

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

Charakterizace mutací proteinu RAD51 a jeho vliv na stabilitu genomu a karcinogenezi

**Nikola Svobodová
Kraj Vysočina**

Pelhřimov 2019

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

**Charakterizace mutací proteinu RAD51
a jeho vliv na stabilitu genomu a karcinogenezi**

**Characterisation of RAD51 mutations and its
role in genome instability and tumorigenesis**

Autor: Nikola Svobodová

Škola: Gymnázium a Obchodní akademie Pelhřimov, Jirsíkova 244,
Pelhřimov 393 01

Kraj: Vysočina

Konzultant: doc. Mgr. Lumír Krejčí, Ph.D.

Pelhřimov 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila 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 zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Pelhřimově dne 25. března 2019.....

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila velké poděkování doc. Mgr. Lumíru Krejčímu, Ph.D. za to, že mi poskytl tu úžasnou příležitost vypracovat svou Středoškolskou odbornou činnost v Laboratoři homologní rekombinace a opravy DNA (LORD) a za odborné vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lucii Molnárové, Ph.D. za zaškolení v laboratorní práci, její vstřícnost, bezmeznou trpělivost a cenné rady při zpracování této práce.

Mé poděkování patří také řediteli Gymnázia v Pelhřimově Mgr. Aleši Petrákovi a profesorům gymnázia za umožnění individuálního studijního plánu.

Anotace

Dvouřetězcové zlomy v DNA představují jeden z nejvíce toxických typů poškození DNA. Homologní rekombinace (HR) je mechanismem odpovědným za jejich spolehlivou opravu a zároveň tak i prevencí vůči rozvoji genomové nestability asociované s procesem tumorigeneze. Centrálním proteinem HR je rekombináza RAD51. Na procesu opravy DNA se rovněž podílí proteiny regulující aktivitu RAD51, mezi nimi hlavní rekombinační mediátor BRCA2 nebo skupina tzv. antirekombináz. Vrozené mutace v genech kódující DNA opravné proteiny jsou často spojené s dědičnými onemocněními nebo predispozicí k rozvoji několika typů karcinomů. I přesto zůstává přesný mechanismus působení zmíněných proteinů nejasný, podobně jako terapeutický potenciál v léčbě radio- a chemorezistentních nádorů.

Tato práce se zabývá biochemickou a biofyzikální charakterizací mutací navržených za účelem odhalení mechanismu regulace RAD51, mimo jiné i mutace asociované s nádorovým onemocněním. Získané výsledky mohou přispět nejen k pochopení mechanismu HR, ale také souvislosti s rozvojem karcinogeneze a terapeutického potenciálu.

Klíčová slova

Homologní rekombinace; DNA opravné proteiny; tumorigeneze; terapeutický potenciál

Annotation

Double strand breaks are considered one of the most toxic of DNA lesions. Homologous recombination (HR) is a mechanism responsible for their repair, as well as preventing genome instability associated with tumorigenesis. A central protein in HR is the RAD51 recombinase. DNA repair involves also proteins, that regulates RAD51 activity, including a key mediator of recombination BRCA2 or a group of anti-recombinases. Congenital mutations in genes encoding DNA repair proteins cause several hereditary diseases or a predisposition to the development of cancer. Despite this, the exact mechanism of action remains unclear, similarly to the therapeutic potential in the treatment of radio- and chemoresistance.

The aim of this thesis is biochemical and biophysical characterization of RAD51 mutations, including cancer associated mutation, to help understand the mechanism of RAD51 regulation. Obtained results thus not only contribute to the understanding the basic mechanism of HR but also to its role in tumorigenesis and possible therapeutic potential.

Keywords

Homologous recombination; DNA repair proteins; tumorigenesis; therapeutic potential

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Homologní rekombinace	10
2.2	Replikační stres.....	13
2.3	Protein RAD51	14
2.3.1	Struktura proteinu.....	14
2.3.2	RAD51 oligomerizace a formování vlákna.....	14
2.4	Regulace aktivity proteinu RAD51	15
2.4.1	BRCA2	15
2.4.2	RAD51 paralogy	16
2.4.3	Negativní regulace.....	16
2.4.4	Posttranslační modifikace	19
2.4.5	Jiné regulátory HR	20
2.5	Defekty v DNA opravných mechanismech	20
3	Cíle práce.....	22
4	Materiály a metody.....	23
4.1	Materiály.....	23
4.1.1	Chemikálie a enzymy	23
4.1.2	Roztoky, média a pufrы	23
4.1.3	Plasmidy	24
4.1.4	Oligonukleotidy.....	25
4.1.5	Bakteriální kmeny	25
4.1.6	Komerční kity.....	26
4.1.7	Protilátky	26
4.1.8	Proteiny	26
4.1.9	Přístroje	26
4.1.10	Software	27
4.2	Metody.....	27
4.2.1	Místně-cílená mutageneze.....	27
4.2.2	Buněčná transformace a izolace DNA	28
4.2.3	Sekvence DNA	28
4.2.4	Expresce proteinu RAD51	28

4.2.5	Expres proteinu RECQ5	29
4.2.6	Purifikace proteinu RAD51	29
4.2.7	Purifikace proteinu RECQ5	30
4.2.8	SDS-PAGE.....	30
4.2.9	Gelová retardační analýza (EMSA)	31
4.2.10	Nukleázová protekční analýza	31
4.2.11	Tvorba D-loop struktury.....	31
4.2.12	Bio-layer interferometrie	31
4.2.13	Pull-down analýza	32
4.2.14	Peptide array.....	32
4.2.15	Fluorescenční polarizace	32
5	Výsledky.....	34
5.1	Mutace RAD51 asociována s nádorovým onemocněním.....	34
5.1.1	DNA-vazebná afinita RAD51 F279L	34
5.1.2	Rekombinační aktivita RAD51 F279L	35
5.1.3	Kinetika tvorby RAD51 F279L vlákna a jeho stabilita.....	36
5.1.4	Interakce RAD51 F279L s mediátorem BRCA2	38
5.2	Mutace RAD51 mimikující fosforylaci proteinu.....	40
5.2.1	DNA-vazebná afinita RAD51 T309D.....	40
5.2.2	Struktura vlákna RAD51 T309D-ssDNA	42
5.2.3	Rekombinační aktivita RAD51 T309D.....	42
5.2.4	Interakce RAD51 T309D s BRCA2.....	43
5.3	Interakční doména RECQ5-RAD51	45
5.3.1	DNA-vazebná afinita RAD51	46
5.3.2	Tvorba D-loop struktury.....	47
5.3.3	Disociace RAD51 K304A z ssDNA v přítomnosti RECQ5	47
6	Diskuze.....	49
6.1	Mutace RAD51 asociována s nádorovým onemocněním.....	49
6.2	Mutace RAD51 mimikující fosforylaci proteinu.....	51
6.3	Interakční doména RECQ5-RAD51	52
7	Závěr.....	55

8	Seznam zkratek	56
9	Použitá literatura	59
10	Seznam obrázků a tabulek.....	73

1 ÚVOD

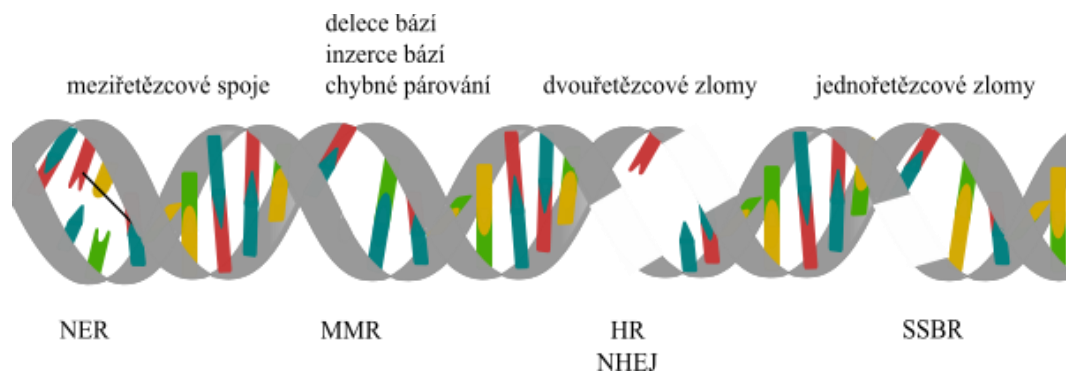
Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je molekulou potřebnou k přenosu genetické informace, ale především podmínkou k samotnému přežití buňky. Integrita DNA je však neustále narušována vlivem exogenních faktorů, především ionizujícím a ultrafialovým zářením, ale i v důsledku chyb vzniklých při replikaci a jiných endogenních faktorů. Předpokladem zachování viability buňky je přesná koordinace signálních drah vedoucích k rozpoznání poškození, pozastavení buněčného cyklu a zahájení příslušné DNA opravné dráhy.

Dvouřetězcové zlomy (DSBs) patří k nejvíce toxickým typům poškození DNA. Klíčovým mechanismem podílejícím se na jejich opravě je homologní rekombinace (HR), která využívá sesterské chromatidy jako templátu k opravě chybějící části DNA, čímž zamezuje ztrátě genetické informace. Centrální úlohu v průběhu HR má protein RAD51, jehož rekombinační aktivita však musí být v průběhu procesu striktně regulována množstvím specifických proteinů a post-translačních modifikací. Narušení DNA opravných mechanismů a následná akumulace vzniklých defektů může vést ke genomové nestabilitě a chromosomálním aberacím. A právě rozvoj genomové nestability může zapříčinit aktivaci onkogenů, podobně jako inaktivaci tumor supresorových genů, podmiňující maligní transformaci buňky i následnou progresi nádoru. Zároveň je však oprava poškození DNA nádorových buněk častou příčinnou rezistence nádoru vůči současné léčbě. Chemoterapie nadto vede k poškození rovněž ostatních, zdravých buněk. V současné době je tedy předmětem výzkumu vývoj nových léčebných přístupů, jakým je například koncept tzv. syntetické letality, který se soustředí na samotný defekt specifický pro daný typ nádoru. Tento přístup je založen na vzájemném vztahu více genů, kdy defekt v kterémkoliv z nich není sám o sobě letální, avšak mutace poškozující určitou kombinaci genů současně způsobuje buněčnou smrt. Vyvolává tím citlivost nádorových buněk na léčbu a minimalizuje poškození normálních buněk. K využití takového terapeutického potenciálu je nezbytné nejen detailní porozumění mechanismům opravy DNA, ale i odhalení molekulární podstaty vzniku nádoru.

2 TEORETICKÁ ČÁST

V lidské buňce vznikají během dne desetitisíce různých typů poškození DNA, a to vlivem působení endogenních i exogenních faktorů. [1] Příkladem faktorů z vnějšího prostředí jsou ionizující a UV záření. Mezi endogenní faktory patří chyby vzniklé při replikaci, poruchy DNA vlivem reaktivních kyslíkových forem, alkylace nebo hydrolýza bází. [2] Předpokladem zachování viability buňky je přesná koordinace signálních drah vedoucích k rozpoznání poškození, pozastavení buněčného cyklu a zahájení příslušné DNA opravné dráhy, případně buněčné smrti – apoptózy, pokud je poškození příliš velké. [1]

V závislosti na typu poškození buňka iniciuje vysoce specifickou kaskádu mechanismů opravy DNA (DDR), mezi které patří: bázeová excisní oprava (BER), nukleotidová excisní oprava (NER), oprava špatného párování (MMR) a oprava jednořetězcových zlomů v DNA (SSBR). [2,3]



Obr. 1: Poškození DNA (vytvořeno v programu Inkscape)

Pokud dojde k přerušení obou vláken DNA, vznikají tzv. dvouřetězcové zlomy (DSBs). Buňka volí mezi dvěma hlavními možnostmi jejich opravy. Jedná se o nehomologní spojování konců DNA (NHEJ) nebo homologní rekombinaci (HR). Jakým způsobem buňka reguluje volbu mezi nimi, není přesně známé, pravděpodobně záleží na druhu organismu, typu buněk daného organismu a fázi buněčného cyklu, během kterého došlo k poškození. [4] NHEJ je proces opravy DNA, který na rozdíl od HR nevyužívá při opravě homologní sekvenci DNA. Tento mechanismus eliminuje poškození přímou ligací konců opravovaného zlomu, to ovšem vede k vyššímu výskytu chyb, kdy může dojít ke ztrátě jak několika, tak tisíce nukleotidů z obou konců příslušného zlomu. [5] I přesto NHEJ zůstává dominantním mechanismem opravy DSBs u mnohobuněčných eukaryot. [6] Jelikož se tato práce věnuje centrálnímu proteinu homologní rekombinace, ochrany a restartu zastavené replikační vidlice, následující kapitoly se zabývají těmito procesy detailněji.

2.1 Homologní rekombinace

Homologní rekombinace je nepostradatelnou součástí obou buněčných dělení eukaryot. Při meióze zajišťuje patřičné rozdělení chromosomů a díky výměně genetické informace tvoří důležitý aspekt genetické variability. Při mitóze mechanismus eliminuje nejen

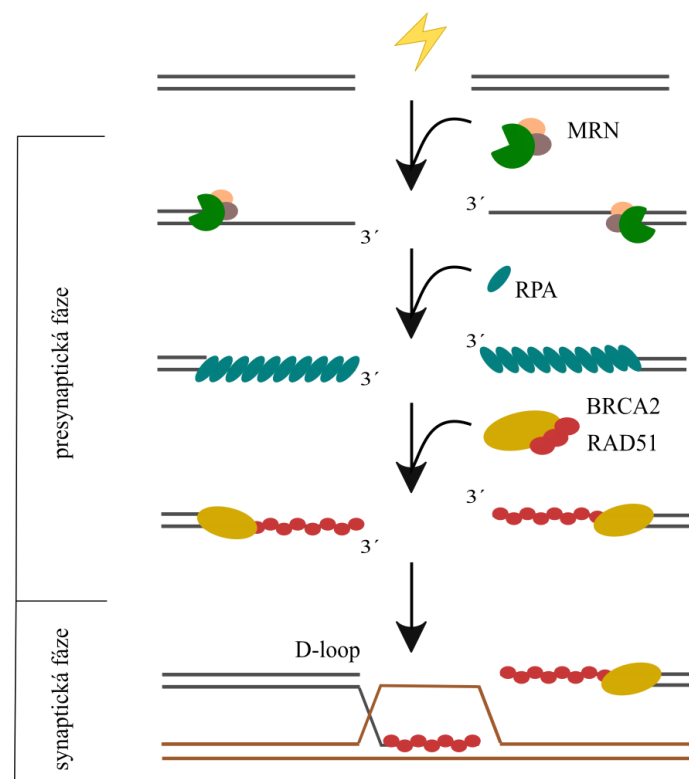
DSBs, ale podílí se i na opravě meziřetězcových spojů (ICLs). [7] HR je také zodpovědná za alternativní prodlužování telomer (ALT) nebo ochranu a obnovení replikace po zastavení replikační vidlice. [8,9] Průběh homologní rekombinace při opravě DSBs lze rozdělit do tří částí: presynaptické, synaptické a postsynaptické fáze.

Presynaptická fáze

Nejdříve dojde k rozpoznání konců zlomů komplexem proteinů MRE11-RAD50-NBS1 (MRN). MRN komplex pozastaví buněčný cyklus a skrze nukleázu MRE11 iniciuje degradaci řetězce směrem od 5' konce. [10] Na vzniklý 3' přesah se naváže jednořetězcový vazebný protein (RPA), který primárně chrání vlákno ssDNA před vznikem sekundárních struktur. [11] K vyhledání homologie a výměně řetězců musí být RPA nahrazeno rekombinázou RAD51 za vzniku nukleoproteinového vlákna. Z důvodu vyšší afinity proteinu RPA k ssDNA je výměna usnadněna funkcí proteinu BRCA2, který vzniklý RAD51 filament také stabilizuje. [7,8] Mezi další možné mediátory v presynaptické fázi HR patří paralogy proteinu RAD51 a RAD52 protein. Jejich role nicméně nebyla zatím dostatečně popsána. [12]

Synaptická fáze

Během synapse RAD51-ssDNA vlákno vyhledává na sesterské chromatidě homologii. Následuje výměna mezi řetězci, čímž vzniká struktura homologního duplexu DNA s invadujícím vláknem tzv. D-smyčka (D-loop).

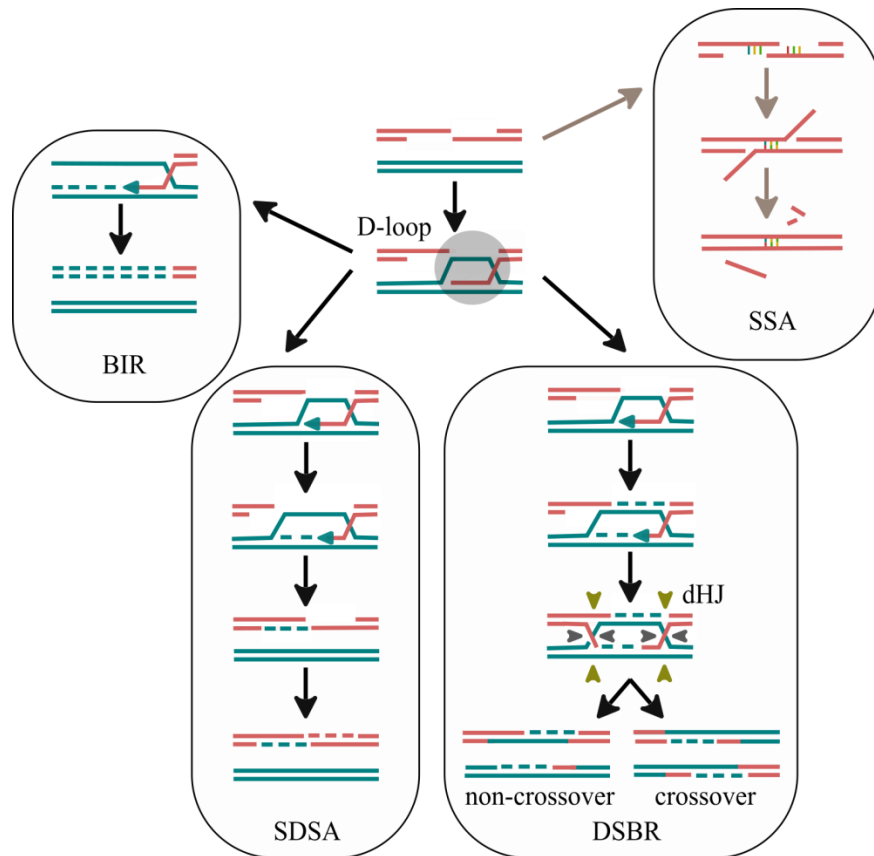


Obr. 2: Homologní rekombinace (vytvořeno v programu Inkscape)

Postsynaptická fáze

Poslední částí HR je fáze postsynaptická. Pomocí DNA polymerázy a templátu je prodlouženo invadující vlákno. V závislosti na typu poškození a fázi buněčného cyklu je oprava dokončena dle jednoho ze tří možných postupů.

Jeden z nich představuje zlomem indukovaná replikace (BIR). Ta probíhá, pokud jeden z konců zlomu chybí, například při opravách poškozené replikační vidlice. Dalším možným postupem je nasedání řetězců (SSA), kdy se komplementární úseky DNA spojí pomocí proteinu RAD52. V mitotických buňkách je preferováno nasedání komplementárních úseků závislé na syntéze DNA (SDSA), jelikož nedochází ke vzniku crossing-overů, tedy výměně části DNA mezi dvěma homologními chromozomy. [13] Oproti tomu během meiózy je crossing-over z hlediska zvýšení genetické variability výhodný. V tomto případě je tedy klasická oprava DSB (DSBR), vedoucí ke vzniku dvou Hollidayových spojů (dHJ), vhodnějším způsobem zakončení opravy DSB. [14,7]



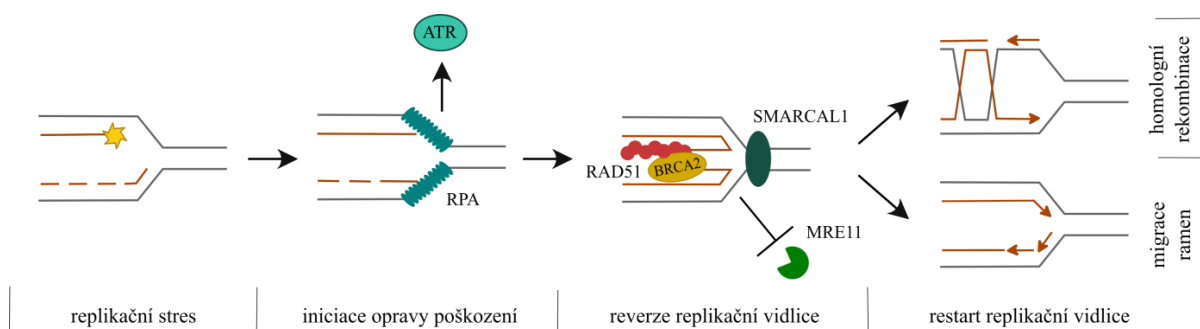
Obr. 3: Postsynaptická fáze HR (vytvořeno v programu Inkscape)

2.2 Replikační stres

Replikace DNA je jedním z klíčových procesů buněčného cyklu, kdy dochází ke zdvojení genetické informace. Mechanismus replikace je zabezpečen díky funkci komplexu proteinů zvaného replisom, jehož jednotlivé komponenty plní časově a místně definované funkce. Na počátku replikace helikáza odvíjí duplexní vlákno DNA, čímž vytváří strukturu tzv. replikační vidlice (RF). Separace vláken je udržena pomocí ssDNA vazebného proteinu RPA. V místě rozdělení vlákna dsDNA na vlákna jednořetězcová nasedají replikační faktory. DNA polymerázy následně zajišťují syntézu nových (dceřiných) vláken DNA na základě komplementarity bází ve směru 5'-3'. Zatímco syntéza vedoucího dceřiného vlákna probíhá kontinuálně, v případě antiparalelního opožďujícího se vlákna probíhá syntéza skrze Okazakiho fragmenty. [15]

Vlivem poškození nebo přítomnosti sekundárních struktur DNA (např. G-quadruplexů) může dojít k narušení postupu replikačního aparátu. [16,17] Tyto faktory mohou vést ke zpomalení nebo zastavení RF a následnému replikačnímu stresu. Buňka proto disponuje několika mechanismy, které zajišťují stabilizaci a restartování RF, čímž předcházejí jejímu kolapsu, vzniku DNA zlomů a napomáhají tak k udržení integrity genomu. [16] Mezi způsoby buněčné odpovědi na replikační stres patří ochrana, stabilizace, reverze či restart replikační vidlice, na které se hlavní měrou podílí i celá řada proteinů HR, včetně RAD51. [18]

V reakci na replikační stres se na RF akumuluje volná ssDNA, na niž se váže protein RPA, který nejenom zabraňuje vzniku sekundárních struktur, ale také se podílí na aktivaci klíčové kinázy ATR, zodpovědné za pozastavení replikace a umožnění opravy poškození. [19] RPA je následně nahrazen proteinem RAD51, který zabraňuje degradaci RF před nukleázami jako je MRE11.[20] Výměnu proteinů podobně jako při HR katalyzuje protein BRCA2. [21] RAD51 také společně s dsDNA translokázami (např. SMARCAL1) zprostředkovává reverzi pozastavené RF do struktury tzv. chicken foot, čímž stabilizuje replikační vidlici a poskytuje tak buňce dostatek času k opravě poškození. Restart replikace z revertované RF je následně zajištěn reverzí vidlice do původní struktury skrze HR nebo tzv. migraci ramen. [22]



Obr. 4: Reverze replikační vidlice (vytvořeno v programu Inkscape)

Přesnost a bezchybnost replikace je nezbytným faktorem k udržení genomové integrity. Navzdory přítomnosti regulačních mechanismů replikace mohou vznikat chyby, jejichž množství se zvyšuje v případě narušení některého z kontrolních nebo opravných procesů. Takové defekty jsou v současnosti považovány za klíčové pro vznik genomové nestability a maligní transformaci (viz kapitola 2.5). [15]

2.3 Protein RAD51

Jak již bylo uvedeno výše, zásadní roli při HR, ale i ochraně a restartu zastavené replikační vidlice má RAD51 protein. Význačnou funkci proteinu potvrzuje i skutečnost embryonální letality u myši v případě jeho absence. [23] U mnoha typů nádorů, jako karcinomu hlavy, krku nebo prostaty, byla zaznamenána zvýšená exprese RAD51 spojená s rezistencí nádoru vůči terapeutické léčbě. [24,25,26] V nádorových buňkách se často vyskytují i alterace RAD51, avšak jejich úloha v průběhu tumorigeneze není přesně známa. [27]

2.3.1 Struktura proteinu

Lidský protein RAD51 se skládá z 339 aminokyselin o celkové velikosti 37 kDa. Je konzervovaným eukaryotickým homologem bakteriálního RecA nebo proteinu Rad51 v kvasinkách. [8,28] V C-terminální doméně proteinu (CTD) se nacházejí dva motivy, které zodpovídají za vazbu a hydrolýzu ATP (Walker A a Walker B motiv). [29] CTD obsahuje také dvě flexibilní smyčky (Loop 1 a Loop 2). Na základě strukturní podobnosti u bakteriálního ortologu - RecA jsou tyto konzervované části považovány za DNA vazebná místa proteinu. [30] Primární vazebné místo je důležité při vlastním formování presynaptického vlákna. Do sekundárního vazebného místa se poté navazuje duplex DNA s homologní sekvencí. [31] N-terminální doména proteinu se rovněž podílí na vazbě DNA, avšak biologický význam této vazby není zatím znám. [32,33] Díky interakci této domény s ATPázovou doménou také sehrává podstatnou roli při regulaci vlastnosti vlákna. [34]

2.3.2 RAD51 oligomerizace a formování vlákna

RAD51 protein se bez přítomnosti DNA vyskytuje ve formě monomerů spojených do prstencových struktur, heptamerů. [35] Na DNA se RAD51 váže v poměru jednoho monomeru na přibližně tři nukleotidy a formuje pravotočivé nukleoproteinové vlákno. V přítomnosti ATP vytváří aktivní formu vlákna, která je schopná vyhledání homologní sekvence a katalýzy výměny řetězců. Vzniklé vlákno se natahuje o více než 50 % původní délky, čímž dochází ke zvýšení jeho katalytické aktivity. [36,37] Při hydrolýze ATP nastává disociace jednotlivých podjednotek z vlákna. [38] Strukturní, ale zároveň i dynamické vlastnosti vlákna společně s množstvím úloh proteinu nicméně naznačují nutnost jeho regulace (viz kapitola 2.4).

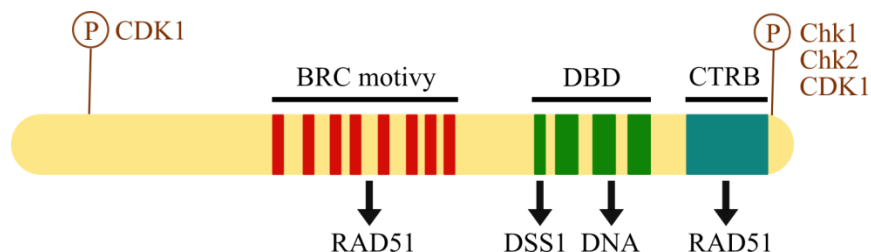
2.4 Regulace aktivity proteinu RAD51

Bezchybný průběh homologní rekombinace a restartu replikační vidlice je podmínkou pro udržení genomové integrity a buněčného přežití. Navzdory centrální roli RAD51 nukleoproteinového vlákna celý proces musí být striktně usměrňován množstvím regulačních proteinů a post-translačních modifikací.

2.4.1 BRCA2

Hlavním faktorem regulujícím funkci RAD51 při homologní rekombinaci je protein BRCA2 (3 418 aminokyselin) kódovaný tumor supresorovým genem BRCA2. [39] Mutace v tomto genu jsou asociovány s predispozicí vzniku melanomu, nádoru prostaty, tlustého střeva, žaludku, ale především karcinomu prsu a vaječníku. [40] Rakovina prsu patří mezi nejčastěji diagnostikovaná nádorová onemocnění. Karcinom vaječníku nemá tak vysokou incidenci, přesto patří mezi karcinomy s nejvyšší úmrtností. [41] Většina geneticky podmíněných nádorů prsu a vaječníku je způsobena mutací jednoho z genů BRCA1 nebo BRCA2. [42] U žen s vrozenou mutací genu BRCA2 se riziko rozvoje rakoviny vaječníku v průběhu života zvyšuje na 20 %. V případě rakoviny prsu je to dokonce více než 80 %. [43]

BRCA2 během HR a restartu pozastavené RF nejen zajišťuje nukleaci RAD51 proteinu na ssDNA, ale i usnadňuje výměnu proteinů RPA a RAD51 a vzniklé RAD51 vlákno také stabilizuje. [7,8]



Obr. 5: Struktura proteinu BRCA2 (vytvořeno v programu Inkscape)

Protein BRCA2 sestává z několika částí. Doména DBD (DNA/DSS1-binding domain) se skládá z OB foldů (oligonucleotide/oligosaccharide-binding) typických pro vazbu DNA. [44] Společně s helikální doménou také interagují s proteinem DSS1 důležitým pro stabilitu BRCA2. [45] Interakce BRCA2 s RAD51 je zprostředkována pomocí dvou vazebných domén, a to C-terminální domény (exon 27) a 8 BRC motivů (exon 11). C-terminální doména váže a stabilizuje vzniklé RAD51 vlákno, čímž zabraňuje disociaci jednotlivých podjednotek. [46] BRC1, BRC2, BRC3 a BRC4 motivy interagují s volným proteinem RAD51, brání jeho vazbě na dsDNA a inhibují RAD51-ssDNA ATPázovou aktivitu a tím stabilizují vazbu na ssDNA. [47] V rozporu s touto funkcí proteinu BRCA2 ale BRC3 a BRC4 mohou

nukleoproteinové vlákno i destabilizovat. Tyto peptidy mimikují motiv struktury proteinu RAD51, čímž udržují RAD51 v jeho monomerické formě, tedy inhibují jeho oligomerizaci a formování vlákna na DNA. [48] Oproti tomu BRC5, BRC6, BRC7 a BRC8 motivy vážou malé množství samotného proteinu RAD51, nicméně zlepšují stabilitu samotného vlákna, stejně jako je tomu v případě C-terminální domény BRCA2. [49] Každý BRC motiv se skládá z přibližně 30 aminokyselin. Mutace i v případě pouze jednoho z motivů zvyšuje riziko vzniku karcinomu. [39] Vzhledem k protikladným úlohám proteinu BRCA2 lze usoudit, že za normálních podmínek udržuje BRCA2 jednotlivé monomery RAD51 samostatně. V reakci na poškození naopak stimuluje mobilizaci rekombinázy k místům poškození. [50]

2.4.2 RAD51 paralogy

Mezi další regulátory HR patří RAD51 paralogy, které sdílí 20-30 % sekvenční shodu s proteinem RAD51, a to především v oblasti ATP vazebných motivů. [51] Lidské RAD51 paralogy vytvářejí dva komplexy: RAD51B–RAD51C–RAD51D–XRCC2 (BCDX2) a RAD51C–XRCC3 (CX3). [52] Mutace v sekvenci paralogů způsobují například chromosomální aberace nebo zvýšenou senzitivitu k DNA poškozujícím faktorům. [36] Konkrétně bíaleické mutace v RAD51C jsou asociovány s dědičným onemocněním Fanconiho anémie, monoaleické mutace v RAD51B a RAD51C s rakovinou prsu a, podobně jako v případě RAD51D, s rakovinou vaječníku. [53,54,55,56] Úplná absence paralogů je podobně jako u RAD51 nebo BRCA2 embryonálně letální. [57,58] I přesto přesný mechanismus mediátorové funkce RAD51 paralogů zatím není zcela známý.

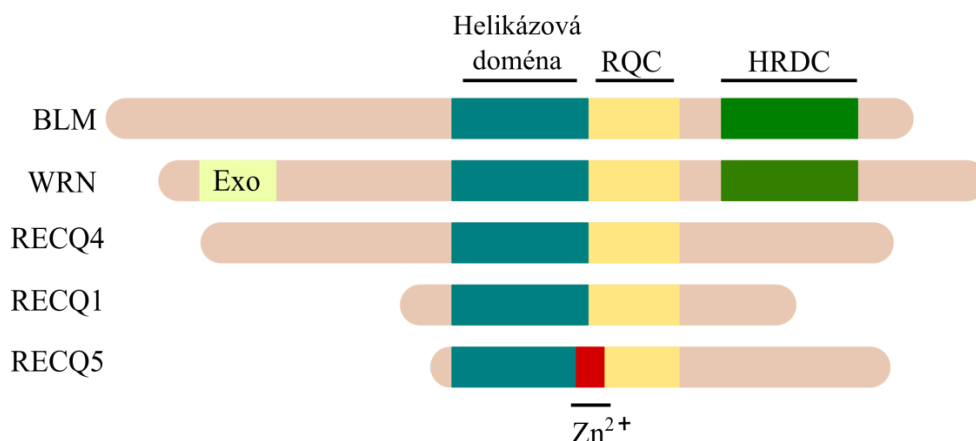
2.4.3 Negativní regulace

Homologní rekombinace je jedním z mechanismů potřebných pro udržení genomové integrity. Pokud však není tento proces zároveň negativně regulovaný, může vést k akumulaci toxických rekombinačních meziproductů a ke vzniku chromosomálních aberací. [59,60] Negativní regulace tak například zajišťuje preventivní krok předčasné a neadekvátní HR volbou alternativní DNA opravné dráhy. [7] Jedním z mechanismů regulace HR je potlačení vazby RAD51 na nepoškozenou dsDNA. Na počátku postsynaptické fáze zůstává protein RAD51 navázaný na vzniklý heteroduplex DNA, což způsobuje problém v progresi do další fáze HR. Protein RAD54 disociuje RAD51 z dsDNA, čímž poskytuje DNA polymeráze volné 3' invadující vlákno potřebné k iniciaci syntézy DNA. [61] Vzhledem k úloze RAD51 během replikace i zde musí být za účelem udržení stability RF jeho funkce striktně regulována. DNA-vazebný protein RADX reguluje množství navázaného RAD51 pomocí kompetitivní vazbu na DNA. Přebytek RAD51 v nepřítomnosti RADX zabraňuje degradaci nukleázami, čímž může dojít ke kolapsu vidlice. [62,63]

Nejlépe popsáný mechanismus regulace představuje vlastní disociace proteinu RAD51 z ssDNA skrze konformační změnu podmíněnou ATP hydrolyzou, ale také pomocí specifických proteinů – tzv. antirekombináz, které nukleoproteinové vlákno aktivně rozrušují. [7] U *S. cerevisiae* se helikáza Srs2 díky své translokázové aktivitě pohybuje po DNA, kde stimuluje ATPázovou aktivitu jednotlivých RAD51 monomerů, čímž katalyzuje jejich

postupnou disociaci. [64] Skrze regulaci vazby RAD51 antirekombináza Srs2 mimo jiné podporuje volbu SDSA dráhy, čímž předchází vzniku crossing-overů, které v somatických buňkách mohou vést ke ztrátě heterozygotnosti. [65] Na regulaci HR v lidských buňkách má vliv několik možných funkčních ortologů Srs2. Na základě sekvenční podobnosti je jedním z možných regulátorů RAD51-ssDNA vlákna helikáza FBH1, která skrze ubikvitinaci RAD51 napomáhá jeho disociaci. [66] Obdobným klíčovým regulátorem RAD51 vlákna na RF je protein PARI. Podobně jako Srs2 podněcuje uvolnění RAD51 skrze stimulaci jeho ATPázové aktivity. Na rozdíl od Srs2 však postrádá ATPázovou doménu, nemůže se tudíž pohybovat jako translokáza. [67] Další potencionální skupinu funkčních ortologů Srs2 tvoří rodina RecQ helikáz.

RecQ helikázy jsou konzervovanou skupinou náležící pod ATP-dependentní helikázy, které se pohybují po vlákně DNA ve směru 3'-5'. [68] Do jedné skupiny je pojí společná helikázová doména a RecQ karboxy-terminální doména (RQC), zodpovědná za proteinovou interakci. Většina RecQ helikáz také zahrnuje helikázovou RNázovou C-terminální doménu (HRDC) rozpoznávající různé struktury DNA. [69] Vyšší eukaryota disponují několika RecQ helikázami, v lidských buňkách mezi ně patří: BLM, WRN, RECQ4, RECQ1 a RECQ5. [68] Mutace genu pro BLM helikázu je spojena s dědičným onemocněním Bloomův syndrom. [70] V presynaptické fázi HR se BLM účastní resekce konců DSBs, ale i disociace RAD51 presynaptického vlákna. [71,72] Mimoto se BLM podílí na rozkladu dHJ, regresi a restartu zastavené RF. [73,74,75,76] Mutace v genu kódujícím helikázu WRN souvisí s autosomálně recesivním onemocněním Wernerův syndrom, způsobujícím předčasné stárnutí. Podobně jako Bloomův syndrom je i toto onemocnění spojeno s predispozicí vzniku rakoviny a chromosomální nestabilitou. [77] Helikáza WRN na rozdíl od ostatních helikáz však vykazuje i exonukleázovou aktivitu. [74,78,79] Mutace genu pro RECQ4 helikázu provází několik dědičných onemocnění, například Rothmund-Thomsonův syndrom. [80] RECQ4 je mimo jiné součástí komplexu proteinů, který při replikaci odděluje řetězce dsDNA. [81] Přestože helikáza RECQ1 není asociována s žádným dědičným onemocněním, skrze schopnost restartovat revertovanou RF se významně podílí na udržení genomové stability. [82] Ačkoli WRN, RECQ4 i RECQ1 kolokalizují s RAD51, nejsou schopny nukleoproteinové vlákno narušit. [68] Helikáze RECQ5 bude věnována následující kapitola.



Obr. 6: Skupina lidských RecQ helikáz (vytvořeno v programu Inkscape)

2.4.3.1 Helikáza RECQ5

I přestože mutace lidské RECQ5 helikázy nejsou spojeny s žádným dědičným onemocněním, myší buňky s Recq5 deficiencí vykazují zvýšenou frekvenci chromosomálních aberací a DSBs, což vede ke genomové nestabilitě a zvýšené náchylnosti vzniku nádoru. [83] V N-terminální části RECQ5 se nachází helikázová doména a v její návaznosti subdoména vazby Zn²⁺, která helikázovou aktivitu proteinu také ovlivňuje. [84,85] Následující úsek, důležitý pro vazbu DNA, představuje RQC doména. [86] V C-terminální části se nachází motivy odpovědné za interakci s proteiny, jako je PCNA nebo RAD51. [87,88]

RECQ5 patří mezi význačné regulátory HR, ale i replikace a transkripce. Během iniciační a elongační fáze transkripce RECQ5 reguluje aktivitu RNA polymerázy II (RNAPII), čímž předchází transkripčnímu stresu vyvolanému jejím zastavením. [87,89] S transkripčním komplexem protein RECQ5 asociuje v místech probíhající replikace, což naznačuje jeho možnou úlohu v případě kolize mezi replikací a transkripcí. [90] Pokud dojde k zastavení replikace, na RF se naváže protein RAD51, který zabraňuje degradaci DNA nukleázami. Tím že RECQ5 reguluje množství navázaného RAD51, zprostředkovává nedoreplikovanou DNA ke štěpení nukleázou umožňující segregaci chromozomů během buněčného dělení. [91]

I během DSB opravy prostřednictvím HR hraje RECQ5 důležitou úlohu, neboť je pomocí MRN komplexu přemístěna ke vzniklému poškození, případně zastavené replikační vidlici. [92] V průběhu rekombinace RECQ5 disociuje RAD51 z ssDNA v závislosti na jejich přímé interakci a ATPázové aktivitě helikázy. Tímto způsobem reguluje množství navázaného RAD51, esenciálního pro vyhledání homologní sekvence a tvorby D-loop struktury a brání tak potenciálně nebezpečné neregulované rekombinaci. [83] Během postsynaptické fáze RECQ5 podporuje volbu SDSA dráhy jako prevence vzniku crossing-overů. [93] I přes rozmanité úlohy proteinu RECQ5 přesný mechanismus jeho působení zatím není zcela známý.

2.4.4 Posttranslační modifikace

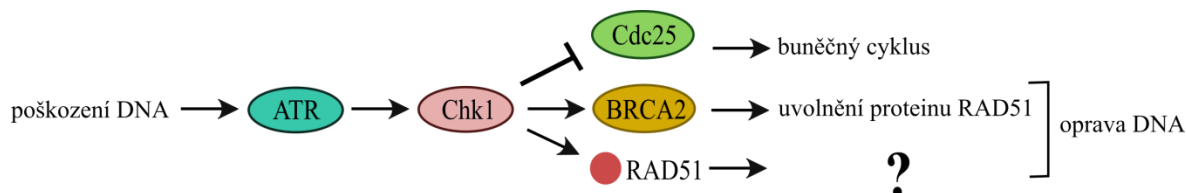
Další možnost, jak regulovat funkce proteinu RAD51, ale i jeho pozitivní a negativní regulátory, závisí na posttranslačních modifikacích, především sumoylaci, ubikvitinaci a fosforylaci. [7] Sumoylace je proces, kdy dochází ke kovalentnímu připojení signálního proteinu SUMO. Tímto způsobem byla popsána regulace akumulace RAD51 v místě poškození DNA. [94] Na podobném principu, tedy přidání proteinu ubiquitin, reguluje funkci proteinů ubikvitinace. V reakci na poškození DNA dochází k deubikvitinaci proteinů RAD51 a BRCA2. Zatímco deubikvitinace RAD51 vede k výraznější vazbě na BRCA2, deubikvitinace samotného proteinu BRCA2 zajišťuje jeho stabilizaci. Nicméně jejich přesná úloha zatím nebyla detailně popsána. [95,96]

Fosforylace značí přidání fosfátu na serin, threonin nebo tyrosin určitého proteinu. Tato reakce je katalyzována kinázami, zatímco defosforylace fosfatázami. Fosforylací se může změnit strukturní konformace proteinu, což vede například k jeho aktivaci nebo změně funkce. Aktivita proteinu RAD51 v buňce je ovlivněna třemi typy fosforylace. Checkpoint kináza 1 (Chk1) fosforyluje threonin 309, čímž reguluje odpověď na poškození DNA. [97] Fosforylace serinu 14 Polo-like kinázou 1 (Plk1) a threoninu 13 Checkpoint kinázou 2 (Chk2) umožňuje interakci s proteinem NBS1, čímž usnadňuje přemístění proteinu do místa poškození. [98] Fosforylace c-Abl/BCR-ABL tyrozinovými kinázami na místech 54 a 315 zvyšuje rekombinační aktivitu proteinu. [99] Funkci RAD51 může ovlivnit i fosforylace proteinů, které jej regulují. Například při fosforylaci threoninu 1 526 BRCA2 proteinu dochází ke snížení vazby na protein RAD51 vlivem změny v konformaci BRC motivů. [39] Obdobným příkladem je fosforylace serinu 3 291 cyklin-dependentní kinázou, která zabraňuje interakci C-terminální domény BRCA2 s proteinem RAD51. [100]

2.4.4.1 Fosforylace Chk1 kinázou

K udržení genomové integrity buňky je esenciální aktivace příslušných signálních drah, které nejen zajišťují opravu poškození, ale vyvolávají také zastavení buněčného cyklu. Chk1 je důležitým regulátorem během S a G2 fáze buněčného cyklu. [101] Aktivace této kinázy je v reakci na replikační stres zprostředkována skrze kinázu ATR. [102] Chk1 kináza zajišťuje při poškození DNA nebo narušení průběhu replikace přerušování buněčného cyklu. V případě defektu ve funkci Chk1 kinázy dochází k zamezení opravy vzniklých poškození pomocí HR. To způsobuje nashromáždění DSBs v buňce i možnou indukci buněčné smrti přerušením progresu vidlice. [97] Kinázy Chk1 a Chk2 regulují interakci RAD51-BRCA2 skrze fosforylaci C-terminální domény proteinu BRCA2 (Thr 3 387). Protein RAD51 se váže na BRCA2 prostřednictvím CTD a BRC motivy. Pokud je DNA buněk poškozena, vazba na BRC motivy se nemění, zatímco z CTD je protein RAD51 uvolněn. Mutace BRCA2 v místě fosforylace Chk1 kinázou zabraňuje uvolnění RAD51 z CTD. Tato data poukazují na možnou úlohu fosforylace Chk1 při lokalizaci RAD51 na místo poškození a jeho uvolnění potřebného k tvorbě filamentu. [103]

Chk1 kináza fosforyluje i protein RAD51, a to na místě Thr 309. Buňky s mutací v tomto místě fosforylace jsou výrazně citlivější vůči působení hydroxyurey. [97] Mutace RAD51 T309 nemá vliv na interakci s BRC motivy, na rozdíl od RAD51 WT však po UV záření nedochází k uvolnění mutovaného proteinu z CTD. Fosforylace RAD51 proteinu tedy může být důležitá i při interakci s proteinem BRCA2. [103]



Obr. 7: Fosforylace Chk1 kinázou (vytvořeno v programu Inkscape)

2.4.5 Jiné regulátory HR

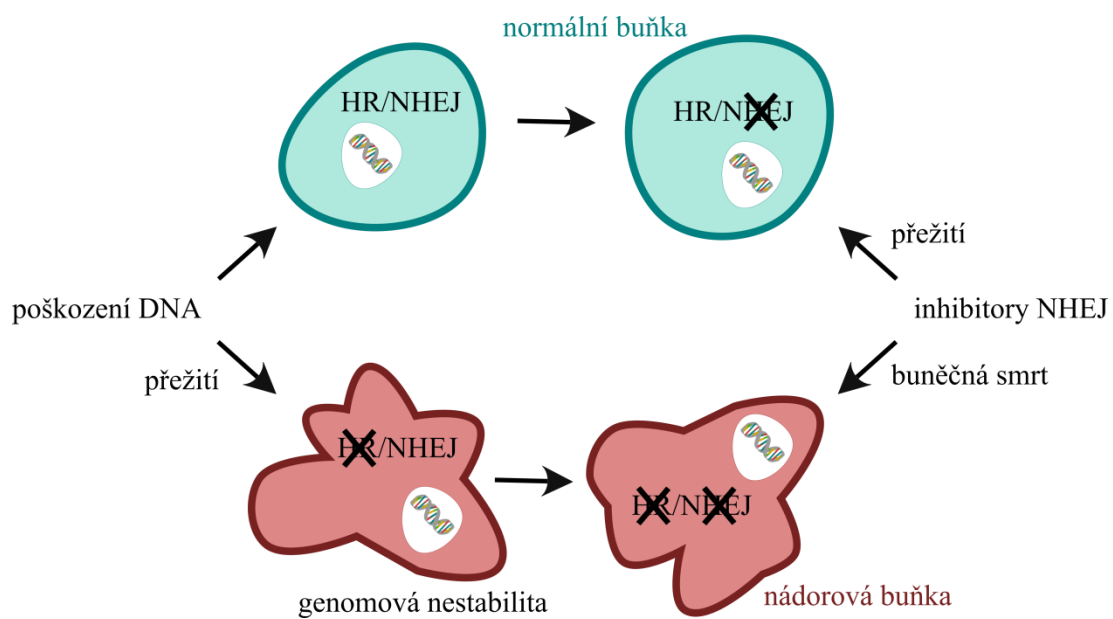
Mezi další faktory regulující HR patří heterodimer HOP2-MND1, který skrze interakci s proteinem RAD51 stabilizuje nukleoproteinové vlákno a napomáhá při tvorbě D-loop struktury zachycením dsDNA. [104] Obdobným pozitivním regulátorem HR je RAD52. Zatímco v kvasinkách tento protein výrazně usnadňuje vazbu RAD51 na ssDNA, v savčích buňkách tuto funkci zastává protein BRCA2. V případě mutace v BRCA2 však může jeho funkci alespoň částečně nahradit. [105]

2.5 Defekty v DNA opravných mechanismech

Předpokladem zachování viability buňky je přesná koordinace signálních drah vedoucích k rozpoznání poškození DNA, pozastavení buněčného cyklu a zahájení příslušné DNA opravné dráhy. Inaktivace alel genů DNA opravných proteinů je často letální již v rané embryogenezi. [23] Defekty v opravných mechanismech rovněž souvisí s dědičnými onemocněními (například Fanconiho anémie, Bloomův syndrom) a vyšším rizikem vzniku rakoviny. [47,106] Detailní porozumění mechanismům opravy DNA je tak důležitým faktorem k objasnění molekulární podstaty vzniku těchto onemocnění, ale také k zvýšení efektivity léčby.

Nejčastějšími metodami současné léčby nádorových onemocnění jsou chemoterapie a radioterapie. Avšak problémem spojeným s touto formou léčby zůstává poškození zdravých buněk a častá rezistence nádoru. Výzkum v oblasti onkologie se proto zaměřuje na vývoj nových terapeutických přístupů ke zlepšení dosavadní léčby. Jedním z nich je i koncept syntetické letality, jenž cílí na nádorové buňky prostřednictvím defektu, který jim v rané fázi karcinogeneze umožnil maligní transformaci. [1] Tento přístup je založen na vzájemném vztahu více genů, kdy defekt v kterémkoliv z nich není sám o sobě letální, avšak mutace poškozující určitou kombinaci genů současně způsobuje buněčnou smrt. Například v případě

nádorových buněk defektních v opravě pomocí HR může inaktivace alternativní opravné dráhy indukovat apoptózu. [107]



Obr. 8: Schéma syntetické letality (vytvořeno v programu Inkscape)

3 CÍLE PRÁCE

K vývoji efektivní, cílené léčby nádorových onemocnění je nezbytné pochopení buněčných mechanismů, například procesu opravy DNA, které přispívají ke vzniku nádoru, jeho následné progresi a často i rezistenci vůči dosavadní léčbě. Bezchybný průběh homologní rekombinace, ale i ochrany a restartu replikační vidlice je podmínkou pro udržení genomové integrity a buněčného přežití. Centrální úlohu při opravě DNA pomocí homologní rekombinace má protein RAD51. Navzdory jeho klíčové roli musí být celý proces striktně usměrňován množstvím regulačních proteinů a post-translačních modifikací.

Hlavním cílem mé práce bylo se pomocí biochemických a biofyzikálních metod více přiblížit pochopení mechanismu regulace rekombinázy RAD51. Z toho důvodu bylo navrženo, izolováno a charakterizováno několik RAD51 mutací, které odlišným způsobem ovlivňují jeho funkci.

- Porozumění souvislosti mutací se vznikem karcinomu a využití defektu nádorových buněk představuje terapeutický potenciál k vyvinutí efektivnější léčby. Jedním z mutantů charakterizovaných v této práci je proto mutant RAD51 F279L asociovaný s nádorovým onemocněním.
- V případě poškození dochází prostřednictvím posttranslačních modifikací k aktivaci specifických DNA opravných proteinů, mezi nimi i rekombinázy RAD51. Mechanismus, jakým jeho fosforylace vyvolává komplikovanou kaskádu dějů, nebyl doposud odhalen. Za takovým účelem byl v mé práci izolován a charakterizován RAD51 protein s mutací mimikující jeho fosforylaci (T309D).
- U mnoha typů karcinomů byla zaznamenána zvýšená exprese RAD51, spojená s rezistencí nádoru vůči současné léčbě. Terapeutický potenciál v tomto ohledu nabízí skupina antirekombináz, které negativně regulují aktivitu RAD51. Jedním z cílů tedy bylo nalézt interakční doménu RAD51 s antirekombinázou RECQ5, porovnat její umístění v souvislosti s mutacemi asociovanými s nádorovým onemocněním a porozumět samotnému mechanismu regulace RECQ5.

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Materiály

4.1.1 Chemikálie a enzymy

Appllichem	akrylamid 4K, aprotinin, benzamidin hydrochlorid, bis-akrylamid, bromfenolová modř, Coomassie Brilliant Blue, sacharóza, dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄), dithiothreitol (DTT), DNáza I, ethanol, ethyléndiamintetraoctová kyselina (EDTA), fenylmethansulfonylfluorid (PMSF), glutaraldehyd, glycerol, hydrogenfosfát didraselný, chlorid draselný, chlorid sodný, isopropyl-β-Dthiogalaktopyranosid (IPTG), kvasinkový extrakt, kyselina boritá, kyselina octová, leupeptin, metanol, Nonidet 40 (NP40), pepstatin A, peroxidisíran amonný (APS), proteináza K, síran amonný, sušené odtučněné mléko, Tris, Tris-HCl, trypton, Tween20, β-merkapt ethanol
BioRad	CHT™ keramická hydroxyapatitová matrice (HAP)
Fermentas	GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, PageRuler™ Prestained Protein Ladder; molekulová hmotnost - 10–170 kDa
Fluka	agar
GE Healthcare	glutathion-sefárové kuličky, Q-Sepharose™ Fast Flow, MonoQ
NEB	DpnI, hovězí sérový albumin BSA
Promega	10x Pfu Turbo polymerázový pufr, Pfu Turbo DNA polymeráza
Serva	agaróza, dodecylsulfát sodný (SDS), ethanol, tetramethylethyléndiamin (TEMED)
Sigma-Aldrich	ampicilin (AMP), chloramfenikol (CAM), chymostatin

Tab. 1: Chemikálie a enzymy

4.1.2 Roztoky, média a pufry

0,9 % agarózový gel	0.9 % agaróza, 1x TAE
10 % nativní TBE gel	1x TBE, 10 % akrylamid, 0.15 % APS, 0.015 % TEMED
10x PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄
10x TBE	900 mM Tris, 90 mM kyselina trihydrogenboritá, 2 mM EDTA

10x TBS	0.25 M Tris-HCl, 0,75 M NaCl, (pH 7.5)
12 % roztok pro separační gel SDS-PAGE	3 M Tris-HCl (pH 8.8), 12 % akrylamid, 0.1 % SDS, 0.09 % APS, 0.015 % TEMED
1M HAPB	1 M KH ₂ PO ₄ , 25 mM Tris-HCl, 8.7 % glycerol, 0.5 mM EDTA, (pH 7,4)
1x B pufr	10 mM Tris-HCL (pH 7.5), 10 mM KCl, 2 mM MgCl ₂
1x BLItz pufr	25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , 0.05 % Tween20
1x FP pufr	25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM KCl, 2 mM MgCl ₂
1x R pufr	25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl ₂ , 50 mM KCl, 1 mM DTT, 100 µg/mL BSA
1x TBST	5 mM Tris-HCl, 75 mM NaCl, 0.1 % Tween20
2x K pufr	40 mM K ₂ HPO ₄ , 20 % glycerol, 1 mM EDTA (pH 7.5)
2x T pufr	5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 % glycerol, 1 mM EDTA, (pH 7.5)
2x TY	2 % trypton, 1 % kvasinkový extrakt, 0.5 % NaCl
3,75 % roztok na koncentrující gel SDS-PAGE	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 3.75 % akrylamid, 0.08 % SDS, 0.071 % APS, 0.036 % TEMED
30 % akrylamid	30 % akrylamid, 0.8 % bis-akrylamid
6x Loading pufr	10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.12 % OrangeG, 60 % glycerol, 60 mM EDTA
Barvicí roztok (Coomassie)	40 % methanol, 20 % kyselina octová, 0.32 % Coomassie Brilliant Blue
Destain	40 % methanol, 20 % kyselina octová
LB médium (misky)	1 % trypton, 0.5 % kvasinkový extrakt, 1 % NaCl, 2 % agar
Lyzační pufr (CBB)	100 mM Tris-HCl, 20 % sacharóza, 4 mM EDTA (pH 7.5)
Regenerační pufr	62.5 mM Tris, 2 % SDS, 100 mM β-merkptoethanol
Směs proteázových inhibitorů (PI)	aprotinin, benzamidin, chymostatin, leupeptin, pepstatin, (5 µg/ml každý)

Tab. 2: Složení roztoků, médií a pufrů

4.1.3 Plasmidy

- plasmid Bluescript SK (metoda tvorby D-loop struktury, vyperifikovaný Mgr. Veronikou Altmannovou PhD.)

- pLK986 nesoucí lidský gen RAD51 (vektor pET-11c, AMP rezistence, Agilent Genomics)
- pLK2288 nesoucí lidský gen RECQ5 (vektor pAIO, AMP rezistence, poskytnut laboratoří Dr. Pavla Janscaka, PhD.)

4.1.4 Oligonukleotidy

Název	Délka (nt)	Použití	Sekvence 5'-3'	Modifikace
pR0027	49	EMSA, Pull-down analýza	AGCTACCATGCCTGCACGAATTAAG CAATTCGTAATCATGGTCATAGCT	Fluorescein na 5' konci
pR0231	90	Nukleázová protekční analýza, Tvorba D-loop struktury	AAATCAATCTAAAGTATATATGAGT AAACTTGGTCTGACAGTTACCAATG CTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCA GCGATCTGTCTATTT	Fluorescein na 5' konci
pR2013	43	Stabilita nukleoproteinového vlákna (BLItz)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTT	-
pR2663	43	Stabilita nukleoproteinového vlákna, Interakce s BRC3 (BLItz)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTT	Biotin na 5' konci
pR3595	31	Mutageneze RAD51 F279L (forward primer)	GATGGAGCAGCGATGTTAGCTGCTG ATCCCA	-
pR3598	31	Mutageneze RAD51 F279L (reverse primer)	TGGGATCAGCAGCTAACATCGCTGC TCCATC	-
pR3654	43	Mutageneze RAD51 T309D (forward primer)	CGTAGATTTTGCAGATTCTGTCTTCC CCTCTTCCTTTCCTCAG	-
pR3655	43	Mutageneze RAD51 T309D (forward primer)	CTGAGGAAAGGAAGAGGGGAAGAC AGAATCTGCAAATCTACG	-
pR3729	40	Mutageneze RAD51 K304A (forward primer)	AACCAGATTGTATCTGAGGGCAGGA AGAGGGGAAACCAGA	-
pR3730	40	Mutageneze RAD51 K304A (reverse primer)	TCTGGTTTCCCCTCTTCTGCCCTCA GATACAATCTGGTT	-

Tab. 3: Sekvence použitých oligonukleotidů

4.1.5 Bakteriální kmeny

- E.coli DH5 α (Invitrogene)
- E.coli Rosetta2(DE3)-pLysS (Novagen)
- E.coli ArcticExpress RIL (Agilent Technologies)

4.1.6 Komerční kity

- GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich)
- Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck)
- Vivaspin® 30 kDa MWCO (GE Healthcare)

4.1.7 Protilátky

- Primární králičí protilátky RECQ5 (1.4 µg/ml) - poskytnuty laboratoří Dr. Pavla Janscaka, PhD.)
- Sekundární kozí Anti-Rabbit IgG protilátky s konjugovanou s peroxidázou (1:10 000)

4.1.8 Proteiny

- BRC3-GST (Bc. Ondrej Beláň)
- BRC4-GST (Bc. Ondrej Beláň)
- HOP2-MND1 (Karina Zadorozhny)
- RPA (RNDr. Mário Špírek, PhD.)

4.1.9 Přístroje

- BLItz Systém (Pall ForteBio)
- Centrifugy: Avanti™ J-26 XPI (Beckman Coulter)
MiniSpin F-45-12-11 (Eppendorf)
Rotina 380R (Hettich)
Spectrafuge 24D (Labnet)
- FPLC: ÄKTA FPLC (GE Healthcare)
- Horizontální elektroforetická jednotka: SCIE-PLAS HU10 (KRD)
- Inkubátory: Innova 43R (New Brunswick scientific)
NB205 (N-Biotek, KRD)
- Laboratorní váhy: 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 (FujiFilm)
Gel Logic 212 PRO (Carestream Molecular Imaging)
Infinity F500 microplate reader (Tecan Group Ltd.)
LAS-4000 (FujiFilm)
- Termoblok: Genius Dry Bath Incubator, MD series (Major Science)
- Termostat: Miniincubator 230 V (Labnet)
- Transiluminátor bílého světla: TW26 (UVP)
- Třepačky: Eppendorf Thermomixer comfort (Labfish)
GFL 3015 (GFL)

- Ultrasonic Processor UP200S (Hilscher Ultrasound Technology)
- Vertikální elektroforetická jednotka: SE206 (Hofer)
- Vortex: Genie 2 MS1 Minishaker (IKA)
- Zdroj elektrického napětí: 300 (Labnet)

4.1.10 Software

- BLItz® Pro 1.2 software
- Carestream Molecular Imaging Software
- Fujifilm Image Reader LAS-4000
- Fujifilm MultiGauge
- I-control™ microplate reader software
- Inkscape
- Microsoft Excel
- Microsoft Word
- MO.Control software
- PyMOL
- SnapGene® Viewer
- The Benchling software
- Unicorn™ Software

4.2 Metody

4.2.1 Místně-cílená mutageneze

Mutace byla do DNA templátu vnesena pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR), založené na cyklickém střídání teplot, při kterých dochází k denaturaci plasmidu, nasedání primerů a syntéze nového komplementárního vlákna DNA. Reakční směs pro PCR obsahovala templát s inkorporovaným genem RAD51 (25 ng), forward a reverse primer (125 ng), dNTP (10 mM každý), 10x Pfu Turbo polymerázový pufr a Pfu Turbo polymerázu (2.5 U). Reakce probíhala v termocykleru podle protokolu v Tab. 4. Na závěr byly vzorky po PCR inkubovány 1 hodinu na 37°C s restričním enzymem Dpn1 (10 U), který štěpí původní metylovanou DNA.

Proces	Teplota	Doba trvání
Počáteční denaturace	95°C	90 s
Denaturace	95°C	50 s
Nasedání primerů	68/70°C	50 s
Extenze	72°C	14 min
Finální extenze	72°C	10 min
-	4°C	-

Tab. 4: Program PCR pro místně-cílenou mutagenezi

4.2.2 Buněčná transformace a izolace DNA

K amplifikaci vygenerovaného plasmidu po PCR byly použity kompetentní buňky DH5 α . K 100 μ l buněk bylo přidáno 7 μ l plasmidu a inkubováno 30 min při 4°C. Po tepelném šoku (42°C, 90 s) byly buňky opět inkubovány na ledu po dobu 5 minut. Poté byl přidán 1 ml 2x TY média a buňky s vloženým plasmidem inkubovány 45 minut při 37°C. Buňky byly následně centrifugovány (30 s, 8 000 rpm), nanесeny na misku s LB médiem a ampicilinem-AMP (0,1 mg/ml) a inkubovány při 37°C přes noc. Kolonie z transformace byly zaočkovány do 4 ml 2x TY média s AMP (0,1 mg/ml), inkubovány (37°C, 190 rpm) a druhý den izolovány pomocí kitu Miniprep (Quiagen) podle protokolu výrobce.

4.2.3 Sekvence DNA

Pro ověření přítomnosti mutace byl izolovaný plasmid zaslán na sekvenaci (Eurofins Genomics) a vyhodnocen pomocí softwaru Benchling.

4.2.4 Exprese proteinu RAD51

K expresi proteinu RAD51 byly použity buňky Rosetta2(DE3)pLysS. Kompetentní buňky (40 μ l) byly inkubovány 30 minut na ledu s 2 μ l plasmidu s mutací. Následoval tepelný šok (90 min, 42°C), inkubace 5 minut při 4°C a po přidání 1 ml 2x TY média inkubace 45 minut na 37°C. Supernatant po centrifugaci (30 s, 8 000 rpm) byl odstraněn a buňky nanесeny na misku s LB médiem, ampicilinem-AMP (0,1 mg/ml) a chloramfenikolem-CAM (0.03 mg/ml). Pět kolonií z LB misky bylo druhý den přeneseno do 200 ml 2x TY média s AMP (0,1 mg/ml) a CAM (0.03 mg/ml) a inkubováno přes noc při 37°C. Druhý den bylo 20 ml z bakteriální kultury přidáno do šesti Erlenmeyerových baněk s 2 l 2x TY média s AMP (0,1 mg/ml) a CAM (0.03 mg/ml). Buňky byly inkubovány (37°C, 190 rpm) do doby než optická hustota (OD₆₀₀) dosáhla hodnoty kolem 0.7. Exprese byla indukována přidáním IPTG (1 mM). Po 3 hodinách inkubace (37°C, 190 rpm) byly buňky centrifugovány (5 500 rpm, 10 min, 4°C) a pelet zmrazen na -80°C.

4.2.5 Exprese proteinu RECQ5

Expresní vektor obsahující gen pro RECQ5 byl transformován do kompetentních buněk ArcticExpress (DE3) RIL, s totožným postupem jako v případě exprese RAD51. Bakteriální kolonie na misce s LB médiem, AMP (0,1 mg/ml) a CAM (0.03 mg/ml) byly zaočkovány do 2x TY média s AMP (0,1 mg/ml) a CAM (0.03 mg/ml), kultivovány do doby než optická hustota (OD_{600}) dosáhla hodnoty kolem 0.7 a indukovány 1 mM IPTG přes noc při 13°C. Buněčná kultura byla centrifugována (5 500 rpm, 10 min, 4°C) a pelet zmražen na 80°C.

4.2.6 Purifikace proteinu RAD51

4.2.6.1 Buněčná lýze

Buněčný pelet byl resuspendován v lyzačním pufru CBB (1 M KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT) se směsí proteázových inhibitorů (P, L, A, B, CH, PMSF). Bakterie byly sonikovány v pěti cyklech po 10 minutách oddělených 5-10 minutami míchání na elektromagnetické míchačce při 4°C. Poté byly bakterie stočeny v ultracentrifuze (19 000 rpm, 1 hod, 4°C). Za účelem selektivního vysrážení proteinu byl k odebranému supernatantu přidán síran amonný (0.242 g/ml). Po dvou hodinách následovala opakovaná centrifugace (9 000 rpm, po 10 minut, 4°C). Pelet byl zamražen a uchován při -80°C.

4.2.6.2 Chromatografie

Na kolonu Q-SepharoseTM (iontově výměnná chromatografie, 40 ml), promytou v pufru K (1x K, 175 mM KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT), byl nanesen v totožném pufru resuspendovaný pelet. Protein byl eluován (1 ml/min, 400 ml) zvyšujícím se gradientem 0-50 % pufru K+1000 (1x K, 1000 mM KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT). Ve všech získaných frakcích byla z důvodu možné degradace proteinu přidána směs proteázových inhibitorů PI (1 000x). Vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a naneseny na hydroxyapatitovou (HAP) kolonu (afinitní chromatografie, 5 ml), promytou pufrům T+100 (1x T, 100 mM KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT). Protein byl eluován zvyšujícím se podílem HAP pufru (1 M KH_2PO_4 , 1x T, 0.01 % NP40, 1 mM DTT) vůči pufru T+100 (50 ml, 0.7 ml/min, 0-50 % pufru HAP). K jednotlivým vzorkům byla přidána směs PI. Frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a 45 minut dialyzovány ve 2 l pufru T (1x T, 0.01 % NP40, 1 mM DTT). Vzorky byly naředěny na požadovanou hodnotu konduktivity a naneseny na MonoQ kolonu (iontově výměnná chromatografie, 1 ml), která byla předtím promyta pufrům T+100 (1x T, 100 mM KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT, bez glycerolu). Protein byl eluován gradientem KCl pufru T+1000 s přidávanými proteázovými inhibitory (1x T, 1000 mM KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT, bez glycerolu) rychlostí 0.5 ml/min o celkovém objemu 20 ml. Přítomnost proteinu RAD51 byla sledována pomocí SDS-PAGE.

4.2.6.3 Koncentrování proteinu

Vybrané frakce s RAD51 proteinem byly koncentrovány pomocí kitu Vivaspin (30 kDa, 2 ml). Ke koncentrovanému proteinu byl přidán 8.7 % glycerol. Jednotlivé alikvoty byly zamrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -80°C.

4.2.7 Purifikace proteinu RECQ5

4.2.7.1 Buněčná lýze

Buněčný pelet byl resuspendován v lyzačním pufru CBB (500 mM KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT) se směsí proteázových inhibitorů. Bakterie byly sonikovány v pěti cyklech po 10 minutách oddělených 5-10 minutami míchání na elektromagnetické míchačce při 4°C a stočeny v ultracentrifuze (19 000 rpm, 1 hod, 4°C).

4.2.7.2 Chromatografie

Protein RECQ5 byl purifikován pomocí afinitní chromatografie. Supernatant odebraný po stočení v ultracentrifuze byl inkubován (2 hod, 4°C) s promytými chitinovými kuličkami. Po nanesení na kolonu byl nenavázaný protein odstraněn v průběhu opakovaného promytí pufrům T+500 (1x T, 500 mM KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT). Kolona s navázaným proteinem byla následně inkubována přes noc při 4°C v pufru T+500 (1x T, 500 mM KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT). Druhý den byl protein eluován v pufru T+150 (1x T, 150 mM KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT). Jednotlivé vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Frakce obsahující RECQ5 byly spojeny a naneseny na HAP kolonu (afinitní chromatografie, 5 ml) promytou pufrům T+150 (1x T, 100 mM KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT). Protein byl eluován zvyšujícím se podílem HAP pufru (1 M KH₂PO₄, 1x T, 0.01 % NP40, 1 mM DTT) vůči pufru T+150 (40 ml, 0.7 ml/min, 0-100 % pufru HAP). K jednotlivým vzorkům byla přidána směs PI. Frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE, naměřená konduktivita zředěna na požadovanou hodnotu a smíchané vzorky naneseny na MonoS kolonu (iontově výměnná chromatografie, 1 ml) promytou pufrům T+150 (1x T, 150 mM KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT). Protein byl eluován gradientem 0-80 % KCl pufru T+1000 s přidávanými proteázovými inhibitory (1x T, 1000 mM KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT) rychlostí 0.4 ml/min o celkovém objemu 10 ml. Přítomnost a koncentrace proteinu RECQ5 byla ověřena pomocí SDS-PAGE.

4.2.8 SDS-PAGE

Výsledná koncentrace proteinů byla stanovena pomocí elektroforetické metody SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfát - polyakrylamidová gelová elektroforéza) určující separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Pro SDS-PAGE byly použity gely skládající se ze dvou částí, a to koncentrující vrstvy a vrstvy separační, s koncentrací polyakrylamidu 10-12 %. Před nanesením byly vzorky zředěny v Laemmli pufru a vařeny po dobu 3 minut.

Elektroforéza probíhala při napětí 205 V po dobu 35 minut. Na závěr byl gel obarven v Coomassie Brilliant Blue a odbarven v roztoku Destainu.

4.2.9 Gelová retardační analýza (EMSA)

Protein RAD51 byl inkubován s fluorescenčně značeným oligonukleotidem pR0027, reakčním pufrům 5x B a ATP (2 mM) 10 minut při 37°C. Na požadované koncentrace byl protein naředěn v T+50 pufru (1x T, 50 mM KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT). Tento pufr byl doplněn i ke kontrolní reakční směsi. Po inkubaci byl za účelem stabilizace vazby přidán 0.07 % glutaraldehyd a ponechán při pokojové teplotě na 10 minut. Vzorky s dodaným 6x LB pufrům byly nanášeny na 0.9 % agarózový gel v pufru 1x TBE. Elektroforéza byla spuštěna na 50 minut, 75 V. Na závěr byl gel oskenován pomocí FLA-9000 skeneru a vyhodnocen v programu MultiGauge V3.2 software. Odchylka byla vypočtena pro tři samostatné a na sobě nezávislé pokusy.

4.2.10 Nukleázová protekční analýza

Oligonukleotid pR0231 (40 nM) značený fluoresceinem byl s proteinem RAD51 inkubován 10 minut při 37°C v pufru 5x R (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 100 µg/mL BSA) s CaCl₂ (5 mM) a ATP (2 mM). Následně byla DNA v reakci štěpena přidáním enzymu deoxyribonukleázy I (DNáza I, 2U) po dobu 20 minut při 37°C. Pomocí směsi 1 % SDS a proteinázy K (PK, 10 µg/µl) v poměru 1:1 byly proteiny denaturovány (10 minut, 37°C). K reakční směsi byl přidán nanášecí pufr 6x LB a vzorky analyzované pomocí 10 % polyakrylamidového nativního gelu v 1x TBE pufru (50 min, 95 V) byly vizualizovány a pomocí FLA-9000 scanneru.

4.2.11 Tvorba D-loop struktury

Fluorescenčně značený oligonukleotid pR0231 (40 nM) byl v pufru 5x R s ATP (2 mM), kreatin kinázou (CK) a fosfatázou (CP) inkubován (10 min, 37°C) s proteinem RAD51. Do reakce byl přidán protein HOP2-MND1, který napomáhá k vytvoření D-loop struktury. Tento protein byl 5 minut inkubován s již vytvořeným vláknem proteinu RAD51 a ssDNA při 37°C. Následně byl k reakci přidán plasmid (pBluescript 2.5 µg/µl) s částí komplementární ke značené ssDNA a inkubován při 37°C po dobu 15 minut. Reakce byla ukončena prostřednictvím směsi 1 % SDS a PK (10 µg/µl) v poměru 100:1 (10 min, 37°C). K reakční směsi byl přidán nanášecí pufr 6x LD a vzorky analyzované pomocí 0.9 % agarózového gelu v 1x TBE pufru (50 min, 95 V) byly vizualizovány FLA-9000 skenerem a vyhodnoceny programem MultiGauge V3.2.

4.2.12 Bio-layer interferometrie

Bio-layer interferometrie (BLItz) umožňuje měření biomolekulární interakce. Technologie analyzuje interferenci světla odraženého od povrchu vrstvy imobilizovaného proteinu na senzoru přístroje a vnitřní referenční vrstvy. Změna v denzitě, úměrná množství navázaných molekul na senzoru, tak umožňuje měřit kinetiku vazby biomolekul v reálném

čase. Prostřednictvím této metody bylo možné sledovat kinetiku tvorby RAD51-ssDNA vlákna, jeho stabilitu v přítomnosti konkurenční DNA (cDNA) nebo interakci s jinými proteiny. V této práci byly použity streptavidinové biosenzory, na které se po hydrataci 10 minut v pufru BLItz (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.05 % Tween20) vázal biotinem značený oligonukleotid pR2663 (120 s), protein RAD51 (240 s) a cDNA, případně BRC3 (240 s). Jednotlivé kroky byly odděleny promytím (30 s) v pufru BLItz s ATP (0.5 mM) a BSA (200 µg/ml).

4.2.13 Pull-down analýza

Metoda pull-down patří mezi *in vitro* metody umožňující analyzovat proteinové interakce. Interakce RAD51 s BRC3 motivem byla stanovena pomocí specifické vazby GST tagu na BRC peptidu a glutathionu (GTH) navázaného na sefárových kuličkách. Protein BRC-GST, v případě kontroly - dH₂O, byl inkubován s GTH-sefárovými kuličkami dvě hodiny při 4°C na rotační třepačce. Následně byla směs kuliček s navázaným BRC3 centrifugována (5 000 rpm, 3 min) a dvakrát promyta v pufru T+100 (1x T, 100 mM KCl, 0.01 % NP40, 1 mM DTT). V tomto pufru také naředěný protein RAD51 se v případě samotné proteinové interakce s BRC-GST inkuboval hodinu při 4°C. V případě interakce BRC-GST a nukleoproteinového vlákna tomuto kroku předcházela inkubace (10 min, 37°C) RAD51 (7 µM) s oligonukleotidem pR0027 (150 nM). Jako kontrola množství vloženého proteinu byla totožná koncentrace RAD51, případně RAD51-ssDNA vlákna naředěna v poměru 1:1 v Laemmlí pufru. Po navázání RAD51 na GTH-sefárové kuličky s BRC-GST byla směs centrifugována (5 000 rpm, 3 min) a supernatant naředěn v Laemmlí pufru v poměru 1:1. K opakovaně promyтым kuličkám v pufru T+100 byl přidán Laemmlí pufr. Frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (12 % polyakrylamidový gel, 203 V, 35 min).

4.2.14 Peptide array

Metoda peptidové eseje se využívá k detekci proteinové interakce skrze celulózovou peptidovou membránu. Membrána s navázanými RAD51 peptidy byla nejprve krátce promyta v metanolu a třikrát po deseti minutách promyta v pufru TBST. Jako preventivní krok nespecifickému navázání protilátek byla membrána dvě hodiny blokována v TBST pufru s 5 % sušeným mlékem. Po promytí v TBST pufru byla membrána přes noc inkubována v totožném pufru se 100 µg proteinu RECQ5. Druhý den byla membrána opakovaně promyta v TBST a inkubována pět hodin s primárními králičími RECQ5 protilátkami (0.1 µg/ml). Následně byla membrána promyta v pufru TBST a inkubována hodinu se sekundárními Anti-Rabbit IgG protilátkami s konjugovanou peroxidázou (1:10 000). Interakční doména RECQ5-RAD51 byla detekována pomocí kitu Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate a skeneru LAS-4000. Regenerace membrány byla provedena dle protokolu výrobce.

4.2.15 Fluorescenční polarizace

Fluorescenční polarizace (FP) patří mezi fluorimetrické metody umožňující detekovat interakci proteinu s peptidem. Metoda využívá změn polarizace způsobené rozdílnou rychlostí

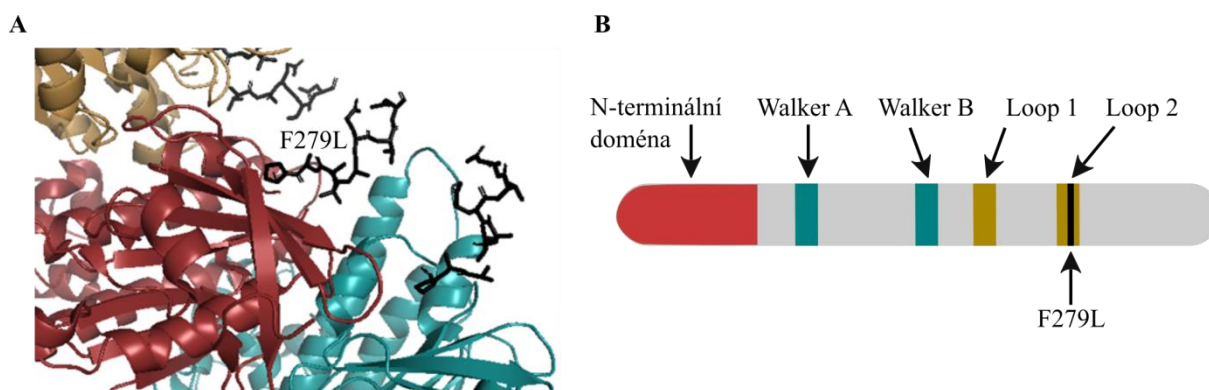
rotace peptidu samotného oproti peptidu s navázaným proteinem. Fluorescenčně značené peptidy BRC3 a BRC4 byly, podobně jako protein RAD51, naředěny v pufru 1x FP (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM KCl, 2 mM MgCl₂). Fluorescencenční polarizace byla bezprostředně měřena pomocí skeneru Infinity F500 microplate reader (Tecan Group Ltd.).

5 VÝSLEDKY

5.1 Mutace RAD51 asociována s nádorovým onemocněním

Defekty v DNA opravných mechanismech jsou mnohdy asociovány s nádorovými onemocněními. K pochopení souvislosti vzniku nádoru je nutné odhalení mechanismu, kterým mutace v DDR zvyšují genomovou nestabilitu, vytváří mutagenní prostředí a skrze akumulaci mutací určují nové vlastnosti buňky. Z toho důvodu byla k bližší charakterizaci zvolena mutace proteinu RAD51 (substituce aminokyselin fenylalaninu za leucin na pozici 279 – F279L), nalezená v nádoru endometria. [108]

Mutace F279L se nachází v konzervované části C-terminální domény RAD51, konkrétně v místě flexibilní smyčky Loop 2 (Obr. 9A a B). Na základě strukturní podobnosti RAD51 ortologů je tato část považována za DNA vazebné místo proteinu, esenciální během fáze presynaptické, ale i při výměně řetězců v průběhu synapse. [30]



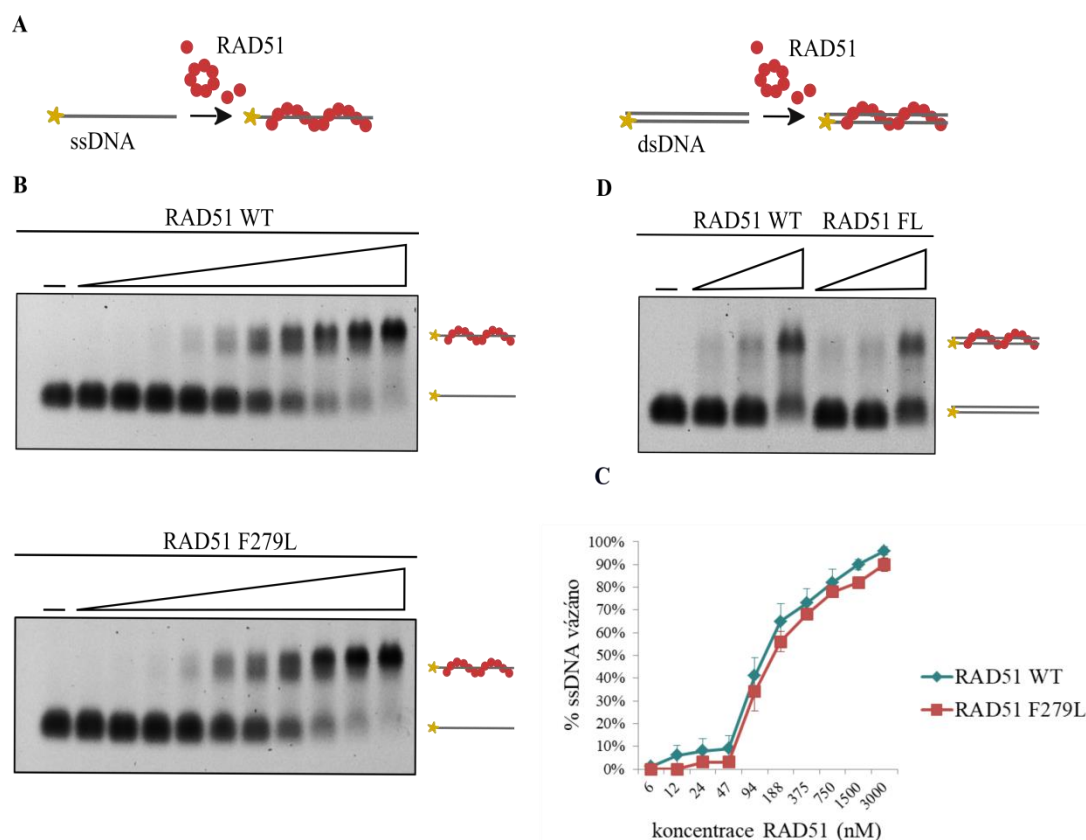
Obr. 9: **Struktura RAD51 F279L** (A) Struktura RAD51 s označením mutace F279L. Jednotlivé podjednotky oligomeru jsou odlišeny barevně (žlutá, červená a modrá), oblast smyčky Loop 2 je označena černou barvou (vytvořeno pomocí softwaru PyMOL™). (B) Schematické znázornění mutace F279L v konzervované části proteinu RAD51, DNA vazebném místě Loop 2.

5.1.1 DNA-vazebná afinita RAD51 F279L

Mutace F279L by vzhledem ke svému umístění mohla způsobit defekt v samotné vazbě RAD51 na DNA. To by mohlo mít za následek pokles v efektivitě proteinu během rekombinace, ale i při ochraně replikační vidlice. Pro porovnání DNA vazebné afinity proteinu byla zvolena gelová retardační esej (EMSA), založená na elektroforetickém dělení. Fluorescenčně značená ssDNA, případně značená dsDNA, byla inkubována se zvyšující se koncentrací RAD51 (Obr. 10A). Vytvořené nukleoproteinové vlákno bylo vzhledem ke své velikosti při průchodu agarózovým gelem oproti samotné DNA zpomalené.

Z porovnání vazebné aktivity divokého kmene RAD51 a F279L mutanta vyplývá, že i navzdory své lokalizaci, nenarušila tato mutace vazbu proteinu na jednořetězcovou

(Obr. 10B a C) i dvouřetězcovou DNA (Obr. 10D). Defekt DNA-vazebné aktivity RAD51 tedy není zodpovědný za asociaci této mutace s příslušným nádorovým onemocněním.



Obr. 10: **DNA vazebná afinita RAD51 F279L** (A) Schematické znázornění experimentu (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Porovnání ssDNA vazebné afinity RAD51 F279L s RAD51 WT. Zvyšující se koncentrace RAD51 (v rozmezí 6 až 3000 nM) byla inkubována s fluorescenčně značeným oligonukleotidem (10 nM). Vazba ssDNA-RAD51 byla následně stabilizována pomocí glutaraldehydu (cross-link). (C) Kvantifikace DNA vazebné afinity se směřodatnou odchylkou; na základě tří na sobě nezávislých experimentů. (D) Porovnání dsDNA vazebné afinity RAD51 F279L s RAD51 WT. Zvyšující se koncentrace (0,5, 1 a 2 μ M) byla inkubována s fluorescenčně značenou dsDNA (10 nM). Vazba dsDNA-RAD51 byla následně stabilizována pomocí glutaraldehydu (cross-link).

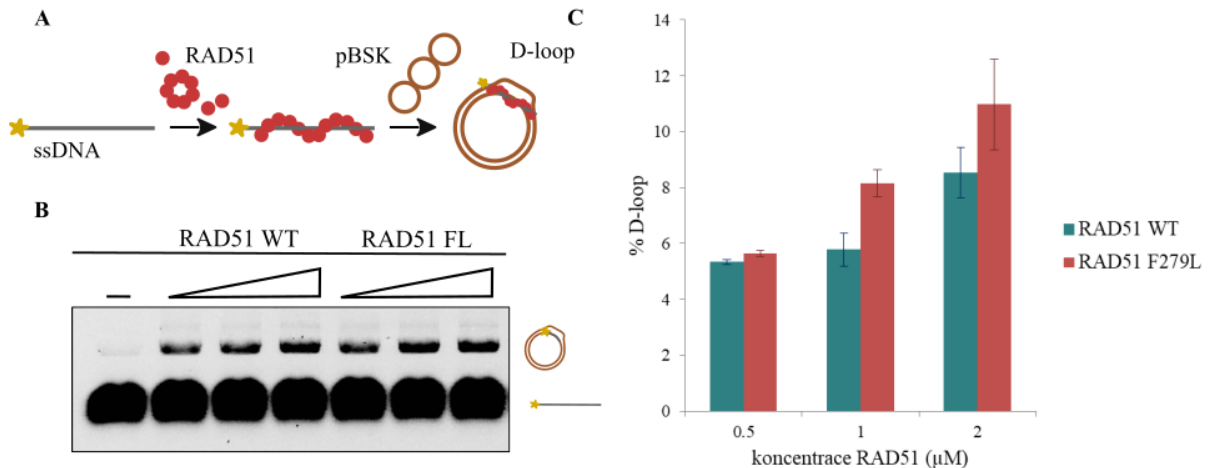
5.1.2 Rekombinační aktivita RAD51 F279L

Centrální roli během HR představuje RAD51 nukleoproteinové vlákno, které v přítomnosti ATP vytvoří aktivní formu vlákna schopnou vyhledávat na sesterské chromatidě homologní sekvenci a katalyzovat výměnu řetězců. V průběhu tohoto procesu vzniká struktura homologního duplexu DNA s invadujícím vláknem tzv. D-loop. Pokud by mutace F279L narušila rekombinační funkci RAD51, buňka by byla nucena opravit poškození pomocí jiné, potenciálně mutagenní DNA opravné dráhy. Tímto by docházelo k akumulaci poškození, potřebné v progresi buňky do maligního stavu.

Pomocí metody analýzy tvorby D-loop struktury *in vitro*, která simuluje mechanismus HR, byl dále testován mutant F279L. Poté co se vytvořilo aktivní nukleoproteinové vlákno,

byla reakce doplněna plasmidem obsahujícím komplementární úsek DNA (Obr. 11A). Vzniklý komplex o vyšší molekulární hmotnosti byl při průchodu agarózovým gelem oproti samotné DNA zpomalen.

Rekombinační úloha proteinu, jak je patrné z výsledku analýzy tvorby D-loop struktury, nebyla mutací narušena, neboť i se zvyšující se koncentrací konstantně narůstá i množství vytvořeného komplexu podobně jako v případě divokého kmene (Obr. 11B). V případě vyšších koncentrací RAD51 F279L je naopak množství D-loop produktu nepatrně vyšší než u přirozené formy proteinu (Obr. 11C).

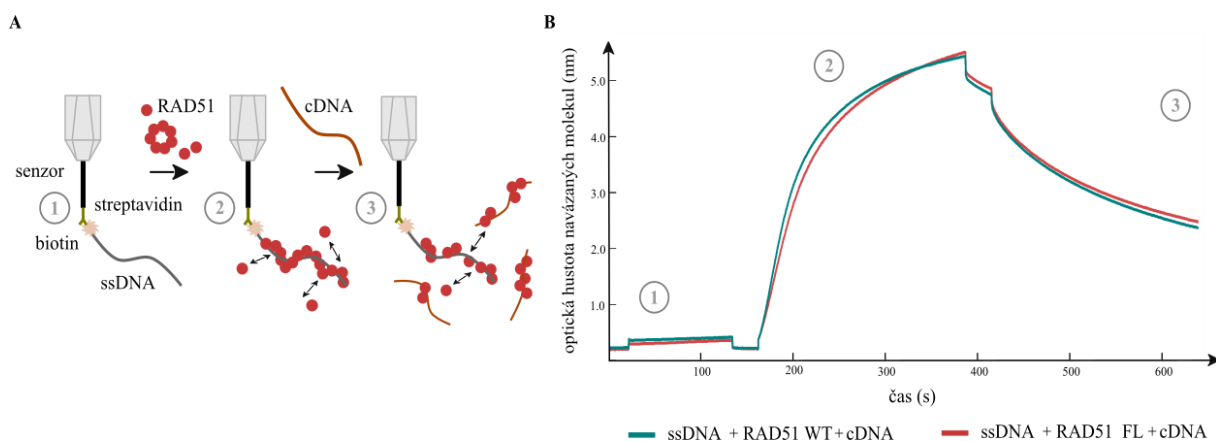


Obr. 11: **Analýza tvorby D-loop struktury RAD51 F279L** (A) Schematické znázornění experimentu (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Analýza tvorby D-loop struktury RAD51 F279L v porovnání s RAD51 WT. Zvyšující se koncentrace RAD51 (0,5, 1 a 2 μM) byla inkubována s fluorescenčně značeným oligonukleotidem (20 nM) a proteinem HOP2-MND1 (300 nM), který napomáhá při tvorbě D-loop struktury zachycením dsDNA (pBSK). (C) Kvantifikace analýzy tvorby D-loop struktury se směrodatnou odchylkou; na základě tří na sobě nezávislých experimentů.

5.1.3 Kinetika tvorby RAD51 F279L vlákna a jeho stabilita

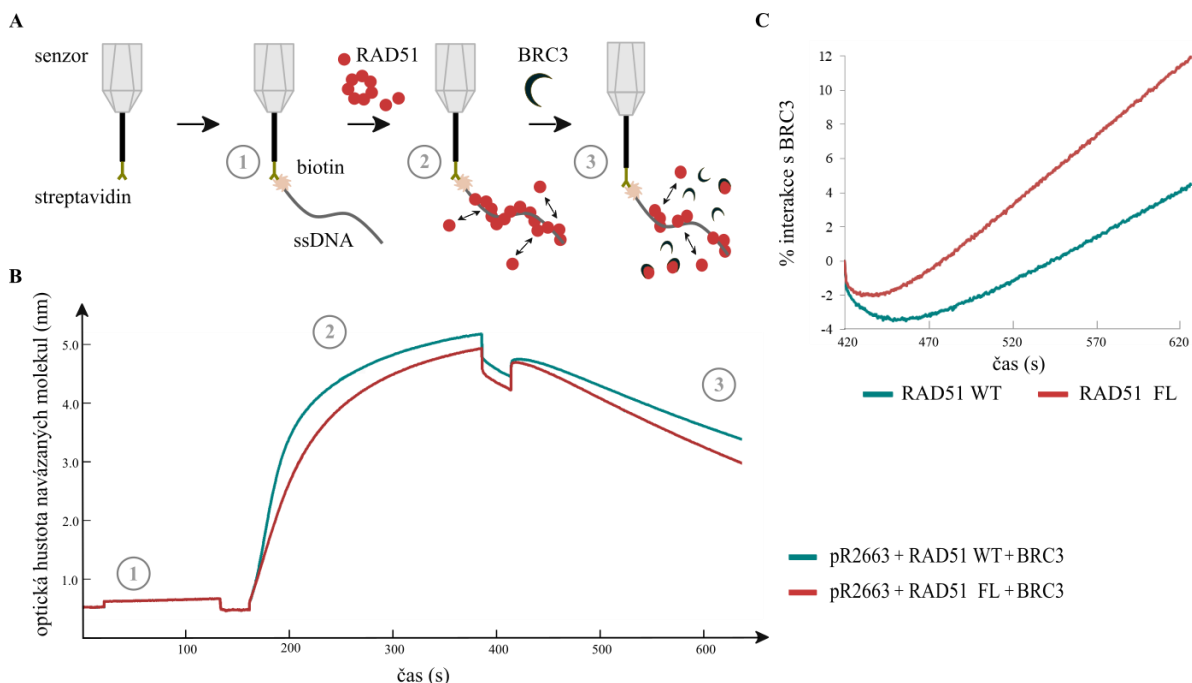
Vlivem hydrolýzy ATP dochází k neustálé disociaci RAD51 z ssDNA. Pokud je v přítomnosti RAD51-ssDNA vlákna i jiný oligonukleotid, disociované podjednotky proteinu se mohou vázat i na konkurenční DNA (cdNA). V takovém případě dochází k narušení stability původního vlákna. Stabilita byla RAD51 F279L-ssDNA v přítomnosti nadbytku neznačené cdNA analyzována pomocí metody BLI. K streptavidinovým biosenzorům s navázaným biotinylovaným oligonukleotidem (Obr. 12A, fáze 1) byl ve druhém kroku přidán protein RAD51 (fáze 2). Poté (fáze 3) bylo vytvořené vlákno destabilizováno nadbytkem neznačené DNA.

Na základě výsledku BLI analýzy lze odvodit, že stabilita vlákna RAD51-ssDNA nebyla v přítomnosti cdNA mutací F279L narušena. Disociační křivka (3) RAD51 F279L je totožná s RAD51 WT. Prostřednictvím této metody lze pozorovat i kinetiku tvorby nukleoproteinového vlákna (2), která je v porovnání RAD51 F279L vůči RAD51 WT také obdobná, což zároveň potvrzuje data z analýzy EMSA (Obr. 12B a 10B).



Obr. 12: **Kinetika tvorby RAD51 F279L vlákna a jeho stabilita v přítomnosti cDNA** (A) Schematické znázornění experimentu (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Analýza kinetiky tvorby vlákna RAD51 F279L (1.5 μ M)-ssDNA (40 nM) a jeho stability v přítomnosti nadbytku neznačené DNA (400 nM).

Biologicky více relevantní strategií ovlivňující stabilitu vlákna je destabilizace prostřednictvím BRC motivů (fragments BRCA2), které interagují s jednotlivými monomery RAD51, čímž zabraňují jejich opětovné vazbě na DNA. K streptavidinovým biosenzorům s navázaným biotinylovaným oligonukleotidem (Obr. 13A, fáze 1) byl ve druhém kroku přidán protein RAD51 (fáze 2). Na závěr (fáze 3) bylo vytvořené vlákno destabilizováno BRC3 peptidem.



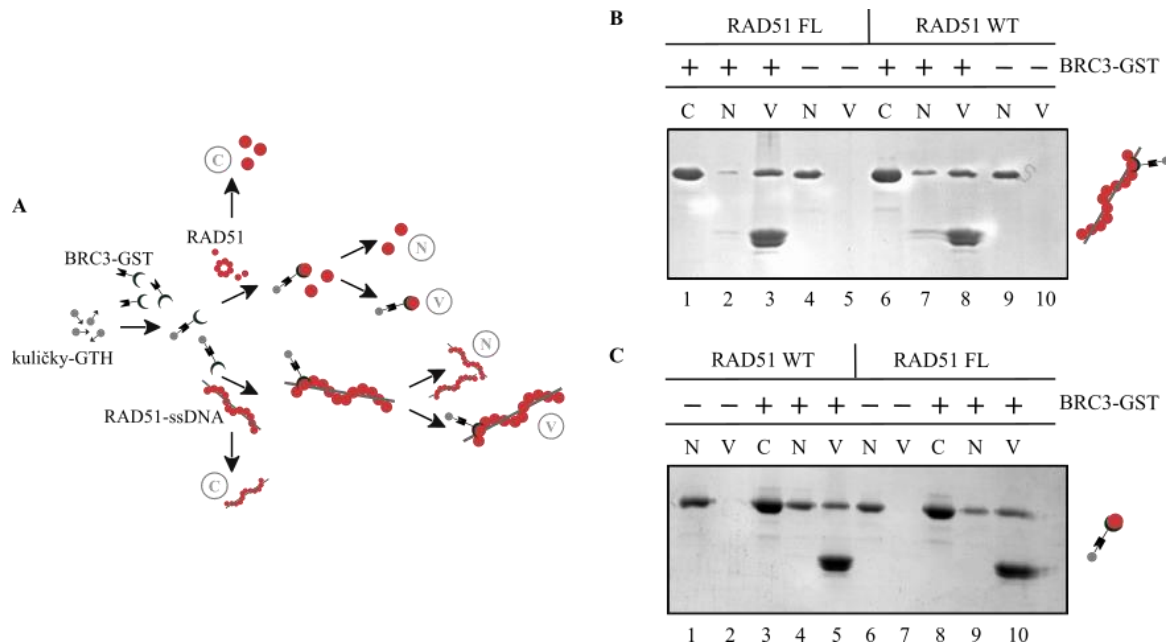
Obr. 13: **Destabilizace RAD51 F279L-ssDNA vlákna prostřednictvím BRC3 peptidu** (A) Schematické znázornění experimentu (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Interakce nukleoproteinového vlákna ssDNA (40 nM)-RAD51 F279L/WT (1.5 μ M) s BRC3 peptidem (1.5 μ M). (C) Kvantifikace míry disociace RAD51 z ssDNA v přítomnosti BRC3 motivu; na základě dvou na sobě nezávislých experimentů.

Přestože mutace nenarušila stabilitu vlákna RAD51-ssDNA v přítomnosti cDNA (Obr. 12B), procento disociace RAD51 F279L z ssDNA vlivem BRC3 peptidu je v porovnání s RAD51 WT vyšší (Obr. 13B a 13C). Tento výsledek naznačuje změnu v interakci s hlavním rekombinačním mediátorem BRCA2. Na základě této metody však nelze s jistotou určit, zda má mutace vliv pouze na interakci BRC motivu s RAD51-ssDNA vláknem nebo zda je interakce specifická již pro samotný protein RAD51.

5.1.4 Interakce RAD51 F279L s mediátorem BRCA2

Dle výsledků předchozí kapitoly byla vazba proteinů RAD51 F279L-BRCA2 zkoumána detailněji. V průběhu presynaptické fáze HR je výměna RAD51 se ssDNA vazebným proteinem RPA v buňce katalyzována mediátorem BRCA2 a to prostřednictvím dvou interakčních domény: skupiny osmi BRC motivů a C-terminální doménou BRCA2 (exon 27).

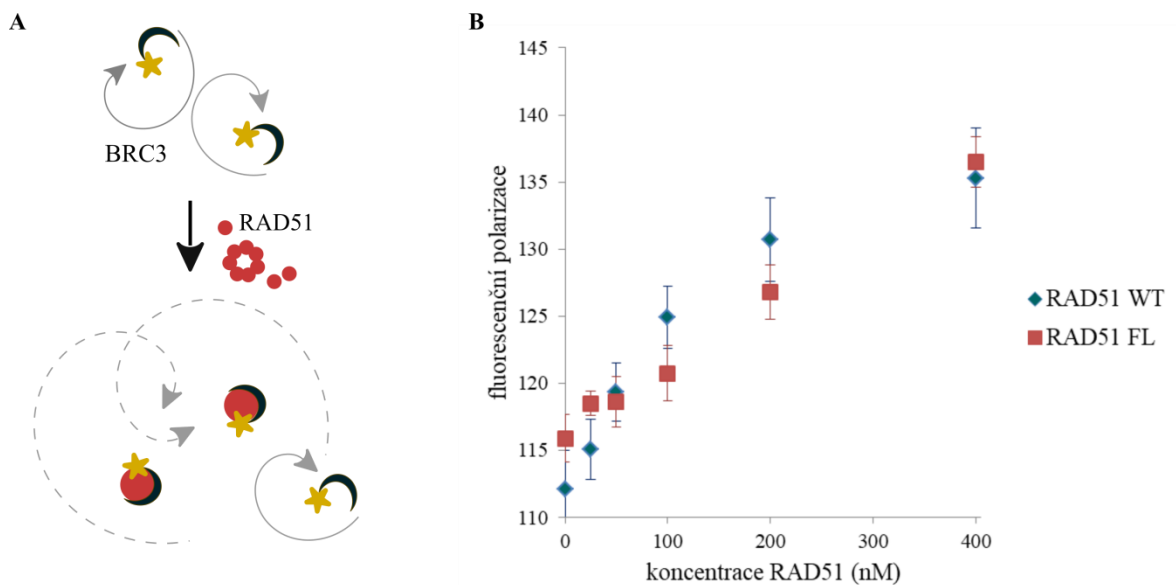
Interakce BRC3 peptidu s proteinem RAD51, případně vláknem RAD51-ssDNA, byla porovnána metodou pull-down. Glutathion-sefárové kuličky s navázaným GST-BRC3 peptidem byly inkubovány s proteinem RAD51, případně nukleoproteinovým vláknem. Následně byly kuličky promyty puforem, aby se oddělil nenasazený RAD51 (N-frakce) od proteinu vázaného (V-frakce). Kontrola množství proteinu přidaného do reakce byla označena jako C-frakce. Souběžně byla provedena také negativní kontrola, která vyloučila možnost nespecifické vazby RAD51 na kuličky s glutathionem. Frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 14A).



Obr. 14: **Analýza interakce RAD51 F279L a BRC3-GST pomocí pull-down metody** (A) Schematické znázornění experimentu (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Analýza interakce BRC3-GST peptidu s RAD51-ssDNA vláknem. Sloupce 4-5 a 9-10 zobrazují negativní kontrolu vazby RAD51-ssDNA vlákna na kuličky s glutathionem. Sloupce 1-3 a 6-8 znázorňují interakci nukleoproteinového vlákna s BRC3-GST. (C) Analýza interakce BRC3-GST peptidu s proteinem RAD51. Sloupce 1-2 a 6-7 zobrazují negativní kontrolu vazby RAD51 na kuličky s glutathionem. Sloupce 3-5 a 8-10 znázorňují interakci RAD51 s BRC3-GST.

Z výsledku analýzy pomocí metody pull-down není patrný jednoznačný rozdíl mezi RAD51 WT a RAD51 F279L, a to v případě nukleoproteinového vlákna (Obr. 14B), ale také v případě samotného proteinu (Obr. 14C). Pro bližší analýzu interakce byla rovněž zvolena senzitivnější esej, a to metoda detekující změnu fluorescenční polarizace značeného peptidu BRC3 s navázaným RAD51. Samotný peptid, vzhledem ke své velikosti, rotuje vyšší rychlostí v porovnání s peptidem s navázaným proteinem. Změna rychlosti pohybu po navázání RAD51 na BRC3 peptid značí rozdíl ve výsledné fluorescenční polarizaci peptidu (Obr. 15A).

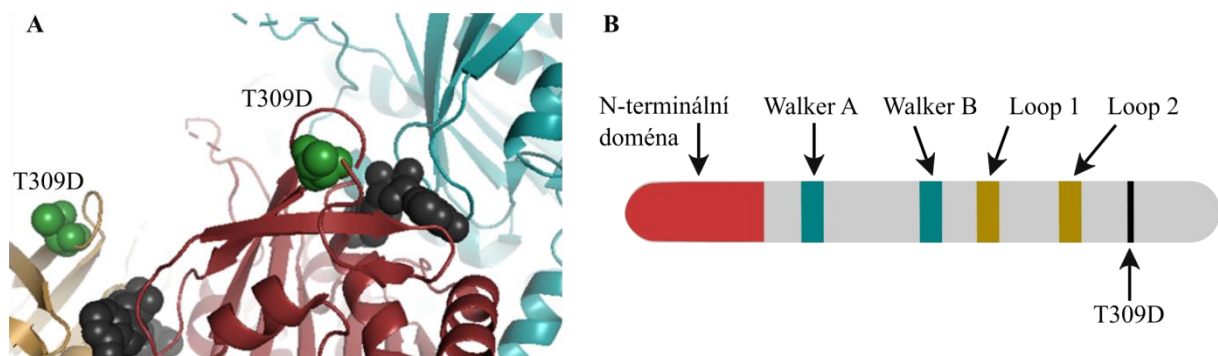
Zvyšující se koncentrací RAD51 se konstantně mění i fluorescenční polarizace peptidu. Afinita RAD51 F279L vůči BRC3 je však podobná jako u RAD51 WT (Obr. 15B). Mutace F279L tedy nezpůsobuje defekt v interakci RAD51 s BRC3.



Obr. 15: Analýza interakce RAD51 F279L a BRC3 peptidu skrze detekci fluorescenční polarizace (A) Schematické znázornění experimentu (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Detekce změny fluorescenční polarizace značeného BRC3 peptidu (100 nM) při zvyšující se koncentraci proteinu RAD51 (25 nM - 400 nM); se směrodatnou odchylkou; na základě tří na sobě nezávislých experimentů.

5.2 Mutace RAD51 mimikující fosforylaci proteinu

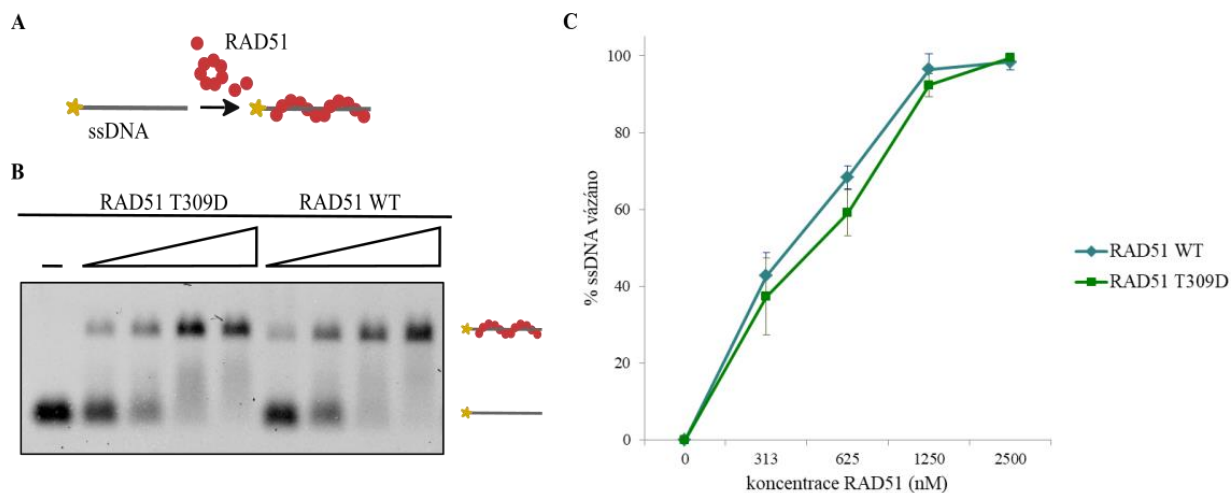
Aktivita proteinu RAD51 může být ovlivněna posttranslačními modifikacemi, například fosforylací. V reakci na poškození DNA je protein RAD51 fosforylován na pozici Thr 309 kinázou Chk1. Buňky s mutací v tomto místě fosforylace jsou výrazně citlivější vůči působení látek toxických pro DNA. [97] Přestože mechanismus vyvolaný fosforylací proteinu je důležitým krokem pro jeho následnou aktivitu, přesná úloha fosforylace zatím není známá. Z toho důvodu byl vygenerován protein RAD51 mimikující fosforylaci - substitucí threoninu kyselinou asparagovou (RAD51 T309D).



Obr. 16: **Struktura RAD51 T309D** (A) Struktura RAD51 se zaznačením mutace T309D (zelená). Jednotlivé podjednotky heptameru jsou odlišeny barevně (žlutá, červená a modrá), oblast vazby ATP je označena černou barvou (vytvořeno pomocí softwaru PyMOL™). (B) Schematické znázornění mutace T309D v C-terminální části proteinu RAD51.

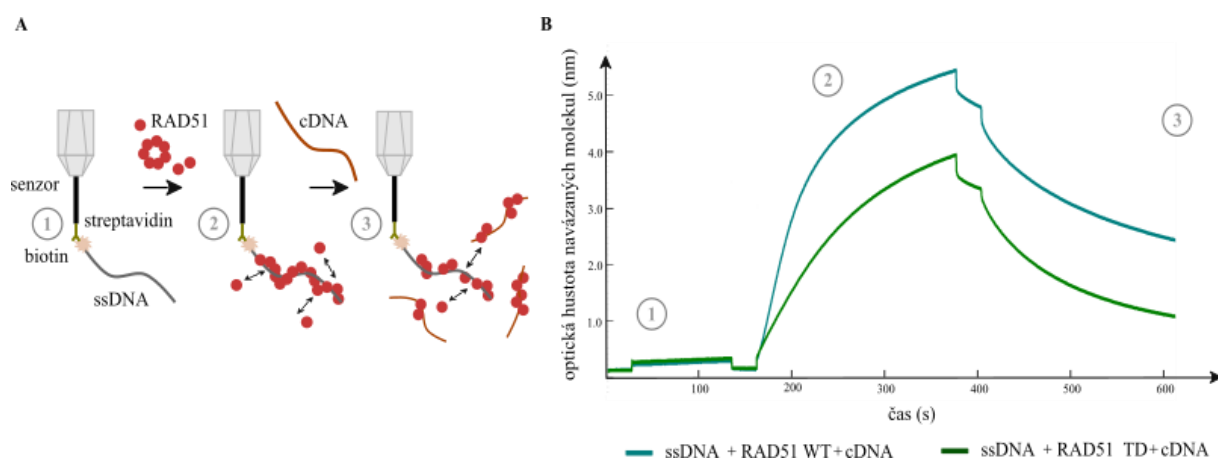
5.2.1 DNA-vazebná afinita RAD51 T309D

Mutace T309D se nachází v C-terminální části proteinu, v blízkosti místa vazby DNA, ATP a interakce jednotlivých monomerů RAD51 (Obr. 16A a B). Mutace by tedy potenciálně mohla narušit některou ze zmíněných vlastností RAD51 proteinu, a tím ovlivnit i jeho funkci. Pro porovnání DNA-vazebné afinity proteinu byla zvolena gelová retardační esej (EMSA). Fluorescenčně značená ssDNA byla inkubována se zvyšující se koncentrací RAD51 (Obr. 17A). Vytvořené vlákno RAD51-DNA bylo vzhledem ke své velikosti při průchodu agarózovým gelem oproti samotné DNA zpomaleno. Nicméně žádný patrný rozdíl v DNA-vazebné afinitě RAD51 T309D v porovnání s RAD51 WT nebyl pozorován (Obr. 17B).



Obr. 17: **DNA vazebná afinita RAD51 T309D** (A) Schematické znázornění experimentu (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Porovnání ssDNA vazebné afinity RAD51 T309D s RAD51 WT. Zvyšující se koncentrace RAD51 (v rozmezí 313 až 2500 nM) byla inkubována s fluorescenčně značeným oligonukleotidem (10 nM). (C) Kvantifikace DNA vazebné afinity se směrodatnou odchylkou, na základě tří na sobě nezávislých experimentů.

Na druhou stranu analýza kinetiky tvorby RAD51 T309D vlákna pomocí metody BLI (Obr. 18B, fáze 2) ukazuje zřejmý signifikantní úbytek optické hustoty navázaných molekul na senzoru oproti RAD51 WT, což naznačuje možnou změnu ve struktuře proteinu. Stabilita vlákna (fáze 3) RAD51 T309D byla porovnána s přirozenou formou proteinu RAD51 v přítomnosti cDNA (Obr. 18A). Disociace vlákna potenciálně fosforylovaného proteinu je obdobná jako v případě RAD51 WT-ssDNA (Obr. 18B).

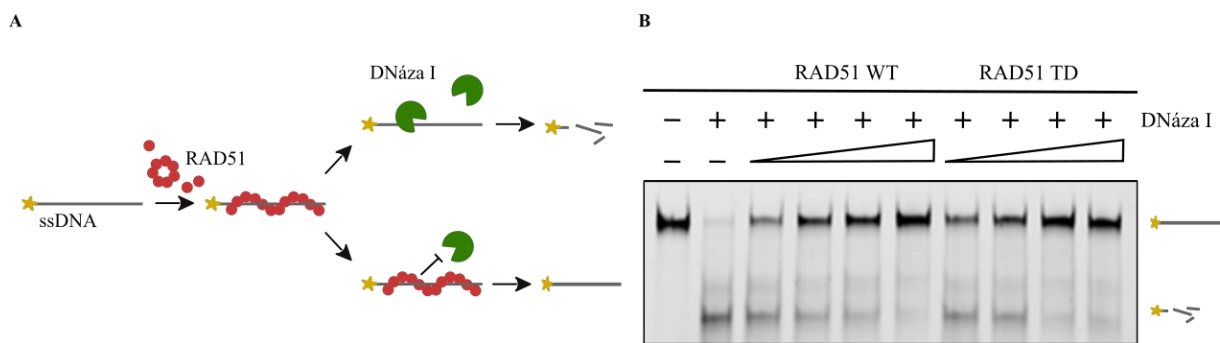


Obr. 18: **Kinetika tvorby RAD51 T309D vlákna a jeho stabilita v přítomnosti cDNA** (A) Schematické znázornění experimentu (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Analýza kinetiky tvorby vlákna RAD51 T309D (1.5 μ M)-ssDNA (40 nM) a jeho stability, tedy disociace RAD51 z ssDNA v přítomnosti cDNA (400 nM).

5.2.2 Struktura vlákna RAD51 T309D-ssDNA

Výsledek analýzy kinetiky tvorby RAD51 T309D vlákna naznačuje změnu v jeho organizaci ve srovnání s RAD51 WT, z toho důvodu byla následně struktura vlákna porovnána s RAD51 WT v souvislosti s ochranou před štěpením nukleázou DNáza I (Obr. 19A).

Inkubace fluorescenčně značené DNA s rostoucí koncentrací RAD51 WT a T309D proteinu vedla ke srovnatelné ochraně před působením nukleázy DNáza I, z čehož vyplývá, že struktura vlákna proteinu mimikujícího fosforylaci je navzdory předešlým výsledkům obdobná (Obr. 19B).

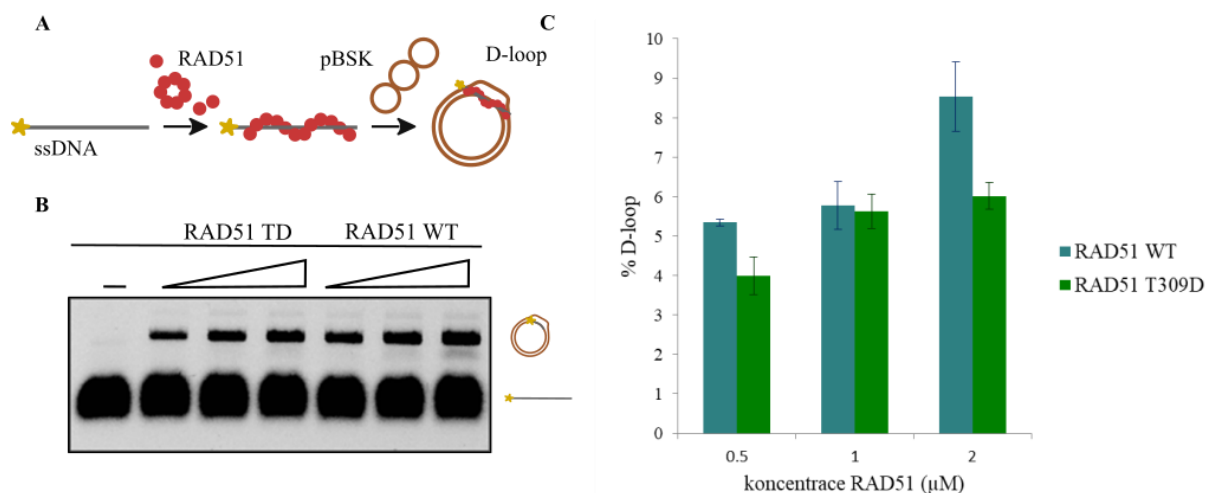


Obr. 19: **Analýza protekční aktivity RAD51 T309D vůči nukleolytické degradaci** (A) Schematické znázornění experimentu (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Analýza schopnosti prevence RAD51 vůči štěpení DNA nukleázou. První sloupec představuje kontrolu samotné DNA, druhý sloupec naštěpenou DNA v přítomnosti nukleázy DNáza I. Následující sloupce zobrazují zvyšující se koncentrace RAD51 WT v porovnání s RAD51 T309D (0.5 μ M - 4 μ M).

5.2.3 Rekombinační aktivita RAD51 T309D

Vzhledem k umístění mutace T309D, na pomezí podjednotek oligomeru, mohla být substitucí narušena jeho rekombinační aktivita. K porovnání funkce RAD51 při vyhledání homologní sekvence a katalýzy výměny řetězců byla zvolena metoda monitorující tvorbu D-loop struktury. Poté co se vytvoří aktivní nukleoproteinové vlákno byla reakce doplněna plasmidem s komplementárním úsekem DNA (Obr. 20A). Vzniklý komplex o vyšší molekulární hmotnosti byl při průchodu agarózovým gelem oproti samotné DNA zpomalen.

Z výsledku analýzy tvorby D-loop struktury je patrný pokles v rekombinační aktivitě T309D mutantu (Obr. 20B a C).

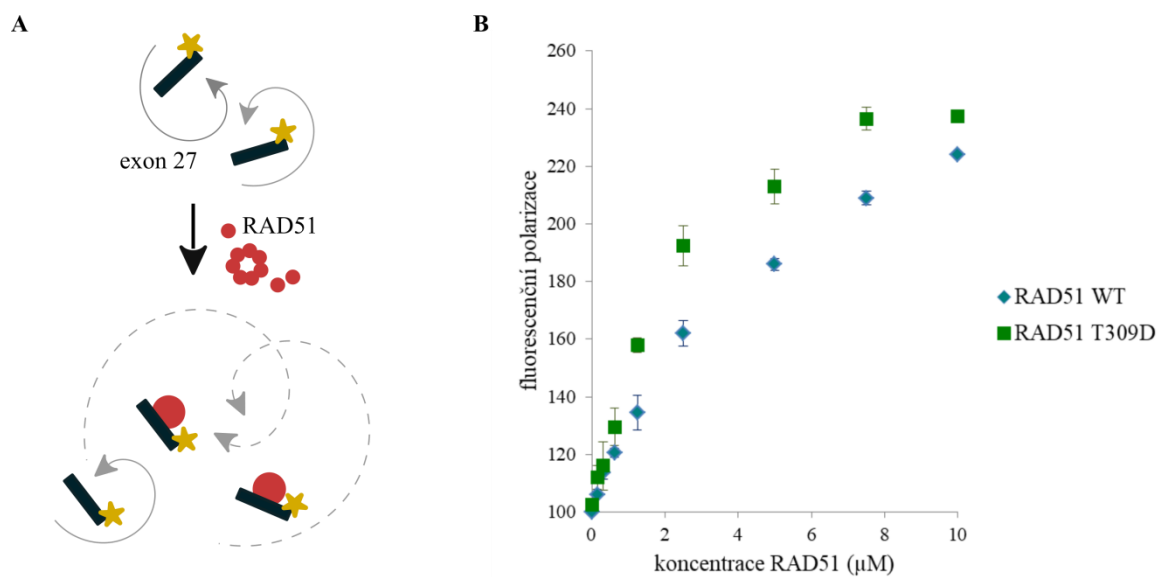


Obr. 20: **Analýza tvorby D-loop struktury RAD51 T309D** (A) Schematické znázornění experimentu. (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Analýza tvorby D-loop struktury RAD51 T309D v porovnání s RAD51 WT. Zvyšující se koncentrace RAD51 (0.5, 1 a 2 μM) byla inkubována s fluorescenčně značeným oligonukleotidem (20 nM) a proteinem HOP2-MND1 (300 nM), který napomáhá tvorbě D-loop struktury zachycením dsDNA (pBSK). (C) Kvantifikace analýzy tvorby D-loop struktury se směrodatnou odchylkou; na základě tří na sobě nezávislých experimentů.

5.2.4 Interakce RAD51 T309D s BRCA2

Jak již bylo zmíněno v teoretické části práce, Chk1 kináza mimo fosforylaci RAD51 fosforyluje také protein BRCA2. Pokud je BRCA2 fosforylována na exonu 27, dochází k uvolnění navázaného proteinu RAD51. [103] Fosforylace RAD51 by tak mohla ovlivnit vazbu s BRCA2 podobným způsobem. K porovnání interakce RAD51 T309D s exonem 27 byla zvolena metoda s fluorescenčně značeným exonem 27 pomocí fluorescenční polarizace. Samotný peptid, vzhledem ke své velikosti, rotuje vyšší rychlostí v porovnání s peptidem s navázaným proteinem. Změna rychlosti pohybu po navázání RAD51 na exon 27 značí rozdíl ve výsledné fluorescenční polarizaci peptidu (Obr. 21A).

Výsledek metody fluorescenční polarizace naznačuje signifikantní změnu v interakci RAD51 s C-terminální doménou BRCA2 způsobenou RAD51 fosforylací (Obr. 21B).

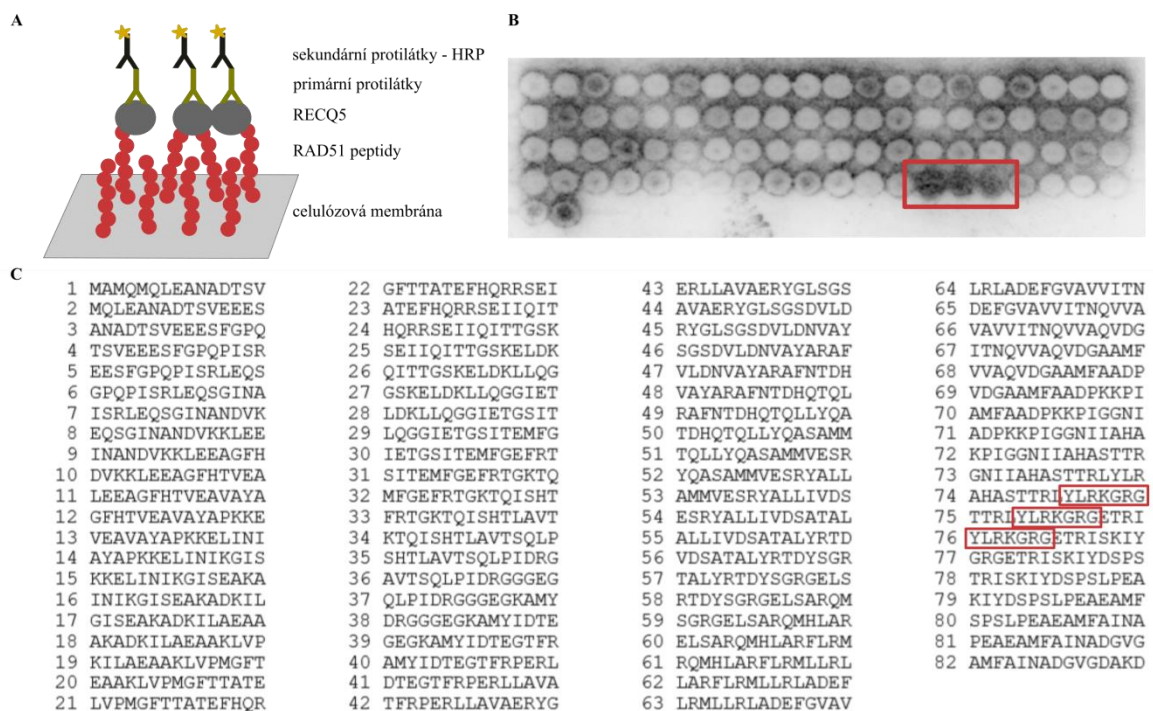


Obr. 21: **Analýza interakce RAD51 T309D s exonem 27 skrze detekci fluorescenční polarizace (A)** Schematické znázornění experimentu (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Detekce změny fluorescenční polarizace značeného fragmentu exonu 27 (75 nM) se zvyšující se koncentrací proteinu RAD51 (156 nM-10 µM); se směrodatnou odchylkou; na základě tří na sobě nezávislých experimentů.

5.3 Interakční doména RECQ5-RAD51

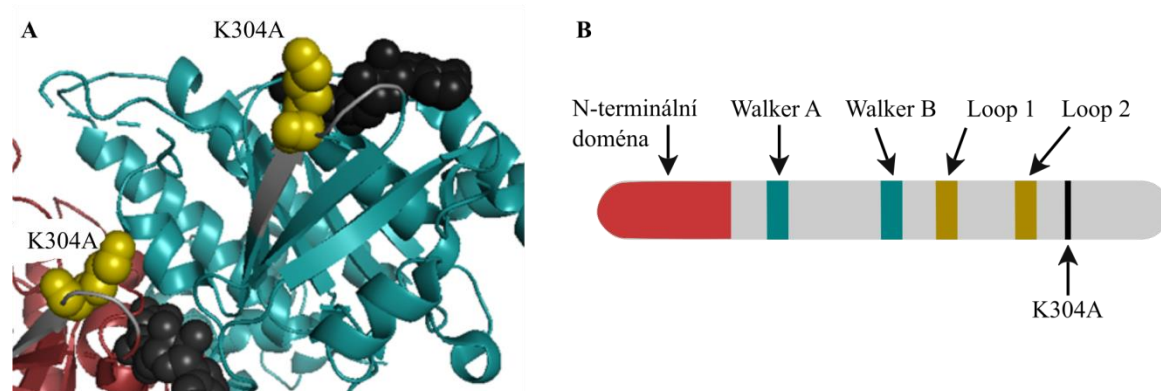
Antirekombináza RECQ5 patří do skupiny RecQ helikáz, které jsou mimo jiné schopny rozrušit RAD51 nukleoproteinové vlákno. K disociaci RAD51 z ssDNA je potřebná ATP hydrolyza a přítomnost ssDNA vazebného proteinu RPA, který zabraňuje zpětnému navázání RAD51. [83] Dalším faktorem rozhodujícím při negativní regulaci vlákna by mohla být samotná interakce proteinů RAD51-RECQ5, jejichž interakční doména se nachází v C-terminální části RECQ5. Mutace v této části proteinu nejen zamezuje interakci s RAD51, ale ovlivňuje i schopnost RECQ5 vlákno RAD51-ssDNA rozrušit. [88] I přesto detailní mechanismus disociace RAD51 z ssDNA zatím není zcela známý.

Mým cílem tedy bylo určit interakční místo proteinu RECQ5 na rekombináze, vygenerovat mutanta RAD51 defektního v této interakci, a tím umožnit studium vlivu této vazby na mechanismus RECQ5 jako negativního regulátoru HR. Výchozím experimentem ke zmapování interakce RAD51-RECQ5 byla peptidová analýza (Obr. 22A). Celulózová membrána s navázanými imobilizovanými peptidy RAD51 byla inkubována se 100 µg RECQ5. Místo interakce bylo detekováno pomocí primárních RECQ5 protilátek (0.1 µg/ml) a sekundárních Anti-Rabbit IgG protilátek s konjugovanou peroxidázou (1:10 000).



Obr. 22: **Detekce interakce imobilizovaných peptidů proteinu RAD51 s RECQ5** (A) Schematické znázornění experimentu (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Interakce peptidů RAD51 s RECQ5 byla detekována pomocí primárních protilátek RECQ5 a sekundárních protilátek s konjugovanou peroxidázou. (C) Výsledná sekvence možného interakčního místa RAD51-RECQ5 – aminokyseliny (Tyr 301 - Gly 307) v C-terminální části proteinu.

Na základě výsledku peptidové analýzy se jako potenciální místo interakce jeví skupina aminokyselin Tyr 301 – Gly 307 v C-terminální části proteinu (Obr. 22B a C). K další charakterizaci byl proto navrhnout a izolován mutant - RAD51 K304A (Obr. 23A a B).

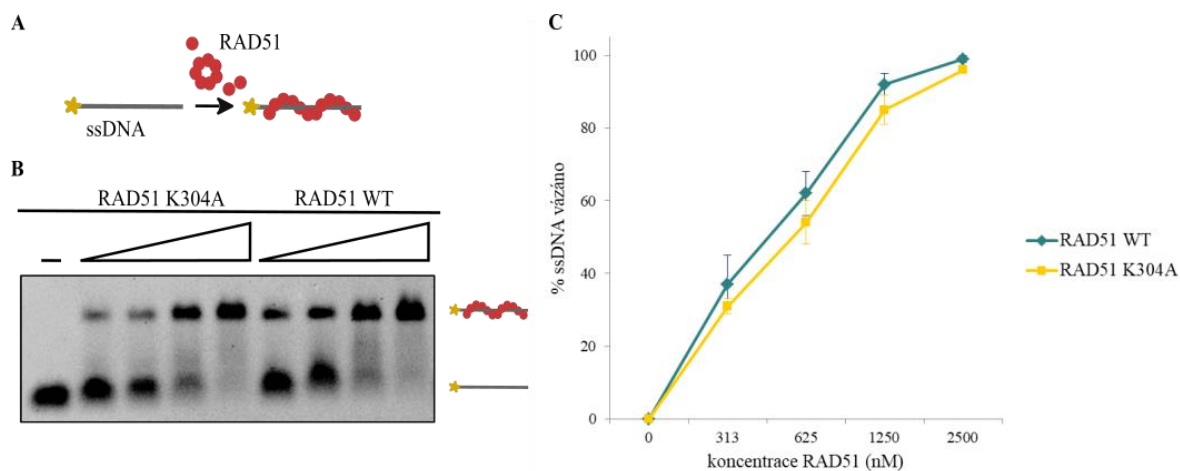


Obr. 23: **Struktura RAD51 K304A** (A) Struktura RAD51 se zaznačením potencionální interakční domény RAD51-RECQ5 (šedá) s mutací K304A (žlutá). Jednotlivé podjednotky heptameru jsou odlišeny barevně (červená a modrá), oblast vazby ATP je označena černou barvou (vytvořeno pomocí softwaru PyMOL™). (B) Schematické zobrazení mutace K304A v C-terminální části proteinu RAD51.

5.3.1 DNA-vazebná afinita RAD51

Z důvodu pozdější charakterizace proteinu bylo nejdříve nutné porovnat, zda mutace K304A nenarušila základní vlastnosti RAD51, jako je vazba na DNA. Pro porovnání vazebné afinity proteinu byla opět zvolena gelová retardační esej (EMSA). Fluorescenčně značený oligonukleotid byl inkubován se zvyšující se koncentrací RAD51 (Obr. 24A). Vytvořené vlákno RAD51-DNA bylo vzhledem ke své velikosti při průchodu agarózovým gelem oproti samotné DNA zpomaleno.

Z výsledku je zřejmé, že schopnost proteinu vázat ssDNA nebyla mutací K304A narušena (Obr. 24B a C).



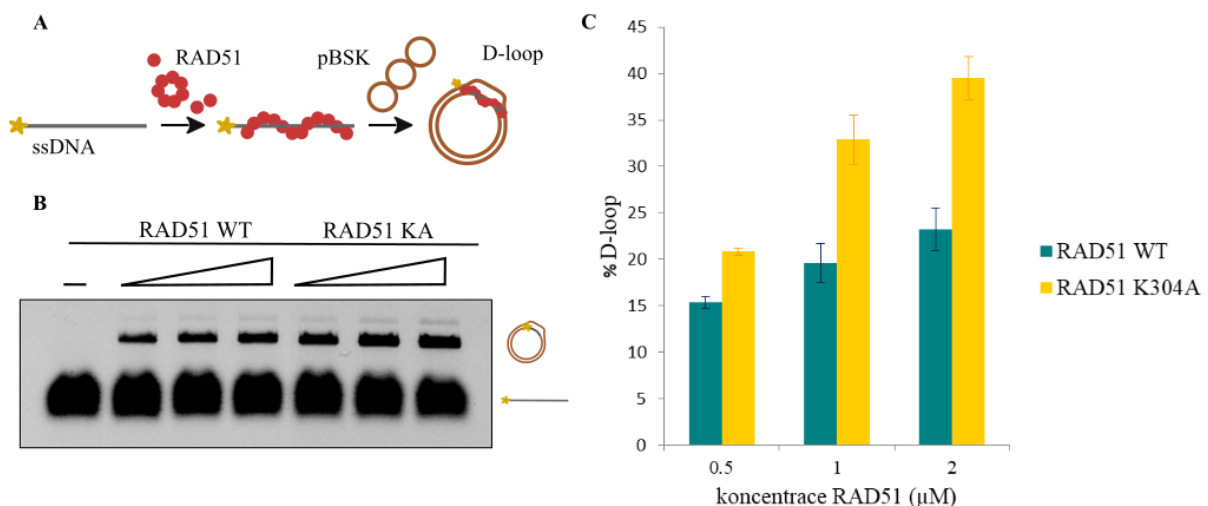
Obr. 24: **DNA vazebná afinita RAD51 K304A** (A) Schematické znázornění experimentu (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Porovnání ssDNA vazebné afinity RAD51 K304A s RAD51 WT. Zvyšující

se koncentrace RAD51 (v rozmezí 313 až 2500 nM) byla inkubována s fluorescenčně značeným oligonukleotidem (10 nM). (C) Kvantifikace DNA vazebné afinity se směrodatnou odchylkou; na základě tří na sobě nezávislých experimentů.

5.3.2 Tvorba D-loop struktury

K porovnání rekombinační aktivity proteinu byla zvolena metoda tvorby D-loop struktury. Poté co se vytvořilo aktivní nukleoproteinové vlákno byla reakce doplněna plasmidem s komplementárním úsekem DNA (Obr. 25A). Vzniklý komplex o vyšší molekulární hmotnosti byl při průchodu agarózovým gelem oproti samotné DNA zpomalen.

Rekombinační úloha proteinu, jak je patrné z výsledku analýzy tvorby D-loop struktury, nebyla mutací narušena (Obr. 25B). Tvorba D-loop struktury je naopak vyšší v případě RAD51 K304A (Obr. 25C). Vzhledem ke skutečnosti, že by defekt v ATP vazbě způsobil zároveň i úbytek v rekombinační aktivitě RAD51, z výsledku lze mimo jiné určit, že ani tato vlastnost nebyla výrazným způsobem mutací narušena.



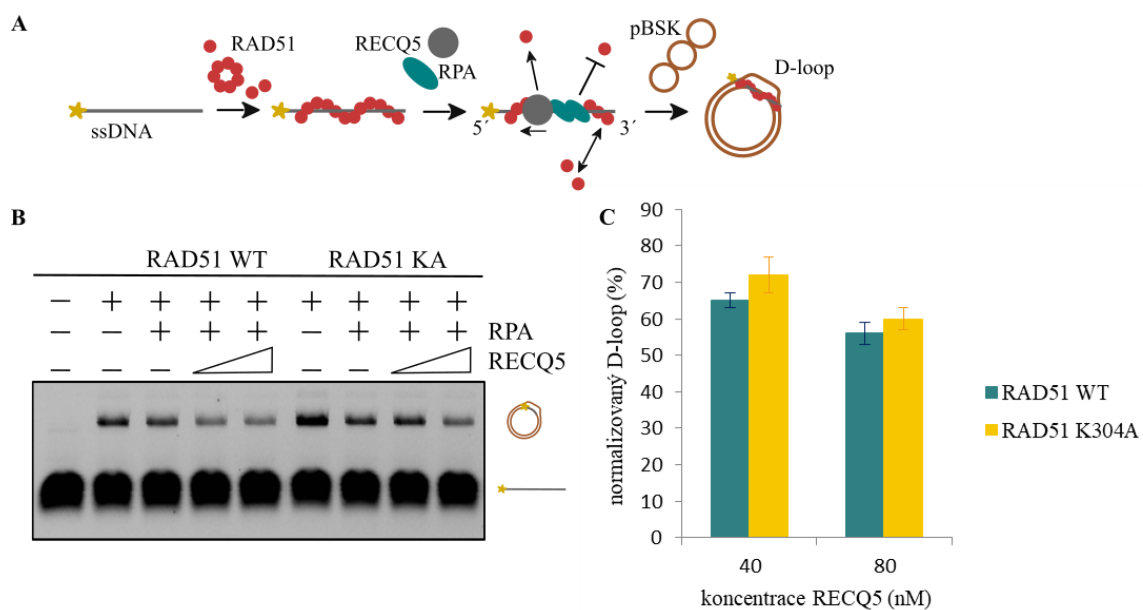
Obr. 25: **Analýza tvorby D-loop struktury RAD51 K304A** (A) Schematické znázornění experimentu (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Analýza tvorby D-loop struktury RAD51 K304A v porovnání s RAD51 WT. Zvyšující se koncentrace RAD51 (0.5, 1 a 2 μM) byla inkubována s fluorescenčně značeným oligonukleotidem (20 nM) a proteinem HOP2-MND1 (300 nM), který napomáhá tvorbě D-loop struktury zachycením dsDNA (pBSK). (C) Kvantifikace analýzy tvorby D-loop struktury se směrodatnou odchylkou; na základě tří na sobě nezávislých experimentů.

5.3.3 Disociace RAD51 K304A z ssDNA v přítomnosti RECQ5

Antirekombináza RECQ5 rozrušuje RAD51 nukleoproteinové vlákno především prostřednictvím vlastní ATPázové aktivity a přítomnosti proteinu RPA. Přesný účel interakce RECQ5-RAD51 není zcela známý. Mutace RECQ5 v interakčním místě RAD51 poukazuje na omezení schopnosti helikázy nukleoproteinové vlákno rozrušit. [88] Pro porovnání

disociace RAD51 K304A z ssDNA v přítomnosti RECQ5 byla zvolena metoda, kdy k vytvořenému vláknu RAD51 WT-ssDNA, případně RAD51 K304A-ssDNA byla přidána helikáza, společně s proteinem RPA. Následně byla reakce doplněna plasmidem s komplementárním úsekem DNA (Obr. 26A). Vzniklý komplex o vyšší molekulární hmotnosti byl při průchodu agarózovým gelem oproti samotné DNA zpomalen.

Z výsledku analýzy disociace RAD51 z ssDNA vlivem působení helikázy RECQ5 není patrný výrazný rozdíl mezi divokým kmenem a mutantem RAD51 K304A (Obr. 26B). Interakci RAD51 K304A-RECQ5, podobně jako disociaci rekombinázy z ssDNA, bude nutné detekovat prostřednictvím senzitivnější metody. V grafu je zobrazen rozdíl v množství vytvořeného komplexu v přítomnosti RECQ5 v porovnání s kontrolou samotného proteinu RPA (Obr. 26C).



Obr. 26: **Disociace RAD51 z ssDNA vlivem působení helikázy RECQ5** (A) Schematické znázornění experimentu (vytvořeno v programu Inkscape). (B) Analýza disociace RAD51 K304A z ssDNA v přítomnosti RECQ5. Vytvořené nukleoproteinové vlákno RAD51 (2 μ M)-ssDNA (40 nM) bylo inkubováno s RPA (100 nM) a zvyšující se koncentrací RECQ5 (40 a 80 nM). Reakce tvorby D-loop struktury byla katalyzována proteinem HOP2-MND1 (300 nM). (C) Kvantifikace disociace RAD51 z ssDNA vlivem působení helikázy RECQ5 se směrodatnou odchylkou; procentuální porovnání k průměrné hodnotě RAD51-RPA (=100 %); na základě tří na sobě nezávislých experimentů.

6 DISKUZE

V případě poškození DNA zajišťuje buňka skrze signální dráhy pozastavení buněčného cyklu a zahájení příslušné DNA opravné dráhy. Defekty v opravných mechanismech často souvisí s dědičnými onemocněními a vyšším rizikem vzniku rakoviny. [13,106] Z hlediska vývoje efektivní léčby nádorových onemocnění je důležité pochopení buněčných mechanismů, které zapříčiňují vznik nádoru, podporují jeho progresi a často i rezistenci vůči léčbě.

6.1 Mutace RAD51 asociována s nádorovým onemocněním

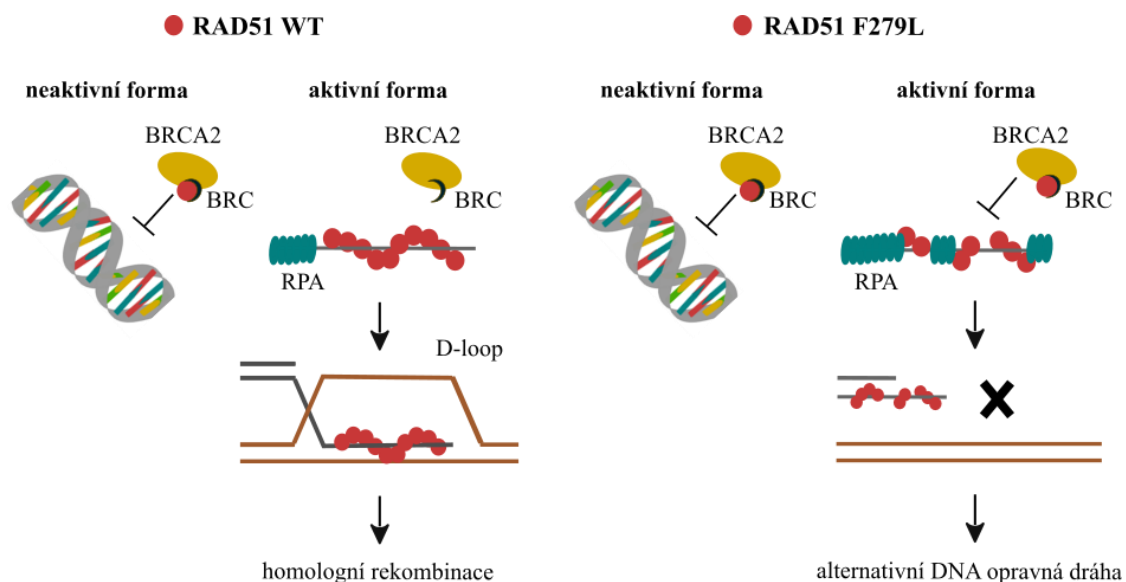
Centrální úlohu při opravě DNA pomocí homologní rekombinace má protein RAD51. Bezchybný průběh homologní rekombinace, ale i ochrany a restartu replikační vidlice je podmínkou pro udržení genomové integrity a buněčného přežití. Navzdory klíčové roli RAD51 nukleoproteinového vlákna musí být celý proces striktně usměrňován množstvím regulačních proteinů a post-translačních modifikací. Souvislost mutací proteinu RAD51 se vznikem karcinomu není navzdory klíčové roli RAD51 zřejmá, podobně jako terapeutický potenciál, se kterým by bylo možné zlepšit dosavadní léčbu rakoviny. Z toho důvodu byla pro bližší charakterizaci zvolena mutace RAD51 F279L asociována s nádorovým onemocněním.

Výsledky této práce ukázaly, že mutace RAD51 F279L i přes své umístění v doméně Loop 2 neomezila DNA-vazebnou afinitu proteinu. Struktura vlákna ani jeho stabilita v přítomnosti konkurenční DNA nebyla mutací narušena, podobně jako rekombinační aktivita proteinu, která je dokonce nepatrně vyšší než v případě RAD51 WT. V dalším kroku byla ověřena disociace vlákna v přítomnosti fragmentu BRCA2 – BRC motivu, který interaguje s jednotlivými monomery RAD51, čímž zamezuje jejich oligomerizaci a formování RAD51-ssDNA vlákna. Z výsledku této analýzy byl patrný signifikantní rozdíl, v případě RAD51 F279L byla disociace prostřednictvím BRC3 motivu efektivnější. Vzhledem k mechanismu působení BRC jako prevence formování vlákna a také skutečnosti, že samotná stabilita vlákna mutanta byla totožná jako u RAD51 WT, tento výsledek naznačuje změnu ve vazbě BRCA2 s RAD51, podmíněnou mutací F279L. Následně tak byla testována přímo interakce RAD51 F279L s BRC3, a to pomocí dvou odlišných metod. Metoda analýzy vazby proteinů pomocí metody pull-down však ukázala, že vazba proteinů RAD51-BRC, ale zároveň ani interakce BRC s RAD51 nukleoproteinovým vláknem nebyla v případě mutanta odlišná. Tento výsledek také jednoznačně potvrdila metoda fluorescenční polarizace, kdy mezi divokým kmenem a mutantem nebyl ve vazbě na BRC peptid zřejmý rozdíl. To tedy poukazuje na odlišnost v mechanismu disociace BRC peptidem, než jakým je pouze samotná vazebná afinita proteinů.

V buňce je iniciační fáze HR katalyzována proteinem BRCA2, který zajišťuje nukleaci RAD51 na ssDNA a usnadňuje tak i výměnu proteinu RPA, podobně jako v případě zastavené RF, vzniklé vlákno zároveň stabilizuje. [7,8] Absence tohoto proteinu je embryonálně letální a jeho mutace jsou asociovány s vysokou predispozicí vzniku karcinomu. [40,109]

BRCA2 interaguje s RAD51 skrze dvě odlišné domény, a to skupinu BRC motivů a CTD proteinu (exon 27). [46] Na základě *in vitro* experimentů bylo definováno několik často i protichůdných mechanismů působení BRC motivů. BRC peptidy pozitivně regulují RAD51 nukleoproteinové vlákno tím, že inhibují vazbu proteinu RAD51 na dsDNA, redukuje jeho ATPázovou aktivitu, čímž vlákno stabilizují a zároveň katalyzují výměnu řetězců. [47] V rozporu s touto funkcí však BRC motivy mohou nukleoproteinové vlákno i destabilizovat, jelikož mimikují strukturu jednotlivých monomerů RAD51 a zamezují tak jejich oligomerizaci a formování nukleoproteinového vlákna. Jednou z možných hypotéz regulace RAD51 prostřednictvím BRCA2 je, že za normálních podmínek buňky jsou jednotlivé monomery pomocí BRC izolovány, avšak v případě poškození jsou dopraveny k místu defektu, kde se uvolní a vytváří nukleoproteinové vlákno. [48]

Jak již bylo zmíněno, na základě detekce nukleoproteinového vlákna v reálném čase bylo odhaleno, že vlákno RAD51 F279L vykazuje vyšší míru disociace v přítomnosti BRC3 motivu v porovnání s RAD51 WT i přesto, že samotná vazba proteinů je totožná. To tedy naznačuje, že za normálních podmínek BRC udržuje jednotlivé podjednotky RAD51 F279L podobně jako u RAD51 WT. V případě poškození však BRC může i přes aktivaci HR dráhy nadále destabilizovat vytvořené vlákno proteinu s F279L mutací. Buňka tak může být nucena k opravě defektu zvolit alternativní, potencionálně mutagenní DNA opravnou dráhu (Obr. 27). Tuto hypotézu by bylo možné ověřit prostřednictvím *in vivo* experimentů porovnáním odpovědi buněčných linií na poškození skrze HR nebo jiné DNA opravné dráhy.



Obr. 27: **Navržený model RAD51 F279L.** Za normálních podmínek jsou v buňce jednotlivé monomery proteinu RAD51 udržovány pomocí BRC motivů (součástí proteinu BRCA2), které tímto způsobem zamezují oligomerizaci a formování nukleoproteinového vlákna. Pokud však dojde k poškození DNA, k iniciaci homologní rekombinace je nutné vytvořit aktivní formu vlákna, která je schopna vyhledat homologní sekvenci a katalyzovat výměnu řetězců. V případě mutace F279L je však vlákno destabilizováno BRC motivy, není tedy schopné dalšího průběhu HR. Buňka je nucena k opravě defektu zvolit alternativní, potencionálně mutagenní DNA opravnou dráhu (vytvořeno v programu Inkscape).

Mutace F279L by mohla zároveň poskytovat výhodu v progresi nádoru, a to podobným způsobem jako již dříve charakterizovaný mutant RAD51 G151D, rovněž asociovaný s nádorovým onemocněním. Mutace G151D zvýšila v přítomnosti proteinu BRCA2 *in vitro* rekombinační aktivitu RAD51, která v buňce vedla k hyper-rekombinaci asociované s rezistencí buněk vůči látkám poškozujícím DNA. [110] Mutace F279L sice zvýšila rekombinační aktivitu proteinu pouze nepatrně, jako je zřejmé z výsledku této práce, ale v buňce by kombinace s působením BRCA2 mohla zapříčinit signifikantně vyšší rekombinaci vedoucí k zvýšené rezistenci nádoru vůči působení léčebných látek.

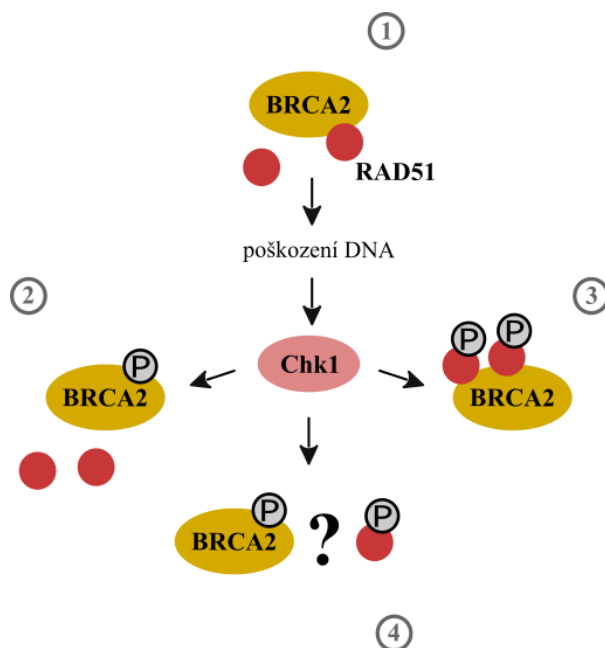
Tato práce tak naznačuje mechanismus, kterým mutace F279L napomáhá při zvyšování genomové nestability a akumulaci mutací, klíčových v extenzivním růstu karcinomu. Pro další charakterizaci mechanismu by bylo vhodné porovnat aktivitu RAD51 v přítomnosti celého proteinu BRCA2, jeho využití *in vitro* je však limitováno obtížností purifikace. Alternativou by mohl být konstrukt několika domén proteinu, mini-BRCA2. [111] Charakterizace působení BRC motivů je nicméně důležitá i z hlediska terapeutické léčby. Skutečnost, že exprese BRC motivů narušuje vazbu RAD51 s BRCA2, a způsobuje tak i zvýšenou senzitivitu buněk vůči ionizujícímu záření, vedla k vývoji syntetických peptidů mimikujících BRC motivy, které interferují s RAD51 a zabraňují formování nukleoproteinového vlákna. [112,113] Další výzkum v oblasti podobných inhibitorů tedy vykazuje potenciál v protinádorové terapii.

6.2 Mutace RAD51 mimikující fosforylaci proteinu

K iniciaci příslušné opravné dráhy, v tomto případě aktivaci DNA opravných proteinů, jako je RAD51 nebo BRCA2, dochází prostřednictvím signálních drah. V reakci na poškození je protein RAD51 fosforylován kinázou Chk1 na pozici 309. Mechanismus, jakým fosforylace vyvolává komplikovanou kaskádu dějů, nebyl doposud odhalen. Za takovým účelem byl v mé práci izolován a charakterizován protein RAD51 s mutací mimikující jeho fosforylaci Chk1 kinázou – RAD51 T309D. Vzhledem k lokalizaci mutace a negativnímu náboji kyseliny asparagové bylo nutné ověřit, zda samotná mutace nenarušila DNA-vazebnou afinitu proteinu. Z výsledku analýzy pomocí metody EMSA je zřejmé, že vazba proteinu na DNA nebyla mutací narušena. Následně však byla testována stabilita a kinetika tvorby nukleoproteinového vlákna, kdy zatímco stabilita vlákna byla obdobná jako v případě RAD51 WT, kinetika tvorby RAD51 T309D-ssDNA byla signifikantně odlišná. To by tedy znamenalo, že v důsledku fosforylace dochází ke změně struktury vlákna. Avšak z výsledku analýzy ochrany DNA před nukleolytickou degradací nebyl patrný žádný strukturální rozdíl mezi divokým kmenem RAD51 a proteinem fosforylovaným, což ale nevylučuje možnost, že použitím jiné, senzitivnější metody by změnu struktury vlákna bylo možné detekovat.

Chk1 kináza nicméně fosforyluje také protein BRCA2. Tato fosforylace má přímý vliv na vazbu části BRCA2 – exonu 27 s RAD51. Podle *in vivo* výsledků fosforylace BRCA2 způsobuje uvolnění navázaného RAD51. [103] Úlohou exonu 27 je stabilizovat vytvořené RAD51-ssDNA vlákno. [46] Jednou z možných hypotéz tedy bylo, že fosforylace RAD51 může vazbu s BRCA2 ovlivnit podobným způsobem. V dalším kroku tedy byla navržena esej

detekující interakci RAD51 T309D s exonem 27 pomocí fluorescenční polarizace. Výsledek analýzy tuto hypotézu potvrdil, neboť interakce v případě fosforylovaného proteinu byla významně vyšší oproti RAD51 WT. Během iniciační fáze opravy je tedy důležitá nejen fosforylace BRCA2, ale také fosforylace rekombinázy RAD51. Předmětem navazujících experimentů tak bude detailnější pochopení mechanismu interakce těchto proteinů, například porovnáním vazby v případě obou fosforylovaných proteinů nebo exonu 27 s RAD51 T309D-ssDNA vláknem.



Obr. 28: **Navržený model RAD51 T309D.** Za normálních podmínek v buňce interaguje BRCA2-exon 27 s RAD51 (1). V reakci na poškození Chk1 fosforyluje s proteiny BRCA2 (2) a RAD51 (3). Fosforylace RAD51 stimuluje vazbu rekombinázy na BRCA2-exon 27 důležitou pro iniciaci opravy poškození. Následně Chk1 fosforyluje protein BRCA2, čímž dochází k uvolnění rekombinázy z exonu 27 a formování nukleoproteinového vlákna. Předmětem navazujících experimentů bude interakce mezi oběma fosforylovanými proteiny (4). (vytvořeno v programu Inkscape).

6.3 Interakční doména RECQ5-RAD51

V souvislosti s nádorovým onemocněním však musí být aktivita RAD51 regulována zároveň negativně, jinak může vést k akumulaci toxických rekombinačních meziproductů a ke vzniku chromosomálních aberací. [59,60] U mnoha typů nádorů byla mimo jiné zaznamenána zvýšená exprese RAD51, vedoucí k rezistenci vůči dosavadní léčbě, podobně jako v případě zvýšené rekombinační aktivity mutace RAD51 G151D nebo potenciálně RAD51 F279L, charakterizované v této práci. [24,25,110] Z důvodu možného terapeutického využití je tedy důležité se mechanismem negativní regulace zabývat detailněji.

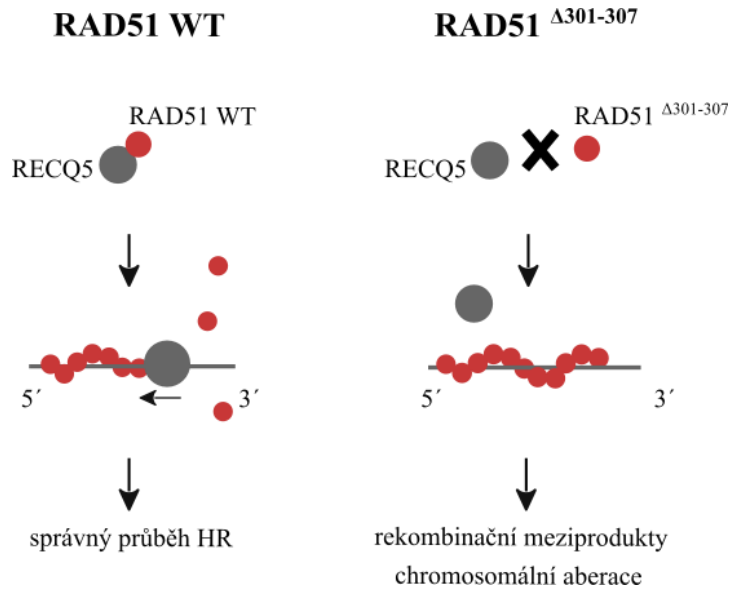
Jak již bylo zmíněno, helikáza RECQ5 negativně reguluje aktivitu RAD51 prostřednictvím disociace proteinu z ssDNA. Nezbytnou podmínkou regulace je ATP hydrolýza RECQ5 a přítomnost ssDNA vazebného proteinu RPA. [83] Dalším faktorem

disociace by mohla být i interakce proteinů RAD51-RECQ5. Tato hypotéza byla podpořena skutečností, že mutace proteinu RECQ5 v interakčním místě s RAD51 výrazným způsobem omezuje míru disociace rekombinázy. [88] I přesto konkrétní mechanismus disociace RAD51 z ssDNA zatím není zcela známý.

Zatímco vazebná oblast RAD51 proteinu RECQ5 již byla zmapována, cílem této práce bylo definovat místo interakce i u RAD51. [88] Odhalení vazebné domény je zásadní nejen z hlediska charakterizace mechanismu negativní regulace, ale také z důvodu porovnání, zda se oblast nepřekrývá s místem mutací asociovaných s nádorovým onemocněním. V této práci byla detekována potencionální interakční doména RECQ5-RAD51, a to v C-terminální části RAD51 na pozici Tyr 301 - Gly 307. Tato oblast se nachází v blízkosti vazby ATP, interakce monomerů proteinu, ale také místa fosforylace Chk1 kinázou - Thr 309, charakterizovaného v této práci. V místě interakční domény se nachází také mutace RAD51 G307V asociovaná s maligním melanomem nebo mutace G307W identifikovaná u Endometriálního karcinomu. [114] Tyto mutace budou v navazující studii izolovány a charakterizovány v souvislosti s defektem v negativní regulaci spojeným s rozvojem nádoru.

Na základě výsledku detekované vazebné domény byl vygenerován protein RAD51 s mutací v místě interakce – RAD51 K304A. Charakterizace základních vlastností proteinu podstatná pro následnou analýzu interakce ukázala, že DNA-vazebná afinita ani rekombinační aktivita nebyla mutací narušena. Aktivita RAD51 K304A v průběhu rekombinace *in vitro* simulované pomocí metody analýzy D-loop struktury je naopak signifikantně vyšší. Prostřednictvím obdobné metody byla porovnána i disociace RAD51 K304A prostřednictvím RECQ5. Z výsledku analýzy však není patrný výrazný rozdíl mezi divokým kmenem a mutantem RAD51 K304A. I přesto tento výsledek jednoznačně nevyločil možnost, že místo vazby RAD51-RECQ5 (Tyr 301 - Gly 307) definované v této práci odpovídá interakční doméně těchto proteinů. Příčinou interakce může být komplexnost vazby RAD51-RECQ5, substituce jedné aminokyseliny nemusela interakci proteinů dostatečně narušit. Následně tak bude navržena rozsáhlejší substituce nebo delece v místě určené vazebné domény, která by mohla mít na interakci proteinů větší vliv. Důvodem, proč rozdíl není pozorovatelný, může být také, že zvolená metoda analýzy pomocí struktury D-loop není dostatečně senzitivní. Výsledky tak bude nutné ověřit pomocí jiných metod, například technologie BLItz, Stopped flow nebo ve spolupráci s laboratoří Dr. Eric C. Greene (Columbia University, USA) metodou DNA curtains.

Pro potvrzení detekované interakční domény RAD51-RECQ5 bude v navazujících experimentech nutné optimalizovat metodu, která umožní sledovat samotnou vazbu proteinů, díky níž bude pozorovatelný rozdíl v interakci RAD51 WT s RECQ5. Následně bude předmětem analýzy vliv interakce na funkci RECQ5 jako antirekombinázy, kdy jednou z možných hypotéz úlohy vazby RECQ5-RAD51 je efektivnější navázání helikázy na nukleoproteinové vlákno. Charakterizace mechanismu funkce RECQ5 je klíčová pro další terapeutické využití v souvislosti s rezistencí nádorů, například při využití látek zvyšujících expresi nebo aktivitu antirekombinázy.



Obr. 29: **Navržený model RAD51 Δ 301-307**. Nukleoproteinové vlákno RAD51 WT je v průběhu HR, a to především v závěrečné fázi procesu, negativně regulováno. Regulace prostřednictvím antirekombináz je však důležitá také jako preventivní krok iniciace toxické rekombinace. Mutace s defektem ve vazbě s antirekombinázou RECQ5 ovlivňuje její aktivitu s následným snížením regulace HR indukující vznik rekombinačních meziproductů a chromosomálních aberací (vytvořeno v programu Inkscape).

7 ZÁVĚR

K vývoji efektivní terapeutické léčby nádorových onemocnění je nezbytné pochopení buněčných mechanismů, které se podílí na vzniku nádoru, jeho následné progresi a často i rezistenci vůči dosavadní léčbě. Mezi hlavní znaky nádorové buňky patří mimo jiné genomová nestabilita, mnohdy spojená s mutací v některém z DNA opravných proteinů. V buňkách různých typů nádorů se vyskytují četné alterace klíčového proteinu HR – RAD51. Porozumění souvislosti mutací RAD51 s rozvojem karcinomu je nezbytné k vývoji cílené a účinné léčby. Z toho důvodu jednou z mutací zvolených k bližší charakterizaci byla RAD51 F279L, asociovaná s nádorovým onemocněním. V této práci byl naznačen mechanismus, jakým mutace F279L prostřednictvím vazby proteinu s hlavním rekombinačním mediátorem BRCA2 může přispívat k progresi buňky do maligního stavu, ale zároveň i rezistenci nádoru vůči standardní léčbě.

V reakci na poškození DNA dochází k aktivaci DNA opravných proteinů prostřednictvím posttranslačních úprav proteinů kinázami, které tak zajišťují iniciaci opravy defektu. Protein RAD51 je v případě poškození, podobně jako BRCA2, fosforylován Chk1 kinázou. Přesný mechanismus, jakým následně dochází pomocí těchto dvou proteinů k opravě defektu, nebyl doposud známý. V této práci bylo odhaleno, jakým způsobem je oprava poškození prostřednictvím této fosforylace regulována. Zatímco fosforylace BRCA2 způsobuje uvolnění vazby s RAD51, v případě fosforylace RAD51 je tato vazba naopak stimulována. Fosforylace Chk1 kinázou tak s časovou návazností reguluje vazbu RAD51-BRCA2, a tím i výslednou opravu poškození.

U mnoha typů karcinomů byla kromě alterací proteinu RAD51 zaznamenána i jeho zvýšená aktivita nebo exprese, spojená s rezistencí nádoru vůči dosavadní léčbě. Terapeutický potenciál v tomto ohledu nabízí skupina antirekombináz, které negativně regulují aktivitu RAD51, mezi nimi například helikáza RECQ5. Jedním z cílů této práce bylo definovat potencionální interakční místo RAD51 s antirekombinázou RECQ5 a porovnat úlohu vazby v závislosti na samotném mechanismu regulace RECQ5. Interakční doména RAD51-RECQ5 identifikovaná v této práci se nachází v C-terminální části RAD51, v blízkosti vazby ATP, interakce jednotlivých monomerů proteinu, ale také fosforylace proteinu Chk1 kinázou. V místě vazby se také nachází některé z mutací RAD51 asociovaných s melanomem nebo nádorem endometria. Předmětem navazující studie tak bude ověření vlivu interakce na funkci helikázy.

V mé práci SOČ byla prostřednictvím biochemické a biofyzikální charakterizace mutací RAD51 navržena možná molekulární podstata rozvoje karcinomu s defektem v HR a jeho rezistence vůči působení dosavadní léčby. Mimo to byla odkryta úloha fosforylace proteinu RAD51 v reakci na poškození a následné iniciaci DNA opravy, ale také interakční doména s jedním z jeho negativních regulátorů.

8 SEZNAM ZKRATEK

ALT	alternativní prodlužování telomer (z angl. alternative lengthening of telomeres)
AMP	ampicilin
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
ATM	serin/threonin protein kináza (z angl. ataxia telangiectasia mutated)
ATP	adenosintrifosfát
ATR	serin/threonin protein kináza (z angl. ATM and Rad3 related)
BER	bázová excisní oprava (z angl. base excision repair)
BIR	zlomem indukovaná replikace (z angl. break-induced replication)
BRCA2	(z angl. Breast Cancer Susceptibility Protein 2)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
CAM	chloramfenikol
CBB	lyzační pufr (z angl. cell breakage buffer)
CTD	C-terminální doména
DBD	(z angl. DNA/DSS1-binding domain)
DDR	reakce na poškození (z angl. DNA damage response)
dH ₂ O	destilovaná voda
D-loop	(z angl. displacement loop)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSB	dvouřetězcový zlom (z angl. double-strand break)
DSBR	klasická oprava DSB (z angl. double-strand break repair)
dsDNA	dvouřetězcové vlákno DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethyléndiamintetraoctová
EMSA	gelová retardační esej (z angl. electrophoretic mobility shift assay)
F279L	záměna fenylalaninu za leucin na 279. pozici
FBH1	(z angl. F-box-containing DNA helicase 1)
FPLC	proteinová chromatografie (z angl. fast protein liquid chromatography)
GTH	glutathion

HJ	Hollidayovy spoje (z angl. Holliday junction)
HR	homologní rekombinace
HRDC	helikázová RNázováD C-terminální doména
Chk1	Checkpoint kináza 1
Chk2	Checkpoint kináza 2
ICL	mezi-řetězcový spoj v DNA (z angl. interstrand cross-link)
IPTG	izopropyl β -D-1-thiogalaktopyran osid
K304A	záměna lysinu za alanin na 304. pozici
kDa	kilo Dalton
MMR	oprava chybného párování (z angl. mismatch repair)
MRN	MRE11/RAD50/NBS1 komplex
NER	nukleotidová excisní oprava (z angl. nucleotide excision repair)
NHEJ	nehomologní spojování konců (z angl. nonhomologous end-joining)
NP40	Nonidet P40
OB	(z angl. oligonucleotide/oligosaccharide-binding)
OD ₆₀₀	optická hustota měřená při vlnové délce 600nm (z angl. optical density)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
pBSK	plasmid Bluescript
PCNA	(z angl. Proliferating cell nuclear antigen)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
pH	vodíkový exponent (z angl. potential of hydrogen)
PI	proteázové inhibitory
PK	proteínáza K
Plk1	Polo-like kináza 1
PMSF	fenylmethansulfonylfluorid
RF	replikační vidlice
RNAPII	RNA polymeráza II
RPA	replikační protein A
RPM	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
RQC	RecQ karboxy-terminální doména

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	dodecylsulfát sodný
SDSA	nasedání komplementárních úseků závislé na syntéze DNA (z angl. synthesis-dependent strand annealing)
SSA	nasedání řetězců (z angl. single strand annealing)
SSB	jednořetězcový zlom (z angl. single strand break)
ssDNA	jednořetězcové vlákno DNA
T309D	záměna threoninu za kyselinu asparagovou na 309. pozici
TAE	Tris/Acetát/EDTA
TBE	Tris/Borát/EDTA
TEMED	N,N,N',N' – tetramethylethyléndiamin
UV	ultrafialové
WT	divoký kmen (z angl. wild-type)

9 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] JACKSON, Stephen P. a Jiri BARTEK. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009, 461(7267), 1071-1078. DOI: 10.1038/nature08467. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nature08467>
- [2] CHATTERJEE, Nimrat a Graham C. WALKER. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2017, 58(5), 235-263. DOI: 10.1002/em.22087. ISSN 08936692. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/em.22087>
- [3] FRIEDBERG, Errol C. DNA damage and repair. *Nature*. 2003, 421(6921), 436-440. DOI: 10.1038/nature01408. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nature01408>
- [4] SHRIVASTAV, Meena, Leyma P DE HARO a Jac A NICKOLOFF. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research*. 2008, 18(1), 134-147. DOI: 10.1038/cr.2007.111. ISSN 1001-0602. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/cr2007111>
- [5] KHANNA, Kum Kum a Stephen P. JACKSON. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*. 2001, 27(3), 247-254. DOI: 10.1038/85798. ISSN 1061-4036. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/ng0301_247
- [6] LIEBER, Michael R. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*. 2010, 79(1), 181-211. DOI: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131. ISSN 0066-4154. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- [7] KREJCI, L., V. ALTMANNOVA, M. SPIREK a X. ZHAO. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Research*. 2012, 40(13), 5795-5818. DOI: 10.1093/nar/gks270. ISSN 0305-1048. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gks270>
- [8] SUNG, Patrick, Lumir KREJCI, Stephen VAN KOMEN a Michael G. SEHORN. Rad51 Recombinase and Recombination Mediators. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278(44), 42729-42732. DOI: 10.1074/jbc.R300027200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.R300027200>
- [9] VERDUN, Ramiro E. a Jan KARLSEDER. The DNA Damage Machinery and Homologous Recombination Pathway Act Consecutively to Protect Human Telomeres. DOI: 10.1016/j.cell.2006.09.034. ISBN 0092-8674. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406012943>

- [10] LAMARCHE, Brandon J., Nicole I. ORAZIO a Matthew D. WEITZMAN. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Letters*. 2010, 584(17), 3682-3695. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.07.029. ISSN 00145793. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2010.07.029>
- [11] CHEN, Ran a Marc S. WOLD. Replication protein A: Single-stranded DNA's first responder. *BioEssays*. 2014, 36(12), 1156-1161. DOI: 10.1002/bies.201400107. ISSN 02659247. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bies.201400107>
- [12] MASSON, J.-Y., Madalena C. TARSOUNAS, Alicja Z. STASIAK, Andrzej STASIAK, Rajvee SHAH, Michael J. MCILWRAITH, Fiona E. BENSON a Stephen C. WEST. Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev*. 2001, 15(24), 3296-3307. DOI: 10.1101/gad.947001. ISSN 08909369. Dostupné také z: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.947001>
- [13] HEYER, Wolf-Dietrich, Kirk T. EHMSSEN a Jie LIU. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annual Review of Genetics*. 2010, 44(1), 113-139. DOI: 10.1146/annurev-genet-051710-150955. ISSN 0066-4197. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-051710-150955>
- [14] SUNG, Patrick a Hannah KLEIN. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006, 7(10), 739-750. DOI: 10.1038/nrm2008. ISSN 1471-0072. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nrm2008>
- [15] O'DONNELL, M., L. LANGSTON a B. STILLMAN. Principles and Concepts of DNA Replication in Bacteria, Archaea, and Eukarya. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013, 5(7), a010108-a010108. DOI: 10.1101/cshperspect.a010108. ISSN 1943-0264. Dostupné také z: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a010108>
- [16] LIAO, Hongwei, Fang JI, Thomas HELLEDAY a Songmin YING. Mechanisms for stalled replication fork stabilization: new targets for synthetic lethality strategies in cancer treatments. *EMBO reports*. 2018, 19(9), 1-18. DOI: 10.15252/embr.201846263. ISSN 1469-221X. Dostupné také z: <http://embr.embopress.org/lookup/doi/10.15252/embr.201846263>
- [17] RODRIGUEZ, Raphaël, Kyle M MILLER, Josep V FORMENT, et al. Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes. *Nature Chemical Biology*. 2012, 8(3), 301-310. DOI: 10.1038/nchembio.780. ISSN 1552-4450. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nchembio.780>
- [18] BRANZELI, Dana a Marco FOIANI. Maintaining genome stability at the replication fork. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010, 11(3), 208-219. DOI:

- 10.1038/nrm2852. ISSN 1471-0072. Dostupné také z:
<http://www.nature.com/articles/nrm2852>
- [19] ZOU, L. Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science*. 2003, 300(5625), 1542-1548. DOI: 10.1126/science.1083430. ISSN 0036-8075. Dostupné také z:
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1083430>
- [20] HASHIMOTO, Yoshitami, Arnab RAY CHAUDHURI, Massimo LOPES a Vincenzo COSTANZO. Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat Struct Mol Biol*. 2010, 17(11), 1305-1311. DOI: 10.1038/nsmb.1927. ISSN 1545-9993. Dostupné také z:
<http://www.nature.com/articles/nsmb.1927>
- [21] KOLINJIVADI, Arun Mouli, Vincenzo SANNINO, Anna DE ANTONI, et al. Smarcal1-Mediated Fork Reversal Triggers Mre11-Dependent Degradation of Nascent DNA in the Absence of Brca2 and Stable Rad51 Nucleofilaments. *Molecular Cell*. 2017, 67(5), 867-881.e7. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.07.001. ISSN 10972765. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276517304951>
- [22] NEELSEN, Kai J. a Massimo LOPES. Replication fork reversal in eukaryotes: from dead end to dynamic response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2015, 16(4), 207-220. DOI: 10.1038/nrm3935. ISSN 1471-0072. Dostupné také z:
<http://www.nature.com/articles/nrm3935>
- [23] TSUZUKI, T., Y. FUJII, K. SAKUMI, et al. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996, 93(13), 6236-6240. DOI: 10.1073/pnas.93.13.6236. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.93.13.6236>
- [24] KLEIN, Hannah L. The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair*. 2008, 7(5), 686-693. DOI: 10.1016/j.dnarep.2007.12.008. ISSN 15687864. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786407004442>
- [25] CONNELL, Philip, Krishanthi JAYATHILAKA, Daniel HARAF, Ralph WEICHSELBAUM, Everett VOKES a Mark LINGEN. Pilot study examining tumor expression of RAD51 and clinical outcomes in human head cancers. *International Journal of Oncology*. 2006, 2006(28), 1113-9. DOI: 10.3892/ijo.28.5.1113. ISSN 1019-6439. Dostupné také z: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.28.5.1113>
- [26] MITRA, Anita, Charles JAMESON, Yolanda BARBACHANO, et al. Overexpression of RAD51 occurs in aggressive prostatic cancer. *Histopathology*. 2009, 55(6), 696-704. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2009.03448.x. ISSN 03090167. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2559.2009.03448.x>

- [27] CHEN, Jianhong, Milagros D. MORRICAL, Katherine A. DONIGAN, Joanne B. WEIDHAAS, Joann B. SWEASY, April M. AVERILL, Jennifer A. TOMCZAK a Scott W. MORRICAL. Tumor-associated mutations in a conserved structural motif alter physical and biochemical properties of human RAD51 recombinase. *Nucleic Acids Research*. 2015, 43(2), 1098-1111. DOI: 10.1093/nar/gku1337. ISSN 1362-4962. Dostupné z: <http://academic.oup.com/nar/article/43/2/1098/2414456/Tumorassociated-mutations-in-a-conserved>
- [28] SHINOHARA, Akira, Hideyuki OGAWA, Yoichi MATSUDA, Noriko USHIO, Kazuho IKEO a Tomoko OGAWA. Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nature Genetics*. 1993, 4(3), 239-243. DOI: 10.1038/ng0793-239. ISSN 1061-4036. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/ng0793-239>
- [29] TOMBLINE, Gregory a Richard FISHEL. Biochemical Characterization of the Human RAD51 Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277(17), 14417-14425. DOI: 10.1074/jbc.M109915200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M109915200>
- [30] STORY, Randall M., Irene T. WEBER a Thomas A. STEITZ. The structure of the E. coli recA protein monomer and polymer. *Nature*. 1992, 355(6358), 318-325. DOI: 10.1038/355318a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/355318a0>
- [31] PRASAD, Tekkate Krishnamurthy, Caitlyn C. YEYKAL a Eric C. GREENE. Visualizing the Assembly of Human Rad51 Filaments on Double-stranded DNA. *Journal of Molecular Biology*. 2006, 363(3), 713-728. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.08.046. ISSN 00222836. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283606010746>
- [32] SUBRAMANYAM, Shyamal, William T. JONES, Maria SPIES a M. Ashley SPIES. Contributions of the RAD51 N-terminal domain to BRCA2-RAD51 interaction. *Nucleic Acids Research*. 2013, 41(19), 9020-9032. DOI: 10.1093/nar/gkt691. ISSN 1362-4962. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkt691>
- [33] AIHARA, Hideki, Yutaka ITO, Hitoshi KURUMIZAKA, Shigeyuki YOKOYAMA a Takehiko SHIBATA. The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: structure and a DNA binding surface as revealed by NMR. *Journal of Molecular Biology*. 1999, 290(2), 495-504. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2904. ISSN 00222836. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283699929042>
- [34] GALKIN, Vitold E., Yan WU, Xiao-Ping ZHANG, et al. The Rad51/RadA N-Terminal Domain Activates Nucleoprotein Filament ATPase Activity. *Structure*. 2006, 14(6), 983-992. DOI: 10.1016/j.str.2006.04.001. ISSN 09692126. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212606002127>

- [35] SHIN, D. S. Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *The EMBO Journal*. 2003, 22(17), 4566-4576. DOI: 10.1093/emboj/cdg429. ISSN 1460-2075. Dostupné také z: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/cdg429>
- [36] LIU, Jie, Kirk T. EHMSSEN, Wolf-Dietrich HEYER a Scott W. MORRICAL. Presynaptic filament dynamics in homologous recombination and DNA repair. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2011, 46(3), 240-270. DOI: 10.3109/10409238.2011.576007. ISSN 1040-9238. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10409238.2011.576007>
- [37] ŠPÍREK, Mário, Jarmila MLČOUŠKOVÁ, Ondrej BELÁŇ, et al. Human RAD51 rapidly forms intrinsically dynamic nucleoprotein filaments modulated by nucleotide binding state. *Nucleic Acids Research*. 2018, 46(8), 3967–3980. DOI: 10.1093/nar/gky111. ISSN 0305-1048. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nar/article/46/8/3967/4898062>
- [38] 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*. 2006, 5(3), 381-91. DOI: 10.1016/j.dnarep.2005.11.005. ISSN 15687864. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786405003174>
- [39] PELLEGRINI, Luca, David S. YU, Thomas LO, Shubha ANAND, MiYoung LEE, Tom L. BLUNDELL a Ashok R. VENKITARAMAN. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51–BRCA2 complex. *Nature*. 2002, 420(6913), 287-293. DOI: 10.1038/nature01230. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature01230>
- [40] NATHANSON, Katherine N., Richard WOOSTER a Barbara L. WEBER. Breast cancer genetics: What we know and what we need. *Nature Medicine*. 2001, 7(5), 552-556. DOI: 10.1038/87876. ISSN 1078-8956. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/nm0501_552
- [41] Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program (1973-2015). National Cancer Institute[online]. Bethesda, MD: Surveillance Research Program, 2018 [cit. 2018-12-18]. Dostupné z: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/
- [42] NAROD, Steven A. Modifiers of risk of hereditary breast and ovarian cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2002, 2(2), 113-123. DOI: 10.1038/nrc726. ISSN 1474-175X. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nrc726>
- [43] KING, M.-C. Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*. 2003, 302(5645), 643-646. DOI: 10.1126/science.1088759. ISSN

- 0036-8075. Dostupné také z:
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1088759>
- [44] YANG, H. BRCA2 Function in DNA Binding and Recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA Structure. *Science*. 2002, 297(5588), 1837-1848. DOI: 10.1126/science.297.5588.1837. ISSN 00368075. Dostupné také z:
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.297.5588.1837>
- [45] LI, J, C ZOU, Y BAI, D E WAZER, V BAND a Q GAO. DSS1 is required for the stability of BRCA2. *Oncogene*. 2006, 25(8), 1186-1194. DOI: 10.1038/sj.onc.1209153. ISSN 0950-9232. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/1209153>
- [46] ESASHI, Fumiko, Vitold E GALKIN, Xiong YU, Edward H EGELMAN a Stephen C WEST. Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007, 14(6), 468-474. DOI: 10.1038/nsmb1245. ISBN 1545-9993. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nsmb1245>
- [47] CARREIRA, Aura a Stephen C. KOWALCZYKOWSKI. BRCA2: Shining light on the regulation of DNA-binding selectivity by RAD51. *Cell Cycle*. 2014, 8(21), 3445-3447. DOI: 10.4161/cc.8.21.9748. ISSN 1538-4101. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.8.21.9748>
- [48] DAVIES, Adelina A, Jean-Yves MASSON, Michael J MCILWRAITH, Alicja Z STASIAK, Andrzej STASIAK, Ashok R VENKITARAMAN a Stephen C WEST. Role of BRCA2 in Control of the RAD51 Recombination and DNA Repair Protein. *Molecular Cell*. 2001, 7(2), 273-282. DOI: 10.1016/S1097-2765(01)00175-7. ISSN 10972765. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276501001757>
- [49] CARREIRA, A. a S. C. KOWALCZYKOWSKI. Two classes of BRC repeats in BRCA2 promote RAD51 nucleoprotein filament function by distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011, 108(26), 10448-10453. DOI: 10.1073/pnas.1106971108. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1106971108>
- [50] VENKITARAMAN, Ashok R. Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. 2002, 108(2), 171-182. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00615-3. ISSN 00928674. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867402006153>
- [51] WIESE, C., J. M. HINZ, R. S. TEBBS, P. B. NHAM, S. S. URBIN, D. W. COLLINS, L. H. THOMPSON a D. SCHILD. Disparate requirements for the Walker A and B ATPase motifs of human RAD51D in homologous recombination. *Nucleic Acids Research*. 2006, 34(9), 2833-2843. DOI: 10.1093/nar/gkl366. ISSN 0305-1048. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkl366>

- [52] MILLER, K. A. Domain mapping of the Rad51 paralog protein complexes. *Nucleic Acids Research*. 2004, 32(1), 169-178. DOI: 10.1093/nar/gkg925. ISSN 1362-4962. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkg925>
- [53] VAZ, Fiona, Helmut HANENBERG, Beatrice SCHUSTER, et al. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nature Genetics*. 2010, 42(5), 406-409. DOI: 10.1038/ng.570. ISSN 1061-4036. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/ng.570>
- [54] MEINDL, Alfons, Heide HELLEBRAND, Constanze WIEK, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nature Genetics*. 2010, 42(5), 410-414. DOI: 10.1038/ng.569. ISSN 1061-4036. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/ng.569>
- [55] LOVEDAY, Chey, Clare TURNBULL, Emma RAMSAY, et al. Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nature Genetics*. 2011, 43(9), 879-882. DOI: 10.1038/ng.893. ISSN 1061-4036. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/ng.893>
- [56] GOLMARD, Lisa, Virginie CAUX-MONCOUTIER, Grégoire DAVY, et al. Germline mutation in the RAD51B gene confers predisposition to breast cancer. *BMC Cancer*. 2013, 13(1). DOI: 10.1186/1471-2407-13-484. ISSN 1471-2407. Dostupné také z: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-13-484>
- [57] TAKATA, M., M. S. SASAKI, S. TACHIIRI, T. FUKUSHIMA, E. SONODA, SCHILD, L. H. THOMPSON a TAKEDA. Chromosome Instability and Defective Recombinational Repair in Knockout Mutants of the Five Rad51 Paralogs. *Molecular and Cellular Biology*. 2001, 21(8), 2858-2866. DOI: 10.1128/MCB.21.8.2858-2866.2001. ISSN 0270-7306. Dostupné také z: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.21.8.2858-2866.2001>
- [58] DEANS, B. Xrcc2 is required for genetic stability, embryonic neurogenesis and viability in mice. *The EMBO Journal*. 2000, 19(24), 6675-6685. DOI: 10.1093/emboj/19.24.6675. ISSN 14602075. Dostupné také z: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/19.24.6675>
- [59] PUTNAM, Christopher D., Tikvah K. HAYES a Richard D. KOLODNER. Specific pathways prevent duplication-mediated genome rearrangements. *Nature*. 2009, 460(7258), 984-989. DOI: 10.1038/nature08217. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nature08217>
- [60] CHAN, Ying Wai, Kasper FUGGER a Stephen C. WEST. Unresolved recombination intermediates lead to ultra-fine anaphase bridges, chromosome breaks and aberrations. *Nature Cell Biology*. 2018, 20(1), 92-103. DOI: 10.1038/s41556-017-0011-1. ISSN 1465-7392. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/s41556-017-0011-1>

- [61] MASON, Jennifer M., Kritika DUSAD, William Douglass WRIGHT, et al. RAD54 family translocases counter genotoxic effects of RAD51 in human tumor cells. *Nucleic Acids Research*. 2015, 43(6), 3180-3196. DOI: 10.1093/nar/gkv175. ISSN 1362-4962. Dostupné také z: <http://academic.oup.com/nar/article/43/6/3180/2453449/RAD54-family-translocases-counter-genotoxic>
- [62] DUNGRRAWALA, Huzefa, Kamakoti P. BHAT, Rémy LE MEUR, et al. RADX Promotes Genome Stability and Modulates Chemosensitivity by Regulating RAD51 at Replication Forks. *Molecular Cell*. 2017, 67(3), 374-386.e5. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.06.023. ISSN 10972765. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276517304574>
- [63] BHAT, Kamakoti P., Archana KRISHNAMOORTHY, Huzefa DUNGRRAWALA, Edwige B. GARCIN, Mauro MODESTI a David CORTEZ. RADX Modulates RAD51 Activity to Control Replication Fork Protection. *Cell Reports*. 2018, 24(3), 538-545. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.06.061. ISSN 22111247. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124718309884>
- [64] ANTONY, Edwin, Eric J. TOMKO, Qi XIAO, Lumir KREJCI, Timothy M. LOHMAN a Tom ELLENBERGER. Srs2 Disassembles Rad51 Filaments by a Protein-Protein Interaction Triggering ATP Turnover and Dissociation of Rad51 from DNA. *Molecular Cell*. 2009, 35(1), 105-115. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.05.026. ISSN 10972765. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276509003876>
- [65] IRA, Grzegorz, Anna MALKOVA, Giordano LIBERI, et al. Srs2 and Sgs1–Top3 Suppress Crossovers during Double-Strand Break Repair in Yeast. *Cell*. 2003, 115(4), 401-411. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00886-9. ISSN 00928674. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867403008869>
- [66] 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*. 2015, 6(1). DOI: 10.1038/ncomms6931. ISSN 2041-1723. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/ncomms6931>
- [67] MOLDOVAN, George-Lucian, Donniphat DEJSUPHONG, Mark I.R. PETALCORIN, Kay HOFMANN, Shunichi TAKEDA, Simon J. BOULTON a Alan D. D'ANDREA. Inhibition of Homologous Recombination by the PCNA-Interacting Protein PARI. *Molecular Cell*. 2012, 45(1), 75-86. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.11.010. ISSN 10972765. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276511008951>
- [68] CROTEAU, Deborah L., Venkateswarlu POPURI, Patricia L. OPRESKO a Vilhelm A. BOHR. Human RecQ Helicases in DNA Repair, Recombination, and Replication. *Annual Review of Biochemistry*. 2014, 83(1), 519-552. DOI:

10.1146/annurev-biochem-060713-035428. ISSN 0066-4154. Dostupné také z:
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-060713-035428>

- [69] DALEY, James M., Hengyao NIU a Patrick SUNG. Roles of DNA Helicases in the Mediation and Regulation of Homologous Recombination. *DNA Helicases and DNA Motor Proteins*. New York, NY: Springer New York, 2013, 2013-10-29, 2013(767), 185-202. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. DOI: 10.1007/978-1-4614-5037-5_9. ISBN 978-1-4614-5036-8. Dostupné také z:
http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-5037-5_9
- [70] ELLIS, Nathan A., Joanna GRODEN, Tian-Zhang YE, Joel STRAUGHEN, David J. LENNON, Susan CIOCCI, Maria PROYTICHEVA a James GERMAN. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*. 1995, 83(4), 655-666. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90105-1. ISSN 00928674. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867495901051>
- [71] NIMONKAR, A. V., J. GENSCHEL, E. KINOSHITA, P. POLACZEK, J. L. CAMPBELL, C. WYMAN, P. MODRICH a S. C. KOWALCZYKOWSKI. BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev*. 2011, 25(4), 350-362. DOI: 10.1101/gad.2003811. ISSN 0890-9369. Dostupné také z:
<http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.2003811>
- [72] BUGREEV, D. V., X. YU, E. H. EGELMAN a A. V. MAZIN. Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. *Genes Dev*. 2007, 21(23), 3085-3094. DOI: 10.1101/gad.1609007. ISSN 0890-9369. Dostupné také z:
<http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1609007>
- [73] DAVIES, Sally L, Phillip S NORTH a Ian D HICKSON. Role for BLM in replication-fork restart and suppression of origin firing after replicative stress. *Nature*. 2007, 14(7), 677-679. DOI: 10.1038/nsmb1267. ISSN 1545-9993. Dostupné také z:
<http://www.nature.com/articles/nsmb1267>
- [74] MACHWE, Amrita, Liren XIAO, Joanna GRODEN a David K. ORREN. The Werner and Bloom Syndrome Proteins Catalyze Regression of a Model Replication Fork †. *Biochemistry*. 2006, 45(47), 13939-13946. DOI: 10.1021/bi0615487. ISSN 0006-2960. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi0615487>
- [75] WU, Leonard, Kok LUNG CHAN, Christine RALF, et al. The HRDC domain of BLM is required for the dissolution of double Holliday junctions. *The EMBO Journal*. 2005, 24(14), 2679-2687. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600740. ISSN 0261-4189. Dostupné také z: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7600740>
- [76] WU, Leonard, Sally L. DAVIES, Nicola C. LEVITT a Ian D. HICKSON. Potential Role for the BLM Helicase in Recombinational Repair via a Conserved Interaction with

- RAD51. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, 276(22), 19375-19381. DOI: 10.1074/jbc.M009471200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M009471200>
- [77] YU, C.-E., J. OSHIMA, Y.-H. FU, et al. Positional Cloning of the Werner's Syndrome Gene. *Science*. 1996, 272(5259), 258-262. DOI: 10.1126/science.272.5259.258. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.272.5259.258>
- [78] SIDOROVA, Julia M., Nianzhen LI, Albert FOLCH a Raymond J. MONNAT, JR. The RecQ helicase WRN is required for normal replication fork progression after DNA damage or replication fork arrest. *Cell Cycle*. 2014, 7(6), 796-807. DOI: 10.4161/cc.7.6.5566. ISSN 1538-4101. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.7.6.5566>
- [79] HUANG, Shurong, Baomin LI, Matthew D. GRAY, Junko OSHIMA, I. Saira MIAN a Judith CAMPISI. The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'→5' exonuclease. *Nature Genetics*. 1998, 20(2), 114-116. DOI: 10.1038/2410. ISSN 1061-4036. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/ng1098_114
- [80] MO, Dongliang, Yongliang ZHAO a Adayabalam S. BALAJEE. Human RecQL4 helicase plays multifaceted roles in the genomic stability of normal and cancer cells. *Cancer Letters*. 2018, 413(28 January), 1-10. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.10.021. ISSN 03043835. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383517306584>
- [81] XU, Xiaohua, Patrick J ROCHETTE, Eminent A FEYISSA, Tina V SU a Yilun LIU. MCM10 mediates RECQ4 association with MCM2-7 helicase complex during DNA replication. *The EMBO Journal*. 2009, 28(19), 3005-3014. DOI: 10.1038/emboj.2009.235. ISSN 0261-4189. Dostupné také z: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2009.235>
- [82] BERTI, Matteo, Arnab RAY CHAUDHURI, Saravanabhavan THANGAVEL, et al. Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nat Struct Mol Biol*. 2013, 20(3), 347-354. DOI: 10.1038/nsmb.2501. ISSN 1545-9993. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nsmb.2501>
- [83] HU, Y., S. RAYNARD, M. G. SEHORN, et al. RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. *Genes Dev*. 2007, 21(23), 3073-3084. DOI: 10.1101/gad.1609107. ISSN 0890-9369. Dostupné také z: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1609107>
- [84] NEWMAN, Joseph A., Hazel AITKENHEAD, Pavel SAVITSKY a Opher GILEADI. Insights into the RecQ helicase mechanism revealed by the structure of the helicase

- domain of human RECQL5. *Nucleic Acids Research*. 2017, 45(7), 4231–4243. DOI: 10.1093/nar/gkw1362. ISSN 0305-1048. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw1362>
- [85] REN, Hua, Shuo-Xing DOU, Xing-Dong ZHANG, et al. The zinc-binding motif of human RECQ5 β suppresses the intrinsic strand-annealing activity of its DExH helicase domain and is essential for the helicase activity of the enzyme. *Biochemical Journal*. 2008, 412(3), 425-33. DOI: 10.1042/BJ20071150. ISSN 0264-6021. Dostupné také z: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20071150>
- [86] GARCIA, Patrick L, Yilun LIU, Josef JIRICNY, Stephen C WEST a Pavel JANŠČAK. Human RECQ5 β , a protein with DNA helicase and strand-annealing activities in a single polypeptide. *The EMBO Journal*. 2004, 23(14), 2882-2891. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600301. ISSN 0261-4189. Dostupné také z: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7600301>
- [87] KANAGARAJ, Radhakrishnan, Daniela HUEHN, April MACKELLAR, et al. RECQ5 helicase associates with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II during productive elongation phase of transcription. *Nucleic Acids Research*. 2010, 38(22), 8131-8140. DOI: 10.1093/nar/gkq697. ISSN 0305-1048. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkq697>
- [88] SCHWENDENER, Sybille, Steven RAYNARD, Shreya PALIWAL, et al. Physical Interaction of RECQ5 Helicase with RAD51 Facilitates Its Anti-recombinase Activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285(21), 15739-15745. DOI: 10.1074/jbc.M110.110478. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M110.110478>
- [89] SAPONARO, Marco, Theodoros KANTIDAKIS, Richard MITTER, et al. RECQL5 Controls Transcript Elongation and Suppresses Genome Instability Associated with Transcription Stress. *Cell*. 2014, 157(5), 1037-1049. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.048. ISSN 00928674. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414004772>
- [90] URBAN, Vaclav, Jana DOBROVOLNA, Daniela HÜHN, Jana FRYZELKOVA, Jiri BARTEK a Pavel JANŠČAK. RECQ5 helicase promotes resolution of conflicts between replication and transcription in human cells. *The Journal of Cell Biology*. 2016, 214(4), 401-415. DOI: 10.1083/jcb.201507099. ISSN 0021-9525. Dostupné také z: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201507099>
- [91] DI MARCO, Stefano, Zdenka HASANOVA, Radhakrishnan KANAGARAJ, et al. RECQ5 Helicase Cooperates with MUS81 Endonuclease in Processing Stalled Replication Forks at Common Fragile Sites during Mitosis. *Molecular Cell*. 2017, 66(5), 658-671.e8. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.05.006. ISSN 10972765. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276517303192>

- [92] ZHENG, Lu, Radhakrishnan KANAGARAJ, Boris MIHALJEVIC, Sybille SCHWENDENER, Alessandro A. SARTORI, Bertran GERRITS, Igor SHEVELEV a Pavel JANŠČAK. MRE11 complex links RECQ5 helicase to sites of DNA damage. *Nucleic Acids Research*. 2009, 37(8), 2645-2657. DOI: 10.1093/nar/gkp147. ISSN 1362-4962. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkp147>
- [93] PALIWAL, Shreya, Radhakrishnan KANAGARAJ, Andreas STURZENEGGER, Kamila BURDOVA a Pavel JANŠČAK. Human RECQ5 helicase promotes repair of DNA double-strand breaks by synthesis-dependent strand annealing. *Nucleic Acids Research*. 2014, 42(4), 2380-2390. DOI: 10.1093/nar/gkt1263. ISSN 1362-4962. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkt1263>
- [94] SHIMA, H., H. SUZUKI, J. SUN, et al. Activation of the SUMO modification system is required for the accumulation of RAD51 at sites of DNA damage. *Journal of Cell Science*. 2013, 126(22), 5284-5292. DOI: 10.1242/jcs.133744. ISSN 0021-9533. Dostupné také z: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.133744>
- [95] LUO, Kuntian, Lei LI, Yunhui LI, et al. A phosphorylation–deubiquitination cascade regulates the BRCA2–RAD51 axis in homologous recombination. *Genes and Development*. 2016, 30(23), 2581-2595. DOI: 10.1101/gad.289439.116. ISSN 0890-9369. Dostupné také z: <http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.289439.116>
- [96] LIU, Jinping, Alex KRUSWICK, Hien DANG, Andy D. TRAN, So Mee KWON, Xin Wei WANG a Philipp OBERDOERFFER. Ubiquitin-specific protease 21 stabilizes BRCA2 to control DNA repair and tumor growth. *Nature Communications*. 2017, 8(1). DOI: 10.1038/s41467-017-00206-2. ISSN 2041-1723. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/s41467-017-00206-2>
- [97] SØRENSEN, Claus Storgaard, Lasse Tengbjerg HANSEN, Jaroslaw DZIEGIELEWSKI, Randi G. SYLJUÅSEN, Cecilia LUNDIN, Jiri BARTEK a Thomas HELLEDAY. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nature Cell Biology*. 2005, 7(2), 195-201. DOI: 10.1038/ncb1212. ISSN 1465-7392. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/ncb1212>
- [98] YATA, Keiko, Janette LLOYD, Sarah MASLEN, Jean-Yves BLEUYARD, Mark SKEHEL, Stephen J. SMERDON a Fumiko ESASHI. Plk1 and CK2 Act in Concert to Regulate Rad51 during DNA Double Strand Break Repair. *Molecular Cell*. 2012, 45(3), 371-383. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.12.028. ISSN 10972765. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276512000342>
- [99] SUBRAMANYAM, Shyamal, Mohammed ISMAIL, Ipshita BHATTACHARYA a Maria SPIES. Tyrosine phosphorylation stimulates activity of human RAD51 recombinase through altered nucleoprotein filament dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016, 113(41), E6045-E6054. DOI:

- 10.1073/pnas.1604807113. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1604807113>
- [100] ESASHI, Fumiko, Nicole CHRIST, Julian GANNON, Yilun LIU, Tim HUNT, Maria JASIN a Stephen C. WEST. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature*. 2005, 434(7033), 598-604. DOI: 10.1038/nature03404. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nature03404>
- [101] BARTEK, Jiri a Jiri LUKAS. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*. 2003, 3(5), 421-429. DOI: 10.1016/S1535-6108(03)00110-7. ISSN 15356108. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610803001107>
- [102] ZHAO, H. a H. PIWNICA-WORMS. ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1. *Molecular and Cellular Biology*. 2001, 21(13), 4129-4139. DOI: 10.1128/MCB.21.13.4129-4139.2001. ISSN 0270-7306. Dostupné také z: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.21.13.4129-4139.2001>
- [103] BAHASSI, E M, J L OVESEN, A L RIESENBERG, W Z BERNSTEIN, P E HASTY a P J STAMBROOK. The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene*. 2008, 27(28), 3977-3985. DOI: 10.1038/onc.2008.17. ISSN 0950-9232. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/onc200817>
- [104] BUGREEV, Dmitry V., Fei HUANG, Olga M. MAZINA, Roberto J. PEZZA, Oleg N. VOLOSHIN, R. DANIEL CAMERINI-OTERO a Alexander V. MAZIN. HOP2-MND1 modulates RAD51 binding to nucleotides and DNA. *Nature Communications*. 2014, 5(1). DOI: 10.1038/ncomms5198. ISSN 2041-1723. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/ncomms5198>
- [105] FENG, Z., S. P. SCOTT, W. BUSSEN, G. G. SHARMA, G. GUO, T. K. PANDITA a S. N. POWELL. Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011, 108(2), 686-691. DOI: 10.1073/pnas.1010959107. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010959107>
- [106] CHAPMAN, J. Ross, Martin R.G. TAYLOR a Simon J. BOULTON. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*. 2012, 47(4), 497-510. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.07.029. ISSN 10972765. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276512006569>
- [107] HELLEDAY, T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis*. 2010, 31(6), 955-960. DOI:

10.1093/carcin/bgq064. ISSN 0143-3334. Dostupné také z:
<https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgq064>

- [108] BARRETINA, Jordi, Giordano CAPONIGRO, Nicolas STRANSKY, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modeling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 2012, 483(7391), 603-607. DOI: 10.1038/nature11003. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nature11003>
- [109] SHARAN, Shyam K., Masami MORIMATSU, Urs ALBRECHT, et al. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature*. 1997, 386(6627), 804-810. DOI: 10.1038/386804a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/386804a0>
- [110] MARSDEN, Carolyn G., Ryan B. JENSEN, Jennifer ZAGELBAUM, Eli ROTHENBERG, Scott W. MORRICAL, Susan S. WALLACE, Joann B. SWEASY a Nancy MAIZELS. The Tumor-Associated Variant RAD51 G151D Induces a Hyper-Recombination Phenotype. *PLOS Genetics*. 2016, 12(8). DOI: 10.1371/journal.pgen.1006208. ISSN 1553-7404. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1006208>
- [111] ZHAO, Weixing, Sivaraja VAITHIYALINGAM, Joseph SAN FILIPPO, David G. MARANON a . Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Molecular Cell*. 2015, 59(2), 176-187. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.05.032. ISSN 10972765. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276515003998>
- [112] CHEN, Chi-Fen, Phang-Lang CHEN, Qing ZHONG, Z. Dave SHARP a Wen-Hwa LEE. Expression of BRC Repeats in Breast Cancer Cells Disrupts the BRCA2-Rad51 Complex and Leads to Radiation Hypersensitivity and Loss of G2/M Checkpoint Control. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274(46), 32931-32935. DOI: 10.1074/jbc.274.46.32931. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.274.46.32931>
- [113] NOMME, Julian, Axelle RENODON-CORNIÈRE, Yuya ASANOMI, et al. Design of Potent Inhibitors of Human RAD51 Recombinase Based on BRC Motifs of BRCA2 Protein: Modeling and Experimental Validation of a Chimera Peptide. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010, 53(15), 5782-5791. DOI: 10.1021/jm1002974. ISSN 0022-2623. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm1002974>
- [114] The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network. NCI Genomic Data Commons [online]. Bethesda, MD: NIH, 2005 [cit. 2019-01-02]. Dostupné z: <https://gdc.cancer.gov/about-data/publications/pancanatlas>

10 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1: Poškození DNA (vytvořeno v programu Inkscape).....	10
Obr. 2: Homologní rekombinace (vytvořeno v programu Inkscape).....	11
Obr. 3: Postsynaptická fáze HR (vytvořeno v programu Inkscape).....	12
Obr. 4: Reverze replikační vidlice (vytvořeno v programu Inkscape).....	13
Obr. 5: Struktura proteinu BRCA2 (vytvořeno v programu Inkscape).....	15
Obr. 6: Skupina lidských RecQ helicáz (vytvořeno v programu Inkscape).....	18
Obr. 7: Fosforylace Chk1 kinázou (vytvořeno v programu Inkscape)	20
Obr. 8: Schéma syntetické letality (vytvořeno v programu Inkscape).....	21
Obr. 9: Struktura RAD51 F279L.....	34
Obr. 10: DNA vazebná afinita RAD51 F279L	35
Obr. 11: Analýza tvorby D-loop struktury RAD51 F279L.....	36
Obr. 12: Kinetika tvorby RAD51 F279L vlákna a jeho stabilita v přítomnosti cDNA	37
Obr. 13: Destabilizace RAD51 F279L-ssDNA vlákna prostřednictvím BRC3 peptidu.....	37
Obr. 14: Analýza interakce RAD51 F279L a BRC3-GST pomocí pull-down metody	38
Obr. 15: Analýza interakce RAD51 F279L a BRC3 peptidu skrze FP.....	39
Obr. 16: Struktura RAD51 T309D.....	40
Obr. 17: DNA vazebná afinita RAD51 T309D.....	41
Obr. 18: Kinetika tvorby RAD51 T309D vlákna a jeho stabilita v přítomnosti cDNA.....	41
Obr. 19: Analýza protekční aktivity RAD51 T309D vůči nukleolytické degradaci	42
Obr. 20: Analýza tvorby D-loop struktury RAD51 T309D	43
Obr. 21: Analýza interakce RAD51 T309D s exonem 27 skrze FP.....	44
Obr. 22: Detekce interakce imobilizovaných peptidů proteinu RAD51 s RECQ5	45
Obr. 23: Struktura RAD51 K304A	46
Obr. 24: DNA vazebná afinita RAD51 K304A	46
Obr. 25: Analýza tvorby D-loop struktury RAD51 K304A.....	47
Obr. 26: Disociace RAD51 z ssDNA vlivem působení helicázy RECQ5	48
Obr. 27: Navržený model RAD51 F279L.....	50
Obr. 28: Navržený model RAD51 T309D	52
Obr. 29: Navržený model RAD51 Δ 301-307.....	54
Tab. 1: Chemikálie a enzymy.....	23
Tab. 2: Složení roztoků, médií a pufřů.....	24
Tab. 3: Sekvence použitých oligonukleotidů	25
Tab. 4: Program PCR pro místně-cílenou mutagenezi.....	28