

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

Charakterizace interakce lidských proteinů RECQ4 a MCM10

Anna Černá
Jihomoravský kraj

Bzenec 2024

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

Charakterizace interakce lidských proteinů RECQ4 a MCM10

Characterization of interaction of human RECQ4 and MCM10 proteins

Autor: Anna Černá

Škola: Klvaňovo gymnázium a střední zdravotnická škola Kyjov,
příspěvková organizace, třída Komenského 549/23, 697 01 Kyjov

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultanti: doc. Mgr. Lumír Krejčí, Ph.D. a Mgr. María Victoria
Marini Palomeque, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a 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.

Ve Bzenci dne 8. 2. 2024

Anna Černá

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala především doc. Mgr. Lumíru Krejčímu Ph.D. za poskytnutí jedinečné příležitosti pracovat v Laboratoři homologní rekombinace a opravy DNA (LORD), za jeho podporu, motivaci a cenné rady.

Dále patří můj velký dík Mgr. Marii Victorii Marini Palomeque, Ph.D. za veškerý čas, který mi v laboratoři věnovala, a hlavně za její vřelý osobní přístup a psychickou podporu.

Také děkuji Mgr. Jakubovi Cibulkovi, Ph.D. za zasvěcení do problematiky fázové separace a Mgr. Magdaléně Zaccalové za její ochotu a pomoc při práci s hmyzími buňkami. Poděkování patří také všem ostatním členům týmu LORD za vytvoření příjemného prostředí a za to, jak mě mezi sebe přijali.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Mgr. Zdeňce Synkové, paní ředitelce Klvaňova gymnázia v Kyjově Mgr. Renátě Soukalové, MBA a mé třídní Mgr. Renatě Výletové za jejich pomoc a umožnění individuálního studia.

Děkuji také svým rodičům za vytvoření perfektního zázemí a veškerou podporu.

Anotace

Replikace DNA je klíčový biologický proces, který zabezpečuje předání a uchování genetické informace během buněčného dělení. První fází tohoto procesu je iniciace replikace DNA, která probíhá díky koordinované aktivitě mnoha proteinů. Mezi ně patří i proteiny RECQ4 a MCM10. Přesná úloha těchto proteinů v iniciaci replikace stále zůstává nejasná. Avšak role proteinu RECQ4 v udržování integrity genomu je zásadní, jelikož mutace v genu *RECQ4* jsou spojeny se třemi závažnými dědičnými onemocněními: Rothmund-Thomsonův syndrom, Baller-Geroldův syndrom a RAPADILINO. Tato práce se zaměřuje na charakterizaci interakce proteinů RECQ4 a MCM10. Výsledky ukazují, že proteiny MCM10 a RECQ4 přímo interagují pomocí interní domény MCM10. Tato interakce má funkční význam, neboť vede ke zlepšení vazby proteinu RECQ4 na DNA a stimuluje fázovou separaci, která může hrát klíčovou roli při iniciaci replikace DNA. Tato práce přispívá k lepšímu pochopení úlohy proteinu RECQ4 a mohla by tedy přispět k porozumění podstaty chorob spojených s mutacemi v genu *RECQ4*.

Klíčová slova

Replikace DNA; RECQ4; MCM10; fázová separace

Annotation

DNA replication is a key biological process that ensures the transmission and preservation of genetic information during cell division. The first stage of this process is the initiation of DNA replication, which is carried out by the coordinated activity of many proteins. These include RECQ4 and MCM10. The precise role of these proteins in replication initiation remains unclear. However, the role of RECQ4 protein in maintaining genome integrity is crucial, as mutations in the *RECQ4* gene are associated with three severe hereditary diseases: Rothmund-Thomson syndrome, Baller-Gerold syndrome and RAPADILINO. This work focuses on the characterization of the interaction between RECQ4 and MCM10. The results show that MCM10 and RECQ4 directly interact through the internal domain of MCM10. This interaction has functional significance as it leads to improved binding of RECQ4 protein to DNA and stimulates phase separation, which may play a key role in the initiation of DNA replication. This work contributes to a better understanding of the role of the RECQ4 protein and could therefore contribute to the understanding of the nature of diseases associated with mutations in the *RECQ4* gene.

Key words

DNA replication; RECQ4; MCM10; liquid-liquid phase separation

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Replikace DNA.....	9
2.2	Iniciace replikace DNA.....	11
2.2.1	Replikační počátky	11
2.2.2	Licencování počátků.....	12
2.2.3	Aktivace helikázy	12
2.3	Protein MCM10	14
2.3.1	Funkce	14
2.3.2	Strukturní domény	14
2.4	Protein RECQ4	15
2.4.1	Struktura a biochemická charakterizace	16
2.4.2	Další úlohy RECQ4 proteinu.....	17
2.4.3	Syndromy asociované s mutacemi v <i>RECQ4</i>	18
3	Cíle práce	20
4	Materiály a metody	21
4.1	Materiály	21
4.1.1	Chemikálie a enzymy	21
4.1.2	Pufry a roztoky	22
4.1.3	Média.....	24
4.1.4	Plazmidy	24
4.1.5	Vektory	25
4.1.6	Bakteriální kmeny.....	25
4.1.7	Hmyzí buňky	25
4.1.8	Oligonukleotidy	25
4.1.9	Proteiny.....	26
4.1.10	Kity.....	26
4.1.11	Přístroje	26
4.1.12	Software	27
4.2	Metody	27
4.2.1	Agarózová gelová elektroforéza	27
4.2.2	Gibsonovo klonování.....	28
4.2.3	Transformace buněk	29
4.2.4	Izolace a sekvenace DNA.....	29
4.2.5	SDS-PAGE	29

4.2.6	Expresa proteinu MCM10 FL v hmyzích buňkách	29
4.2.7	Expresa proteinů v bakteriích	31
4.2.8	Purifikace proteinu MCM10 FL z hmyzích buněk	32
4.2.9	Purifikace proteinů z bakterií.....	33
4.2.10	Kontrola nukleázové kontaminace	34
4.2.11	„Pull-down“ analýza	34
4.2.12	EMSA.....	35
4.2.13	Mikroskopie kondenzátů	35
5	Výsledky	36
5.1	Klonování, exprese a purifikace MCM10 FL	36
5.1.1	Bakterie.....	36
5.1.2	Hmyzí buňky	37
5.2	Expresa a purifikace fragmentů RECQ4 a MCM10	38
5.3	Interakce mezi RECQ4 a MCM10.....	38
5.3.1	Vazba s MCM10 FL	38
5.3.2	Vazba s fragmenty MCM10 proteinu	39
5.4	Vliv interakce na DNA vazbu RECQ4	40
5.5	Fázová separace proteinů RECQ4 a MCM10	41
5.5.1	Interakce mezi RECQ4 a MCM10 vede k fázové separaci	42
5.5.2	Fázová separace RECQ4-MCM10 v přítomnosti DNA	44
6	Diskuze	46
6.1	RECQ4-MCM10 interakce v iniciaci replikace	46
6.2	Navazující studie.....	47
7	Závěr	49
8	Použitá literatura	50
9	Seznam zkratk	56
10	Seznam obrázků a tabulek.....	59

1 ÚVOD

Základní podmínkou pro vznik života bylo vytvoření molekul, které měly schopnost předávat svou dědičnou informaci z generace na generaci. Tuto funkci v našich buňkách zastává deoxyribonukleová kyselina (DNA), která kóduje informace nutné pro správný vývoj a fungování celého organismu. Zdvojení této molekuly se nazývá DNA replikace.

V průběhu evoluce se tento proces čím dál více zdokonaloval a vyvinul se v soubor mnoha proteinů, které dokonale spolupracují a zajišťují přesnou replikaci. Díky nim dojde k rozpletení dvoušroubovice DNA a podle těchto původních vláken se následně dosyntetizují vlákna nová. Z jedné molekuly DNA tak vzniknou dvě identické kopie.

Vysoká přesnost replikace DNA je klíčová pro přežití i zdraví všech živých organismů. Při nesprávné replikaci vznikají mutace, jejichž akumulace vede k nestabilitě genomu. A právě ta je častou příčinou maligní transformace buněk a vzniku dědičných onemocnění [1].

Tato práce se zabývá proteiny RECQ4 a MCM10, které mají klíčovou úlohu v iniciaci replikace DNA. Tyto proteiny spolu přímo interagují, nicméně přesný význam jejich interakce a regulace znám není. Hlavním záměrem práce je mapování této interakce a zjištění jejího vlivu na DNA vazbu a fázovou separaci proteinů. Vzhledem k tomu, že mutace v genu *RECQ4* jsou asociovány se třemi závažnými dědičnými onemocněními, nové poznatky o proteinu RECQ4 mohou přispět k pochopení molekulární podstaty těchto onemocnění a potenciálně napomoci jejich léčbě.

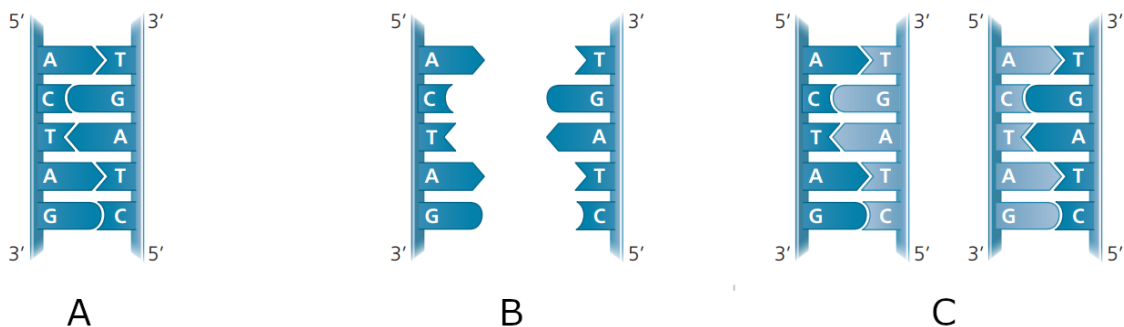
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Replikace DNA

DNA je molekula, která ve své nukleotidové sekvenci obsahuje informace nutné k vývoji, funkci a reprodukci živých organismů. Aby všechny buňky organismu měly identickou genetickou informaci, dochází před každým buněčným dělením k replikaci, vytvoření kopie původní DNA [2].

Molekulu DNA tvoří dva polynukleotidové řetězce, které jsou spojeny vodíkovými můstky mezi jejichmi bázemi. Řetězce dvoušroubovice DNA jsou vzájemně komplementární, každý směřuje opačným směrem, jsou tedy antiparalelní [3].

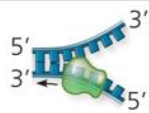


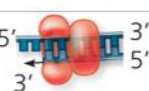

Tato struktura umožňuje elegantní duplikaci DNA (Obr. 1). Vodíkové můstky, které drží dvoušroubovici pohromadě, jsou lokálně relativně slabé a umožňují oddělení vláken od sebe [2]. Každé vlákno pak slouží jako templát pro syntézu nového řetězce podle pravidel párování bází. Tímto způsobem vzniknou z jedné mateřské dvoušroubovice dvě nové, každá s jedním původním a jedním novým vláknem. Proto proces replikace DNA nazýváme semikonzervativní [4].



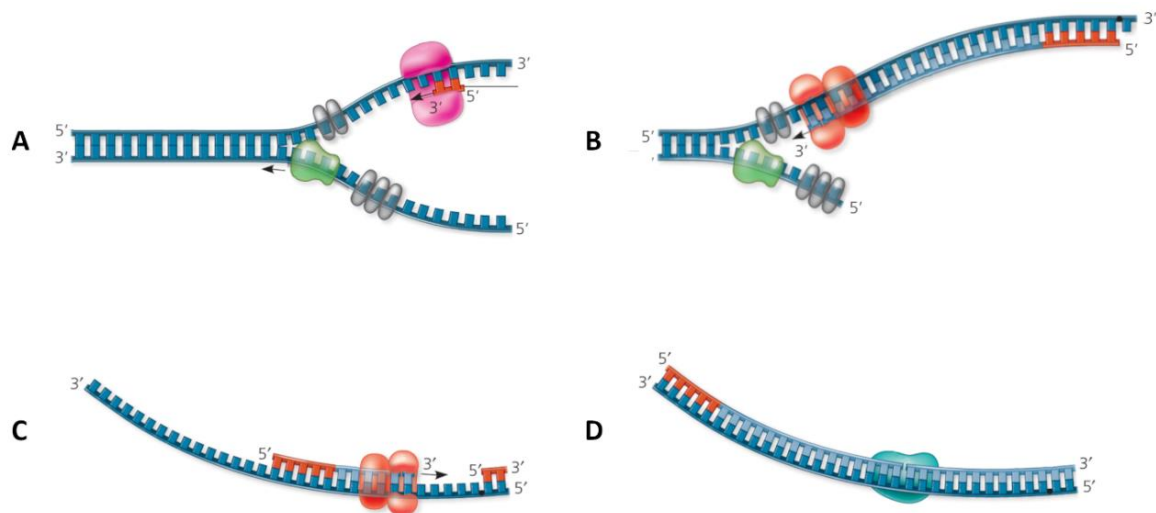
Obr. 1: Model semikonzervativní replikace DNA. (A) Původní dvoušroubovice má dva komplementární řetězce, které jsou spojeny vodíkovými můstky. (B) Řetězce DNA se od sebe oddělí a slouží jako templát pro syntézu nových vláken. (C) Připojením komplementárních nukleotidů vzniknou dvě dvoušroubovice s jedním původním (tmavě modrým) a jedním novým vláknem (světle modrým). Převzato a upraveno [4].

Replikaci DNA zajišťuje mnoho proteinů, které spolupracují při procesu rozdělování dvoušroubovice a syntéze nové DNA, vytvářejí tak komplexní replikační mašinérii (Tab. 1 a Obr. 2). Prvním klíčovým proteinem je helikáza, která je v samém čele replikační vidlice a využívá energii z ATP hydrolýzy k rozvinutí dvoušroubovice během svého pohybu po DNA. S helikázou spolupracuje SSB protein (z angl. single strand binding protein), který váže jednořetězcovou DNA (ssDNA), aby dočasně zabránil spojení oddělených vláken zpět k sobě. Dalším proteinem je primáza, která využívá oddělená vlákna jako vzor k syntéze krátkého úseku RNA nazývaného RNA primer. Tato RNA část umožňuje DNA polymeráze připojovat nukleotidy a syntetizovat nové vlákno DNA komplementární k původnímu. Je důležité poznamenat, že DNA polymeráza má schopnost syntézy pouze ve směru 5'-3', což způsobuje

problém při replikaci, protože dvoušroubovice je antiparalelní. Jeden řetězec, označovaný jako „vedoucí“, je kontinuálně syntetizován ve směru 5'-3', zatímco druhý „opožďující se“ řetězec je orientován opačně. DNA polymeráza tedy diskontinuálně vytváří kratší oddělené úseky DNA, které se nazývají Okazakiho fragmenty. Tyto fragmenty jsou nakonec spojeny dalším enzymem DNA-ligázou do kontinuálního vlákna [5].

Název	Obrázek	Funkce
Helikáza		Rozvíjí dsDNA
SSB protein		Váže a stabilizuje ssDNA
Primáza		Syntetizuje RNA primer
DNA polymeráza		Syntetizuje nové vlákno DNA
DNA ligáza		Spojuje Okazakiho fragmenty

Tab. 1: Proteiny zapojené do replikace DNA v bakteriích. Převzato a upraveno [4].



Obr. 2: Proteiny zapojené do replikace DNA v bakteriích. (A) Zahájení replikace DNA: helikáza rozplétá dvoušroubovici, SSB protein stabilizuje rozdělaná vlákna DNA a primáza začíná syntetizovat RNA primer (červeně) za využití původní DNA jako templátu. (B) Vedoucí vlákno je syntetizováno DNA polymerázou kontinuálně ve směru 5'-3'. (C) Na opožďujícím se vlákně je tvořen Okazakiho fragment ve směru 5'-3'. (D) DNA-ligáza spojuje Okazakiho fragmenty na opožďujícím se řetězci v jedno souvislé vlákno. Převzato a upraveno [4].

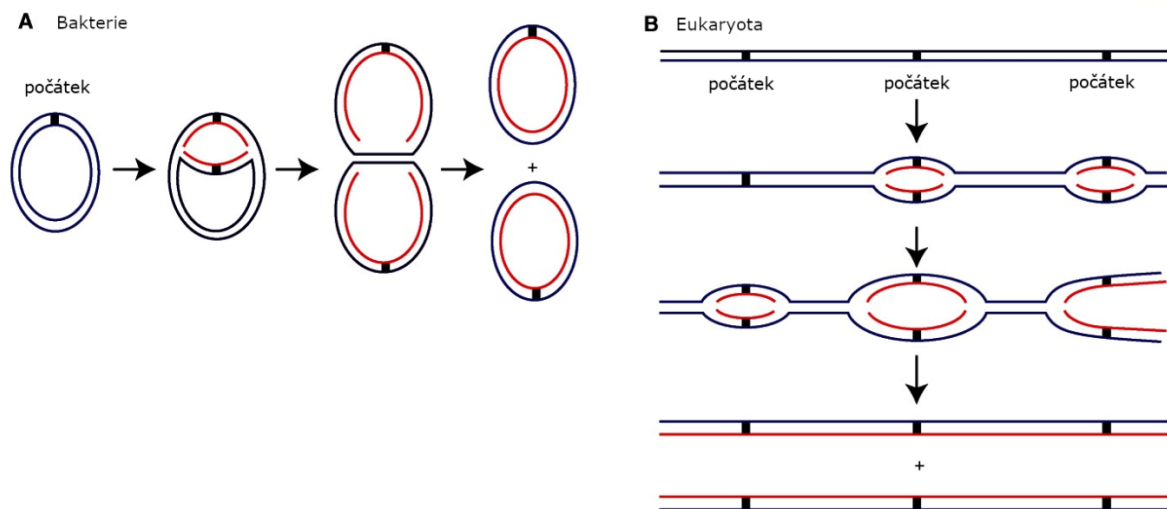
Nicméně pro samotný průběh replikace je zásadní její iniciace vedoucí k zahájení [6]. Vzhledem k tomu, že náplní této práce je právě iniciace replikace, budou se další kapitoly věnovat tomuto procesu detailněji.

2.2 Iniclace replikace DNA

Duplikace genomu buňky musí proběhnout pouze jednou v průběhu buněčného cyklu. Pro zdraví buňky je totiž klíčové, aby nedošlo k opakované replikaci nějaké části genomu, nebo k tomu, že část DNA zůstane nedoreplikována. To by mohlo vést k buněčné smrti nebo v horším případě vyústit ke genetickým změnám spojeným s onemocněním, jako je například rakovina [7, 8]. Iniclace replikace DNA proto hraje klíčovou roli v tomto procesu a je striktně regulována. Tato fáze je rozdělena do dvou oddělených kroků: licencování počátků replikace DNA a aktivace helikázy [9, 10]. Nejprve je třeba se zaměřit na samotné počátky replikace DNA.

2.2.1 Replikační počátky

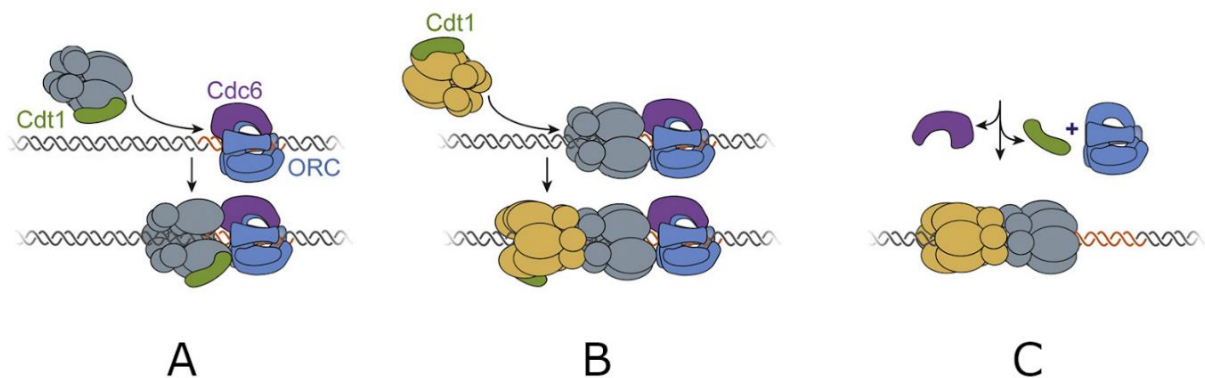
K zahájení replikace dochází na specifických místech na chromozomech zvaných počátky replikace DNA. Tyto úseky DNA jsou vázány iniciačními proteiny a dochází zde k prvotnímu rozvinutí dvoušroubovice. Zatímco bakteriím vystačí pouze jeden replikační počátek a dvě replikační vidlice, které se zde vytvoří, syntetizují DNA v opačných směrech (Obr. 3-A), genom eukaryotických organismů je podstatně větší a obsahují mnoho počátků replikace, přičemž každý z nich je zodpovědný za replikaci jen malé části genomu (Obr. 3-B) [11].



Obr. 3: Iniclace replikace DNA u bakterií a eukaryot. (A) Kruhový chromozom bakterií má jeden replikační počátek, ze kterého se dvě replikační vidlice pohybují v opačných směrech. (B) Eukaryota mají mnohem větší lineární genom, který má více replikačních počátků. U každého z nich syntéza DNA také probíhá obousměrně díky dvěma replikačním vidlicím. Převzato a upraveno [12].

2.2.2 Licencování počátků

K zahájení replikace u eukaryot je nezbytné, aby se několik iniciačních proteinů navázalo na replikační počátky. Prvotním krokem je vytvoření pre-replikačního komplexu (pre-RC) v procesu, který se nazývá „licencování“ počátků (Obr. 4). Nejdříve dochází k rozpoznání a vazbě replikačních počátků proteinovým komplexem ORC [13]. Díky dalším dvěma proteinům, Cdc6 a Cdt1, dochází k postupnému navázání dvou komplexů replikační helikázy MCM2-7 [14]. Následně jsou proteiny Cdc6, Cdt1 a ORC uvolněny a na každém licencovaném počátku tak vzniknou dva MCM2-7 komplexy, které jsou připraveny na iniciaci replikace DNA [15].



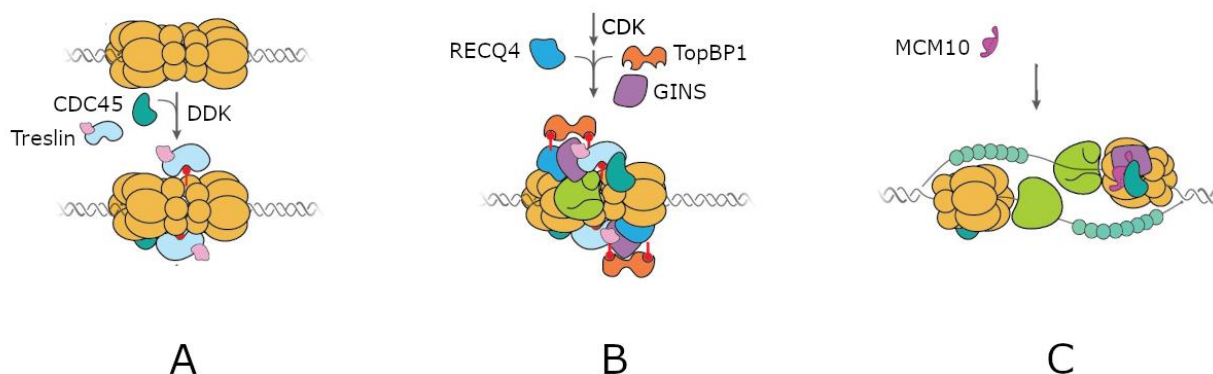
Obr. 4: Licencování počátků replikace DNA. (A) ORC proteiny rozpoznají počátek replikace, vytvoří komplex s Cdc6 a díky Cdt1 se naváže první MCM2-7 hexamer (šedý). (B) Druhý MCM2-7 komplex (žlutý) se naváže na DNA a spojí s prvním MCM2-7. (C) ORC, Cdc6 a Cdt1 se následně uvolní z replikačních počátků a oba MCM2-7 komplexy jsou připraveny na aktivaci. Převzato a upraveno [16].

MCM2-7 je replikační helikáza, která se skládá z šesti podjednotek (hexamer), schopná obepnout dvouřetězcovou DNA (dsDNA). V této fázi je dvojitý hexamer MCM2-7 v neaktivní formě a jenom část takto licencovaných počátků bude později skutečně aktivována. Je to z toho důvodu, aby v případě problému během replikace mohla část licencovaných replikačních počátků sloužit jako záloha [17].

2.2.3 Aktivace helikázy

Druhým krokem po licencování počátků replikace je aktivace replikační helikázy. MCM2-7 helikáza je aktivována pomocí dvou kináz, CDK a DDK, a dalších proteinů, které společně s MCM2-7 vytváří pre-iniciační komplex (pre-IC) (Obr. 5).

Dva klíčové proteiny v tomto procesu jsou CDC45 a GINS. Ty spolu s MCM2-7 tvoří CMG komplex. K seskupení a aktivaci tohoto CMG komplexu jsou potřebné další proteiny pre-IC, a to RECQ4, MCM10, Treslin a TopBP1. Aktivací DDK vzniká komplex mezi Treslinem a CDC45, díky čemuž se CDC45 připojí k MCM2-7 (Obr. 5-A). Naopak za aktivity CDK vytvoří Treslin, RECQ4 a GINS komplex, který zajistí připojení GINS k MCM2-7 (Obr. 5-B). Takto vznikne CMG helikáza, která je následně aktivována proteinem MCM10. Každý MCM2-7 hexamer se dočasně rozpojí, obkrouží pouze jednořetězcovou DNA a znovu se spojí. Nakonec jsou řetězce DNA odděleny od sebe a na každém z nich je přítomen pouze jeden CMG komplex (Obr. 5-C) [10, 18].



Obr. 5: Model aktivace helicázy. (A) Aktivaci pomocí DDK Treslin připojí CDC45 k MCM2-7 komplexu. (B) Aktivita CDK umožní vytvoření komplexu RECQ4, TopBP1 a Treslin a připojí GINS k MCM2-7. (C) Vytvoření aktivní replikační vidlice za pomoci MCM10. Převzato a upraveno [19].

Následující kapitoly se budou již detailněji věnovat lidským proteinům RECQ4 a MCM10, které jsou v popředí zájmu této práce.

2.2.3.1 Proteiny RECQ4, MCM10 a jejich interakce

RECQ4 má klíčovou úlohu v iniciaci replikace v lidských buňkách; pouhé připojení tohoto proteinu k pre-RC vede k navázání ostatních proteinů pre-IC a následnému odstartování replikace [20]. Hlavní interakční partneři RECQ4 během replikace jsou MCM10, MCM2-7, CDC45 a GINS, a právě MCM10 zajišťuje jeho asociaci s MCM2-7 helicázou [21]. V další fázi iniciace se RECQ4 a MCM10 podílí na stabilní formaci CMG komplexu. Bez proteinů RECQ4 a MCM10 totiž nedochází k asociaci CDC45 a GINS s chromatinem, což vede k výraznému úbytku vytvořených CMG komplexů a k následným defektům v zahájení replikace [22, 23].

Interakce mezi RECQ4 a MCM10 je přímá, zprostředkovaná N-koncem RECQ4, konkrétně oblastí v rozmezí aminokyselin 76-145 [24]. Ze strany MCM10 však interakční doména známá není. Interakce s MCM10 ovlivňuje helicázovou aktivitu RECQ4 [21]. *In vitro* je prokázána regulace jejich interakce fosforylací [21], ale *in vivo* není tento efekt fosforylace zaznamenán [24].

Přestože v lidských buňkách nebyla interakce mezi RECQ4 a MCM10 nezbytná pro jejich přežití, má značný vliv na míru jejich růstu, ovlivňuje normální postup buněčného cyklu a je nutná k účinnému zahájení replikace [24].

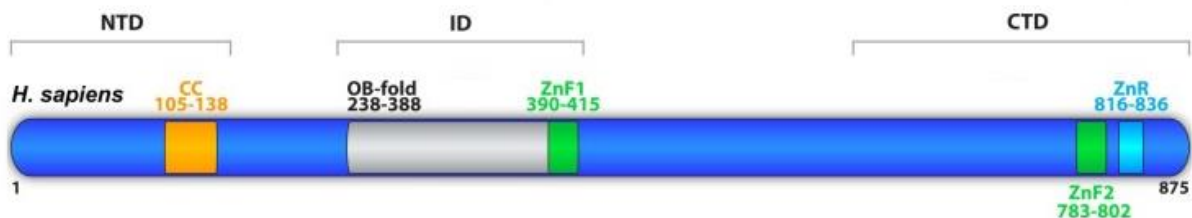
2.3 Protein MCM10

2.3.1 Funkce

Kromě již popsané funkce MCM10 v iniciaci replikace DNA má úlohu také v její následné fázi – v elongaci. MCM10 přivádí DNA polymerázy syntetizující opožďující se vlákno k počátkům replikace. Poté MCM10 zůstává součástí postupující replikační vidlice a účastní se syntézy Okazakiho fragmentů [25].

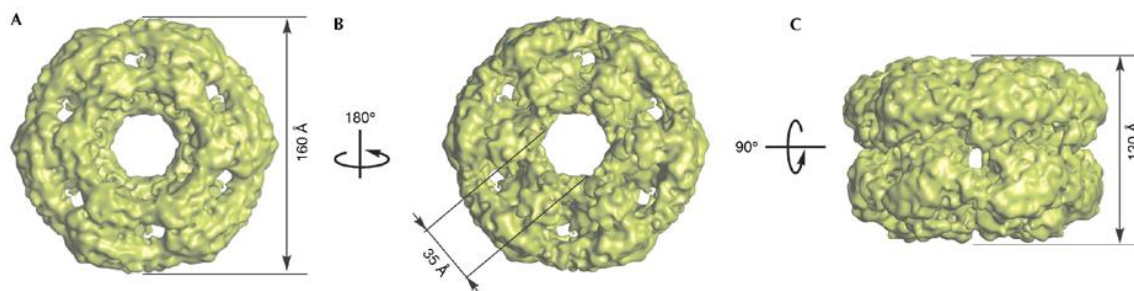
2.3.2 Strukturní domény

MCM10 se skládá ze tří strukturních domén: N-terminální (NTD), interní (ID) a C-terminální (CTD). Jednotlivé domény jsou navzájem propojeny flexibilními proteinovými úseky [26] (Obr. 6).



Obr. 6: Strukturní domény proteinu MCM10. MCM10 se skládá z 875 aminokyselin a je rozdělen na: N-terminální doménu (NTD), která obsahuje CC (z angl. coiled coil) motiv, interní doménu (ID), která má „OB-fold“ a zinkový prst (ZnF1), a C-terminální doménu, ve které je druhý zinkový prst (ZnF2) a „Zn-ribbon“ (ZnR). Převzato a upraveno [27].

- NTD obsahuje „coiled-coil“ motiv, díky kterému je MCM10 schopen vytvořit oligomer. Lidský MCM10 vytváří hexamer, podobně jako MCM2-7 helikáza, který má podobu prstence (Obr. 7) [28].
- ID je evolučně nejvíce konzervovaná doména. Obsahuje „OB-fold“ a zinkový prst (ZnF1), které dohromady vytváří souvislou oblast pro interakci s DNA. „OB-fold“ také zajišťuje důležité proteinové interakce, například s MCM2-7 helikázou.
- CTD je specifická pouze pro živočichy. Tato doména zprostředkovává interakci sDNA a dalšími proteiny. CTD váže DNA díky zinkovému prstu (ZnF2) a mezi jeho proteinové interakční partnery patří CDC45 [25, 29]. Kromě toho obsahuje „Zn-ribbon“ (ZnR), jehož funkce zatím nebyla objasněna [27].



Obr. 7: Prstencová struktura hexameru MCM10. Zobrazení trojrozměrné rekonstrukce povrchu MCM10 pod různými úhly získané z elektronové mikroskopie. (A) pohled shora. (B) pohled zespodu. (C) pohled z boku. Převzato a upraveno [30].

Jak ID, tak CTD domény mají schopnost vázat ssDNA i dsDNA s preferencí k jednořetězcové DNA. Tyto domény též váží s vysokou afinitou i složitější struktury DNA, které imitují počátek replikace [29]. Nicméně celý protein MCM10 má asi stokrát vyšší afinitu k DNA než jednotlivé domény odděleně, což naznačuje, že ID i CTD mohou při vazbě na DNA spolupracovat. Posttranslační modifikace MCM10 proteinu regulují tyto domény odlišně. Acetylace stimuluje DNA-vazebnou aktivitu ID, kdežto na vazbu DNA u CTD má inhibiční efekt. Toto může představovat jeden ze způsobů regulace překrývajících se funkcí ID a CTD [27].

2.4 Protein RECQ4

RECQ4 patří do rodiny RecQ helikáz. Ty jsou vysoce konzervovanou skupinou od bakterií po člověka, která byla pojmenována podle bakteriálního proteinu RecQ. Díky jejich úlohám při udržování stability genomu jsou RecQ helikázy nazývány jako „ochránci genomu“. Fungují na pomezí DNA replikace, rekombinace, opravy ale také transkripce. Mezi lidské homology patří RECQ1, helikáza Bloomova syndromu (BLM), helikáza Wernerova syndromu (WRN), RECQ4 a RECQ5. Důležitost této skupiny v uchování genomu zdůrazňuje to, že mutace v BLM, WRN a RECQ4 způsobují vzácná dědičná onemocnění, která jsou spojena s vysokou predispozicí ke vzniku rakoviny [31]. V roce 2022 byl také objeven nový syndrom asociován s RECQ1, který dostal název RECON (RECq ONE) [32].

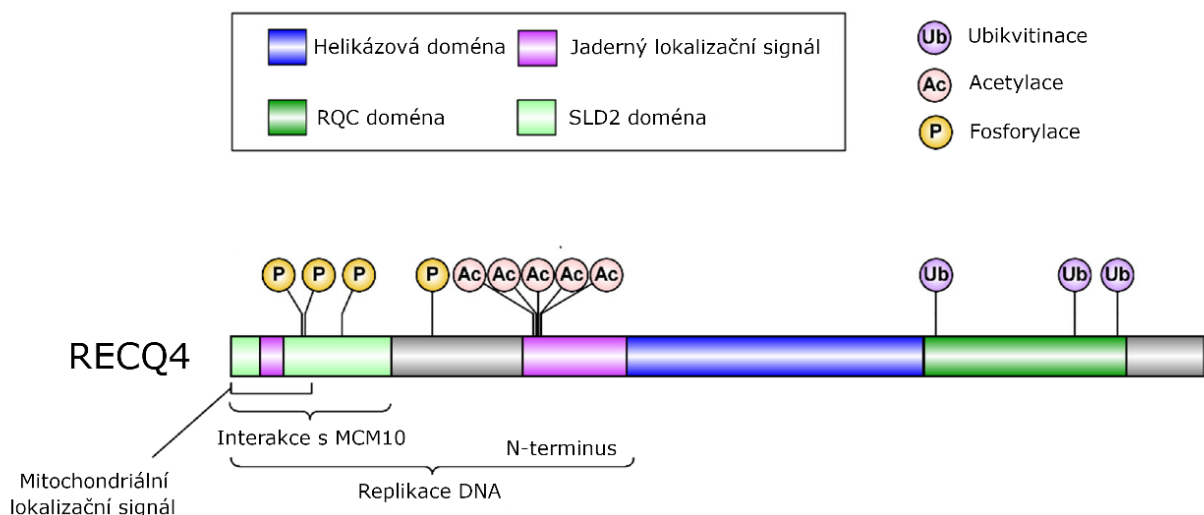
Gen *RECQ4* se nachází na chromozomu 8q24.3 a kóduje stejnojmenný protein o celkovém počtu 1208 aminokyselin. Byl objeven jako čtvrtý z rodiny RecQ helikáz, nicméně se od těch ostatních v mnohém odlišuje a je jedním z nejméně prozkoumaných. Biologický význam RECQ4 je podtržen asociací se třemi vzácnými dědičnými onemocněními, kterými jsou: Rothmund-Thomsonův syndrom, Baller-Geroldův syndrom a syndrom RAPADILINO [33]. Naopak zvýšená exprese RECQ4 je spojována se vznikem rakoviny [34].

2.4.1 Struktura a biochemická charakterizace

N-terminus proteinu RECQ4 vykazuje homologii k proteinu Sld2, který má v kvasinkách nezastupitelnou roli v iniciaci replikace DNA (Obr. 8). Tato funkce byla zachována i u lidí a SLD2 doména RECQ4 má důležitou úlohu v replikaci DNA v lidských buňkách [35]. Na kritickou roli N-konce ukazuje to, že delece genu *RECQ4* je u myši embryonálně letální. Naopak myši, které exprimovaly pouze N-terminální část proteinu, byly životaschopné [36].

N-terminální část má schopnost vazby ssDNA, dsDNA i RNA, ale má vyšší afinitu ke složitějším strukturám jako je vidlicová DNA nebo guaninové kvadruplexy (G4) [37–39]. Tato oblast má taktéž schopnost katalyzovat nasedání dvou komplementárních řetězců DNA [37] a zprostředkovává důležité proteinové interakce, včetně interakce s MCM10 [24].

Ve střední části proteinu RECQ4 se nachází konzervovaná helikázová doména, kterou mají i ostatní RecQ helikázy a která je nejvíce konzervovanou částí proteinu. Má ATP-dependentní helikázovou aktivitu, která však nebyla zpočátku kvůli jeho silné schopnosti katalyzovat nasedání komplementárních řetězců DNA vůbec zaznamenána. Rozpletené řetězce totiž RECQ4 zase mohl rychle spojit zpět k sobě [40].



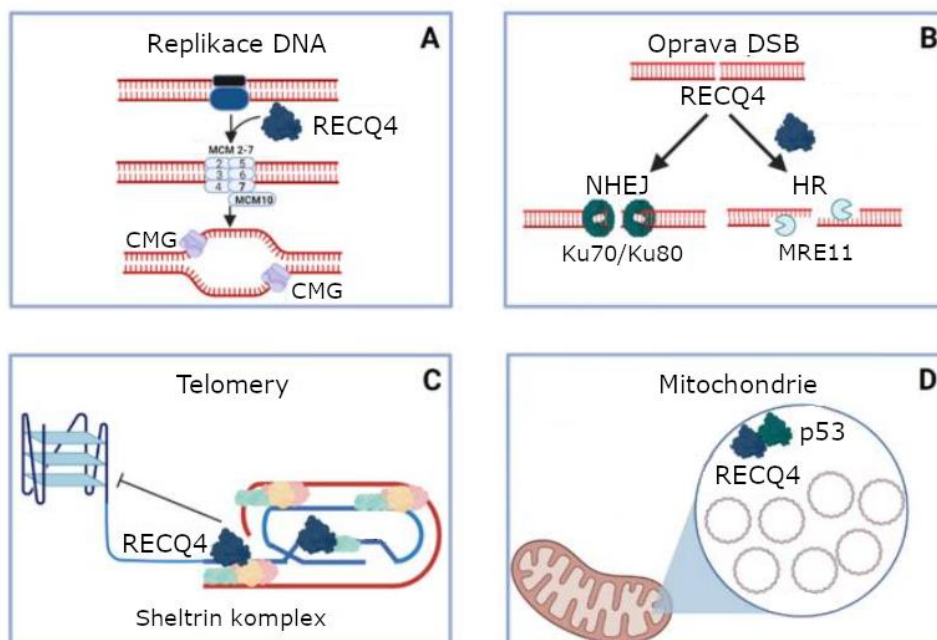
Obr. 8: Protein RECQ4. V N-terminu RECQ4 je SLD2 doména, ve středu proteinu je helikázová doména a v C-terminu je RQC doména (**RecQ** C-terminální doména). N-terminus obsahuje dva jaderné lokalizační signály a mitochondriální lokalizační signál, který má RECQ4 jako jediný z RecQ helikáz a díky němuž má roli v údržbě mitochondriálního genomu (viz 3.2.2 Role RECQ4). Interakce s MCM10 je taktéž zprostředkována N-koncem. RECQ4 je regulován posttranslačními modifikacemi: fosforylací, acetylací a ubikvitinací. Převzato a upraveno [33].

2.4.2 Další úlohy RECQ4 proteinu

Kromě iniciace replikace DNA zastává RECQ4 i další funkce v udržování stability genomu (obr. 9). RECQ4 se účastní několika DNA opravných drah, například opravy dvouřetězcových zlomů (DSB, z angl. double-strand breaks), které jsou jedním z nejtoxičtějších poškození DNA. RECQ4 má funkci v obou procesech, které DSB opravují, a sice v nehomologním spojování konců (NHEJ, z angl. nonhomologous end joining) a v homologní rekombinaci (HR) [33].

V NHEJ se poškozená DNA přímo spojí zpět v místě zlomu, což však může vést k mutacím. RECQ4 interaguje s klíčovým proteinem tohoto procesu, KU70, a stimuluje jeho aktivitu. Naopak HR využívá nepoškozenou sesterskou chromatidu jako vzor k obnově původní DNA a zajišťuje tak věrnou opravu DSB. V tomto procesu spolupracuje RECQ4 s proteinem MRE11, který má zásadní roli v prvotní fázi HR při nukleázovém zpracování poškozené DNA [33, 41] (Obr. 9-B).

Syndromy asociované s mutacemi v *RECQ4* způsobují předčasné stárnutí, neboť často vykazují poškození telomer a mitochondrií. V souladu s těmito poznatky vychází najevo, že RECQ4 chrání telomery i genom mitochondrií před poškozením. Navíc telomery buněk s mutací v *RECQ4* jsou zkracovány více než u buňky zdravé [42]. RECQ4 se totiž díky své interakci komplexem, který telomery ochraňuje (Shelterin) může podílet na rozplétání složitých struktur telomerické DNA (obr. 9-C). Jako jediný z RecQ helicáz je RECQ4 lokalizován i do mitochondrií. Předpokládá se, že s tumor-supresorovým genem p53 podporuje syntézu mitochondriální DNA [33] (Obr. 9-D).



Obr. 9: Role *RECQ4* v údržbě genomu. (A) RECQ4 má klíčovou roli v iniciaci replikace DNA, spolu s MCM10 aktivuje CMG helicázu. (B) RECQ4 se účastní opravy DSB, s Ku70/Ku80 spolupracuje v nehomologním spojování konců (NHEJ) a s MRE11 kooperuje v prvotním kroku homologní rekombinace (HR). (C) RECQ4 interaguje se Shelterin komplexem a společně rozplétají složité struktury DNA v telomerách. (D) Na údržbě mitochondriálního genomu se RECQ4 podílí díky interakci s p53. Převzato a upraveno [33].

2.4.3 Syndromy asociované s mutacemi v *RECQ4*

- Rothmund-Thomsonův syndrom (RTS)

RTS je vzácné autosomálně recesivní onemocnění s dosud popsányými méně než 500 případy [43]. Charakteristickými příznaky RTS jsou červená vyrážka poikiloderma, řidnutí vlasů, nízký vzrůst, šedý zákal, kosterní abnormality, předčasné stárnutí a zvýšená predispozice k rakovině, především osteosarkomu, tedy nádorovému onemocnění kostí [44]. RTS byl poprvé popsán Rothmundem, později zaznamenal stejné onemocnění Thomson a v roce 1957 Taylor tento syndrom spojil v jeden a pojmenoval jej Rothmund-Thomsonův syndrom. Toto onemocnění se dělí na RTS typu II, které má většina pacientů a je spojeno právě s mutacemi v *RECQ4*, a RTS typu I., jehož pacienti mají mutaci v proteinu *ANAPC1* [45].

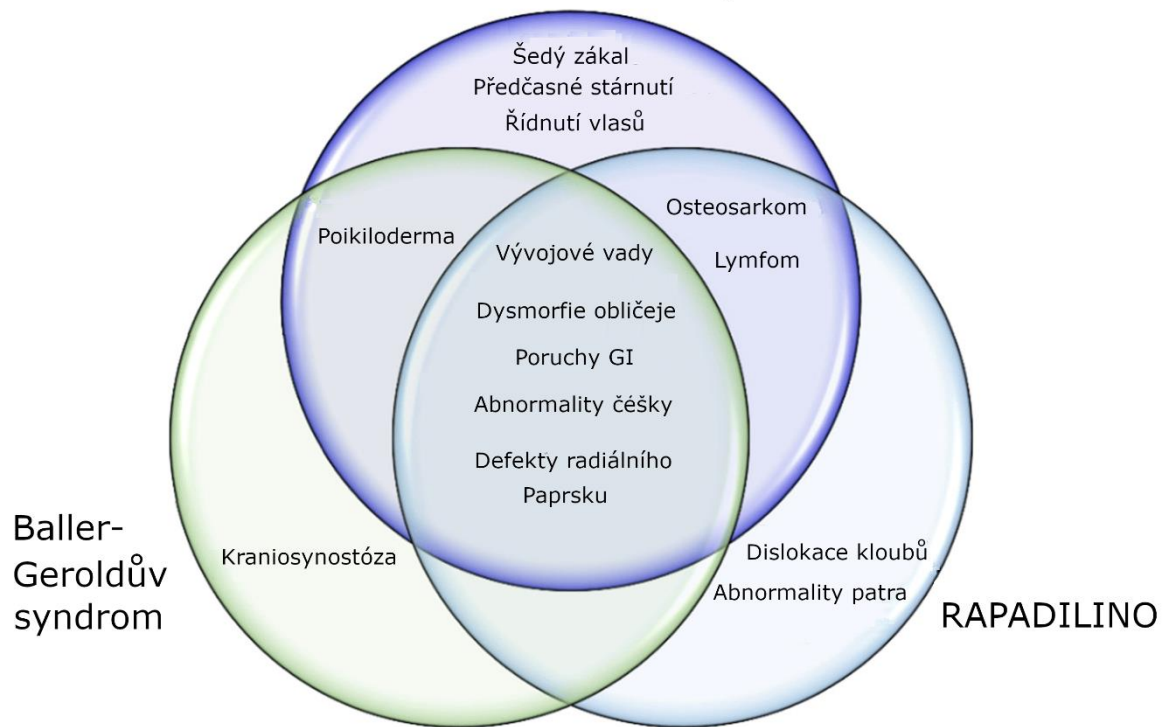
- Baller-Geroldův syndrom (BGS)

Podobně jako RTS je BGS velmi vzácné onemocnění, které se také dědí autosomálně recesivně. Celkem bylo identifikováno pouze okolo 40 případů. Poprvé byl syndrom popsán Ballerem a následně Geroldem. Onemocnění má podobné symptomy jako RTS. Patří mezi ně poikiloderma, kosterní abnormality (především anomálie horních končetin) a nízký vzrůst. Na rozdíl od RTS je pro BGS typická kraniosynostóza, což je předčasný srůst švů způsobující deformaci lebky [46].

- RAPADILINO

Název tohoto onemocnění je akronymem jeho hlavních znaků: RA = radiální hypoplazie/aplazie (RADial hypo/aplasia), PA = rozštěp nebo vysoké patro (z angl. PATellae and cleft or highly arched PALate), DI = průjem a dislokace kloubů (z angl. DIarrhea and DIsllocated joints), LI = nízký vzrůst a malformace končetin (z angl. LIttle size and LImb malformation), NO = úzký nos a normální inteligence (z angl. Nose slender and Normal intelligence) [47]. Nejvíce případů bylo zaznamenáno u finské populace [48].

Rothmund-Thomsonův syndrom



Obr. 10: Vennův diagram znázorňující překrývající se symptomy onemocnění asociovaných s mutacemi v RECQ4. Převzato a upraveno [33].

3 CÍLE PRÁCE

Iniciace replikace DNA je prvotním krokem replikace a má tedy zásadní úlohu v regulaci tohoto procesu. Pokud není replikace striktně regulována, může to vést k nestabilitě genomu a potenciálně k nekontrolovanému dělení buněk a rozvoji nádorových onemocnění. I z tohoto důvodu je velmi důležité pochopit tento proces na molekulární úrovni. Navíc asociace mutací v genu *RECQ4* s dědičnými syndromy podtrhuje biologický význam jeho studia.

Je známo, že *RECQ4* a *MCM10* přímo interagují a že narušení této interakce vede k defektům v iniciaci replikace. Přesná úloha proteinů *RECQ4* a *MCM10* v tomto procesu a význam jejich interakce však objasněny nebyly. Proto je cílem mé práce mapování interakce mezi *RECQ4* a *MCM10* a zjištění jejího vlivu na vlastnosti proteinu *RECQ4*.

Pro splnění tohoto cíle bylo stanoveno několik úkolů:

- naklonovat gen *MCM10* do expresního vektoru,
- exprimovat a purifikovat vybrané verze proteinů *RECQ4* a *MCM10*,
- potvrdit interakci mezi *RECQ4* a *MCM10*,
- zjistit doménu *MCM10* zodpovědnou za tuto interakci,
- otestovat vliv interakce na biochemické vlastnosti *RECQ4* proteinu.

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Materiály

4.1.1 Chemikálie a enzymy

Applichem	akrylamid 4K, ampicilin (sodná sůl), aprotinin, benzamidin hydrochlorid, bis-akrylamid, bromfenolová modř, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside (X-gal), Coomassie Brilliant Blue R-250 , D(+)-sacharóza, dithiotreitol (DTT), DNáza I, D(+)-Maltóza, monohydrate, ethanol, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), glutathion, glycerol, glycin, chlorid draselný, chlorid hořečnatý, chlorid sodný, chymostatin, imidazol, isopropyl-B-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG), kvasinkový extrakt, kyselina boritá, kyselina octová, lauroylsarkosinát sodný, leupeptin, methanol, β -merkapt ethanol (β -ME), Nonidet P40 (NP40), octan draselný, Orange G, pepsatin A, peroxodisíran amonný (APS), 2-propanol, RNáza A, tetracyklin hydrochlorid, N,N,N',N' – tetramethyl-ethylendiamin (TEMED), Tris, Tris-HCl, Tris-ultračistý, trypton
Biorad	iProof™ High-Fidelity DNA polymeráza, 5x iProof HF pufr
Biosera	fetální hověží sérum (FBS), L-Glutamine
Fermentas	GeneRuler™ 1kb DNA Ladder
Fluka	Agar
GE Healthcare	Glutathion-sefarózové kuličky, SourceS (1mL)
Gibco	Penicillin-Streptomycin
New England Biolabs	Amylose Resin High Flow, Gibson master mix, OneTaq® Hot Start DNA Polymeráza, proteináza K (PK), 5x Q5® reakční pufr
Nippon Genetics	Midori Green-direct DNA dye
Promega	FuGENE HD transfekční činidlo
Roche	cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail
Serva	agaróza, dodecylsíran sodný (SDS), ethanol (pro molekulární biologii)
Sigma Aldrich	ampicilin (sodná sůl), chloramfenikol, His-Select® Nickel Affinity Gel, kanamycin sulfát, gentamycin, 50% polyethylenglykol (PEG)

Tab. 2: Chemikálie a enzymy

4.1.2 Pufry a roztoky

30% akrylamid	30% akrylamid, 0,8% bis-akrylamid
5x B pufr	150 mM Tris (pH 7,5), 5 mM DTT, 500 mM KCl, 500 µg/mL BSA
barvicí roztok (Coomassie)	40% methanol, 20% kyselina octová, 0,32% Coomassie Brilliant Blue
Destain	40% methanol, 20% kyselina octová
6x DNA nanášecí pufr (6xLB)	10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,12% OrangeG, 60% glycerol, 60 mM EDTA
1x L pufr	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5% glycerol, 1 mM β-ME, 1mM NP40, 300 mM NaCl
1x M pufr	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (7,5), 250 mM KCl
lyzační pufr CBB HS	100 mM Tris-HCl, 20% sacharóza, 4 mM EDTA (pH 7.5), 600 mM KCl
P1 pufr	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNáza A
P2 pufr	200 mM NaOH, 1% SDS
P3 pufr	3 M octan draselný (pH 5,5)
10x PBS	1.37 M NaCl, 26 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 17 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Směs proteázových inhibitorů	aprotinin, benzamidin, chymostatin, leupeptin, pepstatin, (5 µg/mL každý)
2x SDS Laemmli pufr	125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 10% B-ME, 20% glycerol, 0.004% bromfenolová modř

10x SDS pufr	0,25 M Tris-HCl, 0,192 M glycin, 2% SDS
10% SDS-PAGE dělicí gel	3 M Tris-HCl, 10% akrylamid, 0,1% SDS, 0,09% APS, 0,015% TEMED
12% SDS-PAGE dělicí gel	3 M Tris-HCl, 12% akrylamid, 0,1% SDS, 0,09% APS, 0,015% TEMED
15% SDS-PAGE dělicí gel	3 M Tris-HCl, 15% akrylamid, 0,1% SDS, 0,09% APS, 0,015% TEMED
3,75% SDS-PAGE zaostřovací gel	0,5 M Tris-HCl, 3,75% akrylamid, 0,08% SDS, 0,09% APS, 0,015% TEMED
10x TAE	900 mM Tris-ultračistý, 90 mM kyselina octová, 2mM EDTA (pH 8)
10x TBE	900 mM Tris-ultračistý, 90 mM kyselina boritá, 2mM EDTA (pH 8)
1% agarózový TAE gel	1% agaróza, 1x TAE
0,9% agarózový TBE gel	0,9% agaróza, 1x TBE
6% nativní TBE gel	0,5x TBE, 6% akrylamid, 0,15% APS, 0,015% TEMED
2x T pufr	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 20% glycerol, 1 mM EDTA (7,5)
T+150 pufr	1x T pufr, 150 mM KCl, 0,01 % NP40, 1mM DTT
T+100 pufr	1x T pufr, 100 mM KCl, 0,01 % NP40, 1mM DTT

Tab. 3: Pufry a roztoky

4.1.3 Média

2xTY medium	2% trypton, 1% kvasinkový extrakt, 0.5% NaCl
LB médium	1% trypton, 0.5% kvasinkový extrakt, 1% NaCl
LB médium (misky)	1% trypton, 0.5% kvasinkový extrakt, 1% NaCl, 2% agar
SF900II médium	SF900II™ serum-free medium (Gibco), 10% FBS, 100x zředěný Penicilin-Streptomycin
ExpressFive médium	ExpressFive™ serum-free medium (Gibco), 2 mM L-Glutamine, 100x zředěný Penicilin-Streptomycin

Tab. 4: Média

4.1.4 Plazmidy

- pLK3076 obsahující lidský gen RECQ4 (1-400) (vektor pETM11, KAN rezistence)
- pLK3165 obsahující lidský gen RECQ4 (1-150) (vektor pETM11, KAN rezistence)

Plazmidy kódující proteiny RECQ4 byly poskytnuty laboratoří Konstantina Tripsianese, Ph.D.

- pLK3096 obsahující lidský gen MCM10 NTD (vektor pET3T1¹, KAN rezistence)
- pLK3097 obsahující lidský gen MCM10 ID (vektor pET3T1, KAN rezistence)
- pLK3151 obsahující lidský gen MCM10 CTD (vektor pET31T1, KAN rezistence)
- pLK3072 obsahující lidský gen MCM10 (vektor pET100/D-TOPO, AMP rezistence), sloužil jako templát pro klonování genu MCM10 do následujících vektorů

Plazmidy kódující proteiny MCM10 byly poskytnuty laboratoří Dr. Andreie Okorokova.

¹ pET3T1 je modifikovaná verze vektoru pETM30 (změna polylinkeru)

4.1.5 Vektory

Vektory linearizoval RNDr. Mária Špírek, PhD.

Pro expresi v bakteriích:

- pLK2900 (vektor pCOLI_A_His, AMP rezistence)
- pLK2901 (vektor pCOLI_A_MBP, AMP rezistence)

Pro expresi v hmyzích buňkách:

- pLK3160 (vektor pLIB s N-terminálním His, MBP štítkem a C-terminálním 12x His štítkem, AMP rezistence)

4.1.6 Bakteriální kmeny

- *E. coli* DH5 α (Invitrogen)
- *E. coli* DH10Bac (Gibco)
- *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Novagen)
- *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS (Novagen)
- *E. coli* ArcticExpress RIL (Agilent)

4.1.7 Hmyzí buňky

- *Trichoplusia ni* High Five™ (Gibco)
- *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect cells (Gibco)

4.1.8 Oligonukleotidy

Název	Využití	Sekvence (5'-3')	Modifikace
pR0027	EMSA, fázová separace	AGCTACCATGCCTGCACGAATTAAGCAATT CGTAATCATGGTCATAGCT	Fluorescein na 5' konci
pR0039	EMSA, fázová separace	AGCTACCATGCCTGCACGAATTAAGCAATT CGTAATCATGGTCATAGCT	
pR3601	koloniová PCR	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	
pR3602	koloniová PCR	AGCGGATAACAATTCACACAGG	
pR4788	MCM10 sekvenační (1)	TAACAGATGAAGAAGAAGTTCCCG	

pR4789	MCM10 sekvenační (2)	GAAATAGATTGGGTGACATTTGGG	
pR4849	Gibsonovo klonování, MCM10 F	TCCTCTAGTACTTCTCGACAAGCTTTTATTT AAGGCTGTTCAGAAATTTAGCATGTTC	
pR4850	Gibsonovo klonování, MCM10 R	CTGTTCCAGGGGCCCGSTCCATGGATGAG GAGGAAGACAATCTGTCTCTG	
pR5052	MCM10 sekvenační (3), koloniová PCR	AGCTGTGCCATCTTCATCAAGAC	

Tab. 5: Oligonukleotidy

4.1.9 Proteiny

- RECQ4-MBP, His (1-269) byl purifikován Mgr. Hanou Sedláčkovou, PhD.

4.1.10 Kity

- QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen)
- NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel)
- Vivaspin® 30 kDa MWCO (GE Healthcare)

4.1.11 Přístroje

- Centrifugy:
 - Avanti™ J-26 XPI (Beckman Coulter)
 - MiniSpin F-45-12-11 (Eppendorf)
 - Rotanta 460R (Hettich)
 - Rotina 380R (Hettich)
 - Rotofix 32A (Schoeller Instruments)
 - Spectrafuge 24D (Labnet)
- DeltaVision Elite mikroskop (GE Healthcare)
- FPLC: ÄKTA FPLC (GE Healthcare)
- Horizontální elektroforetická jednotka: SCIE-PLAS HUIO (KRD)
- Indukční plotýnka: CT18/15 (Rommelsbacher Germany)
- Inkubátory:
 - Innova 43R (New Brunswick scientific)
 - Innova 42 (New Brunswick Scientific)
 - NB-205 (n-Biotek, KRD)

- Laboratorní váha: ACB plus-300 (ADAM)
- Magnetická míchačka: Variomag MONO (Thermo-Scientific)
- Rotátor: Multi RS-60, Lab-4you
- Skenery
 - Amersham Typhoon RGB biomolecular imager (Cytiva)
 - Gel logic 212 PRO (Carestream)
- Sonikátor: Ultrasonic Processor UP200S (Hilscher Ultrasound Technology)
- Termoblok: Genius Dry Bath Incubator, MD series (Major Science)
- Termocykler: TProfessional standard (Biometra)
- Termostat: Miniincubator 230 V (Labnet)
- Transiluminátor bílého světla: TW26 (UVP)
- Třepačka: Eppendorf Thermomixer comfort (Labfish)
- Vertikální elektroforetická jednotka: SE206 (Hofer)
- Vortex:
 - Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
 - Genie 2 MS1 Minishaker (IKA)
- Zdroj napětí pro elektroforézu: 300 (Labnet)

4.1.12 Software

- CareStream MI SE (CareStream Health)
- GIMP 2.10.
- ImageJ software
- ImageReader LAS-4000 2.1
- Inkscape
- Microsoft PowerPoint
- Microsoft Word
- SnapGene® Viewer
- The Benchling software
- Unicorn™ Software

4.2 Metody

4.2.1 Agarózová gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je metoda sloužící k rozdělení biomolekul na základě jejich nábojů a velikosti. Agarózová elektroforéza byla využita pro separaci fragmentů DNA a také pro studium vazby proteinů na DNA. Pro analýzu fragmentů DNA byl připraven gel s koncentrací agarózy 1 %. Agaróza byla rozpuštěna v 1x TAE pufru a tato směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě. Po jejím zchlazení byly k 50 mL agarózového roztoku přidány 2 µL barviva Midori green, což umožní následnou vizualizaci DNA. Roztok byl přelit do formy horizontální elektroforetické aparatury a pomocí hřebíků byly vytvořeny jamky. Po ztuhnutí gelu byly do jednotlivých jamek nanесeny vzorky, ke kterým byl předtím přidán 6x LB pufr. Elektroforéza probíhala při pokojové teplotě (RT, z angl. room temperature) po dobu 1 h za stálého napětí 90 V.

4.2.2 Gibsonovo klonování

Pro expresi proteinu MCM10 byl gen *MCM10* naklonován do expresních vektorů pLK2900 (His štítek) a pLK2901 (His a MBP štítky) určených pro bakteriální buňky a expresního vektoru pLK3160 (His a MBP štítky) určeného pro buňky hmyzí. Nejprve byla provedena polymerázová řetězová reakce (PCR, z angl. polymerase chain reaction), která sloužila k amplifikaci fragmentu DNA kódujícího *MCM10*. K PCR byla využita iProof High-fidelity DNA polymeráza a jako templát byla využita plazmidová DNA (pDNA), která obsahovala gen *MCM10*. Celkový objem reakční směsi byl 20 μL a její obsah je uveden v tab. 6. Průběh PCR je uveden v tab. 7.

	koncentrace
5x iProof HF pufr	1x
dNTP mix	200 μM
Primer 1 (pR4849)	0,5 μM
Primer 2 (pR4850)	0,5 μM
Templátová DNA	0,5 ng/ μL
iProof™ High-Fidelity DNA	0,02 U/ μL

Tab. 6: Obsah PCR k amplifikaci *MCM10*

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98 °C	30 s	1
Denaturace	98 °C	5 s	30
Annealing	60 °C	10 s	
Extenze	72 °C	40 s	
Finální extenze	72 °C	10 min	1

Tab. 7: Průběh PCR při amplifikaci genu *MCM10*

Celý obsah vzorku z PCR byl nanesen na agarózový gel. Po dokončení gelové elektroforézy byla vyříznuta část gelu obsahující cílový fragment DNA. Ten byl posléze izolován pomocí komerčního kitu QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen) dle protokolu výrobce.

Následně byly 3 μL tohoto purifikovaného inzertu smíchány se 2 μL linearizovaného vektoru a 7,5 μL roztoku Gibson Master Mix. Tato směs byla inkubována při teplotě 50 °C po dobu 1 h. Následovala transformace (5 μL reakční směsi) do bakterií *E. coli* DH5 α , izolace a sekvenace DNA podle níže popsaného protokolu.

4.2.3 Transformace buněk

Transformace je metoda sloužící k tomu, aby bakterie přijaly cizí molekulu DNA. Transformace byla využita ke dvěma účelům – k amplifikaci plazmidu anebo k expresi proteinů.

Do 50 μ L kompetentních bakterií *E. coli* bylo přidáno 0,5–2 μ L pDNA. Tato směs byla inkubována na ledě po dobu 30 min. Následoval teplotní šok, kdy byly bakterie s plazmidem přesunuty na 42 °C po dobu 1,5 min. Bakterie byly ponechány dalších 5 min na ledě. Dále byly regenerovány tak, že k nim bylo přidáno 300 μ L LB média a byly inkubovány po dobu 1 h při teplotě 37 °C. Následně byly bakterie centrifugovány (1 min, 7000 RPM, RT) a byla odebrána většina média. Ve zbytku média byly buňky resuspendovány, naneseny na Petriho misku s LB médiem a adekvátním antibiotikem a byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

4.2.4 Izolace a sekvenace DNA

Všechny plazmidy byly za účelem jejich amplifikace a následné izolace transformovány do bakterií *E. coli* DH5 α . Na druhý den byly kolonie naočkovány do 5 mL LB média s příslušným antibiotikem a tato kultura byla v třepačce inkubována přes noc při 37 °C. Následující den byly bakterie centrifugovány (3 min, 4000 RPM, 4 °C), byl odebrán supernatant a pelet byl zamražen na -20 °C. Plazmid byl z peletu izolován pomocí komerčního kitu NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) podle protokolu výrobce. Pro ověření správnosti sekvence byl plazmid poslán na sekvenaci (Eurofins Genomics).

4.2.5 SDS-PAGE

SDS-PAGE (sodium dodecyl-sulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza) umožňuje rozdělení proteinů ve vzorku podle jejich molekulové hmotnosti. Samotný gel byl vytvořen ze dvou vrstev: zaostřovací (s 3,75% akrylamidem) a dělicí (s 12-15% akrylamidem). Před zatuhnutím byl do zaostřovací části gelu vložen hřebínek, který vytvořil jamky. Gel byl umístěn do vertikální elektroforetické aparatury s 1x SDS puřem. Vzorky byly smíchány v poměru 1 : 1 s 2x Laemmliho puřem a byly povařeny při teplotě 100 °C. Tím byly proteiny denaturovány a byl jim udělen záporný náboj. Díky tomu, po nanesení vzorků na gel a připojení ke zdroji napětí, putovaly proteiny od záporné elektrody ke kladné. Elektroforéza probíhala při pokojové teplotě po dobu 40 min při konstantním napětí 210 V. Následně byl gel barven 20 min v Coomassie Brilliant Blue a odbarven v roztoku Destain.

4.2.6 Exprese proteinu MCM10 FL v hmyzích buňkách

Transpozice do bakmidu

V hmyzích buňkách byl exprimován celý protein MCM10 (neboli MCM10 FL). Po izolaci a sekvenaci byla pDNA obsahující gen *MCM10* transformována do bakterií *E. coli* DH10bac. Regenerační doba byla však oproti běžným transformacím prodloužena na 4 h. Petriho miska, na kterou byly bakterie následně rozetřeny, obsahovala kanamycin (50 μ g/mL), gentamycin (7 μ g/mL), tetracyklin (10 μ g/mL), X-gal (100 μ g/mL) a IPTG (40 μ g/mL). Bakterie byly inkubovány po dobu 48 h při teplotě 37° C.

Po 48 hodinách narostly na Petriho misce modré a bílé kolonie. Bílé kolonie obsahovaly bakmid s naším inzertem, což bylo ověřeno koloniovou PCR. Jedna kontrolní reakce obsahovala univerzální primery pR3601 a pR3602, kdežto ta druhá obsahovala jeden primer specifický na sekvenci genu *MCM10* (pR5052) a druhý primer univerzální (pR3602). Obsah a průběh koloniové PCR je uveden v tabulkách 3 a 4. Po skončení PCR bylo 10 μL vzorku nanášeno na agarózový gel a proběhla gelová elektroforéza. Potvrzením úspěšné transpozice do bakmidu bylo získání většího produktu v druhé reakci (s primery pR5052 a pR3602). Čtyři kolonie s pozitivním výsledkem byly vybrány a inokulovány do 5 mL LB média obsahujícího kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tetracyklin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a gentamycin (7 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Poté byly inkubovány přes noc při 37 °C. Následující den byly bakterie centrifugovány (3000 RPM, 3 min, 4 °C) po 2 mL, médium bylo odebráno a pelety byly zamrazeny na -20 °C.

	koncentrace
5x Q5 pufr	1x
dNTP mix	200 μM
Primer 1 (pR3601 nebo pR5052)	0,5 μM
Primer 2 (pR3602)	0,5 μM
DNA	část kolonie
OneTaq Hot Start DNA polymeráza	0,02 U/ μL

Tab. 8: Obsah koloniové PCR

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94 °C	30 s	1
Denaturace	94 °C	20 s	30
Annealing	53 °C	30 s	
Extenze	68 °C	30 s	
Finální extenze	68 °C	5 min	1

Tab. 9: Průběh koloniové PCR

Izolace bakmidu

Pelet byl resuspendován ve 200 μL pufru P1. Následně bylo přidáno 200 μL pufru P2, čímž došlo k lyzi buněk. Po třech minutách inkubace bylo přidáno 200 μL předem ochlazeného neutralizačního pufru P3. Suspenze byla ponechána pět minut na ledě a poté byla centrifugována (10 min, 14 000 RPM, 4 °C). Supernatant byl přemístěn do nové zkumavky a byl opět centrifugován (10 min, 14 000 RPM, 4 °C). Následně bylo 500 μL supernatantu smícháno s 500 μL isopropanolu. Směs byla ponechána 15 min na ledě a opět byla

centrifugována (10 min, 14 000 RPM, 4 °C). Supernatant byl odebrán a k peletu bylo přidáno 750 µL předchlazeného 70% ethanolu, aby došlo ke sterilizaci zkumavky. Ethanol byl odebrán a pelet byl vysušen ve *flow boxu*. Poté byl resuspendován ve 12 µL 10 mM Tris-HCl (pH 8).

Transfekce Sf9 buněk

Hmyzí buňky *Spodoptera frugiperda* Sf9 byly dvakrát promyty SF900II médiem (bez antibiotik a FBS) a centrifugovány (3 min, 100× g, RT). Následně byly resuspendovány v SF900II médiu (bez antibiotik a FBS) tak, aby byla dosažena koncentrace 1×10^6 buněk/mL. Poté byly 2 mL kultury přeneseny do kultivační destičky, kde byly ponechány 15 min. Následně bylo 10 µL izolovaného bakmidu zředěno do 100 µL SF900II média. V jiné zkumavce bylo do 100 µL SF900II média stejným způsobem zředěno 10 µL FuGENE transfekčního činidla. Bakmid v médiu byl přidán k tomuto roztoku a byl inkubován 15 min při pokojové teplotě. Poté bylo k roztoku přidáno 800 µL SF900II média (bez antibiotik a FBS). Z buněk bylo odebráno médium, a místo něj byla k buňkám přidána naše připravená směs s bakmidem. Inkubace proběhla přes noc. Na druhý den bylo z buněk médium odebráno a místo něj byly přidány 3,5 mL SF900II média (s antibiotiky a 10% FBS) a inkubace probíhala dalších 72 h při 27 °C. Supernatant poté prošel 0.22 µM filtrem, čímž byl vytvořen P0 virus.

Amplifikace viru

Pomocí 500 µL P0 viru bylo infikováno 50 mL Sf9 buněk, byly inkubovány 72 h při 27 °C a centrifugovány (10 min, 800× g, RT). Supernatant prošel 0,22 µM filtrem. P1 virus byl uchováván ve tmě při teplotě 4 °C.

Expese v High5 buňkách

Hmyzí buňky *Trichoplusia ni* High5 byly kultivovány v ExpressFive médiu. Poté, co dosáhly hustoty $1-2 \times 10^6$, bylo 600 mL buněk infikováno 6,5 mL P1 viru. Buňky byly inkubovány 48 h, centrifugovány (15 min, 800× g, RT) a promyty 50 mL PBS. Pelet byl uchován při teplotě -80 °C. Expese proteinu MCM10 FL byla ověřena na SDS-PAGE.

4.2.7 Expese proteinů v bakteriích

V bakteriích byly exprimovány proteiny RECQ4 (His a protein A štítky): RECQ4 (1-150), RECQ4 (1-400) a fragmenty proteinu MCM10 (His a GST štítky): MCM10 NTD, ID i CTD. Expese těchto proteinů byla optimalizována a podmínky byly vybrány především na základě množství proteinu vyrobeného bakteriemi a míry rozpustnosti tohoto proteinu (Tab. 10).

Pro expresi proteinů RECQ4 byly transformovány bakterie *E. coli* BL21 (DE3), pro MCM10 NTD a ID bakterie *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS a pro MCM10 CTD bakterie *E. coli* ArcticExpress RIL. Kolonie byly naočkovány do 2xTY média s kanamycinem (50 µg/mL) a inkubovány ve třepačce přes noc při teplotě 37 °C. Na druhý den byla bakteriální kultura 100x zředěna do 2xTY média (s 50 µg/mL kanamycinem) a byla inkubována ve třepačce při teplotě 37 °C, dokud optická hustota (OD₆₀₀) nedosáhla hodnoty mezi 0,6-0,8. Poté byla expese cílového proteinu indukována látkou IPTG a bakterie byly dále inkubovány za

podmínek uvedených v tab. 3. Následně byly bakterie centrifugovány (5500 RPM, 8 min, 4 °C) a pelet byl uchován při teplotě -80 °C. Expres byla ověřena pomocí SDS-PAGE.

	Antibiotikum	Bakterie	Množství IPTG	Délka exprese	Teplota při expresi
RECQ4 (1-150)	Kanamycin	BL21 (DE3)	0,1 mM	Přes noc	16 °C
RECQ4 (1-400)	Kanamycin	BL21 (DE3)	0,1 mM	Přes noc	16 °C
MCM10 NTD	Kanamycin	Rosetta 2 (DE3) pLysS	1 mM	3 h	37 °C
MCM10 ID	Kanamycin	Rosetta 2 (DE3) pLysS	1 mM	Přes noc	30 °C ²
MCM10 CTD	Kanamycin	ArcticExpress RIL	0,1 mM	Přes noc	11 °C

Tab. 10: Podmínky exprese proteinů v bakteriích.

4.2.8 Purifikace proteinu MCM10 FL z hmyzích buněk

Lyze buněk

Buněčný pelet byl resuspendován v lyzačním pufru 1x L s proteázovými inhibitory cOmplete EDTA-free (Roche) a přídatkem 10 mM imidazolu. Jako metoda rozbíjení buněk byla zvolena sonikace. Hmyzí buňky byly sonikovány pouze dvakrát 20 sekund s 2 min pauzou mezi sonikacemi. Následně byl lyzát centrifugací (45 min, 11 000 RPM, 4 °C) rozdělen na nerozpustný pelet a supernatant, který obsahoval rozpuštěný cílový protein.

Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je purifikační metoda, která využívá specifické vazby mezi štítkem připojeným k proteinu a imobilizovaným ligandem, který je navázán na matici. K purifikaci MCM10 FL byl využit jeho polyhistidinový (His) štítek, díky němuž byl protein navázán na niklové agaróзовé kuličky (Ni-NTA).

Supernatant s proteinem byl nejprve inkubován 1 h s 0,6 mL promytých niklových kuliček při teplotě 4 °C. Následně byla tato směs nanášena na kolonu a promyta 10 mL T+150 pufru s 10 mM imidazolem, čímž došlo k vymytí nespecificky navázaných proteinů. Cílový protein byl eluován T+150 pufrům s rostoucí koncentrací imidazolu (0,1-0,5 M). Jednotlivé frakce byly analyzovány na SDS-PAGE. Frakce obsahující protein byly alikvotovány, zamrazeny tekutým dusíkem a uchovány při -80 °C. Koncentrace byla stanovena pomocí SDS-PAGE porovnáním se standardem BSA.

² MCM10 ID byl exprimován za neobvyklých podmínek (30 °C, přes noc, s 1 mM IPTG) z toho důvodu, že za standardních podmínek se nepodařilo získat žádný protein. Při expresi přes noc o teplotě 16 °C totiž nebyl protein vůbec exprimován, kdežto při expresi při teplotě 37 °C na 3 h byl vzniklý protein nerozpustný.

4.2.9 Purifikace proteinů z bakterií

Lyze buněk

Bakteriální pelet byl resuspendován v lyzačním pufru CBB HS, ke kterému byla přidána směs proteázových inhibitorů (P, L, A, B, CH), 0,01% NP40 a 1 mM DTT. U všech proteinů kromě MCM10 CTD bylo použito 5 mL pufru na 1 g peletu. Z důvodu nízké rozpustnosti MCM10 CTD bylo na 1 g peletu použito až 15 mL pufru, který navíc obsahoval 0,2% lauroylsarkosinát sodný. Bakterie byly třikrát sonikovány po dobu 8 min a mezi jednotlivými cykly byla pauza 2 min. Poté byl lyzát centrifugován (45 min, 11 000 RPM, 4 °C).

Afinitní chromatografie

Všechny proteiny byly nejprve purifikovány díky svému 6xHis štítku podobně jako u MCM10 FL. Fragmenty MCM10 (MCM10 NTD, ID i CTD) byly dále ještě purifikovány druhou afinitní chromatografií pomocí svého GST štítku, který má schopnost se vázat na glutathionové (GTH) kuličky.

K supernatantu bylo přidáno 0,4–0,6 mL niklových kuliček a byl inkubován 1 h při teplotě 4 °C. Směs byla nanášena na kolonu a promyta 10 mL T+150 pufru s 10 mM imidazolem. Eluce byly získány promýváním kolony T+150 pufrům s rostoucí koncentrací imidazolu (0,1–1 M). Jednotlivé frakce byly analyzovány na SDS-PAGE.

Pro fragmenty proteinu MCM10 byly dále vybrány ty frakce, které obsahovaly protein, a byly inkubovány další hodinu s 0,5 mL promytých GTH kuliček. Tato směs byla opět nanášena na kolonu, promyta T+150 pufrům, eluována T+150 pufrům s rostoucí koncentrací glutathionu (25–100 mM) a frakce byly analyzovány na SDS-PAGE.

Iontově výměnná chromatografie

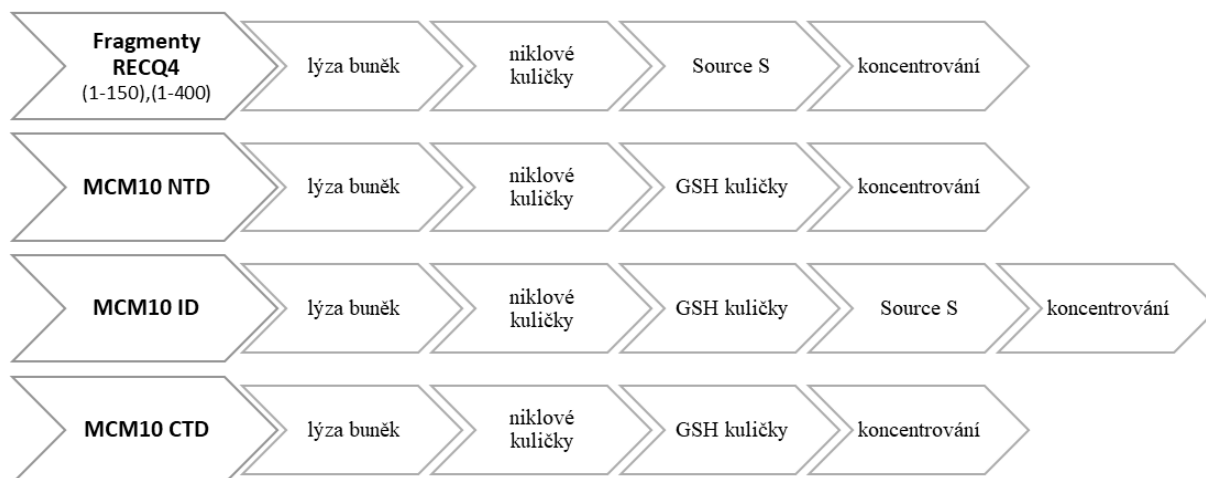
Dalším krokem purifikace proteinů RECQ4 (1-150), RECQ4 (1-400), a MCM10 ID byla kationtová výměnná chromatografie. Ta funguje na principu navázání proteinů s kladným nábojem na záporně nabitou matici. Poté jsou proteiny eluovány pufrům se zvyšující se koncentrací KCl.

Pro tyto proteiny byla použita SourceS (1mL) kolona, která byla promyta 10 mL T+100 pufrům. Frakce z předchozího kroku purifikace byly nanášeny na kolonu a opět následovalo promytí 10 mL T+100 pufru. Proteiny byly posléze eluovány gradientem KCl (0,1–1M). Frakce byly analyzovány na SDS-PAGE.

Koncentrování proteinů

Frakce, které obsahovaly protein, byly spojeny a zakoncentrovány pomocí koncentrátoru Vivaspinu (30 kDa, 2 mL). U proteinů, jejichž poslední purifikační krok byla afinitní chromatografie (proteiny MCM10 NTD a CTD), byl v průběhu koncentrování vyměněn původní pufr na pufr T+150. To z toho důvodu, aby purifikovaný protein neobsahoval glutathion, který by mohl ovlivňovat následné experimenty. Poté byl zakoncentrovaný protein

rozdělen do alikvotů, zamražen tekutým dusíkem a alikvoty byly uchovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Koncentrace jednotlivých proteinů byla stanovena pomocí SDS-PAGE porovnáním s BSA.



Obr. 11: Schéma purifikace proteinů z bakterií.

4.2.10 Kontrola nukleázové kontaminace

Po purifikaci proteinů z hmyzích i bakteriálních buněk bylo zkontrolováno, zda ve vzorku s purifikovaným proteinem není nukleázová kontaminace, která by mohla v následujících experimentech degradovat DNA. Byla připravena reakce s celkovým objemem $10\text{ }\mu\text{L}$, která obsahovala 5 nM fluorescenčně značenou ssDNA, $1\text{ }\mu\text{M}$ protein a $1\times\text{ B}$ pufr s 1 mM MgCl_2 . Jako kontrola byla připravena stejná reakce bez proteinu. Vzorky byly inkubovány 20 min při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně k nim byly přidány $2\text{ }\mu\text{L}$ směsi SDS-PK a byly inkubovány dalších 5 min při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky byly smíchány se $2\text{ }\mu\text{L}$ $6\times\text{LB}$ a naneseny na polyakrylamidový gel, který obsahoval 6% akrylamid v $0,5\times\text{ TBE}$ pufru. Elektroforéza probíhala při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 h za konstantního napětí 95 V .

4.2.11 „Pull-down“ analýza

Pull down je metoda, která umožňuje analyzovat interakce mezi proteiny. Podobně jako u afinitní purifikace byl protein MCM10 díky svému štítku navázán na kuličky. Protein RECQ4 tento štítek nemá a samotný se na kuličky neváže. Pokud by však mezi nimi byla přímá interakce, tak přes jeho interakci s MCM10 zůstane i RECQ4 na kuličkách zachycen.

V pufru T+150 byly smíchány $2\text{ }\mu\text{g}$ proteinu MCM10 FL se $2\text{ }\mu\text{g}$ proteinu RECQ4 (1-400) nebo RECQ4 (1-150). Jako kontrolní reakce byly připraven samotný RECQ4 bez MCM10. Celkový objem reakcí byl $30\text{ }\mu\text{L}$. Nejprve byly proteiny inkubovány 30 min za stálého třepání při teplotě $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně bylo odebráno $5\text{ }\mu\text{L}$ jako vstup a zbytek vzorku byl přidán ke $20\text{ }\mu\text{L}$ amylozových kuliček, na které se MCM10 navázal díky svému MBP štítku. Tato směs byla inkubována dalších 15 min za stálého třepání při teplotě $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byla směs centrifugována (2 min , 5000 RPM , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), byl odebrán supernatant a kuličky byly dvakrát promyty pufrům T+150. Vstup, supernatant a kuličky byly následně analyzovány na SDS-PAGE.

Podle stejného protokolu byl proveden tento test i u fragmentů MCM10 (MCM10 NTD, ID a CTD) s RECQ4 (1-400). Fragmenty MCM10 měly namísto MBP štítku GST štítek, a tak byly pro tento experiment použity GTH kuličky.

4.2.12 EMSA

K analýze interakcí mezi proteiny a DNA byla využita metoda EMSA (z angl. Electrophoretic mobility shift assay). Ta využívá faktu, že volná DNA putuje v gelu rychleji než komplex mezi proteinem a DNA. Reakční směs s celkovým objemem 10 μ L obsahovala pufr 1x B, 15 nM fluorescenčně značenou ssDNA a proteiny RECQ4 (1-269) a MCM10 ID. V reakcích byl ke 200 nM RECQ4 přidáván MCM10 ID se zvyšující se koncentrací. Kontrolní reakce byly bez obou proteinů, samotný 200 nM RECQ4 a samotný MCM10 ID se zvyšující se koncentrací. Proteiny byly nejprve inkubovány bez DNA po dobu 10 min při pokojové teplotě. Po přidání DNA byly vzorky inkubovány dalších 20 min při teplotě 37 °C. Poté byly přidány 2 μ L 6xLB a byly nanесeny na agarózový gel. Ten byl připraven rozpuštěním agarózy s finální koncentrací 0,9% v 1x TBE pufru. Agarózová gelová elektroforéza probíhala při teplotě 4 °C po dobu 50 min za stálého napětí 75 V.

4.2.13 Mikroskopie kondenzátů

V pufru 1x M byl smíchán 20 μ M RECQ4 (1-150) s 10 μ M MCM10 ID (popřípadě s 10 μ M MCM10 NTD). Druhý experiment byl proveden stejně, ale do vzorku byl navíc přidán 1,25% polyethylenglykol (PEG). V posledním vzorku byla kromě PEGu ještě přidána 5 μ M neznačená ssDNA a 30 nM fluorescenčně značená ssDNA o stejné sekvenci. Ke každému z těchto experimentů byly za stejných podmínek provedeny také kontrolní reakce, které obsahovaly tyto proteiny zvlášť. Vzorky byly nanесeny na podložní sklíčko (Ibidi) a obrázky byly pořízeny při pokojové teplotě pomocí DeltaVision Elite mikroskopu (GE Healthcare) s 60x olejovým imerzním objektivem.

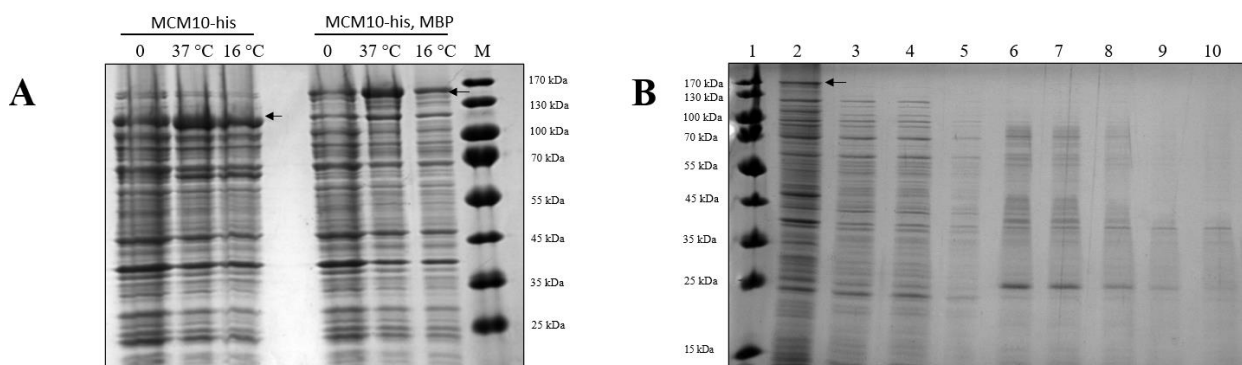
5 VÝSLEDKY

5.1 Klonování, exprese a purifikace MCM10 FL

Vzhledem k tomu, že interakční doména ze strany MCM10 není známa, musela být nejprve ověřena interakce mezi RECQ4 a celým proteinem MCM10 (MCM10 FL). K tomu bylo nutné proteiny exprimovat a purifikovat. Purifikace MCM10 FL se však ukázala jako problematická, o čemž najdeme i zmínky v literatuře [29].

5.1.1 Bakterie

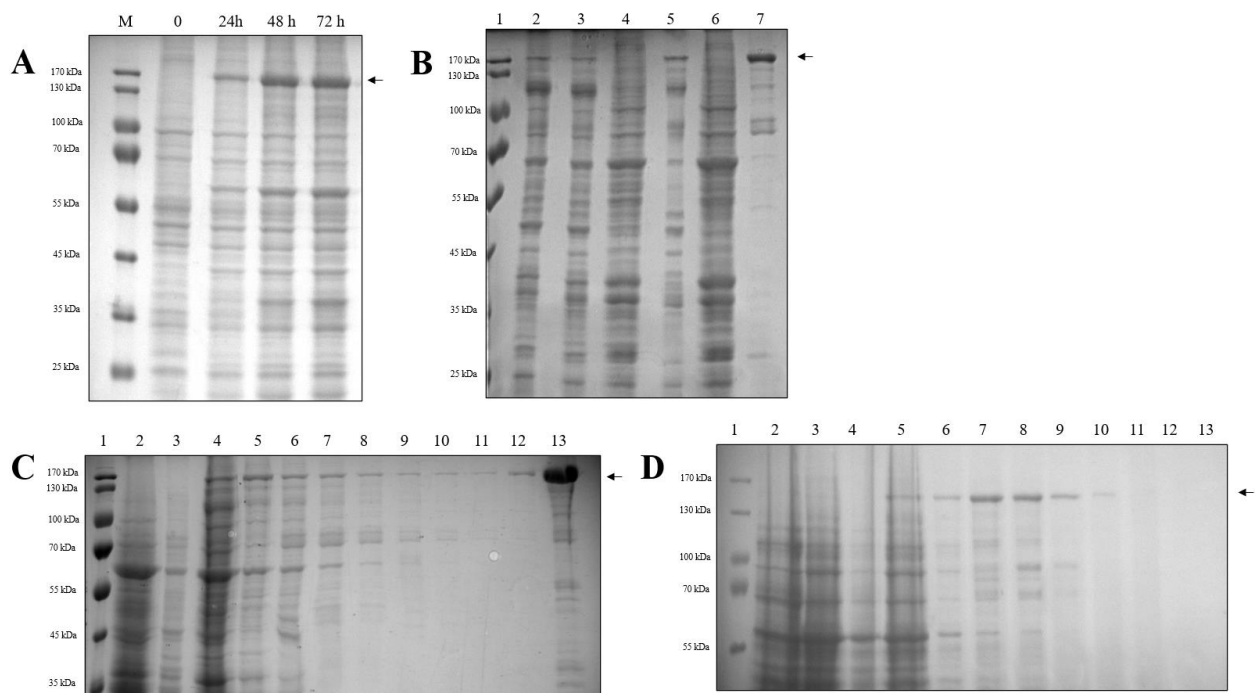
Nejprve byl pro expresi proteinu MCM10 FL zvolen bakteriální expresní systém. Gen *MCM10* byl naklonován do bakteriálních expresních vektorů pomocí Gibsonova klonování. Byly vybrány vektory s His štítkem (pLK2900) a s MBP i His štítky (pLK2901). Tyto proteiny byly následně exprimovány v bakteriích *E. coli* Rosetta 2 a exprese proteinů byla analyzována na SDS-PAGE (Obr. 12-A). Protože byla exprese úspěšná a v obou případech bylo vyrobeno dostatečné množství proteinu, v dalším kroku byla zvolena niklová afinitní chromatografie (za podmínek popsaných v 5.8.). Při purifikaci se ukázalo, že oba proteiny jsou nerozpustné, neboť v části supernatantu není protein přítomen (Obr. 12-B). Stejný výsledek byl pozorován i při expresi probíhající 3 h na 37 °C nebo přes noc na 16 °C. Proto byly následně s malým množstvím peletu prováděny různé optimalizace rozpustnosti požadovaného proteinu (např. přidavek lauroylsarkosinátu sodného, různé koncentrace KCl v rozbíjecím pufru, fosfátový pufr místo pufru Tris-HCl, přidavek DNázy do rozbíjecího pufru). Nicméně žádná z úprav nepřinesla výrazné vylepšení, proto nebyl pro expresi proteinu MCM10 FL bakteriální expresní systém dále používán.



Obr. 12: Expresa a purifikace MCM10 FL z bakterií. (A) Expresa proteinů MCM10-His a MCM10-His, MBP. Vzorky byly naneseny v pořadí: lyzát před indukcí (0), exprese při teplotě 37 °C po dobu 3 h (37 °C), exprese při teplotě 16 °C přes noc (16 °C) a marker (M). (B) Niklová afinitní chromatografie proteinu MCM10-His,MBP. Vzorky: (1) marker, (2) lyzát, (3) supernatant, (4) flowthrough, (5) wash, (6-9) eluce a (10) kuličky. Analyzováno pomocí SDS-PAGE v 12% gelu. Šipky ukazují na protein MCM10.

5.1.2 Hmyzí buňky

Jednou z výhod využití hmyzích expresního systému je lepší rozpustnost proteinů, proto byl tento systém vybrán k vyzkoušení. Gen MCM10 byl tedy obdobně naklonován do expresního vektoru se štítky MBP i His (pLK3160) určeného pro hmyzí buňky. Protein byl úspěšně exprimován (Obr. 13-A) a následně byla otestována jeho rozpustnost a vazba na amyložové kuličky (Obr. 13-B). Z tohoto výsledku je zřejmé, že rozpustnost proteinu byla výrazně vylepšena díky expresi v hmyzích buňkách. Bohužel protein nebylo možné purifikovat přes jeho MBP štítek, jelikož pravděpodobně dochází k agregaci proteinu na amyložových kuličkách a protein nelze eluovat ani nejvyšší možnou koncentrací maltózy (Obr. 13-C). Z tohoto důvodu byl MCM10 protein purifikován pouze přes jeho His štítek na niklových kuličkách (Obr. 13-D). MCM10 protein je však poměrně nestabilní. Velmi rychle degraduje (již přes noc při 4 °C) a při pokusu o koncentrování proteinu byla jeho koncentrace naopak snížena, pravděpodobně z důvodu agregace proteinu na membránu koncentrátoru. Proto byla niklová afinitní chromatografie posledním krokem jeho purifikace. Přestože byl nakonec získán protein MCM10 FL, bude se muset jeho purifikace nadále optimalizovat, aby bylo dosaženo větší čistoty a výtěžku proteinu.

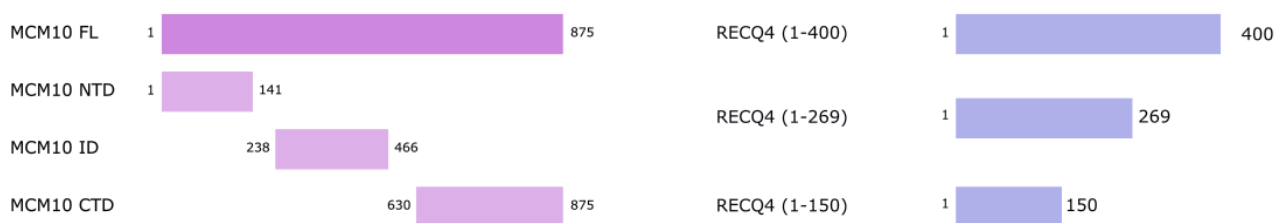


Obr. 13: Exprese a purifikace MCM10 FL z hmyzích buněk. (A) Exprese proteinu MCM10 FL. Vzorky: marker (M), lyzáty před expresí (0) a 24 h, 48 h a 72 h po expresi. (B) Test rozpustnosti proteinu a jeho vazby na amyložové kuličky. Vzorky: (1) marker, (2) lyzát, (3) supernatant, (4) pelet, (5) flowthrough, (6) wash, (7) kuličky. (C) Amyložová afinitní chromatografie proteinu MCM10 FL. Vzorky: (1) marker, (2) lyzát, (3) supernatant, (4) flowthrough, (5) wash, (6-12) eluce, (13) kuličky. (D) Niklová afinitní chromatografie proteinu MCM10 FL. Vzorky byly naneseny ve stejném pořadí jako u Obr. 13-C. Analyzováno pomocí SDS-PAGE v 12% gelu. Šipky ukazují na protein MCM10.

5.2 Exprese a purifikace fragmentů RECQ4 a MCM10

Protože interakce mezi RECQ4 a MCM10 probíhá prostřednictvím N-konce RECQ4 a tato doména je dostačující k životaschopnosti buněk, byl pro další práci vybrán fragment RECQ4 (1-400). K bližšímu pohledu na interakci mezi RECQ4 a MCM10 byly zvoleny i kratší fragmenty RECQ4: fragment RECQ4 (1-269) pro zkoumání jeho DNA vazby a fragment RECQ4 (1-150) pro fázovou separaci. RECQ4 (1-269) byl purifikován Mgr. Hanou Sedláčkovou, PhD. a proteiny RECQ4 (1-400) a (1-150) byly exprimovány a purifikovány podle protokolu popsaného v metodách.

Protože se purifikace MCM10 FL ukázala jako obzvláště problematická, byly kromě něj exprimovány a purifikovány také jeho fragmenty (MCM10 NTD, ID a CTD) a tento proces byl optimalizován (viz 4.2.9).



Obr. 14: Schéma použitých verzí proteinů MCM10 a RECQ4. Vytvořeno v programu Inkscape.

5.3 Interakce mezi RECQ4 a MCM10

5.3.1 Vazba s MCM10 FL

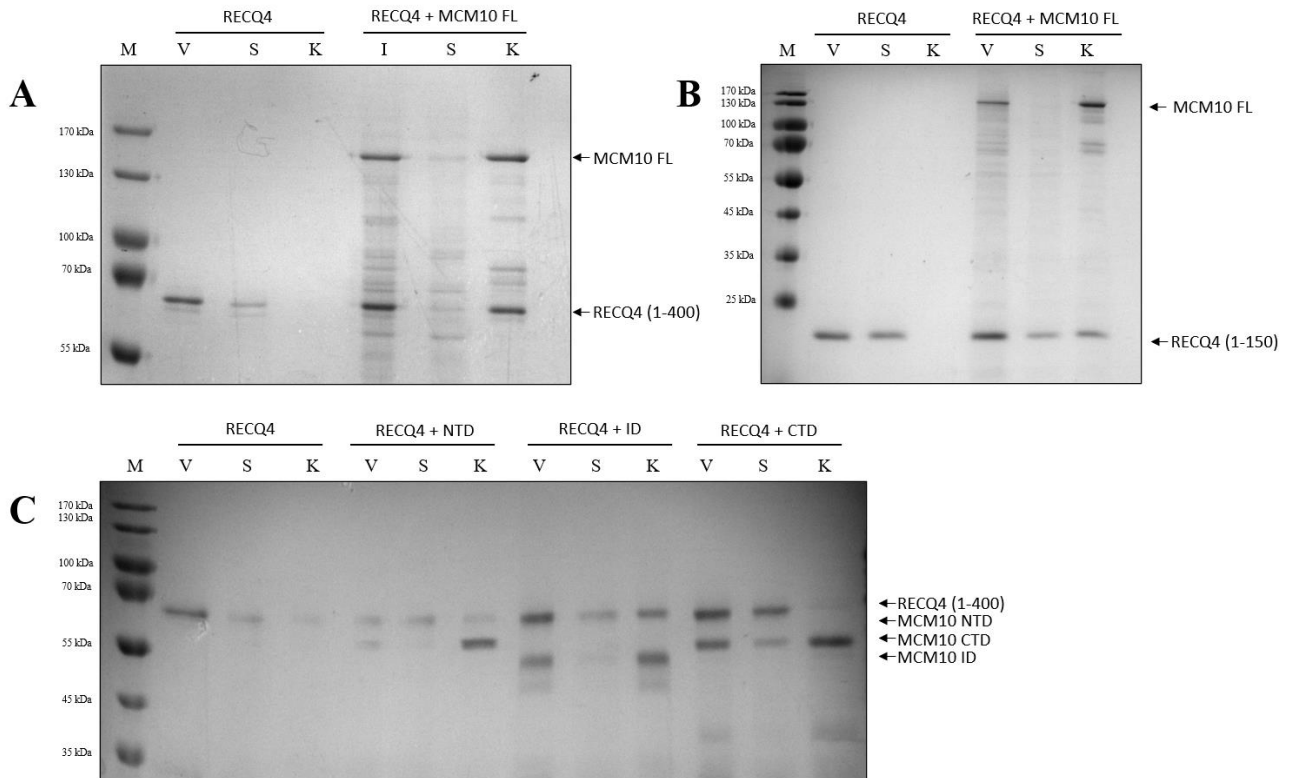
K ověření, že MCM10 FL interaguje s RECQ4, byla použita metoda „pull-down“. Proteiny MCM10 FL a RECQ4 byly nejprve inkubovány spolu a následně byly přidány k amylozovým kuličkám. Díky svému MBP štítku se MCM10 FL naváže na amylozové kuličky a pokud dojde k interakci mezi proteiny, je RECQ4 přes MCM10 taktéž na kuličky zachycen. V průběhu experimentu byly odebrány vzorky: vstup (V) po inkubaci samotných proteinů, supernatant (S) po navázání proteinu na kuličky a kuličky (K) po jejich promytí. Tyto vzorky byly analyzovány na gelu. Souběžně byla též provedena kontrolní reakce bez proteinu MCM10, která potvrdila, že RECQ4 se na kuličky nespecificky neváže (Obr. 15-A a 15-B).

Z fragmentů RECQ4 byl vybrán RECQ4 (1-400) a RECQ4 (1-150), které obsahují známou interakční doménu pro protein MCM10, která se nachází v rozmezí aminokyselin 76-145 [24]. Analýza interakce ukazuje, že zatímco v kontrolní reakci se RECQ4 nenačkal na kuličky, v reakci s MCM10 jsou RECQ4 (1-400) i RECQ4 (1-150) na kuličkách zachyceny (Obr. 15-A a 15-B). Z výsledků vyplývá, že N-terminus RECQ4 přímo interaguje s MCM10 a že prvních 150 aminokyselin proteinu RECQ4 je dostatečných k této interakci.

5.3.2 Vazba s fragmenty MCM10 proteinu

Na rozdíl od RECQ4 není ze strany MCM10 interakční doména těchto proteinů známá. Proto byla opět využita metoda „pull down“ ke zjištění, která doména MCM10 (NTD, ID nebo CTD) je za interakci s RECQ4 zodpovědná.

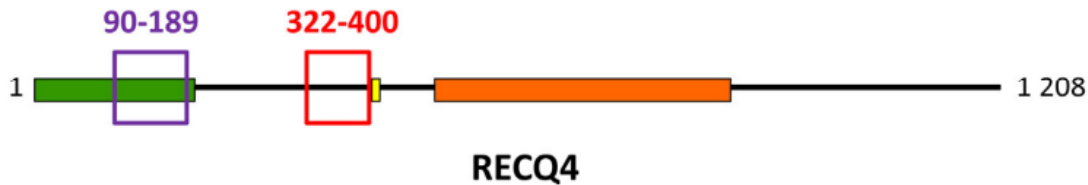
RECQ4 (1-400) byl proto inkubován s jednotlivými doménami MCM10 a směs byla poté přidána ke GTH kuličkám, na které se fragmenty MCM10 navázaly díky svému GST štítku. V kontrolní reakci byl RECQ4 samotný inkubován s GTH kuličkami k vyloučení jeho nespecifické vazby. Ze všech reakcí byl opět odebrán vstup (V), supernatant (S) a kuličky (K) a tyto vzorky byly analyzovány na gelu. Výsledky ukazují, že RECQ4 je v přítomnosti NTD nebo CTD domén jen velmi slabě navázán na kuličky, a to v podobné míře jako v kontrolní reakci (Obr. 15-C). Naopak v reakci obsahující MCM10 ID došlo k výraznému zachycení RECQ4 (1-400) na GTH kuličky. Z těchto výsledků lze vyvodit, že doména ID proteinu MCM10 zajišťuje interakci s RECQ4. V následujících experimentech, které zkoumají interakci mezi RECQ4 a MCM10, byl tedy využíván tento fragment proteinu MCM10.



Obr. 15: Interakce mezi RECQ4 a MCM10. (A) Pull down analýza MCM10 FL (2 µg) s RECQ4 (1-400) (2 µg). Analyzováno pomocí SDS-PAGE v 10% gelu. (B) Pull down analýza MCM10 FL (2 µg) s RECQ4 (1-150) (2 µg). Analyzováno pomocí SDS-PAGE v 15% gelu. (C) Pull down analýza RECQ4 (1-400) (2 µg) s fragmenty proteinu MCM10 (MCM10 NTD, ID a CTD) (2 µg). Analyzováno pomocí SDS-PAGE v 12% gelu.

5.4 Vliv interakce na DNA vazbu RECQ4

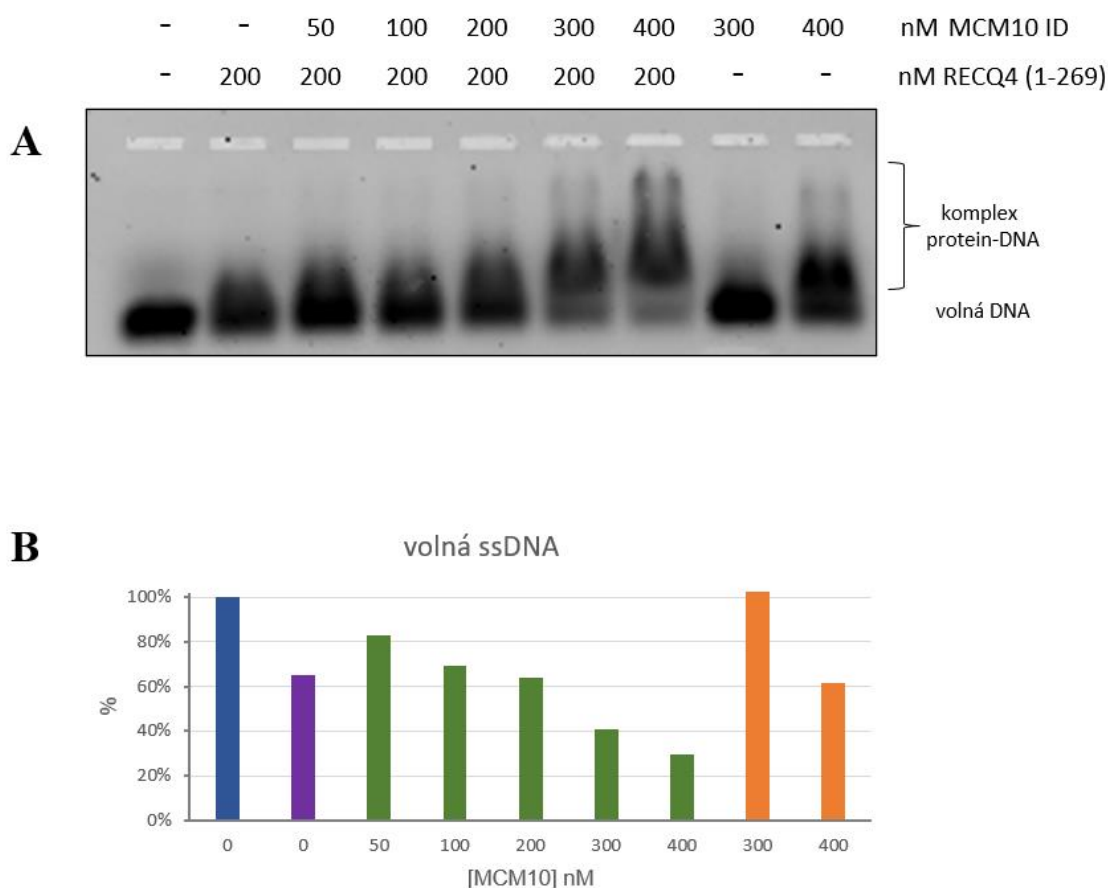
RECQ4 má schopnost vazby DNA a v N-terminální části proteinu se vyskytují dvě DNA-vazebné domény [37] (Obr. 16). První z nich se nachází v oblasti interakční domény s MCM10. Vzhledem k tomu, že předcházející studie naznačují roli RECQ4 v zacílení MCM10 do počátku replikace [22], bylo s fragmentem RECQ4 (1-269) otestováno, zda interakce s MCM10 ovlivňuje DNA vazbu proteinu RECQ4.



Obr. 16: Schématické znázornění DNA-vazebných domén RECQ4. Fialový rámeček znázorňuje první a červený rámeček druhou DNA-vazebnou doménu RECQ4. Zeleně je vyznačená SLD2 doména, oranžově helicázová doména a žlutě jaderný lokalizační signál. Převzato a upraveno [37].

Pro analýzu DNA vazby byla zvolena metoda EMSA. Protein RECQ4 (1-269) o koncentraci 200 nM byl inkubován se zvyšující se koncentrací (50-400 nM) proteinu MCM10 ID a následně byla k proteinům přidána fluorescenčně značená ssDNA (15 nM). Pro porovnání byla otestována i vazba proteinů RECQ4 a MCM10 ID na ssDNA samostatně. Vzorky byly analyzovány na agarózovém gelu (Obr. 17-A)

Výsledek ukazuje, že se zvyšující se koncentrací MCM10 ID dochází ke zvýšení afinity proteinu RECQ4 k DNA. Tento efekt je nejlépe viditelný u 300 nM MCM10 ID. Za této koncentrace je zřetelný posun ve vazbě RECQ4 na DNA, zatímco MCM10 ID při této koncentraci DNA samostatně neváže. Při samostatné vazbě proteinu RECQ4 je kolem 60 % volné DNA, naopak po přidání 300 nM MCM10 je nevyvázáno už jen 40 % DNA (Obr. 17-B). Z výsledků tedy vyplývá, že MCM10 stimuluje DNA-vazebnou aktivitu proteinu RECQ4.



Obr. 17: Vliv interakce na DNA vazbu proteinu RECQ4. (A) Vazba DNA analyzována na 0,9% agarózovém gelu. (B) Kvantifikace experimentu ukazující množství volné DNA: bez proteinu (modře), samotný RECQ4 (fialově), RECQ4 se zvyšující se koncentrací MCM10 (zeleně), samotný MCM10 (oranžově).

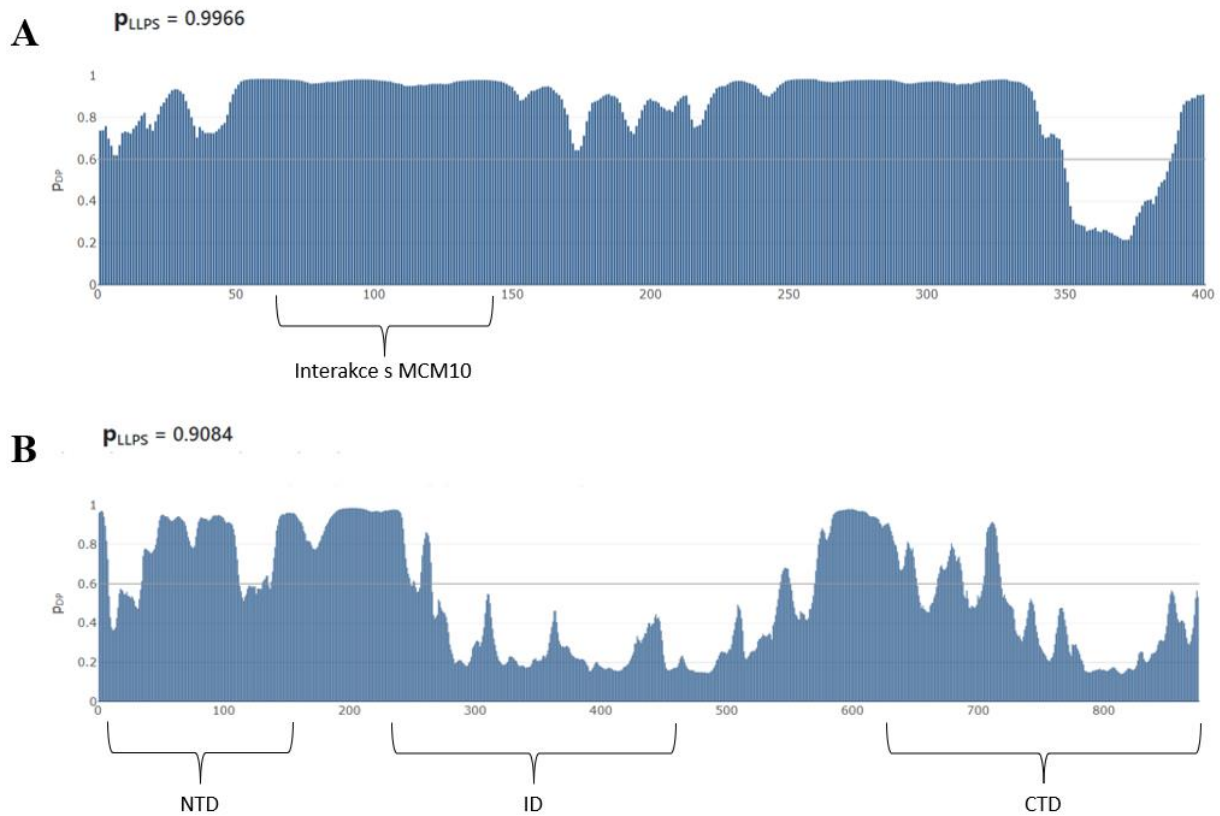
5.5 Fázová separace proteinů RECQ4 a MCM10

Aby buňky plnily svou funkci, musí být organizovány do buněčných organel a kompartmentů. Nejznámější je organizace buněk v podobě organel obalených membránami, jako jsou například mitochondrie nebo jádro. Nicméně v buňkách jsou kromě těchto struktur i bezmembránové organely, nejčastěji tvořené proteiny a nukleovými kyselinami. Některé z nich vznikají procesem zvaným fázová separace (LLPS, z angl. liquid-liquid phase separation). Tyto biomolekulární kondenzáty pravděpodobně slouží k lokalizaci a uchování potřebných faktorů, a regulují tak biochemické děje [49].

Nedávná studie ukazuje, že proteiny, které se podílí na licencování počátků replikace DNA (ORC, Cdc6, Cdt1 a MCM2-7), podléhají fázové separaci *in vitro* [50]. Tyto výsledky naznačují, že LLPS může hrát roli v iniciaci replikace DNA. Je otázka, zda dochází k tomuto jevu i v pozdější fázi iniciace replikace, kde mají funkci proteiny RECQ4 a MCM10.

Jedním z předpokladů LLPS je výskyt tzv. vnitřně neuspořádaných oblastí (IDR, z angl. intrinsically disordered region) v proteinu, které jsou velmi flexibilní a nemají jasně danou sekundární strukturu. N-terminální část RECQ4 je velmi neuspořádaná, obsahuje několik IDR oblastí a jedna z nich (348-388 aminokyselin) byla nedávno publikována, že prochází fázovou separací v přítomnosti guaninových kvadruplexů [51].

Schopnost spontánní fázové separace N-konce proteinu RECQ4 byla předpovězena pomocí programu FuzDrop [52]. Podle predikce by se výrazná IDR oblast N-konce RECQ4 měla nacházet právě v oblasti interakční domény s MCM10 (Obr. 18-A). Proto byla predikovaná i pravděpodobnost fázové separace proteinu MCM10 (Obr. 18-B). Výsledek naznačuje, že by MCM10 taktéž mohl podléhat LLPS.



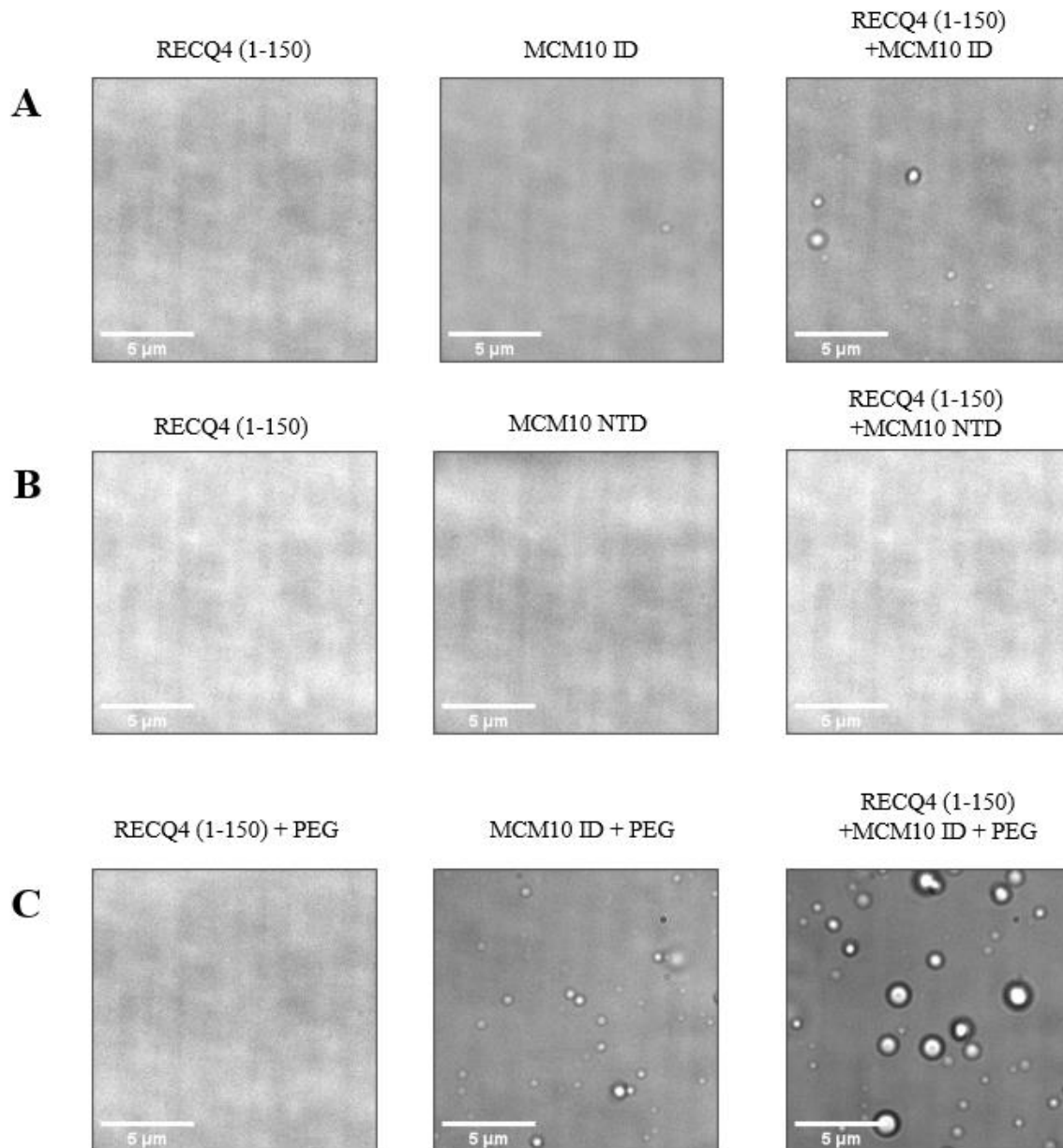
Obr. 18: Pravděpodobnost spontánní fázové separace (P_{LLPS}) proteinů RECQ4 a MCM10. (A) Pravděpodobnost fázové separace N-terminální domény proteinu RECQ4. (B) Pravděpodobnost fázové separace MCM10 s vyznačenými doménami proteinu. U proteinů s P_{LLPS} větší než 0,6 je vysoká pravděpodobnost fázové separace. Předpověď byla získána pomocí programu FuzDrop [52].

5.5.1 Interakce mezi RECQ4 a MCM10 vede k fázové separaci

K ověření předpovězené schopnosti proteinu RECQ4 a MCM10 fázově separovat byly využity proteiny RECQ4 (1-150) o koncentraci 20 μM a MCM10 ID (10 μM), které byly smíchány v pufru 1x M. Pufir obsahoval 250 mM KCl, z toho důvodu, že MCM10 má tendenci agregovat v nižší koncentraci KCl. V kontrolních reakcích byly proteiny inkubovány s pufrům 1x M samostatně. Vzorky byly následně pozorovány pod mikroskopem (Obr. 19-A).

Výsledek experimentu ukazuje, že zatímco proteiny RECQ4 (1-150) a MCM10 ID samostatně nevytváří žádné kondenzáty, jejich společná směs vede ke vzniku drobných kondenzátů. Pro ověření, že je tento efekt způsobený přímou interakcí mezi RECQ4 a MCM10, byl experiment proveden i s MCM10 NTD, tedy doménou MCM10, která s RECQ4 neinteraguje (Obr. 19-B). Je vidět, že MCM10 NTD s RECQ4 kondenzáty netvoří. Z výsledků lze vyvodit, že přímá interakce mezi RECQ4 a MCM10 indukuje jejich fázovou separaci.

V experimentech musela být vysoká koncentrace KCl (250 mM), která brání agregaci MCM10 ID. Takto vysoká koncentrace KCl však částečně také inhibovala LLPS. Proto byl v následujícím experimentu do 1x M pufru přidán 1,25% polyethylenglykol (PEG), který může indukovat LLPS (Obr. 19-C). I za těchto podmínek samotný RECQ4 (1-150) nevytvářel žádné kondenzáty, naopak MCM10 ID začal vytvářet drobné kondenzáty. Při kombinaci obou proteinů byl zřetelný výrazný nárůst v jejich velikosti a množství, z čehož opět vyplývá, že MCM10-RECQ4 komplex stimuluje fázovou separaci.

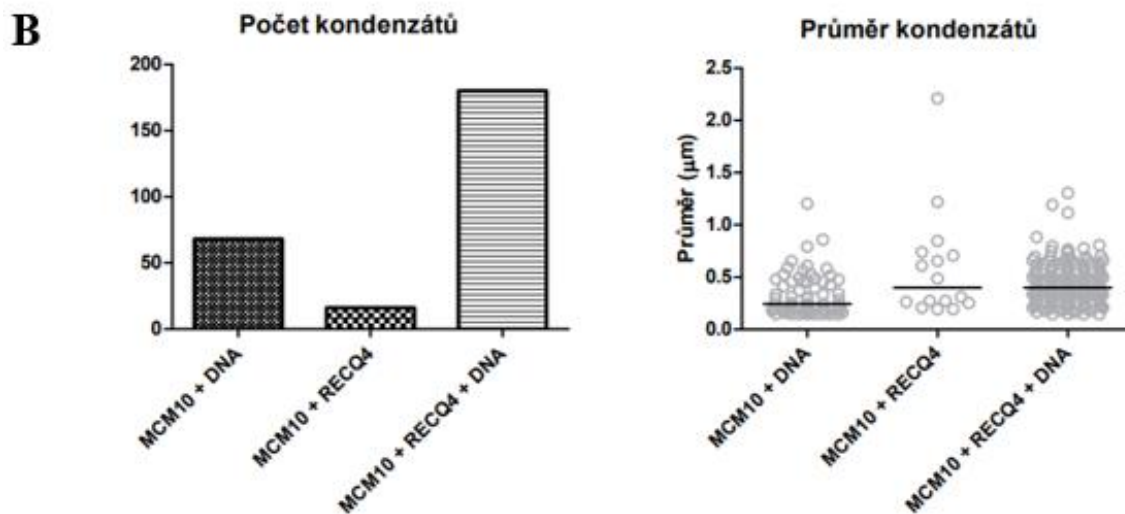
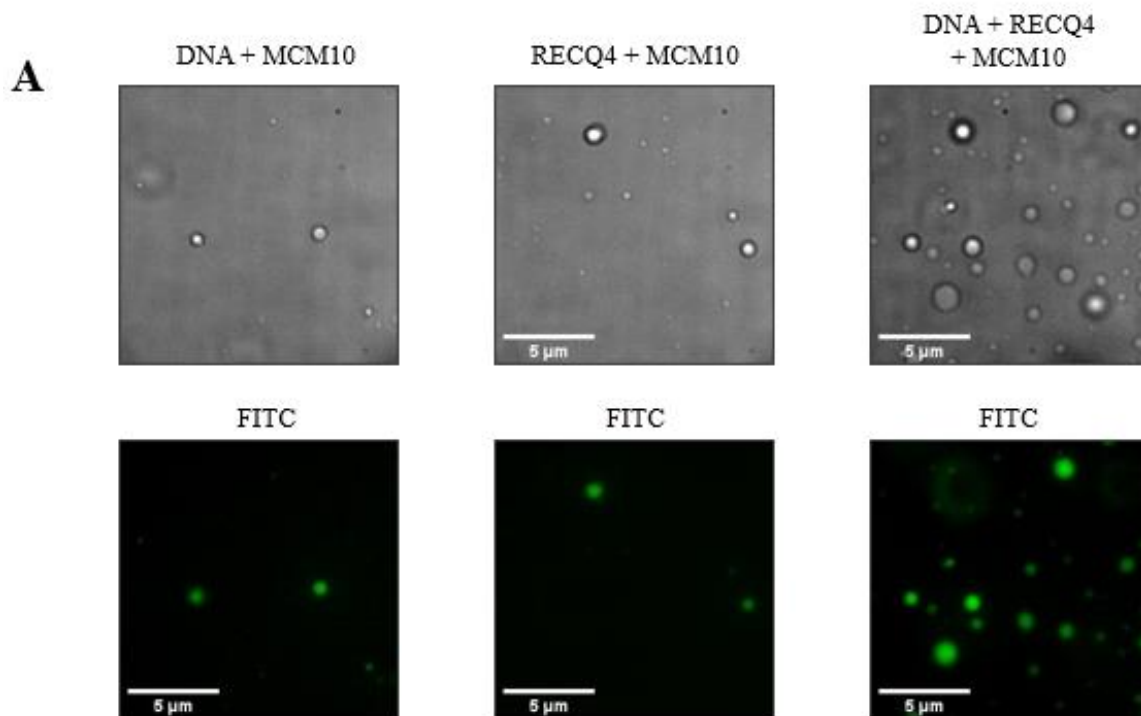


Obr. 19: Mikroskopická analýza fázové separace proteinů RECQ4 a MCM10. (A) Fázová separace proteinů RECQ4 (1-150) a MCM10 ID. (B) Fázová separace proteinů RECQ4 (1-150) a MCM10 NTD. (C) Fázová separace proteinů RECQ4 (1-150) a MCM10 ID s přidavkem 1,25% PEG.

5.5.2 Fázová separace RECQ4-MCM10 v přítomnosti DNA

Protože předchozí výsledky naznačují, že MCM10 stimuluje vazbu RECQ4 na DNA, byly provedeny experimenty, zda se RECQ4-MCM10 kondenzáty tvoří v přítomnosti DNA. V pufru, který opět obsahoval 1,25 % PEG, byl smíchán 10 μM RECQ4 (1-150) a 5 μM MCM10 ID s 5 μM ssDNA. Ke všem vzorkům byla také pro vizualizaci přidána zanedbatelná část fluorescenčně značené DNA (30 nM).

Díky fluorescenční značce na DNA (FITC) můžeme pozorovat, že DNA se vyskytuje vně kondenzátů s RECQ4-MCM10 i MCM10 samotným (Obr. 20-A), na rozdíl od RECQ4, který za těchto podmínek kondenzáty s DNA netvoří. Fluorescence umožnila nejen vizualizaci kondenzátů, ale i jejich kvantifikaci. Při porovnání fázové separace komplexu MCM10-DNA se po přidání RECQ4 počet kondenzátů trojnásobně zvýšil a došlo i ke zvětšení jejich průměru (Obr. 20-B). To je dalším potvrzením předchozích experimentů, který ukazuje, že interakce mezi RECQ4 a MCM10 indukuje jejich fázovou separaci. K výraznému zvětšení počtu kondenzátů došlo i po přidání DNA k MCM10-RECQ4 kondenzátům (Obr. 20-B). Tento výsledek nově ukazuje, že i vazba DNA stimuluje fázovou separaci proteinů RECQ4 a MCM10.



Obr. 20: Fázová separace RECQ4-MCM10 v přítomnosti DNA. (A) Fázová separace proteinů RECQ4 a MCM10 s DNA. (B) Kvantifikace fázové separace proteinů RECQ4 a MCM10 s DNA v programu ImageJ ukazující počet a průměr kondenzátů získaný ze dvou zorných polí mikroskopu.

6 DISKUZE

6.1 RECQ4-MCM10 interakce v iniciaci replikace

Tato práce se zabývala studiem interakce proteinů RECQ4 a MCM10 a jejich rolí při iniciaci replikace DNA. Přestože je jejich interakce známá, důležité informace, které jsou nezbytné k pochopení úlohy těchto proteinů v iniciaci replikace, chybí. Proto se práce na některé tyto aspekty zaměřila.

Výsledky tohoto výzkumu potvrzují, že interakce mezi proteiny MCM10 a RECQ4 je přímá a že se interakční doména nachází v prvních 150 aminokyselinách proteinu RECQ4, což je v souladu s předešlými výsledky [24]. Nově bylo ukázáno, že ze strany MCM10 je za interakci zodpovědná interní doména (238-466 aminokyselin) tohoto proteinu.

Právě s MCM10 ID byly následně provedeny experimenty zkoumající role této interakce. Studium bylo zaměřeno na to, jakým způsobem interakce s MCM10 ovlivňuje vlastnosti proteinu RECQ4. Jedna ze známých aktivit proteinu RECQ4, kterou zprostředkovává jeho N-konec, je vazba DNA. Bylo zjištěno, že MCM10 ID stimuluje DNA-vazebnou aktivitu RECQ4 (1-269) a že společně vytvářejí komplex RECQ4-MCM10-DNA. RECQ4 by tak za pomoci MCM10 mohl být navázán na replikační počátek s větší afinitou. To by vedlo ke stabilnějšímu a pevnějšímu komplexu mezi proteiny a DNA na počátku replikace.

Fázová separace proteinů se ukazuje jako klíčová v mnoha biologických procesech [49]. Nový zajímavý aspekt by mohla přinést i do iniciace replikace DNA. Nejenže by to mohlo umožnit efektivnější lokalizaci proteinů k počátku replikace, ale také by pomocí fázové separace mohlo docházet k elegantní regulaci tohoto procesu, například fosforylací. Proto byla u proteinů RECQ4 a MCM10 nejprve zhotovena předpověď schopnosti jejich spontánní fázové separace. Výsledky ukázaly, že oba proteiny obsahují domény, které s vysokou pravděpodobností fázové separaci podléhají. Na základě těchto predikcí byly provedeny experimenty s proteiny RECQ4 (1-150) a MCM10 ID. Moje výsledky ukázaly, že komplex RECQ4-MCM10 podléhá fázové separaci. Nejvýrazněji byl tento efekt pozorován s přidavkem polyethylenglykolu (PEG). Za těchto podmínek i MCM10 samotný podléhá fázové separaci. Přesto měl přidavek RECQ4 opět stimulační efekt na fázovou separaci proteinů. Kontrolní experimenty s fragmentem MCM10 NTD, který s RECQ4 neinteraguje, rovněž nevedly ke vzniku kondenzátů, což dokazuje, že za fázovou separaci proteinů RECQ4 a MCM10 je zodpovědná jejich přímá interakce. Další experimenty potvrdily, že DNA vazba komplexu RECQ4-MCM10 také stimuluje fázovou separaci a DNA je schopná vytvořit s těmito proteiny kondenzáty. Tento výsledek koresponduje s předcházejícími experimenty, které ukazovaly, že MCM10 stimuluje vazbu RECQ4 na DNA.

Již dříve bylo publikováno, že fázová separace ovlivňuje proteiny, které mají roli v iniciaci replikace DNA [50]. Tato studie dokazuje schopnost fázové separace proteinů v prvotní fázi iniciace – při licencování počátků replikace. Mezi tyto proteiny patří ORC, Cdc6, Cdt1 a MCM2-7. V této studii bylo dokázáno, že Cdt1, Cdc6 a ORC podléhají fázové separaci při vazbě DNA a poté mají proteiny schopnost přivolat MCM2-7 helikázu do těchto kondenzátů.

Již v následujícím kroku iniciace mají úlohu proteiny RECQ4 a MCM10 [21]. Výsledky této práce tedy na předešlou studii navazují a rozšiřují ji o proteiny podílející se na dalším kroku iniciace replikace. Interakce mezi RECQ4 a MCM10 indukuje fázovou separaci a bylo by nesmírně zajímavé, kdyby jejich asociace s faktory podílejícími se na licencování vyžadovala fázovou separaci. Tím by došlo k jejich zakoncentrování a lokalizaci k počátkům replikace. RECQ4-MCM10 kondenzát by se navíc mohl spojit s kondenzátem helikázy MCM2-7 vytvořeným na replikačních počátcích a vést k její aktivaci [50]. Výsledky této práce dále naznačují, že by interakce s MCM10 pomohla proteinu RECQ4 lépe vázat DNA, která by se jednak taktéž stala součástí kondenzátu, a ještě by fázovou separaci stimulovala. To by opět mohlo mít dopad na stabilitu celého komplexu na replikačním počátku a jeho schopnost zahájit replikaci DNA.

Je také možné, že by fázová separace hrála roli i v seskupení CMG helikázy. V lidských buňkách totiž protein CDC45 není asociován s chromatinem bez MCM10 a RECQ4 [22, 23]. MCM10 CTD navíc přímo interaguje se CDC45 [29]. V souvislosti s těmito poznatky si lze představit model, kde by pomocí interakce mezi MCM10 ID a RECQ4 proteiny podléhaly LLPS a následně by byl CDC45 přivolán do kondenzátů přes jeho interakci s MCM10 CTD. Tato skutečnost by však musela být teprve otestována.

6.2 Navazující studie

Výsledky této práce inspirují mnoho nových otázek, které by mohly přispět k pochopení iniciace replikace a její regulace. Nicméně bude ještě nutné již provedené experimenty zopakovat, a navíc je provést s dalšími kontrolami.

Jednou z důležitých kontrol by mohl být RECQ4 (1-400) s deletovanou interakční doménou proteinu MCM10. Tento konstrukt byl dokonce připraven jako součást této práce a protein byl již exprimován. Po jeho purifikaci může být použit jako negativní kontrola vlivu přímé interakce mezi těmito proteiny v celé řadě experimentů. Jeho vazba ssDNA by neměla být ovlivněna interakcí s MCM10 ID a stejně tak by nemělo docházet k fázové separaci mezi těmito proteiny.

V navazující práci by bylo vhodné ještě nadále optimalizovat purifikaci MCM10 FL. Přestože byly publikovány články, ve kterých se purifikace tohoto proteinu podařila z bakterií [24, 30], objevují se v literatuře také náznaky komplikací. Buď autoři dosahovali z purifikací velmi nízkých výtěžků [30], nebo se jim MCM10 FL kvůli nízké rozpustnosti a stabilitě proteinu purifikovat vůbec nepodařilo [29]. V této práci protein MCM10 FL také především kvůli jeho nízké rozpustnosti získán nebyl. Tento problém byl vyřešen díky využití hmyzích buněk místo bakterií. Purifikace z hmyzích buněk byla úspěšná a vedla k získání proteinu, což by do budoucna umožnilo celou řadu nových experimentů, včetně strukturní analýzy tohoto proteinu pomocí kryo-elektronové mikroskopie. Nicméně zatím nebyl MCM10 FL purifikován v dostatečném množství a čistotě a purifikaci je potřeba zopakovat a optimalizovat.

Navazující charakterizace proteinu MCM10 FL by se mohla věnovat i jeho afinitě k různým DNA substrátům. Jako součást tohoto projektu byla po purifikaci jednotlivých domén MCM10 otestována jejich aktivita pomocí DNA vazby. V souladu s předchozími studiemi [29] bylo potvrzeno, že MCM10 ID i CTD vážou DNA, nejlépe substráty imitující replikaci

DNA. Předběžně byly také otestovány další substráty a MCM10 překvapivě váže s vysokou afinitou guaninové kvadruplexy (G4). Navíc má kromě DNA schopnost vazby i RNA. Bylo by zajímavé zjistit, zda má tato vazba G4 struktur souvislost s tím, že G4 jsou asociovány s počátky replikace DNA [53]. Také je otázka, proč má MCM10 schopnost vazby RNA. Zda to například nemůže být z toho důvodu, že počátky replikace jsou asociovány s aktivní transkripcí, která by mohla ovlivňovat zahájení replikace [54]. Další vysvětlení by mohlo být, že by vazba RNA či G4 mohla indukovat fázovou separaci a RNA a G4 by vstupovaly do kondenzátů. Toto jsou však pouze hypotézy a zmíněné výsledky jsou předběžné a prozatím nedostatečně otestované.

Studium fázové separace proteinů RECQ4 a MCM10 je nesmírně zajímavé a inovativní téma, které se vyznačuje světovou jedinečností. Rozšíření našeho poznání by mohlo být dosaženo prostřednictvím následujících experimentů. Nejprve by bylo možné proteiny fluorescenčně označit a díky této vizualizaci potvrdit, zda oba vstupují do kondenzátů. Dále by mohlo být otestováno, zda se tyto kondenzáty chovají podle fázového diagramu a zda dochází k rozpouštění kondenzátů při zvyšování koncentrace jednoho či druhého proteinu. Také by bylo zajímavé otestovat, jestli další proteiny, které jsou asociovány s počátkem replikace, vstupují do kondenzátů, například již zmíněný protein CDC45.

Důležitý aspekt fázové separace v kontextu iniciace replikace je také její regulace. V následujícím studiu proteinu RECQ4 by mohl být otestován například vliv fosforylace proteinu na jeho fázovou separaci. Fosforylace je klíčový regulátor iniciace replikace DNA a fosforylace Sld2 (kvasinkového homologu RECQ4) pomocí CDK kinázy je důležitá pro iniciaci replikace DNA v kvasinkách [55]. Přestože není jednoznačně potvrzené, že fosforylace lidského RECQ4 je stejně nezbytná jako u kvasinek, nachází se v N-konci RECQ4 několik fosforylačních míst. Taktéž bylo dokázáno, že fosforylace může být regulátor fázové separace. Ve studii o fázové separaci proteinů licencujících replikační počátky bylo prokázáno, že jejich fosforylace inhibuje fázovou separaci [50]. Tyto poznatky korespondují s tím, že fosforylace má v této fázi iniciace replikace DNA inhibiční efekt na proteiny. Naopak v další fázi iniciace, kde má roli RECQ4, fosforylace proteiny aktivuje. Proto by byla předpokládána spíše stimulace fázové separace při fosforylaci proteinu RECQ4.

7 ZÁVĚR

Replikace DNA je komplexní molekulární proces, který musí proběhnout před každým buněčným dělením. Je zajištěna mnoha proteiny, které musí precizně fungovat a spolupracovat, protože deregulace tohoto procesu často vede k buněčné smrti nebo rozvoji dědičných onemocnění. Tato práce se zabývala proteiny RECQ4 a MCM10, které mají úlohu v iniciaci replikace DNA, tedy v počátečním kroku tohoto procesu.

Hlavním tématem práce bylo studium interakce mezi těmito proteiny. Výsledky potvrzují přímou interakci mezi RECQ4 a MCM10 a vymezují ji na interní doménu proteinu MCM10. Dále bylo ukázáno, že interakce má i funkční význam, neboť MCM10 stimuluje DNA-vazebnou aktivitu proteinu RECQ4 a interakce mezi RECQ4 a MCM10 indukuje jejich fázovou separaci. Tato data celkově naznačují, že fázová separace může hrát velmi důležitou roli v iniciaci replikace DNA.

Získané poznatky jsou v kontextu světové vědy zcela nové a přispívají k lepšímu pochopení úlohy proteinů RECQ4 a MCM10 v iniciaci replikace. Díky tomuto projektu také vyvstaly nové zajímavé otázky, které mohou sloužit jako témata pro navazující výzkum. Biologický význam výzkumu proteinu RECQ4 je navíc podtržen jeho asociací se závažnými dědičnými onemocněními, jako jsou Rothmund-Thomsonův syndrom, Baller-Geroldův syndrom a syndrom RAPADILINO. Nové informace ohledně proteinu RECQ4 mohou být prvním krokem k porozumění příčinám těchto onemocnění na molekulární úrovni.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MERTZ, Tony; HARCY, Victoria a ROBERTS, Steven. Risks at the DNA Replication Fork: Effects upon Carcinogenesis and Tumor Heterogeneity. Online. *Genes*. 2017, roč. 8, č. 1. ISSN 2073-4425. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/genes8010046>. [cit. 2024-01-30].
- [2] AHERN, Kevin. *Biochemistry and Molecular Biology: How Life Works*. The Teaching Company, 2019. ISBN 9781629977706.
- [3] KOČÁREK, Eduard. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vyd. Praha: Scientia, 2008. ISBN 978-80-86960-36-4.
- [4] URRY, Lisa; CAIN, Michael; WASSERMAN, Steven; MINORSKY, Peter a REECE, Jane. *Campbell Biology*. 11th ed. Pearson, 2016. ISBN 978-0134093413.
- [5] ALBERTS, Bruce; BRAY, Dennis; HOPKIN, Karen; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Science, 2013. ISBN 978-0815345244.
- [6] DEWAR, James M. a WALTER, Johannes C. Mechanisms of DNA replication termination. Online. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2017, roč. 18, č. 8, s. 507-516. ISSN 1471-0072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.42>. [cit. 2024-01-31].
- [7] BRUCK, Irina; PEREZ-ARNAIZ, Patricia; COLBERT, Max K a KAPLAN, Daniel L. Insights into the Initiation of Eukaryotic DNA Replication. Online. *Nucleus*. 2016, roč. 6, č. 6, s. 449-454. ISSN 1949-1034. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1115938>. [cit. 2024-01-30].
- [8] DIFFLEY, John F.X. DNA replication: Building the perfect switch. Online. *Current Biology*. 2001, roč. 11, č. 9, s. R367-R370. ISSN 09609822. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00196-8). [cit. 2024-01-30].
- [9] AVES, Stephen J. DNA Replication Initiation. Online. In: VENGROVA, Sonya a DALGAARD, Jacob Z. (ed.). *DNA Replication. Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2009, s. 1-16. ISBN 978-1-60327-814-0. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-815-7_1. [cit. 2024-01-31].
- [10] KAPLAN, Daniel L. *The Initiation of DNA Replication in Eukaryotes*. Springer Cham, 2016. ISBN 978-3-319-24696-3.
- [11] ALBERTS, Bruce, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, David MORGAN, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER. *Molecular Biology of the Cell*. 6th ed. Garland Science, 2014. ISBN 978-0815345244.
- [12] O'DONNELL, M.; LANGSTON, L. a STILLMAN, B. Principles and Concepts of DNA Replication in Bacteria, Archaea, and Eukarya. Online. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013, roč. 5, č. 7, s. a010108-a010108. ISSN 1943-0264. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010108>. [cit. 2024-01-30].
- [13] MASAI, Hisao. *DNA Replication*. Springer Singapore, 2018. ISBN 978-981-10-6955-0.

- [14] SUN, Jingchuan; FERNANDEZ-CID, Alejandra; RIERA, Alberto; TOGNETTI, Silvia; YUAN, Zuanning et al. Structural and mechanistic insights into Mcm2–7 double-hexamer assembly and function. Online. *Genes & Development*. 2014, roč. 28, č. 20, s. 2291-2303. ISSN 0890-9369. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/gad.242313.114>. [cit. 2024-01-30].
- [15] TICAU, Simina; FRIEDMAN, Larry J; CHAMPASA, Kanokwan; CORRÊA, Ivan R; GELLES, Jeff et al. Mechanism and timing of Mcm2–7 ring closure during DNA replication origin licensing. Online. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2017, roč. 24, č. 3, s. 309-315. ISSN 1545-9993. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nsmb.3375>. [cit. 2024-01-30].
- [16] TICAU, Simina; FRIEDMAN, Larry J.; IVICA, Nikola A.; GELLES, Jeff a BELL, Stephen P. Single-Molecule Studies of Origin Licensing Reveal Mechanisms Ensuring Bidirectional Helicase Loading. Online. *Cell*. 2015, roč. 161, č. 3, s. 513-525. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.012>. [cit. 2024-01-30].
- [17] GE, Xin Quan; JACKSON, Dean A. a BLOW, J. Julian. Dormant origins licensed by excess Mcm2–7 are required for human cells to survive replicative stress. Online. *Genes & Development*. 2007, roč. 21, č. 24, s. 3331-3341. ISSN 0890-9369. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/gad.457807>. [cit. 2024-01-30].
- [18] TANAKA, S. a ARAKI, H. Helicase Activation and Establishment of Replication Forks at Chromosomal Origins of Replication. Online. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013, roč. 5, č. 12, s. a010371-a010371. ISSN 1943-0264. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010371>. [cit. 2024-01-30].
- [19] DE JESÚS-KIM, Lorraine; FRIEDMAN, Larry J; LŐÖKE, Marko; RAMSOOMAIR, Christian K; GELLES, Jeff et al. DDK regulates replication initiation by controlling the multiplicity of Cdc45-GINS binding to Mcm2-7. Online. *ELife*. 2021, roč. 10. ISSN 2050-084X. Dostupné z: <https://doi.org/10.7554/eLife.65471>. [cit. 2024-01-30].
- [20] SHIN, Gwangsung; JEONG, Dongsoo; KIM, Hyunsup; IM, Jun-Sub a LEE, Joon-Kyu. RecQL4 tethering on the pre-replicative complex induces unscheduled origin activation and replication stress in human cells. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2019, roč. 294, č. 44, s. 16255-16265. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009996>. [cit. 2024-01-30].
- [21] XU, Xiaohua; ROCHETTE, Patrick J; FEYISSA, Eminent A; SU, Tina V a LIU, Yilun. MCM10 mediates RECQ4 association with MCM2-7 helicase complex during DNA replication. Online. *The EMBO Journal*. 2009, roč. 28, č. 19, s. 3005-3014. ISSN 0261-4189. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.235>. [cit. 2024-01-30].
- [22] IM, Jun-Sub; PARK, Soon-Young; CHO, Won-Ho; BAE, Sung-Ho; HURWITZ, Jerard et al. RecQL4 is required for the association of Mcm10 and Ctf4 with replication origins in human cells. Online. *Cell Cycle*. 2015, roč. 14, č. 7, s. 1001-1009. ISSN 1538-4101. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1007001>. [cit. 2024-01-30].
- [23] IM, Jun-Sub; KI, Sang-Hee; FARINA, Andrea; JUNG, Dong-Soo; HURWITZ, Jerard et al. Assembly of the Cdc45-Mcm2–7-GINS complex in human cells requires the Ctf4/And-1, RecQL4, and Mcm10 proteins. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

2009, roč. 106, č. 37, s. 15628-15632. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0908039106>. [cit. 2024-01-30].

[24] KLISZCZAK, Maciej; SEDLACKOVA, Hana; PITCHAI, Ganesh P.; STREICHER, Werner W.; KREJCI, Lumir et al. Interaction of RECQ4 and MCM10 is important for efficient DNA replication origin firing in human cells. Online. *Oncotarget*. 2015, roč. 6, č. 38, s. 40464-40479. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6342>. [cit. 2024-01-30].

[25] THU, Yee Mon a BIELINSKY, Anja-Katrin. Enigmatic roles of Mcm10 in DNA replication. Online. *Trends in Biochemical Sciences*. 2013, roč. 38, č. 4, s. 184-194. ISSN 09680004. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.12.003>. [cit. 2024-01-30].

[26] DU, Wenyue; STAUFFER, Melissa E. a EICHMAN, Brandt F. Structural Biology of Replication Initiation Factor Mcm10. Online. In: MACNEILL, Stuart (ed.). *The Eukaryotic Replisome: a Guide to Protein Structure and Function*. Subcellular Biochemistry. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012, s. 197-216. ISBN 978-94-007-4571-1. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-94-007-4572-8_11. [cit. 2024-01-30].

[27] BAXLEY, Ryan a BIELINSKY, Anja-Katrin. Mcm10: A Dynamic Scaffold at Eukaryotic Replication Forks. Online. *Genes*. 2017, roč. 8, č. 2. ISSN 2073-4425. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/genes8020073>. [cit. 2024-01-30].

[28] THU, Yee Mon a BIELINSKY, Anja-Katrin. MCM10: One tool for all—Integrity, maintenance and damage control. Online. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014, roč. 30, s. 121-130. ISSN 10849521. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.017>. [cit. 2024-01-30].

[29] DI PERNA, Roberta; ARIA, Valentina; DE FALCO, Mariarosaria; SANNINO, Vincenzo; OKOROKOV, Andrei L. et al. The physical interaction of Mcm10 with Cdc45 modulates their DNA-binding properties. Online. *Biochemical Journal*. 2013, roč. 454, č. 2, s. 333-343. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/BJ20130059>. [cit. 2024-01-30].

[30] OKOROKOV, Andrei L.; WAUGH, Alastair; HODGKINSON, Julie; MURTHY, Andal; HONG, Hye Kyung et al. Hexameric ring structure of human MCM10 DNA replication factor. Online. *EMBO reports*. 2007, roč. 8, č. 10, s. 925-930. ISSN 1469-221X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401064>. [cit. 2024-01-30].

[31] CROTEAU, Deborah L.; POPURI, Venkateswarlu; OPRESKO, Patricia L. a BOHR, Vilhelm A. Human RecQ Helicases in DNA Repair, Recombination, and Replication. Online. *Annual Review of Biochemistry*. 2014, roč. 83, č. 1, s. 519-552. ISSN 0066-4154. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035428>. [cit. 2024-01-30].

[32] ABU-LIBDEH, Bassam; JHUJH, Satpal S.; DHAR, Srijita; SOMMERS, Joshua A.; DATTA, Arindam et al. RECON syndrome is a genome instability disorder caused by mutations in the DNA helicase RECQL1. Online. *Journal of Clinical Investigation*. 2022, roč. 132, č. 5. ISSN 1558-8238. Dostupné z: <https://doi.org/10.1172/JCI147301>. [cit. 2024-01-30].

- [33] LUONG, Thong T. a BERNSTEIN, Kara A. Role and Regulation of the RECQL4 Family during Genomic Integrity Maintenance. Online. *Genes*. 2021, roč. 12, č. 12. ISSN 2073-4425. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/genes12121919>. [cit. 2024-01-30].
- [34] BALAJEE, Adayabalam S. Human RecQL4 as a Novel Molecular Target for Cancer Therapy. Online. *Cytogenetic and Genome Research*. 2021, roč. 161, č. 6-7, s. 305-327. ISSN 1424-8581. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000516568>. [cit. 2024-01-30].
- [35] XU, Xiaohua; CHANG, Chou-Wei; LI, Min; LIU, Chao a LIU, Yilun. Molecular Mechanisms of the RECQ4 Pathogenic Mutations. Online. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021, roč. 8. ISSN 2296-889X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.791194>. [cit. 2024-01-31].
- [36] MANN, M. B. Defective sister-chromatid cohesion, aneuploidy and cancer predisposition in a mouse model of type II Rothmund-Thomson syndrome. Online. *Human Molecular Genetics*. 2005, roč. 14, č. 6, s. 813-825. ISSN 0964-6906. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi075>. [cit. 2024-01-31].
- [37] SEDLACKOVA, Hana; CECHOVA, Barbora; MLCOUSKOVA, Jarmila a KREJCI, Lumir. RECQ4 selectively recognizes Holliday junctions. Online. *DNA Repair*. 2015, roč. 30, s. 80-89. ISSN 15687864. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.02.020>. [cit. 2024-01-31].
- [38] KELLER, Heidi; KIOSZE, Kristin; SACHSENWEGER, Juliane; HAUMANN, Sebastian; OHLENSCHLÄGER, Oliver et al. The intrinsically disordered amino-terminal region of human RecQL4: multiple DNA-binding domains confer annealing, strand exchange and G4 DNA binding. Online. *Nucleic Acids Research*. 2014, roč. 42, č. 20, s. 12614-12627. ISSN 1362-4962. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/nar/gku993>. [cit. 2024-01-31].
- [39] MARINO, Francesca; MOJUMDAR, Aditya; ZUCHELLI, Chiara; BHARDWAJ, Amit; BURATTI, Emanuele et al. Structural and biochemical characterization of an RNA/DNA binding motif in the N-terminal domain of RecQ4 helicases. Online. *Scientific Reports*. 2016, roč. 6, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/srep21501>. [cit. 2024-01-31].
- [40] XU, Xiaohua a LIU, Yilun. Dual DNA unwinding activities of the Rothmund–Thomson syndrome protein, RECQ4. Online. *The EMBO Journal*. 2009, roč. 28, č. 5, s. 568-577. ISSN 0261-4189. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.13>. [cit. 2024-01-31].
- [41] HER, Joonyoung a BUNTING, Samuel F. How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2018, roč. 293, č. 27, s. 10502-10511. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000371>. [cit. 2024-01-31].
- [42] GHOSH, Avik K.; ROSSI, Marie L.; SINGH, Dharmendra Kumar; DUNN, Christopher; RAMAMOORTHY, Mahesh et al. RECQL4, the Protein Mutated in Rothmund-Thomson Syndrome, Functions in Telomere Maintenance. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, roč. 287, č. 1, s. 196-209. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.295063>. [cit. 2024-01-31].

- [43] WANG, Lisa L a PLON, Sharon E. Rothmund-Thomson Syndrome. Online. National Library of Medicine. 1999, last revision: June 4, 2020. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1237/>. [cit. 2024-01-31].
- [44] LARIZZA, Lidia; ROVERSI, Gaia a VOLPI, Ludovica. Rothmund-Thomson syndrome. Online. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2010, roč. 5, č. 1. ISSN 1750-1172. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-2>. [cit. 2024-01-31].
- [45] ZIRN, B.; BERNBECK, U.; ALT, K.; OEFFNER, F.; GERHARDINGER, A. et al. Rothmund-Thomson syndrome type 1 caused by biallelic ANAPC1 gene mutations. Online. Skin Health and Disease. 2021, roč. 1, č. 1. ISSN 2690-442X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ski2.12>. [cit. 2024-01-31].
- [46] VAN MALDERGEM, Lionel; PIARD, Juliette; LARIZZA, Lidia a WANG, Lisa L. Baller-Gerold Syndrome. Online. National Library of Medicine. 2007, last update: April 19, 2018. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1204/>. [cit. 2024-01-31].
- [47] VARGAS, Fernando Regla; DE ALMEIDA, José Carlos Cabral; LLERENA, Juan Clinton a REIS, Dimas Fagundes. Rapadilino syndrome. Online. American Journal of Medical Genetics. 1992, roč. 44, č. 6, s. 716-719. ISSN 0148-7299. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320440604>. [cit. 2024-01-31].
- [48] SIITONEN, H Annika; SOTKASIIRA, Jenni; BIERVLIET, Martine; BENMANSOUR, Abdelmadjid; CAPRI, Yline et al. The mutation spectrum in RECQL4 diseases. Online. European Journal of Human Genetics. 2009, roč. 17, č. 2, s. 151-158. ISSN 1018-4813. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.154>. [cit. 2024-01-31].
- [49] BOEYNAEMS, Steven; ALBERTI, Simon; FAWZI, Nicolas L.; MITTAG, Tanja; POLYMENIDOU, Magdalini et al. Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology. Online. Trends in Cell Biology. 2018, roč. 28, č. 6, s. 420-435. ISSN 09628924. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.004>. [cit. 2024-01-31].
- [50] PARKER, Matthew W; BELL, Maren; MIR, Mustafa; KAO, Jonchee A; DARZACQ, Xavier et al. A new class of disordered elements controls DNA replication through initiator self-assembly. Online. ELife. 2019, roč. 8. ISSN 2050-084X. Dostupné z: <https://doi.org/10.7554/eLife.48562>. [cit. 2024-01-31].
- [51] PAPAGEORGIU, Anna C.; POSPISILOVA, Michaela; CIBULKA, Jakub; ASHRAF, Raghif; WAUDBY, Christopher A. et al. Recognition and coacervation of G-quadruplexes by a multifunctional disordered region in RECQ4 helicase. Online. Nature Communications. 2023, roč. 14, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42503-z>. [cit. 2024-01-31].
- [52] HARDENBERG, Maarten; HORVATH, Attila; AMBRUS, Viktor; FUXREITER, Monika a VENDRUSCOLO, Michele. Widespread occurrence of the droplet state of proteins in the human proteome. Online. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020, roč. 117, č. 52, s. 33254-33262. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.2007670117>. [cit. 2024-01-31].
- [53] PROROK, Paulina; ARTUFEL, Marie; AZE, Antoine; COULOMBE, Philippe; PEIFFER, Isabelle et al. Involvement of G-quadruplex regions in mammalian replication

origin activity. Online. Nature Communications. 2019, roč. 10, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11104-0>. [cit. 2024-01-31].

[54] CHEN, Yu-Hung; KEEGAN, Sarah; KAHLI, Malik; TONZI, Peter; FENYÖ, David et al. Transcription shapes DNA replication initiation and termination in human cells. Online. Nature Structural & Molecular Biology. 2019, roč. 26, č. 1, s. 67-77. ISSN 1545-9993. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0171-0>. [cit. 2024-01-31].

[55] TANAKA, Seiji; UMEMORI, Toshiko; HIRAI, Kazuyuki; MURAMATSU, Sachiko; KAMIMURA, Yoichiro et al. CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. Online. Nature. 2007, roč. 445, č. 7125, s. 328-332. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nature05465>. [cit. 2024-02-08].

9 SEZNAM ZKRATEK

ANAPC1 – podjednotka 1 komplexu podporujícího anafázi (z angl. anaphase-promoting complex subunit 1)

APS – peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)

ATP – adenosintrifosfát

BGS – Baller-Geroldův syndrom

BLM – Bloomova helikáza

BSA – hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)

CBB HS – lyzační pufr s vysokou koncentrací soli (z angl. cell breaking buffer high salt)

CDC45 – protein cyklu buněčného dělení 45 (z angl. cell division cycle 45)

Cdc6 – protein cyklu buněčného dělení 6 (z angl. cell division cycle 6)

CDK – cyklin-dependentní kináza

Cdt1 – chromatin licencující DNA replikační factor 1 (z angl. chromatin licensing and DNA replication factor 1)

CMG – CDC45-MCM2-7-GINS komplex

CTD – C-terminální doména

DDK – Dbf4-dependentní kináza

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxyribonukleotid trifosfát (z angl. deoxyribonucleotide triphosphate)

DSB – dvouřetězcový zlom (z angl. double-strand break)

dsDNA – dvouřetězcové vlákno (z angl. double-strand DNA)

DTT – dithiotreitol

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – kyselina ethyléndiamintetraoctová

EMSA – gelová retardační esej (z angl. electrophoretic mobility shift assay)

FBS – Fetální hovězí sérum (z angl. fetal bovine serum)

FITC – Fluorescein isothiokyanát

FL – celý protein (z angl. full-length)

G4 – guaninové kvadrupelexy

GINS – komplex pojmenovaný podle prvních písmen japonských čísel 5-1-2-3 (z japonštiny go-ichi-ni-san)

GST – glutathion-S-transferáza

GTH – glutathion

HR – homologní rekombinace

IPTG – izopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid

kDa – kilo Dalton

KU70 – ATP-dependenční helikáza 2 podjednotka 1

LB – Luria–Bertani médium

LLPS – kapalinová fázová separace (z angl. liquid-liquid phase separation)

MBP – maltózu vázající protein (angl. maltose binding protein)

MCM10 – minichromozomový udržovací protein 10 (z angl. minichromosome maintenance 10 replication initiation factor)

MCM2-7 – minichromozomový udržovací komplex 2-7 (z angl. minichromosome maintenance complex 2-7)

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

NHEJ – nehomologní spojování konců (z angl. nonhomologous end-joining)

NP40 – Nonidet P40 (substitute)

OB – (z angl. oligonucleotide/oligosaccharide-binding)

OD₆₀₀ – optická hustota měřená při vlnové délce 600 nm (z angl. optical density)

ORC – komplex rozpoznávání počátků replikace (z angl. origin recognition complex)

p53 – protein 53 (z angl. tumor protein p53)

PCR – polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)

pDNA – plazmidová DNA

PEG – polyethylenglykol

PK – proteináza K

Pre-IC – pre-iniciační komplex

Pre-RC – pre-replikační komplex

RECON – syndrom asociovaný s RECQ1

RNA – ribonukleová kyselina

RPM – otáček za minutu (z angl. revolutions per minute)

RT – pokojová teplota (z angl. room temperature)

RTS – Rothmund-Thomsonův syndrom

SDS – dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecylsulfate)

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

Sld2 – synteticky letální s Dpb11-1 (z angl. synthetically lethal with Dpb11-1)

SSB protein – jednořetězcový vazbený protein (z angl. single-strand binding protein)

ssDNA – jednořetězcové vlákno DNA

TAE – Tris-Acetát-EDTA

TBE – Tris-Borát-EDTA

TEMED – tetramethylethylendiamin

TopBP1 – protein vázající DNA topoisomerázu II (z angl. DNA topoisomerase II binding protein 1)

Treslin – interakční protein TopBP1 (z angl. TopBP1-interacting protein)

WRN – Wernerova helikáza

ZnF – zinkový prst (z angli. zinc finger)

ZnR – zinková stuha (z angl. zinc ribbon)

10 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1: Model semikonzervativní replikace DNA.	9
Obr. 2: Proteiny zapojené do replikace DNA v bakteriích.....	10
Obr. 3: Iniciace replikace DNA u bakterií a eukaryot.....	11
Obr. 4: Licencování počátků replikace DNA	12
Obr. 5: Model aktivace helikázy.	13
Obr. 6: Strukturní domény proteinu MCM10.....	14
Obr. 7: Prstencová struktura hexameru MCM10	15
Obr. 8: Protein RECQ4.....	16
Obr. 9: Role RECQ4 v údržbě genomu	17
Obr. 10: Vennův diagram znázorňující překrývající se symptomy onemocnění asociovaných s mutacemi v RECQ4.....	19
Obr. 11: Schéma purifikace proteinů z bakterií.....	34
Obr. 12: Expres a purifikace MCM10 FL z bakterií.....	36
Obr. 13: Expres a purifikace MCM10 FL z hmyzích buněk.....	37
Obr. 14: Schéma použitých verzí proteinů MCM10 a RECQ4.....	38
Obr. 15: Interakce mezi RECQ4 a MCM10	39
Obr. 16: Schématické znázornění DNA-vazebných domén RECQ4	40
Obr. 17: Vliv interakce na DNA vazbu proteinu RECQ4.	41
Obr. 18: Pravděpodobnost spontánní fázové separace (P_{LLPS}) proteinů RECQ4 a MCM10... ..	42
Obr. 19: Mikroskopická analýza fázové separace proteinů RECQ4 a MCM10	43
Obr. 20: Fázová separace RECQ4-MCM10 v přítomnosti DNA.....	45
Tab. 1: Proteiny zapojené do replikace DNA v bakteriích.....	10
Tab. 2: Chemikálie a enzymy	21
Tab. 3: Pufry a roztoky	23
Tab. 4: Média.....	24
Tab. 5: Oligonukleotidy.....	26
Tab. 6: Obsah PCR k amplifikaci MCM10	28
Tab. 7: Průběh PCR při amplifikaci genu MCM10.....	28
Tab. 8: Obsah koloniové PCR	30
Tab. 9: Průběh koloniové PCR.....	30
Tab. 10: Podmínky exprese proteinů v bakteriích.....	32