **39**(6), 2153–2164. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkq1139
- [24] BÉTOUS, Rémy, Frank. B. COUCH, Aaron C. MASON, Brandt F. EICHMAN, Maria MANOSAS a David CORTEZ. Substrate-selective repair and restart of replication forks by DNA translocases. *Cell reports* [online]. 2013, **3**(6), 1958–1969. ISSN 2211-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2013.05.002
- [25] COUCH, Frank B., Carol E. BANSBACH, Robert DRISCOLL, Jessica W. LUZWICK, Gloria G. GLICK, Rémy BÉTOUS, Clinton M. CARROLL, Sung Yun JUNG, Jun QIN, Karlene A. CIMPRICH a David CORTEZ. ATR phosphorylates SMARCAL1 to prevent replication fork collapse. *Genes & Development* [online]. 2013, **27**(14), 1610–1623. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.214080.113
- [26] BÉTOUS, Rémy, Aaron C. MASON, Robert P. RAMBO, Carol E. BANSBACH, Akosua BADU-NKANSAH, Bianca M. SIRBU, Brandt F. EICHMAN a David CORTEZ. SMARCAL1 catalyzes fork regression and Holliday junction migration to maintain genome stability during DNA replication. *Genes & Development* [online]. 2012, **26**(2), 151–162. ISSN 1549-5477. Dostupné z: doi:10.1101/gad.178459.111
- [27] REFERENCE, Genetics Home. Schimke immuno-osseous dysplasia. *Genetics Home Reference* [online]. [vid. 2017-12-02]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/schimke-immuno-osseous-dysplasia>
- [28] WESTON, Ria, Hanneke PEETERS a Dragana AHEL. ZRANB3 is a structure-specific ATP-dependent endonuclease involved in replication stress response. *Genes & Development* [online]. 2012, **26**(14), 1558–1572. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.193516.112
- [29] BERTI, Matteo, Arnab Ray CHAUDHURI, Saravanabhavan THANGAVEL, Shivasankari GOMATHINAYAGAM, Sasa KENIG, Marko VUJANOVIC, Federico ODREMAN, Timo GLATTER, Simona GRAZIANO, Ramiro MENDOZA-MALDONADO, Francesca MARINO, Bojana LUCIC, Valentina BIASIN, Matthias GSTAIGER, Ruedi AEBERSOLD, Julia M. SIDOROVA, Raymond J. MONNAT, Massimo LOPES a Alessandro VINDIGNI. Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nature structural & molecular biology* [online]. 2013, **20**(3), 347–354. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb.2501
- [30] BLASTYÁK, András, Ildikó HAJDÚ, Ildikó UNK a Lajos HARACSKA. Role of Double-Stranded DNA Translocase Activity of Human HLTF in Replication of Damaged DNA. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2010, **30**(3), 684–693. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.00863-09
- [31] UNK, Ildiko, Ildikó HAJDÚ, Károly FÁTYOL, Jerard HURWITZ, Jung-Hoon YOON, Louise PRAKASH, Satya PRAKASH a Lajos HARACSKA. Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2008, **105**(10), 3768–3773. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0800563105

- [32] FUGGER, Kasper, Martin MISTRİK, Kai J. NEELSEN, Qi YAO, Ralph ZELLWEGER, Arne Nedergaard KOUSHOLT, Peter HAAHR, Wai Kit CHU, Jiri BARTEK, Massimo LOPES, Ian D. HICKSON a Claus Storgaard SØRENSEN. FBH1 Catalyzes Regression of Stalled Replication Forks. *Cell Reports* [online]. 2015. ISSN 2211-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2015.02.028
- [33] CHU, Wai Kit, Miranda J. PAYNE, Petra BELI, Katsuhiko HANADA, Chunaram CHOUDHARY a Ian D. HICKSON. FBH1 influences DNA replication fork stability and homologous recombination through ubiquitylation of RAD51. *Nature Communications* [online]. 2015, **6**, 5931. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms6931
- [34] MASUDA-OZAWA, Tokiha, Trish HOANG, Yeon-Soo SEO, Lin-Feng CHEN a Maria SPIES. Single-molecule sorting reveals how ubiquitylation affects substrate recognition and activities of FBH1 helicase. *Nucleic Acids Research* [online]. 2013, **41**(6), 3576–3587. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkt056
- [35] TAGLIALATELA, Angelo, Silvia ALVAREZ, Giuseppe LEUZZI, Vincenzo SANNINO, Lepakshi RANJHA, Jen-Wei HUANG, Chioma MADUBATA, Roopesh ANAND, Brynn LEVY, Raul RABADAN, Petr CEJKA, Vincenzo COSTANZO a Alberto CICCIA. Restoration of Replication Fork Stability in BRCA1- and BRCA2-Deficient Cells by Inactivation of SNF2-Family Fork Remodelers. *Molecular Cell* [online]. 2017, **68**(2), 414–430.e8. ISSN 1097-4164. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2017.09.036
- [36] COTTA-RAMUSINO, Cecilia, Daniele FACHINETTI, Chiara LUCCA, Yili DOKSANI, Massimo LOPES, José SOGO a Marco FOIANI. Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells. *Molecular Cell* [online]. 2005, **17**(1), 153–159. ISSN 1097-2765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2004.11.032
- [37] LEMAÇON, Delphine, Jessica JACKSON, Annabel QUINET, Joshua R. BRICKNER, Shan LI, Stephanie YAZINSKI, Zhongsheng YOU, Grzegorz IRA, Lee ZOU, Nima MOSAMMAPARAST a Alessandro VINDIGNI. MRE11 and EXO1 nucleases degrade reversed forks and elicit MUS81-dependent fork rescue in BRCA2-deficient cells. *Nature Communications* [online]. 2017, **8**(1), 860. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-017-01180-5
- [38] NIMONKAR, Amitabh V., Jochen GENSCHEL, Eri KINOSHITA, Piotr POLACZEK, Judith L. CAMPBELL, Claire WYMAN, Paul MODRICH a Stephen C. KOWALCZYKOWSKI. BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes & Development* [online]. 2011, **25**(4), 350–362. ISSN 1549-5477. Dostupné z: doi:10.1101/gad.2003811
- [39] THANGAVEL, Saravanabhavan, Matteo BERTI, Maryna LEVIKOVA, Cosimo PINTO, Shivasankari GOMATHINAYAGAM, Marko VUJANOVIC, Ralph ZELLWEGER, Hayley MOORE, Eu Han LEE, Eric A. HENDRICKSON, Petr CEJKA, Sheila STEWART, Massimo LOPES a Alessandro VINDIGNI. DNA2 drives processing and restart of reversed replication forks in human cells. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2015, **208**(5), 545–562. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.201406100

- [40] SCHLACHER, Katharina, Nicole CHRIST, Nicolas SIAUD, Akinori EGASHIRA, Hong WU a Maria JASIN. Double-Strand Break Repair Independent Role For BRCA2 In Blocking Stalled Replication Fork Degradation By MRE11. *Cell* [online]. 2011, **145**(4), 529–542. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.03.041
- [41] SOMYAJIT, Kumar, Sneha SAXENA, Sharath BABU, Anup MISHRA a Ganesh NAGARAJU. Mammalian RAD51 paralogs protect nascent DNA at stalled forks and mediate replication restart. *Nucleic Acids Research* [online]. 2015, **43**(20), 9835–9855. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkv880
- [42] SATO, Koichi, Mayo SHIMOMUKI, Yoko KATSUKI, Daisuke TAKAHASHI, Wataru KOBAYASHI, Masamichi ISHIAI, Hiroyuki MIYOSHI, Minoru TAKATA a Hitoshi KURUMIZAKA. FANCI-FANCD2 stabilizes the RAD51-DNA complex by binding RAD51 and protects the 5'-DNA end. *Nucleic Acids Research* [online]. 2016, **44**(22), 10758–10771. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkw876
- [43] SIMANDLOVA, Jitka, Jennifer ZAGELBAUM, Miranda J. PAYNE, Wai Kit CHU, Igor SHEVELEV, Katsuhiko HANADA, Sujoy CHATTERJEE, Dylan A. REID, Ying LIU, Pavel JANSČAK, Eli ROTHENBERG a Ian D. HICKSON. FBH1 Helicase Disrupts RAD51 Filaments in Vitro and Modulates Homologous Recombination in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2013, **288**(47), 34168–34180. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M113.484493
- [44] HIGGS, Martin R., John J. REYNOLDS, Alicja WINCZURA, Andrew N. BLACKFORD, Valérie BOREL, Edward S. MILLER, Anastasia ZLATANOU, Jadwiga NIEMINUSZCZY, Ellis L. RYAN, Nicholas J. DAVIES, Tatjana STANKOVIC, Simon J. BOULTON, Wojciech NIEDZWIEDZ a Grant S. STEWART. BOD1L Is Required to Suppress Deleterious Resection of Stressed Replication Forks. *Molecular Cell* [online]. 2015, **59**(3), 462–477. ISSN 1097-4164. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2015.06.007
- [45] OSMAN, Fekret a Matthew C. WHITBY. Exploring the roles of Mus81-Eme1/Mms4 at perturbed replication forks. *DNA repair* [online]. 2007, **6**(7), 1004–1017. ISSN 1568-7864. Dostupné z: doi:10.1016/j.dnarep.2007.02.019
- [46] HIGGINS, N. P., K. KATO a B. STRAUSS. A model for replication repair in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*. 1976, **101**(3), 417–425. ISSN 0022-2836.
- [47] KAWABE YI, null, D. BRANZEI, T. HAYASHI, H. SUZUKI, T. MASUKO, F. ONODA, S. J. HEO, H. IKEDA, A. SHIMAMOTO, Y. FURUICHI, M. SEKI a T. ENOMOTO. A novel protein interacts with the Werner's syndrome gene product physically and functionally. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, **276**(23), 20364–20369. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C100035200
- [48] TSURIMOTO, Toshiki, Ayako SHINOZAKI, Masaki YANO, Masayuki SEKI a Takemi ENOMOTO. Human Werner helicase interacting protein 1 (WRNIP1) functions as a novel modulator for DNA polymerase delta. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* [online]. 2005, **10**(1), 13–22. ISSN 1356-9597. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2443.2004.00812.x
- [49] YOSHIMURA, Akari, Masayuki SEKI, Makoto KANAMORI, Satoshi TATEISHI, Toshiki TSURIMOTO, Shusuke TADA a Takemi ENOMOTO. Physical and functional

- interaction between WRNIP1 and RAD18. *Genes & Genetic Systems*. 2009, **84**(2), 171–178. ISSN 1341-7568.
- [50] CROSETTO, Nicola, Marzena BIENKO, Richard G. HIBBERT, Tina PERICA, Chiara AMBROGIO, Tobias KENSCHKE, Kay HOFMANN, Titia K. SIXMA a Ivan DIKIC. Human Wrnip1 is localized in replication factories in a ubiquitin-binding zinc finger-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2008, **283**(50), 35173–35185. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M803219200
- [51] BISH, Rebecca A. a Michael P. MYERS. Werner helicase-interacting protein 1 binds polyubiquitin via its zinc finger domain. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2007, **282**(32), 23184–23193. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M701042200
- [52] BRANZEI, Dana, Masayuki SEKI, Fumitoshi ONODA, Hideki YAGI, Yoh-ichi KAWABE a Takemi ENOMOTO. Characterization of the slow-growth phenotype of *S. cerevisiae* whip/mgs1 sgs1 double deletion mutants. *DNA Repair* [online]. 2002, **1**(8), 671–682. ISSN 1568-7864. Dostupné z: doi:10.1016/S1568-7864(02)00073-3
- [53] HISHIDA, T., H. IWASAKI, T. OHNO, T. MORISHITA a H. SHINAGAWA. A yeast gene, MGS1, encoding a DNA-dependent AAA(+) ATPase is required to maintain genome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2001, **98**(15), 8283–8289. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.121009098
- [54] HISHIDA, Takashi, Tomoko OHYA, Yoshino KUBOTA, Yusuke KAMADA a Hideo SHINAGAWA. Functional and physical interaction of yeast Mgs1 with PCNA: impact on RAD6-dependent DNA damage tolerance. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2006, **26**(14), 5509–5517. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.00307-06
- [55] GSL BIOTECH LLC. pGEX-6P-1. *Snapgene* [online]. 2017 [vid. 2017-12-13]. Dostupné z: [http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pgex_vectors_\(ge_healthcare\)/pGEX-6P-1/](http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pgex_vectors_(ge_healthcare)/pGEX-6P-1/)
- [56] GSL BIOTECH LLC. pET-11c. *Snapgene* [online]. 2017 [vid. 2017-12-13]. Dostupné z: [http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pet_and_duet_vectors_\(novagen\)/pET-11c/](http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-11c/)
- [57] HANSON, Phyllis I. a Sidney W. WHITEHEART. AAA+ proteins: have engine, will work. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2005, **6**(7), 519–529. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm1684
- [58] WENDLER, Petra, Susanne CINIANSKY, Malte KOCK a Sebastian KUBE. Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 2012, **1823**(1), AAA ATPases: structure and function, 2–14. ISSN 0167-4889. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2011.06.014
- [59] HAKOSHIMA, Toshio. Leucine Zippers. In: *eLS* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2001. ISBN 978-0-470-01590-2. Dostupné z: doi:10.1038/npg.els.0005049
- [60] NOMURA, Hironoshin, Akari YOSHIMURA, Takato EDO, Shin-ichiro KANNO, Syusuke TADA, Masayuki SEKI, Akira YASUI a Takemi ENOMOTO. WRNIP1

accumulates at laser light irradiated sites rapidly via its ubiquitin-binding zinc finger domain and independently from its ATPase domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2012, **417**(4), 1145–1150. ISSN 1090-2104. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.080

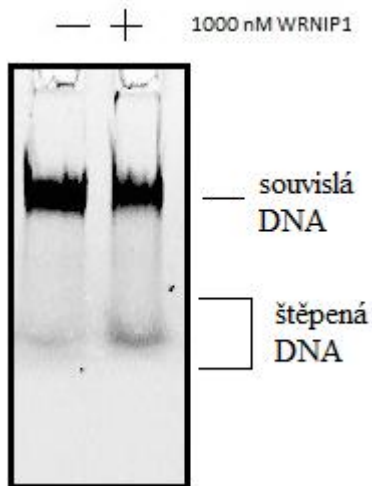
- [61] KIM, Jeong-Hoon, Young-Hoon KANG, Hyo-Jin KANG, Do-Hyung KIM, Gi-Hyuck RYU, Min-Jung KANG a Yeon-Soo SEO. In vivo and in vitro studies of Mgs1 suggest a link between genome instability and Okazaki fragment processing. *Nucleic Acids Research* [online]. 2005, **33**(19), 6137–6150. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gki900
- [62] CHI, Peter, Stephen VAN KOMEN, Michael G. SEHORN, Stefan SIGURDSSON a Patrick SUNG. Roles of ATP binding and ATP hydrolysis in human Rad51 recombinase function. *DNA repair* [online]. 2006, **5**(3), 381–391. ISSN 1568-7864. Dostupné z: doi:10.1016/j.dnarep.2005.11.005
- [63] BRANZEI, D., M. SEKI, F. ONODA a T. ENOMOTO. The product of *Saccharomyces cerevisiae* WHIP/MGS1, a gene related to replication factor C genes, interacts functionally with DNA polymerase delta. *Molecular genetics and genomics: MGG* [online]. 2002, **268**(3), 371–386. ISSN 1617-4615. Dostupné z: doi:10.1007/s00438-002-0757-3
- [64] LAI, Xianning, Ronan BRODERICK, Valérie BERGOGLIO, Jutta ZIMMER, Sophie BADIE, Wojciech NIEDZWIEDZ, Jean-Sébastien HOFFMANN a Madalena TARSOUNAS. MUS81 nuclease activity is essential for replication stress tolerance and chromosome segregation in BRCA2-deficient cells. *Nature Communications* [online]. 2017, **8**, 15983. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms15983

8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

<i>OBR. 1: SCHÉMA MOŽNÝCH LÉZÍ DNA.</i>	12
<i>OBR. 2: SCHÉMA BUNĚČNÉHO CYKLU.</i>	13
<i>OBR. 3: STRUKTURA REPLISOMU A JEHO KOMPONENTY NAPŘÍČ DRUHY.</i>	14
<i>OBR. 4: SHRNUÍ PŘEKÁŽEK PROGRESE REPLIKAČNÍ VIDLICE.</i>	15
<i>OBR. 5: SCHÉMA TRANSLÉZNÍ SYNTÉZY.</i>	17
<i>OBR. 6: SCHÉMA REPLIKACE INDUKOVANÉ ZLOMEM (BIR) V POROVNÁNÍ S OSTATNÍMI VARIACEMI HR.</i>	18
<i>OBR. 7: SHRNUÍ VLIVU REVERZE REPLIKAČNÍ VIDLICE NA JEDNOTLIVÉ DRUHY REPLIKAČNÍHO STRESU.</i>	19
<i>OBR. 8: PROCES REVERZE ZASTAVENÉ REPLIKAČNÍ VIDLICE.</i>	20
<i>OBR. 9: SCHÉMA NUKLEOLYTICKÉ DEGRADACE REVERTOVANÉ REPLIKAČNÍ VIDLICE</i>	21
<i>OBR. 10: SROVNÁNÍ DNA2/WRN A RECQ1 RESTARTU REPLIKAČNÍ VIDLICE.</i>	23
<i>OBR. 11: SCHÉMA RESTARTU ZPŮSOBEM VÝMĚNY TEMPLÁTU.</i>	24
<i>OBR. 12: MAPA EXPRESNÍHO VEKTORU PGEX-6P-1.</i>	30
<i>OBR. 13: MAPA EXPRESNÍHO VEKTORU PET-11C.</i>	31
<i>OBR. 14: SCHÉMA AFINITNÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE POMOCÍ GTH-SEFARÓZY</i>	38
<i>OBR. 15: MAPA A SCHÉMA PURIFIKACE WRNIP1</i>	45
<i>OBR. 16: DNA VAZEBNÁ AFINITA PROTEINU WRNIP1</i>	46
<i>OBR. 17: INTERAKCE WRNIP1 S RAD 51</i>	49
<i>OBR. 18: STIMULACE TAQ POLYMERÁZY</i>	50
<i>OBR. 19: MODEL MECHANISMU RESTARTU REPLIKAČNÍ VIDLICE PODPOROVANÉHO WRNIP1.</i>	53

9 PŘÍLOHY

9.1 Kontrola nukleázové kontaminace

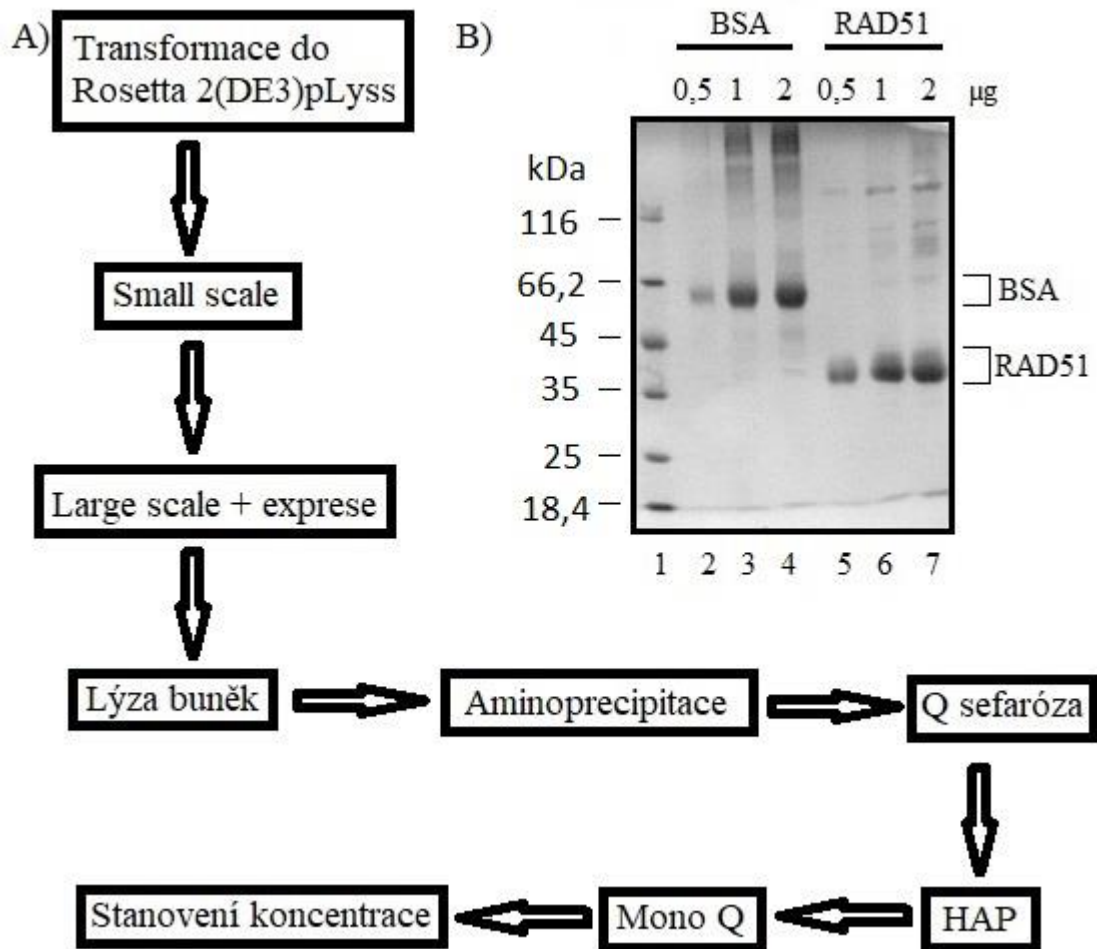


Příloha 1: Kontrola vůči nukleázové kontaminaci

K fluorescenčně značené ssDNA byl přidán WRNIP1, proteiny byly denaturovány směsí SDS + PK a analyzovány pomocí Elektroforézy na nativním gelu

Nebyla detekována žádná signifikantní nukleázová kontaminace.

9.2 Purifikace proteinu RAD51



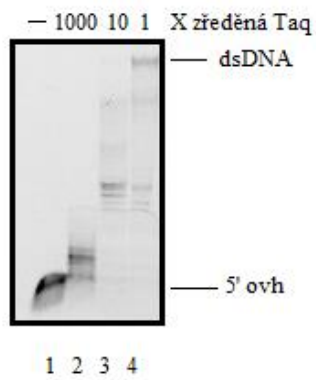
Příloha 2: Purifikace proteinu RAD51 WT

A) Schéma purifikace RAD51

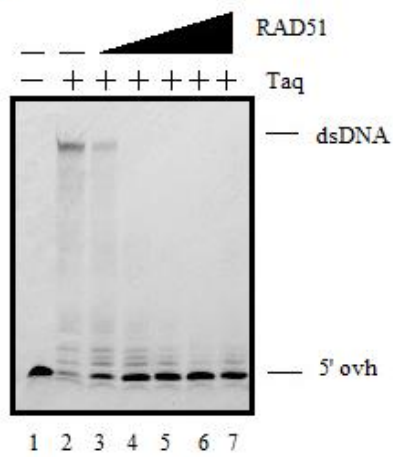
B) Porovnání koncentrace RAD51 oproti titračnímu standardu BSA. Vzorčky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE
Výsledná koncentrace proteinu je $2 \mu\text{g}/\mu\text{L} = 55 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$

9.3 Optimalizace polymerázové extenze

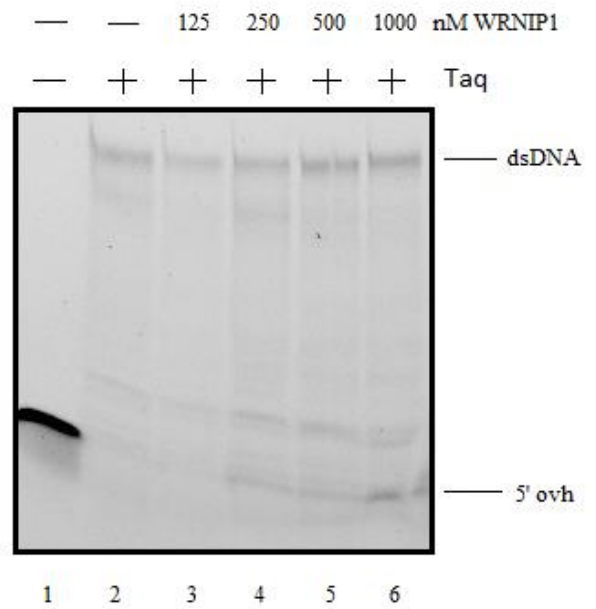
A)



B)



C)



Příloha 3: Optimalizace polymerázové extenze

A) Titrace Taq polymerázy

B) Titrace proteinu RAD51

C) Efekt zvyšující se koncentrace WRNIP1 na polymerázovou extenzi