creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

교육학석사 학위논문

RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 특성 연구

Characterization of RecQL4 recruitment on DNA damage site

2021년 2월

서울대학교 대학원

과학교육과 생물전공

김 경 민

RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 특성

Characterization of RecQL4 DNA damage site recruitment

지도교수 이 준 규

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함
2020년 12월

서울대학교 대학원
과학교육과 생물전공
김 경 민

김경민의 석사 학위논문을 인준함
2021년 1월

위 원 장 김 재 근 (인)
부위원장 전 상 학 (인)
위 원 이 준 규 (인)

국문초록

RecQ Helicase에 속하는 RecQL4는 유전체 안정성 유지에 중요하며, RecQL4의 돌연변이는 상염색체 열성 질환인 Rothmund-Thomson syndrome(RTS)의 원인이다. 많은 연구를 통해 DNA 손상 수선 반응에서 RecQL4가 중요하다는 것이 알려졌지만, RecQL4의 DNA 손상 부위에서의 역할과 작용 기전은 밝혀지지 않았다. DNA 손상 부위에서 RecQL4의 작용 기전을 밝히기 위해서는 RecQL4가 DNA 손상 부위에 결합하는 특성을 이해할 필요가 있다. 따라서 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 특성을 확인하여 RecQL4의 작용 기전 연구를 위한 정보를 제공하고자 하였다.

이에, 본 연구에서는 EGFP가 융합된 다양한 길이의 RecQL4 변이 단백질을 발현하는 플라스미드를 제작하였고, 이를 세포에 주입하여 EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질을 발현시켰다. 레이저 미세 조사를 통해 세포에 DNA 손상을 유발하고, EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질이 DNA 손상 부위에 결합하는 양상을 분석하여 DNA 손상 부위 결합에 중요한 도메인을 탐색하였다. 또한 DNA 손상 수선 초기 반응에서 중요한 효소인 ATM, DNA-PK, PARP의 억제제를 처리한 후, EGFP 융합 RecQL4가 DNA 손상 부위에 결합하는 양상을 확인하여 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 영향을 미치는 중요 효소 활성을 확인하였다. 연구 결과 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합은 PARP 활성 의존적으로, RecQL4가 DNA 손상 부위에 결합하는데 폴리 ADP 라이보스(PAR)의 합성이 필요함을 확인하였다. 또한 RecQL4의 아미노산 360-437의 부분만으로도 PARP 활성 의존적으로 DNA 손상 부위에 결합이 가능하였다. 나아가 PARG 억제제를 처리하여 폴리 ADP 라이보스(PAR)가 제거되지 않은 상황에서 EGFP 융합 RecQL4가 손상 부위에서 해리되지 않음을 확인하여 RecQL4의 DNA 손상 부위로부터의 해리에 폴리 ADP-라이보스(PAR) 의 제거가 중요함을 밝혀냈다.

주요어 : RecQL4, DNA 손상, DNA 수선, DNA 손상 부위 결합
학 번 : 2019-28744

목 차

제 1 장 서론 ····· 1
제 1 절 이론적 배경 ····· 1
제 2 절 연구의 필요성 및 목적 ····· 5

제 2 장 연구 방법 ····· 6
제 1 절 세포 배양 ····· 6
제 2 절 플라스미드 준비 ····· 7
제 3 절 플라스미드 및 siRNA 형질주입 ····· 7
제 4 절 레이저 미세 조사 ····· 7
제 5 절 면역 형광 염색법 ····· 10
제 6 절 웨스턴 블롯 ····· 10
제 7 절 억제제 및 항체 ····· 11

제 3 장 연구 결과 ····· 12
제 1 절 레이저 미세 조사를 통한 DNA 손상 조건 탐색 ····· 12
제 2 절 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 양상 ····· 16
제 3 절 DNA 손상 수선에 관여하는 효소의 활성이 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 미치는 영향 ····· 19
제 4 절 Helicase 활성이 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 미치는 영향 ····· 22
제 5 절 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 도메인 탐색 ····· 26
제 6 절 PARP 억제제가 DNA 손상 부위 결합 도메인에 미치는 영향 ····· 31

제 7 절 PARG 억제제가 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 미치는 영향 33

제 4 장 논의 36

참고문헌 39

Abstract 47

표 목 차

[표 1] 사용한 억제제 ····· 11
[표 2] 사용한 1차 항체 ····· 11
[표 3] 사용한 2차 항체 ····· 11

그 림 목 차

[그림 1] 레이저 미세 조사를 통한 DNA 손상 부위 결합 특성 분석 ····· 9
[그림 2] 레이저 미세 조사를 통한 DNA 손상 조건 탐색 ·· 14
[그림 3] EGFP-RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 양상 ··· 17
[그림 4] EGFP-Mre11의 DNA 손상 부위 결합 양상 ····· 18
[그림 5] 억제제 처리에 따른 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 양상 ····· 21
[그림 6] EGFP 융합 RecQL4 야생형과 돌연변이형의 모식도 ····· 23
[그림 7] RecQL4 돌연변이형의 DNA 손상 부위 결합 양상 ····· 24
[그림 8] RecQL4 발현이 억제된 세포에서 RecQL4 돌연변이형의 DNA 손상 부위 결합 양상 ····· 25
[그림 9] DNA 손상 부위 결합 도메인 탐색을 위해 제작된 EGFP 융합 RecQL4 변이형의 모식도 ····· 27
[그림 10] 제작된 EGFP 융합 RecQL4 변이형 Western blot 결과 ····· 28

[그림 11] EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질의 DNA 손상 부위 결합 유무 ····· 29
[그림 12] EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질의 DNA 손상 부위 결합 양상 ····· 30
[그림 13] PARP 억제제 처리에 따른 DNA 손상 부위 결합 도메인의 DNA 손상 부위 결합 양상 ····· 32
[그림 14] PARG 억제제 처리에 따른 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 양상 ····· 34
[그림 15] PARG 억제제 처리에 따른 DNA 손상 부위 결합 도메인의 DNA 손상 부위 결합 양상 ····· 35

제 1 장 서론

제 1 절 이론적 배경

RecQL4는 포유류 세포에 존재하는 5가지 RecQ Helicase(RecQL1, BLM, WRN, RecQL4, RecQL5) 중 하나로, 1208개의 아미노산으로 구성된 단백질(133 kDa)이다(Kitao et al., 1998). RecQ Helicase는 DNA 복제, 재조합, 수선 과정 등에서 작용하여 유전체 안정성을 유지시키는데 필수적인 DNA 풀림 효소군이다. RecQ Helicase들은 손상된 DNA 복제 분기점, 텔로미어 유지, 염기 절제 수선, 상동 재조합, DNA 손상 신호전달 등 다양한 세포 반응에 관여한다(Croteau et al., 2014; Keijzer et al., 2014; Larsen et al., 2013).

5가지 RecQ Helicase들은 Helicase 도메인이라는 공통점을 가지고 있지만 각 효소에 따라 고유하고 추가적인 도메인들을 가지고 있다. RecQL4는 RecQ Helicase의 공통적인 특징인 Helicase 도메인이 가운데 영역에 존재하지만, 다른 RecQ Helicase에서 진화적으로 보존되고 있으며 Helicase 활성이 필수적인 RecQ-C-terminal(RQC) 도메인과 BLM과 WRN에 존재하는 Helicase and RNase D-like C-terminal(HRDC) 도메인을 가지고 있지 않다(Larsen et al., 2013). 이러한 RecQL4의 구조적인 차이는 RecQL4가 Helicase 활성을 가지고 있지 않다는 초기의 연구들(Yin et al., 2004; Macris et al., 2006)을 지지하는 것처럼 보였지만, 최근의 연구들(Capp et al., 2009; Suzuki et al., 2009; Rossi et al., 2010)은 *in vitro*에서 RecQL4가 Helicase 활성이 존재함을 확인하였고, 발달된 생물정보학(Bioinfomatics) 분석을 통해 RecQL4도 다른 Helicase들이 가지고 있는 RQC 도메인의 기능을 수행할 수 있는 도메인을 가지고 있을 가능성이 제안되었다(Marino et al., 2013). 단백질 구조 분석과 컴퓨터 모델링을 활용한 최근 연구에서는 RecQL4의 C-말단 영역에 구조적으로는 차이가 있지만 RQC 도메인의 특징인 WH(winged helix) 도메인과

Zn^{2+} 결합 도메인의 기능을 수행할 수 있는 R4ZBD(RecQL4 Zn^{2+} bingding domain)기 존재한다는 것을 밝혀냈다(Mojumdar et al., 2016; Kaiser et al., 2017). RecQL4의 N-말단에는 효모에서 DNA 복제 인자인 Sld2와 상동인 Sld homology 도메인을 가지고 있어, DNA 복제 과정에서 RecQL4의 필요성을 설명해준다(Sangrithi et al., 2005; Marino et al., 2013). RecQL4의 또다른 특징으로는 ATPase 활성과 단일 가닥 annealing 활성을 가지고 있으며(Yin et al., 2004; Macris et al., 2006), 2개의 핵 신호서열을 가지고 있다(Burks et al., 2007).

RecQL4의 결함은 조기 노화, 발암과 관련되어 있다(Lu et al., 2017; Croteau et al., 2012). 사람에서 RecQL4의 돌연변이는 3가지 상염색체 열성 유전 질병인 Rothmund‐Thomson Syndrome(RTS), RAPADILINO Syndrome 그리고 Baller‐Gerold Syndrome의 원인이 된다(Croteau et al., 2012). 이 질병들은 골격 이상, 성장 지연을 동반하며 RTS와 RAPADILINO의 경우 골육종과 같은 암 발생이 증가한다고 알려져 있다(Siitonen et al., 2009). RecQL4가 결핍된 RTS 쥐 모델에서 DNA 손상 축적으로 인해 증가된 세포 노화가 관찰되었다(Lu et al., 2014). 많은 연구들에서 RecQL4는 DNA 복제, 텔로미어와 미토콘드리아 DNA 유지, DNA 손상 수선 반응 등 세포내에서 다양한 역할을 수행한다는 것을 입증하였다(Sangrithi et al., 2005; Fang et al., 2018; Shin et al., 2019, Croteau et al., 2012; Kumari et al., 2016; De et al., 2012). 이 외에도 RecQL4는 DNA 이중 가닥 손상 수선 반응에 있어 중요한 역할을 한다(Abe et al., 2011; Lu et al., 2016).

DNA 이중 가닥 손상(DNA double strand breaks, DSBs)은 외부적인 스트레스, 세포 내 복제 과정과 재조합 과정에서 발생될 수 있다. 발생된 DSBs가 적절하게 복구되지 않는다면 유전체 불안전성이 증가하고, 염색체 재배열, 나아가 세포 사멸을 일으키게 된다(Symington, 2014). DSBs는 일반적으로 비상동말단결합(Non-homologous end joining, NHEJ)과 상동재조합(Homologous recombination, HR)과 의 2가지 복구 경로에 의해 수선된다(Aparicio et al., 2014).

NHEJ는 DSBs를 재결합시키는 주요 과정으로 세포 주기 전체에서 일어난다. NHEJ는 DNA 손상 부위에 결합한 Ku70/80 복합체가 DNA-protein kinase catalytic subunit(DNA-PKcs)를 활성화 시키고, 연쇄 반응 후에 활성화된 XRCC4-ligase의 작용에 의해 직접 수선되는 반응으로 이 과정에서 비특이적으로 말단을 결합시켜 본래의 염기 서열 변화로 인해 오류가 발생할 가능성이 있다(Lieber, 2010; Neal and Meek, 2011; Kass and Jasin, 2011; Mazon et al., 2010). 반면에 HR은 손상받지 않은 자매 염색 분체를 주형 가닥으로 사용하여 수선이 일어나므로 오류가 발생하지 않지만, 자매 염색 분체가 있는 S 및 G_2기에만 일어난다(Helleday, 2003). HR에서는 DSBs가 발생되면, Mre11-Rad50-NBS1 (MRN) 복합체가 손상 부위를 인식하여 결합하고, 인산화효소인 ATM을 활성화시켜 H2AX의 Ser-139(γH2AX) 인산화를 포함한 연쇄 반응이 활성화 된다(Berkovich et al., 2007; Falck et al., 2005). MRN 복합체와 CtIP 매개 핵산분해효소 활성에 의해 손상 부위에서 절제가 시작되고, EXO1 또는 DNA2와 같은 핵산분해효소에 의해 최종적으로 단일 가닥 DNA(ssDNA)가 생성된다(Cejka et al., 2010; Gravel et al., 2008; Mimitou and Symington, 2008; Nimonkar et al., 2011; Nimonkar et al., 2008; Niu et al., 2010; Zhu et al., 2008). 생성된 ssDNA에 RPA가 결합하고 재조합 단백질인 RAD51이 RPA를 대체 후 주형 가닥으로의 침투를 촉진하여 손상 부위의 수선이 일어나게 한다(Suwaki et al.2011). NHEJ와 HR 수선 경로 모두에 RecQL4가 관련이 있다는 보고들이 있다(Lu et al., 2017).

DNA 손상 반응에서 손상 부위를 감지, 신호 전달, 단백질 상호작용 변화 등 여러 과정에서 단백질들에게 인산화, 유비퀴틴화, 폴리 ADP 라이보실화 같은 번역 후 수정 과정이 일어난다(Harper, 2007; Wei et al., 2016). 그 중 폴리 ADP 라이보실화는 DNA 수선 과정 등 다양한 세포 반응 경로를 통해 유전체 안정성을 유지하는 과정이다(Burkle, 2005; Kraus, 2015). 폴리 ADP 라이보실화는 DNA 수선, 전사 조절, RNA 간섭, 미토콘드리아 기능, 세포 분열, 세포 반응에서 다양하게 이용된다

(Gibson and Kraus, 2012).

여러 연구들이 폴리 ADP 라이보실화가 DNA 손상반응에서 중요한 반응을 한다는 것을 입증하였다(Hassa and Hottiger, 2008; Schreiber et al., 2006). 폴리 ADP 라이보스는 ADP 라이보스의 중합으로 형성되며 폴리 ADP 라이보스 중합효소(Poly(ADP-ribose) polymerase, PARPs)에 의해 공유 결합으로 단백질에 첨가된다(Burkle, 2005). PARPs는 ADP 라이보스를 첨가하여 기질을 폴리 ADP 라이보실화 시키는 중합효소들로, DNA 손상 반응에 관여하는 대표적인 PARP는 Poly(ADP-ribose) polymerase-1(PARP-1)이다. DNA 손상 초기에 PARP-1은 이합체를 형성하여 DNA 손상 부위에 결합하며 자가 폴리 ADP 라이보실화 및 히스톤과 같은 다른 단백질을 폴리 ADP 라이보실화 시킨 후, 폴리 ADP 라이보스와 비공유적으로 결합할 수 있는 여러 DNA 손상 반응 단백질들을 손상 부위로 모이게 하는데 관여한다(Leung et al., 2014; Bai et al., 2015). DNA 손상 후, DNA 손상 회복 반응에 관여하는 많은 단백질이 폴리 ADP 라이보스를 인지하거나, 폴리 AD 라이보실화에 의해 손상 부위로 모집된다(Teloni et al., 2016).

폴리 ADP 라이보스는 DNA 손상이 발생하면 관련 단백질에 일시적으로 첨가되었다가 poly(ADP-ribose) glycohydolase(PARG)와 같은 폴리 ADP 라이보실 분해 효소에 의해 빠르게 분해된다(Barkauskaite et al., 2015). PARG도 PARP와 같이 DNA 이중 가닥 손상과 DNA 단일 가닥 손상 수선을 용이하게 하며, DNA 손상 반응에서 빠른 폴리 ADP 라이보스의 합성과 분해가 중요하다(Feng et al., 2013; Mortusewicz et al., 2011). PARP-1은 RecQL4와 상호작용하는 단백질로 *in vitro*에서 RecQL4의 C-말단 부분과 상호작용한다는 연구 결과가 있다(Woo et al., 2006). 다른 연구(Kohzaki et al., 2012)에서도 RecQL4의 C-말단이 γ-irradiation에 대한 반응에서 중요함을 밝혀 PARP-1과의 상호작용이 DNA damage 상황에서 중요하게 작용할 것으로 생각되지만 구체적인 기작은 알려지지 않았다.

제 2 절 연구의 필요성 및 목적

RecQL4는 DNA 복제, 텔로미어와 미토콘드리아 DNA 유지 등 세포내에서 다양한 역할을 수행한다(Sangrithi et al., 2005; Fang et al., 2018; Shin et al., 2019, Croteau et al., 2012; Kumari et al., 2016; De et al., 2012). 최근 RecQL4의 다양한 역할 중 DNA 이중 가닥 손상 수선 반응에서도 RecQL4의 중요성을 밝히는 연구들(Singh et al., 2010; Abe et al., 2011; Lu et al., 2016; Duan et al., 2020)이 증가하고 있다. Singh 등(2010)은 RecQL4가 결핍된 세포에서 γ-irradiation을 조사하였을 때, 이중 가닥 손상 시 관찰되는 γH2AX와 53BP1의 foci가 RecQL4가 정상적으로 발현되는 세포보다 증가함을 확인하였고, Lu 등(2016)은 RecQL4의 결핍된 세포에서 이중 가닥 손상 수선 과정인 상동 재조합(HR)과 이 과정에서 중요 단계인 5′ 말단의 절제가 감소한 것을 확인하였다.

이처럼 여러 연구에서 DNA 이중 가닥 손상 수선 반응에서 RecQL4의 중요성을 확인하였지만, RecQL4가 DNA 손상 부위에 결합해서 수행하는 역할과 작용 기전은 밝혀지지 않았다. DNA 손상 부위에서 RecQL4의 작용 기전을 밝히기 위해서는 RecQL4가 DNA 손상 부위에 결합되는 특성을 이해할 필요가 있다. DNA 손상 부위 결합 특성을 이해한다면, RecQL4에 영향을 주는 효소 활성, DNA 손상 부위 결합에 중요하게 작용하는 RecQL4의 영역과 그 영역의 특성, DNA 손상 부위에서 상호작용하는 후보 단백질의 탐색과 관련한 정보를 제공함으로써 DNA 손상 수선 반응에서 RecQL4의 작용 기전을 밝혀내기 위한 연구 방향을 제안할 수 있을 것이다.

이에, 본 연구에서는 레이저 미세 조사를 통해 DNA 이중 가닥 손상을 유발하였고, 녹색형광단백질(EGFP)이 융합된 다양한 길이의 RecQL4 변이 단백질을 활용하여 DNA 손상 부위 결합에 중요한 영역을 탐색하였다. 또한 DNA 이중 가닥 손상 반응에 중요한 효소들의 억제제를 처리하여 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 영향을 미치는 중요 효소 활성을 확인하였다.

제 2 장 연구 방법

제 1 절 세포 배양

본 연구에서 사용한 세포는 인간 골육종 세포(Human Osteosarcoma, U2OS)이다. U2OS 세포는 10% fetal bovine sereum(FBS; Welgene, Korea)와 항생제(Welgene, Korea)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Welgene, Korea)에서 배양 하였다. 세포는 5% 이산화탄소 농도와 37 ℃가 유지되는 세포배양기에서 배양하였다(Shin et al., 2019).

제 2 절 플라스미드 준비

RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 중요한 영역을 찾기 위해 EGFP가 결합된 변형 RecQL4를 발현하는 플라스미드를 제작하였다. 야생형 RecQL4 cDNA(아미노산 잔기 1-1208)의 N-말단 영역(CD1 1-247, CD2 1-492, CD3 1-835), C-말단 영역(ND1 820-1208, ND2 437-1208, ND3 241-1208), 중간 영역(241-437, 241-492, 224-437, 224-492, 360-437, 360-492)을 중합효소연쇄반응(PCR)으로 증폭하였고, 이를 연구실에서 제작된 EGFP-2HA-NLS-pcDNA3.1(-) 벡터에 삽입하였다.

EGFP-RecQL4, EGFP-RecQL4 WA mutant, EGFP-RecQL4 WB mutant, EGFP-RecQL4 helicase truncated mutant 발현을 위해 본 연구실에서 기존에 제작되어 있는 플라스미드를 사용하였다. EGFP-Mre11은 아주대학교 지재훈교수 연구실에서 제작한 플라스미드를 사용하였다.

제 3 절 플라스미드 및 siRNA 형질주입

플라스미드를 형질주입하기 전, U2OS 세포를 배양 접시 중앙에 얇은 유리가 부착되어있는 Confocal용 접시 101350(SPL, Korea)에서 배양하였다. 24시간 후 Lipofectamin 3000(ThermoFisher Scientific, USA)를 사용하여 플라스미드를 형질주입 하였다. 사용법에 따라 시료당 2개의 튜브를 준비하고 튜브 각각에 125 uL의 Serum free DMEM을 넣었다. 하나의 튜브에는 형질주입시킬 DNA와 Plus 3000 TM reagent를 넣고, 다른 튜브에는 Lipofectamin TM 3000 reagent 3.75 uL을 넣었다. 그 후 각 튜브를 잘 섞은 후 하나의 튜브로 합치고 상온에서 15분 동안 반응하였다. 반응 용액을 세포에 균등하게 떨어뜨리고 24시간 동안 세포 배양기에서 배양 후 실험을 진행하였다.

siRNA는 Neon transfection system(MPK5000, ThermoFisher Scientific, USA)을 활용한 전기천공법으로 세포 내로 주입되었다. 본 연구에서 모든 siRNA는 Bioneer(Daejeon, Korea)에 주문하여 화학적으로 합성하였고, 사용된 siRNA의 sense strand의 서열은 다음과 같다.

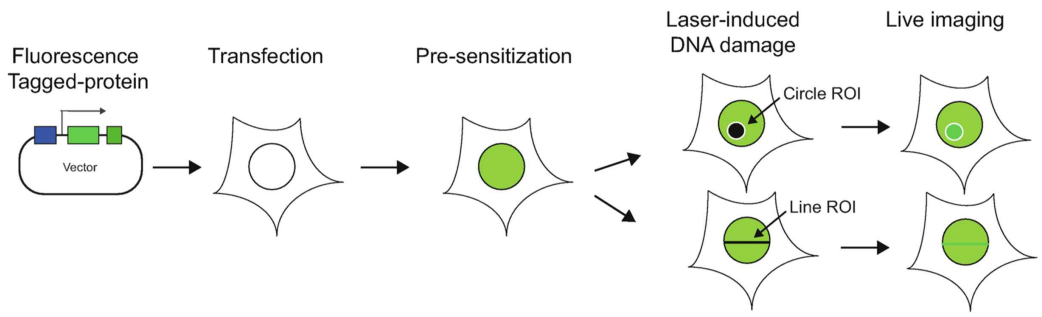
GL-2, 5´-AACGUACGCGGAAUACUUCGA-3´

RecQL4, 5´-GACUGAGGACCUGGGCAAA-3´

제 4 절 레이저 미세 조사

U2OS 세포는 배양 접시 중앙에 얇은 유리가 부착되어있는 Confocal용 접시 101350(SPL, Korea)에서 배양되었다. Micro-irradation을 조사하기 10분 전에 Hoechst 33342(ThermoFisher Scientific, Korea)를 5 ㎍/㎖가 되도록 처리하였다. 레이저 미세 조사 실험은 37 ℃와 5% CO_2가 유지되는 챔버가 장착된 레이저 공초점 현미경 시스템(LSM880, Zeiss, Germany)을 사용하였다. DNA 손상 유발을 위해 405 nm 파장의 레이저를 20% 출력으로 5번 반복(3 iteration)하여 원하는 영역에 조사하였다. 레이저 조사 후 10초 간격으로 세포를 촬영하였고, ZEN 2.3 SP1(black

edition) software(Zeiss, Germany)를 사용하여 ROI(Region of Interest)의 형광 강도를 측정하였다[그림1]. 레이저를 조사한 ROI의 형광 강도와 레이저를 조사하지 않은 두 영역의 형광 광도 평균값의 변화 비를 계산하여 시간에 따른 EGFP 융합 단백질의 DNA 손상 부위 결합 양상을 그래프로 분석하였다.



[그림 1] 레이저 미세 조사를 통한 DNA 손상 부위 결합 특성 분석 (Kim et al., 2019)

형광물질 융합 단백질을 발현하는 플리스미드를 세포에 형질주입을 시킨다. BrdU 또는 Hoechst 처리를 통해 DNA 손상에 대한 사전 민감화(Pre-sensitization) 시킨 후, 선(Line) 또는 원(Circle) 모양의 원하는 영역(ROI)에 레이저를 조사한다. 시간에 따라 사진 촬영 및 ROI의 형광 강도를 측정한다.

제 5 절 면역 형광 염색법

공초점 현미경용 접시 101350(SPL, Korea)에서 배양된 U2OS 세포에 레이저 미세 조사를 통해 DNA 손상을 유발시킨 후, 얼음 위에서 CSK 용액(10 mM PIPES pH 7.0, 100mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM $MgCl_2$ 0.5% TritonX-100)을 1분간 처리하여 pre-extract하였다. 이어서 3.7% 포름알데하이드 용액으로 상온에서 10분간 고정하였고, 차가운 인산완충용액(PBS)으로 3번 씻어준 후, 상온에서 0.25% Triton-X 100/PBS 용액을 10분간 처리하여 항체가 세포 내로 투과할 수 있는 상태로 만들었다. 불특정한 항원-항체 반응을 억제하기 위해 블로킹(Blocking) 용액(5% bovine serum albumin과 0.1% Tween-20를 포함한 PBS)을 상온에서 30분간 처리하였다. 그 후 블로킹 용액에서 1차 항체와 2차 항체를 각각 1시간씩 반응시켰다. 세포의 핵을 염색하기 위해서 0.2 ㎍/ml 4´-6´-diamidino-2-phenylindole(DAPI)를 포함한 PBS로 3분간 처리하였다. 염색된 세포를 형광 현미경(TE2000-U, Nikon, Japan)으로 관찰 및 촬영하였다(Shin et al., 2019).

제 6 절 웨스턴 블롯

실험에 사용된 U2OS 세포를 Cell scrapper를 이용하여 수거하여 3,000 rpm, 4 ℃에서 원심 분리하였다. 세포의 용해에는 NETN 용액(40 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM sodium chloride, 1% NP-40, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid) 사용하였고, 추가로 초음파 처리를 하였다. Bradford assay(BIORAD, USA), 를 통해 용해된 세포 내 단백질 농도를 측정하고, 20 ㎍의 단백질을 SDS 폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동하였다. 분리된 단백질은 나이트로셀룰로스 막으로 390 mA에서 1시간 30분 동안 이동 및 부착되었다. 1차 항체를 항체별 적정 비율로 3% bovine serum albumin(BSA) 용액에 희석하여 상온에서 2시간, 2차 항체는 5% non-fat milk에 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 항체 처

리된 나이트로셀룰로스 막은 세척 후 ECL 용액을 처리하였고, Chemidoc(ATTO, Korea)을 통해 형광 반응 사진을 촬영하였다(Shin et al., 2019).

제 7 절 억제제 및 항체

본 연구에서 사용한 억제제는 [표 1]과 같다.

[표 1] 사용한 억제제

억제제	최종 농도	구입처
PARP 억제제(Olaparib)	10 μM	Sigma-Aldrich
ATM 억제제(KU-55933)	10 μM	Sigma-Aldrich
DNA-PK 억제제(NU7441)	10 μM	Axon Medchem
PARG 억제제(PDD00017273)	1 μM	Sigma-Aldrich

억제제는 micro-irradiation을 조사하기 한 시간 전에 [표 1]최종 농도로 처리하였다. 본 연구에서 웨스턴 블롯과 면역 염색법을 위해 사용한 1차 항체는 [표 2]와 같고, 2차 항체는 [표 3]과 같다.

[표 2] 사용한 1차 항체

1차 항체	희석 비율	구입처
RecQL4	1 : 50000	AR05-PA0007, Abfrontier
GFP(B-2)	1 : 250	sc9996, Santa Cruz
GAPDH	1 : 30000	GTX100118, Genetex
PARP	1:50	GTX100573, Genetex
γH2AX	1:100	A300-081A, Bethyl

[표 3] 사용한 2차 항체

2차 항체	희석 비율	구입처
Rabbit IgG antibody(HRP)	1 : 10000	GTX213110-01, GeneTex
Mouse IgG antibody(HRP)	1 : 10000	GTX213111-01, GeneTex
Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG	1 : 1000	A11008, ThermoFisher
Alexa Fluor 594 anti-mouse IgG	1 : 1000	A11005, ThermoFisher

제 3 장 연구 결과

제 1 절 레이저 미세 조사를 통한 DNA 손상 조건 탐색

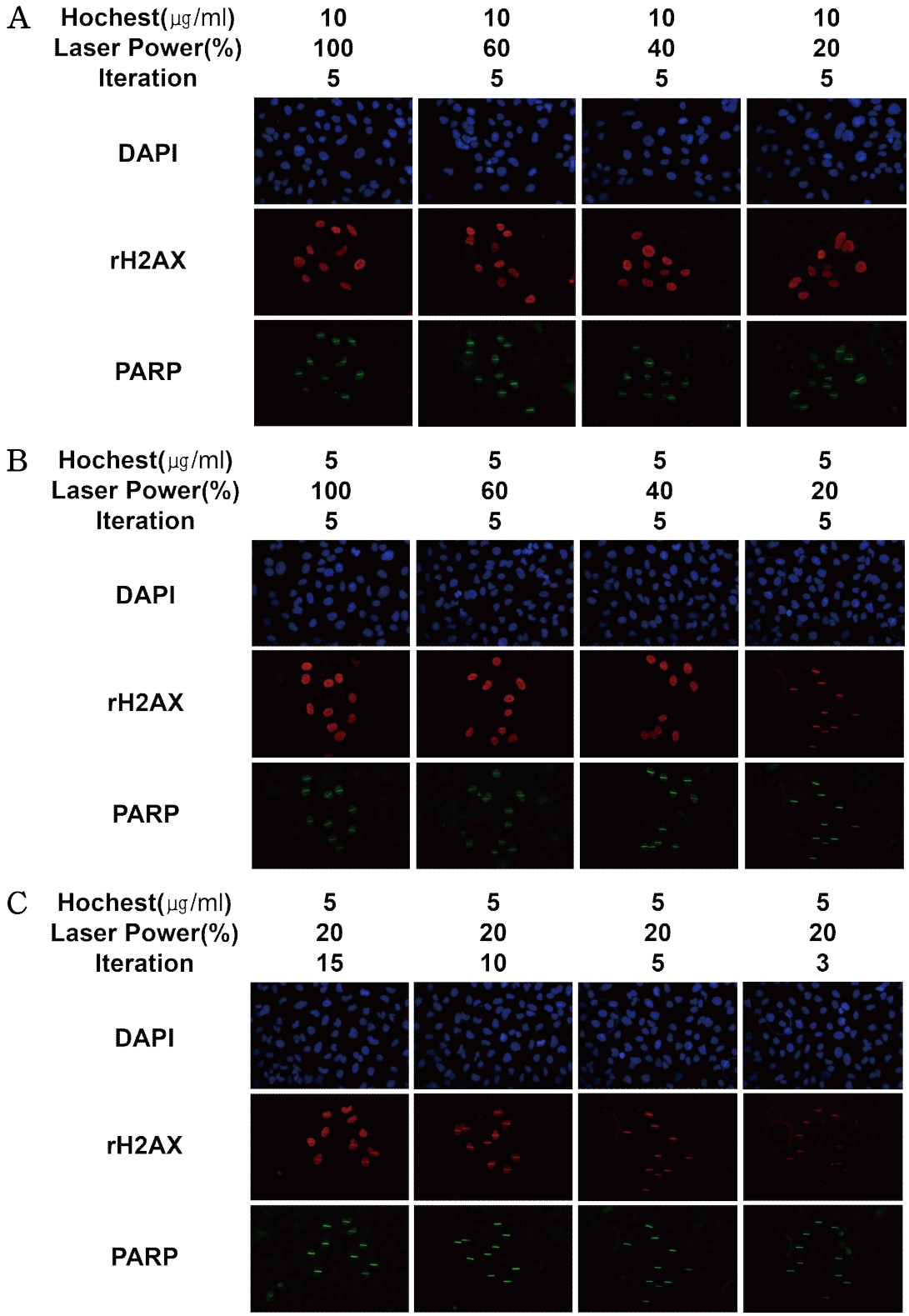
레이저 미세 조사(laser micro-irradiation)를 통한 DNA 손상을 유발하기 위해서는 레이저를 조사하기 전 BrdU와 Hochest를 사용하여 DNA 손상에 대해 민감화 시키는 과정(pre-sensitization)이 필요하다(Stixova et al., 2014; Marianna & Oliver, 2016; Kim et al., 2019). BrdU의 경우 DNA 복제 과정에서 티민(T)을 대체하여 사용되어, DNA로 삽입된다. 본 연구의 초점 단백질인 RecQL4는 DNA 복제에 관여하므로(Sangrithi et al., 2005; Kohzaki et al., 2012; Croteau et al., 2014), RecQL4의 발현을 억제하는 실험에서는 DNA 복제 과정 지연 등의 문제로 인해 BrdU가 DNA에 삽입되는 양을 통제하기 어렵다. 따라서 본 연구에서는 Hochest를 사용하여 DNA 손상에 대해 민감화 시키는 과정을 수행하였다. 그러나 Hoechst를 사용한 기존 연구가 많지 않으며, Marianna와 Oliver(2016)의 연구에서는 DNA 손상에 대해 민감화 시키는 과정에서 Hoechst를 10 ㎍/ml로 10분간 처리하였고, Stixova 등(2014)의 연구에서는 Hoechst를 0.5 ㎍/ml로 5분간 처리하는 등 연구에 따라 Hoechst의 처리 농도와 시간에서 차이를 보였다. 따라서 본 연구를 진행함에 있어 Hochest를 처리한 상황에서 레이저 미세 조사를 통한 DNA 손상 조건을 탐색할 필요성이 있다. DNA 손상이 정상적으로 일어났는지 확인하고자 DNA 손상 마커로 사용되는 γH2AX와 PARP의 foci가 레이저를 조사한 부위에서 형성되는지 면역 형광 염색법으로 확인하였다. Hochest의 처리 농도를 10 ㎍/ml, 5 ㎍/ml, 2.5 ㎍/ml인 조건, 레이저의 출력이 100%, 80%, 60%, 40%, 20%인 조건, 레이저의 반복 수(iteration)가 15, 10 5, 3, 1인 조건에서 실험을 진행하여 레이저 미세 조사를 통한 최적의 DNA 손상 조건을 탐색하였다. 연구 결과 Hoechst 처리 농도가 10 ㎍/ml인 경우에 Hoechst의 세포에 대한 독성으로 인해 Hoechst 처리 후 1시간 경과 후부터 세포의 형태가 비정삭적으로 변하는 것이 관찰되었다. 또한

레이저의 출력과 반복 수가 각각 20%와 5로 레이저 세기가 낮은 조건에서도 레이저를 조사한 부분 외에 핵 전체적으로 γH2AX가 형성되었다[그림 2A]. 반면에 Hoechst 처리 농도가 5 ㎍/ml인 경우, 레이저 세기가 20%이고, 반복 수가 5 또는 3인 조건에서는 γH2AX의 형성이 레이저를 조사한 부분에서만 관찰이 되었다[그림 2B, 2C]. PARP의 경우는 γH2AX와는 달리 레이저의 세기와 반복 수가 높은 경우를 제외하고는 레이저를 조사한 부분에서만 관찰 되었다[그림 2A, 2B, 2C].

본 연구실에서 진행된 추가 실험에서 민감화 과정(pre-sensitization)에 Hoechst를 처리한 경우 γH2AX의 형성이 시간에 따라 레이저를 조사한 영역에서 핵 전체로 퍼져나가는 것을 확인하였다. 또한 레이저의 세기가 강한 조건에서는 레이저 조사 후 면역 형광 염색법을 위해 고정된 시간이 다른 모든 샘플에서 핵 전체에서 γH2AX가 형성되었다. 이러한 결과들을 종합해볼 때, Hoechst 사용하는 경우에는 레이저의 출력이 높거나 반복 수가 많으면 γH2AX가 레이저 조사 부위에서 핵 전체로 매우 빠르게 퍼져나가기 때문에 면역 형광 염색법으로 관찰 시 γH2AX가 핵 전체에서 관찰된다는 것을 추론할 수 있었다[그림 2].

RecQL4와 같이 DNA 손상 초기에 관여하는 단백질의 DNA 손상 부위 결합 특성을 확인하기 위해서는 DNA 손상 수선 초기 과정이 관찰 및 분석이 가능해야 한다. 따라서 pre-sensitization 과정에서 Hoechst를 사용할 경우에는 레이저의 세기를 낮출 필요성이 있다. 이러한 결과는 pre-sensitization 과정에서 Hoechst를 사용한 경우가 BrdU를 사용한 경우보다 같은 레이저 세기에서 더 큰 DNA 손상을 유발한다는 Stixova 등(2014)의 연구 결과와 일치한다.

결과들을 종합하면, Hoechst의 농도가 10 ㎍/ml인 경우 세포의 형태가 빠르게 변하며, 레이저의 출력이 높고 반복 수가 많을 때에는 심한 DNA 손상이 발생할 수 있다. Hoechst 처리 농도가 5 ㎍/ml이고 레이저의 세기가 20%, 반복 수가 5인 조건에서는 세포의 형태 변화가 크지 않고, PARP와 γH2AX가 micro-irradiation을 조사한 부위에서 관찰되므로 본 연구에서는 이와 같은 조건으로 레이저 미세 조사 실험을 진행하였다.


A
Hochest(μg/ml) 10 10 10 10
Laser Power(%) 100 60 40 20
Iteration 5 5 5 5
DAPI
rH2AX
PARP
B
Hochest(μg/ml) 5 5 5 5
Laser Power(%) 100 60 40 20
Iteration 5 5 5 5
DAPI
rH2AX
PARP
C
Hochest(μg/ml) 5 5 5 5
Laser Power(%) 20 20 20 20
Iteration 15 10 5 3
DAPI
rH2AX
PARP

[그림 2]

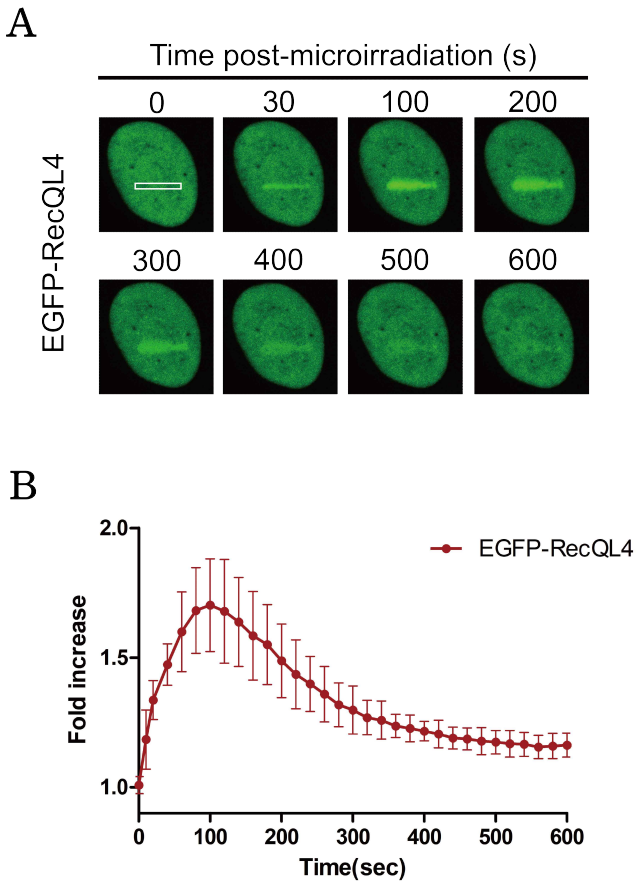
[그림 2] 레이저 미세 조사를 통한 DNA 손상 조건 탐색

공초점 현미경용 접시에서 배양된 U2OS 세포에 레이저 미세 조사를 통해 DNA 손상을 유발하고, 면역 형광 염색법을 통해 γH2AX와 PARP의 foci 형성을 관찰하였다. γH2AX와 PARP의 각각 항 γH2AX 항체와 항 PARP 항체에 의해 검출되었으며, DAPI는 세포의 핵을 나타낸다. 레이저 미세 조사 10분 전에 Hoechst를 제시된 조건의 농도가 되도록 처리하였다. 조건당 10개의 세포에 레이저 미세 조사를 통해 DNA 손상이 유발되었고, 3번 반복 실험을 수행하였다. 그림은 대표이미지를 나타낸 것이다.

A. Hochest 농도가 10 ㎍/ml, 레이저 반복 수는 5이고, 레이저 세기는 각각 100%, 60%, 40%, 20%인 조건이다. **B.** Hochest 농도가 5 ㎍/ml, 레이저 반복 수는 5이고, 레이저 세기는 각각 100%, 60%, 40%, 20%인 조건이다. **C.** Hochest 농도가 5 ㎍/ml, 레이저 세기는 20%이고, 레이저 반복 수가 각각 15, 10, 5, 3인 조건이다.

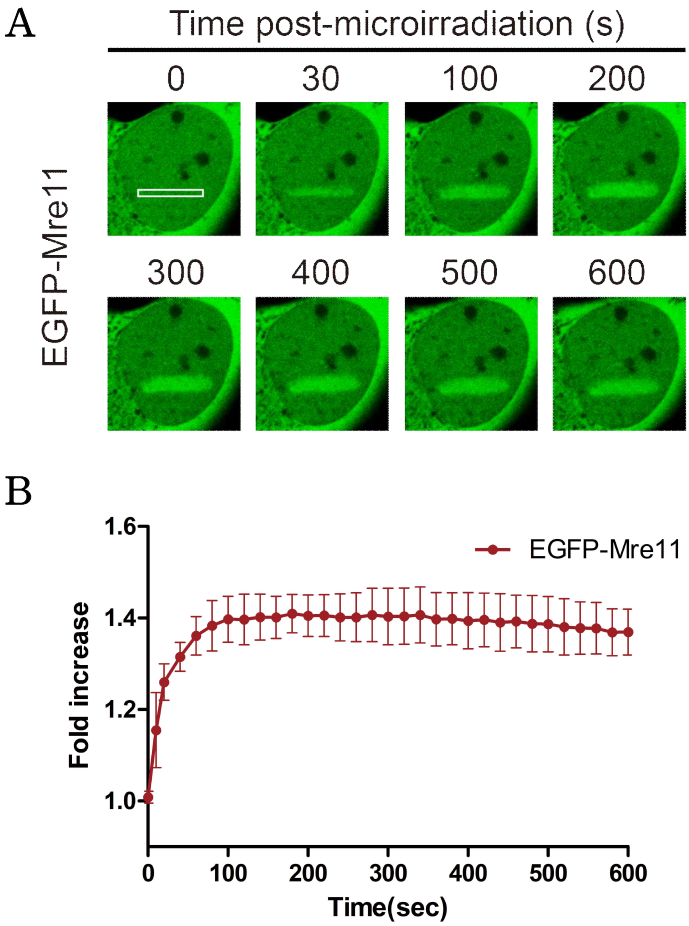
제 2 절 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 양상

RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 양상을 확인하기 위해 녹색형광단백질(EGFP)이 융합된 RecQL4를 세포 내에 발현시켰다. 레이저를 특정 영역에 조사하여 DNA 손상을 유발하였고, 손상 부위로 EGFP RecQ4의 이동과 그에 따른 형광 강도 변화를 측정하였다. EGFP 형광 강도는 손상 부위에서 증가하였고 약 100초 이후 손상 부위에서 감소하는 양상이 관찰되었다[그림 3]. DNA 이중 가닥 수선 반응에 중요한 MRN 복합체를 구성하는 Mre11의 DNA 손상 부위 결합 양상과 비교한 결과, EGFP-Mre11은 DNA 손상 부위로 모인 후 측정 시간인 10분 동안 손상 부위에 계속 잔류하였다[그림 4]. EGFP-Mre11과는 달리 EGFP-RecQL4는 DNA 손상 상황에서 초기에 손상 부위에 결합되었다가 다시 해리되는 양상이 관찰되었다. 이 결과는 RecQL4가 손상 부위에서 짧게 점유하는 단백질이라는 Aleksandrov 등(2018)의 연구 결과와 일치하였다.



[그림 3] EGFP-RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 양상

A. U2OS 세포에 EGFP-RecQL4를 발현하는 플라스미드를 형질주입 시키고, 24시간 뒤에 micro-irradiation을 조사하였다. 하얀색 사각형으로 표시된 영역이 micro-irradiation을 조사한 영역이다. 10초 간격으로 사진을 촬영하였으며, 그림은 제시된 시간에 촬영한 이미지를 대표로 나타낸 것이다. **B.** A의 시간에 따른 형광 강도를 20초 간격으로 나타낸 그래프로, micro-irradiation을 조사한 영역의 형광 강도 측정값을 micro-irradiation을 조사하지 않은 2개 영역의 형광 강도 측정값의 평균값으로 나눈 것이다. 그래프는 15개의 샘플에 대한 평균값을 나타낸 것이고, Error bar는 표준편차이다.



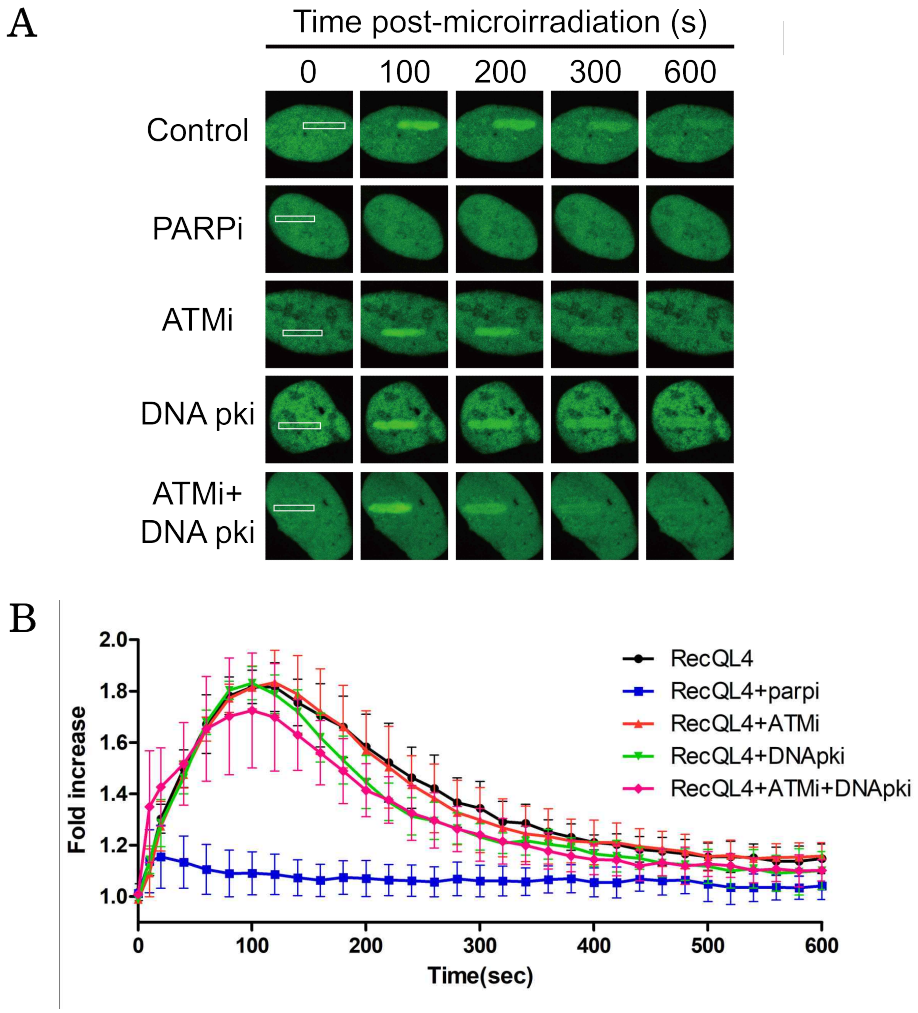
[그림 4] EGFP-Mre11의 DNA 손상 부위 결합 양상

A. U2OS 세포에 EGFP-Mre11를 발현하는 플라스미드를 형질주입 하고, 24시간 뒤에 micro-irradiation을 조사하였다. 하얀색 사각형으로 표시된 영역이 micro-irradiation을 조사한 영역이다. 10초 간격으로 이미지를 획득하였으며, 그림은 제시된 시간에 촬영한 사진을 대표로 나타낸 것이다. **B.** A의 시간에 따른 형광 강도를 20초 간격으로 나타낸 그래프로, micro-irradiation을 조사한 영역의 형광 강도 측정값을 micro-irradiation을 조사하지 않은 2개 영역의 형광 강도 측정값의 평균값으로 나눈 것이다. 그래프는 15개의 샘플에 대한 평균값을 나타낸 것이고, Error bar는 표준편차이다.

제 3 절 DNA 손상 수선에 관여하는 효소의 활성이 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 미치는 영향

RecQL4는 DNA가 손상되었을 때 초기에 손상 부위에 결합되었다가 해리된다. 따라서 RecQL4는 DNA 손상 수선에 관여하는 단백질 중 초기에 손상 부위에 모이는 단백질에 의해 조절을 받거나, 또는 상호작용을 통해 초기에 오는 단백질에 영향을 줄 것이라 예상할 수 있다. 대표적인 예인 PARP-1, ATM, DNA-PKcs는 손상 부위에 빠르게 결합하는 초기 단백질로, 다른 단백질을 활성화 시켜 DNA 손상 수선 과정이 일어나게 한다(Lieber, 2010; Leung et al., 2014; Falck et al., 2005). PARP-1은 DNA 손상 수선 반응에 관여하는 초기 단백질의 손상 부위 결합에 중요하게 작용하는 단백질이며, RecQL4의 C-말단 부분과 상호작용한다고 알려져 있다(Woo et al., 2006). 또한 Hela 세포에서 RecQL4가 DNA 손상 부위에 결합되는데 Poly(ADP-Ribose)의 합성이 필요하다는 연구 결과가 있다(Aleksandrov, 2018). 따라서 RecQL4가 DNA 손상 부위에 결합하는 것에 대한 PARP의 영향을 확인할 필요가 있다. 또한 DNA 손상 수선 반응에서 초기에 ATM과 DNA-PKcs의 활성화가 중요하게 작용하므로 이들이 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 영향을 미치는 확인하고자 하였다. 이를 위해 세포에 PARP 억제제, ATM 억제제, DNA-PK 억제제를 각각 처리한 후 레이저 조사에 의한 DNA 손상 부위로 EGFP 융합 RecQL4의 이동과 결합 양상을 확인하였다. 나아가 DNA 이중 가닥 손상 수선 반응에 있어 H2AX의 인산화를 통한 γH2AX 형성이 중요하며, γH2AX의 형성은 ATM과 DNA-PKcs에 조절되므로(Stiff et al. 2004; Falck et al., 2005; Berkovich et al., 2007), γH2AX의 형성이 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 미치는 영향을 확인하고자 ATM 억제제와 DNA-PK 억제제를 함께 처리하였다. 그 결과 PARP 억제제를 처리한 경우에서만 EGFP-RecQL4가 DNA 손상 부위로 결합되지 않았다[그림 5A]. ATM 억제제, DNA-PK 억제제 그리고 ATM 억제제와 DNA-PK 억제제를 함께 처리한 경우에는

EGFP-RecQL4가 DNA 손상 부위로 결합을 가능 했을 뿐 아니라 결합 양상도 억제제를 처리하지 않는 경우와 유사하게 관찰되었다[그림 5]. 이 결과들은 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 ATM과 DNA-PK의 활성, γH2AX의 형성은 중요하지 않으며, PARP의 활성이 중요하게 작용한다는 것을 의미한다.

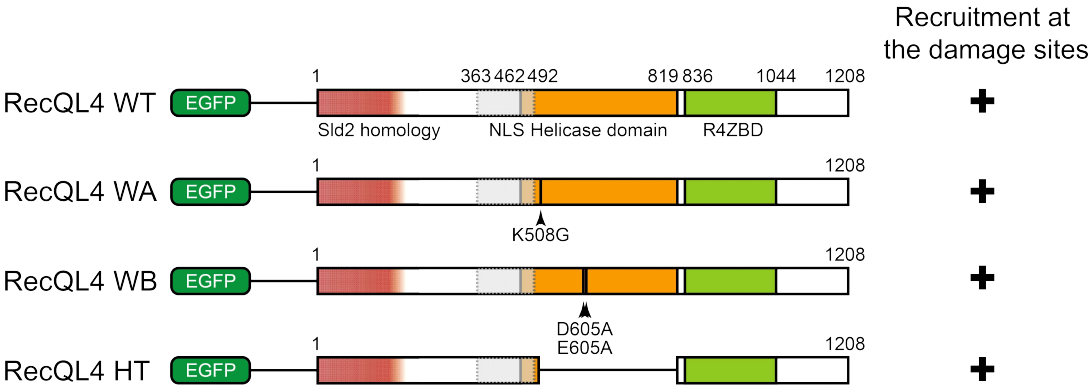


[그림 5] 억제제 처리에 따른 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 양상

A. [그림 3]과 같은 방법으로 micro-irradiation을 조사하였다. Laser를 조사하기 1시간 전에 PARP 억제제(PARPi, 10 μM), ATM 억제제(ATMi, 10 μM), DNA-PK 억제제(DNA-PKi, 10 μM)를 처리하였다. 하얀색 사각형으로 표시된 영역이 micro-irradiation을 조사한 영역이다. 10초 간격으로 이미지를 획득하였으며, 그림은 제시된 시간에 획득한 이미지를 대표로 나타낸 것이다. **B.** A의 시간에 따른 형광 강도를 20초 간격으로 나타낸 그래프로, micro-irradiation을 조사한 영역의 형광 강도 측정값을 micro-irradiation을 조사하지 않은 2개 영역의 형광 강도 측정값의 평균으로 나눈 것이다. 그래프는 15개의 샘플에 대한 평균값을 나타낸 것이고, Error bar는 표준편차를 나타낸다.

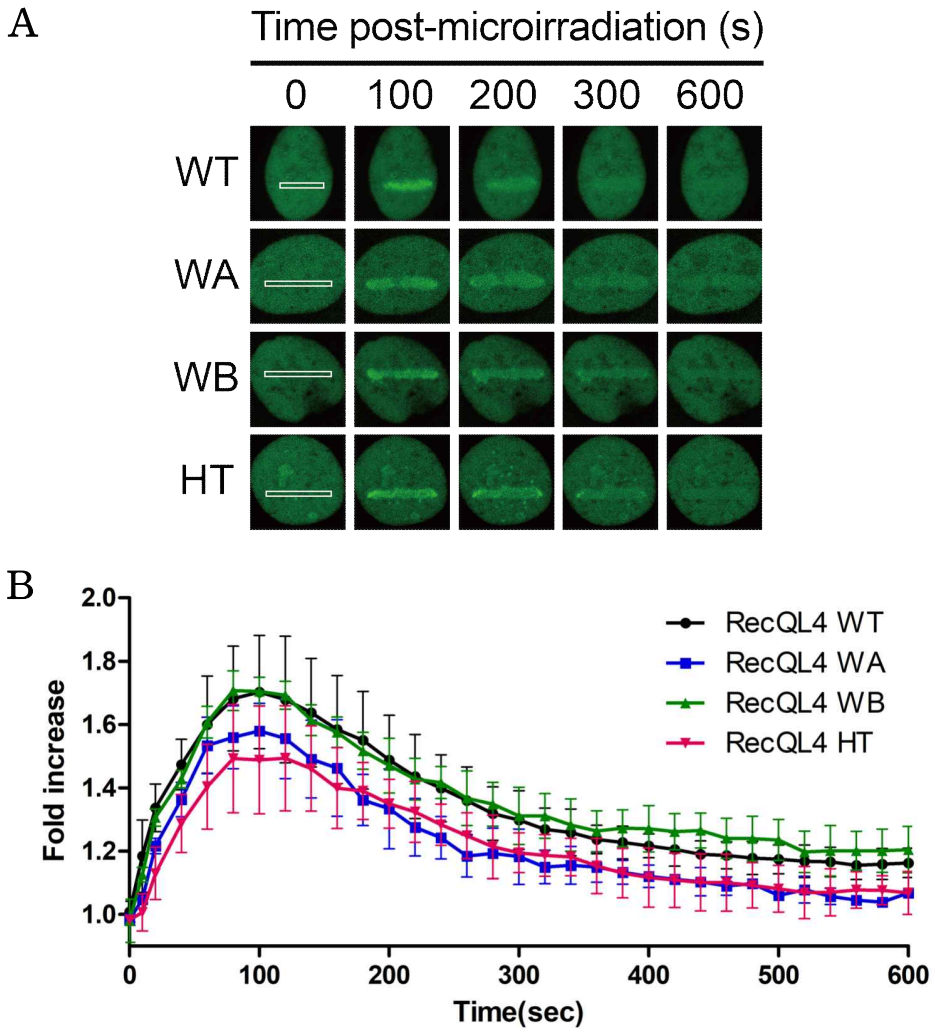
제 4 절 Helicase 활성이 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 미치는 영향

RecQL4는 RecQ Helicase family에 속하는 Helicase이다(Kitao et al., 1998). RTS 환자의 경우 RecQL4의 Helicase 도메인이 없는 경우도 존재하며, Helicase 도메인이 DNA 손상 수선 반응에서 중요하게 작용한다는 연구도 있다(Rossi et al., 2010). 따라서 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 있어 Helicase 활성의 영향을 확인하였다. Helcase 도메인의 Walker A 모티프에서 일어난 점돌연변이(이하 WA)와 Walker B 모티프에서 일어난 점돌연변이(이하 WB)는 RecQL4의 ATPase 또는 Helicase 활성을 저해한다고 알려져 있다(Kitao et al. 1999). 따라서 Helicase 도메인이 없는 EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질(HT, Helicase Truncated), EGFP 융합 RecQL4 WA 변이 단백질, EGFP 융합 RecQL4 WB 변이 단백질을 이용하여 Helicase 활성이 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 미치는 영향을 확인하였다[그림 6]. 그 결과, 3가지 변이 단백질 모두 micro-irradiation 조사에 의해 유발된 DNA 손상 부위에 결합하였다[그림 7A]. 또한, DNA 손상 부위 결합 양상 역시 야생형 RecQL4와 유사하게 관찰되었다[그림 7B]. 하지만 RecQL4가 세포내에서 주로 이합체(dimer)로 존재한다는 연구결과(Croteau et al., 2014)가 있으므로, endogenous RecQL4와 RecQL4 변이 단백질이 이합체를 형성하여 DNA 손상 부위에 결합할 가능성이 있다. 이 가능성을 배제하기 위해, endogenous RecQL4의 발현을 억제하는 siRNA를 형질주입한 후 3가지 변이 단백질들의 DNA 손상 부위 결합 양상을 확인하였다[그림 8A, 8B]. 그 결과 endogeneous RecQL4의 발현을 억제한 상태에서도 Helicase 활성이 억제된 3가지 돌연변이형 모두 DNA 손상 부위에 결합하였고, 결합 양상 역시 야생형 RecQL4와 유사하였다[그림 8C]. 결과들을 종합할 때, Helicase 활성은 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 중요한 영향을 미치지 않는다.



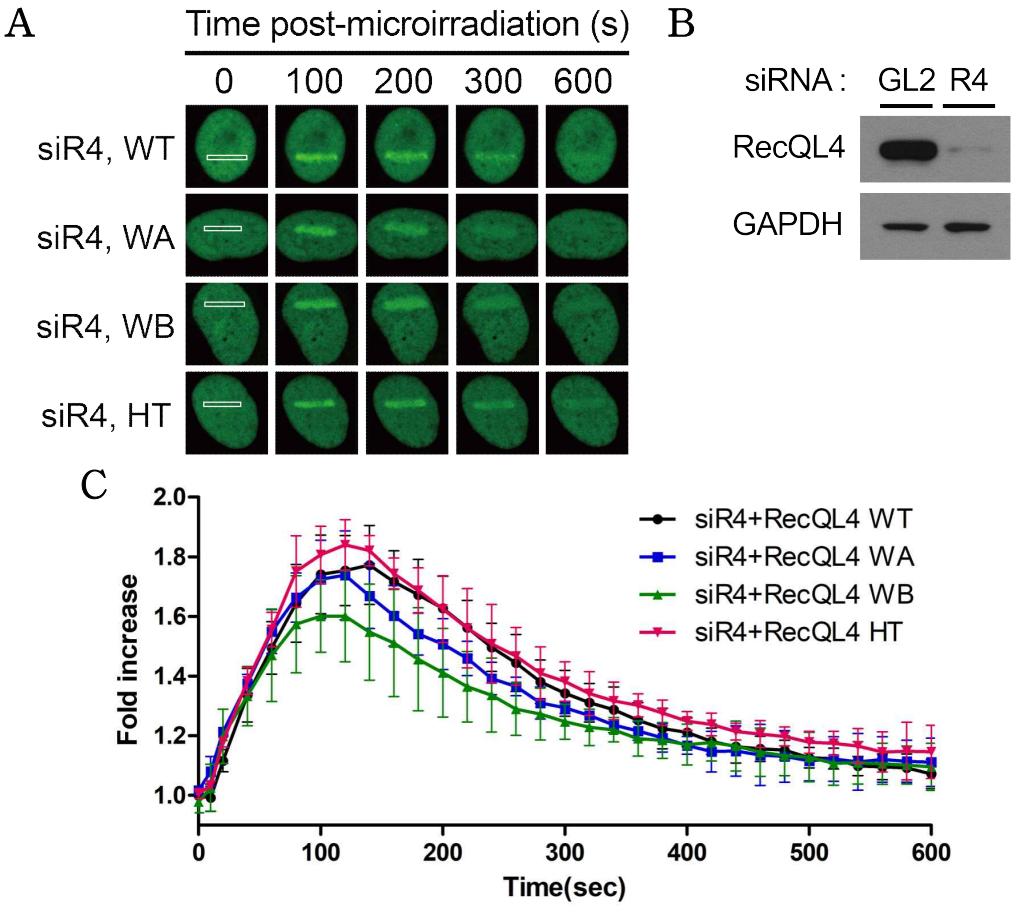
[그림 6] EGFP 융합 RecQL4 야생형과 돌연변이형의 모식도

RecQL4의 N-말단에 EGFP가 결합되어 있다. RecQL4 WT(Wild type), 야생형 RecQL4; RecQL4 WA(Walker A), 508번 아미노산이 리신(K)에서 글라이신(G)으로 치환된 돌연변이형; RecQL4 WB(Walker B), 605번 아미노산이 아스파르트산에서 알라닌으로, 606번 아미노산이 글루탐산에서 아미노산으로 치환된 돌연변이형; RecQL4 HT(Helicase Truncated), 492번부터 819번까지 절단된 돌연변이형; NLS, 핵 신호서열; R4ZBD, RecQ4-Zn^{2+}-binding domain.



[그림 7] RecQL4 돌연변이형의 DNA 손상 부위 결합 양상

A. U2OS 세포에 EGFP-RecQL4, EGFP-RecQL4 WA, EGFP-RecQL4 WB, EGFP-RecQL4 HT를 발현하는 플라스미드를 각각 형질주입 하고, [그림 3]과 같이 micro-irradiation 조사 및 형광 강도를 측정하였다. B. A의 시간에 따른 형광 강도를 20초 간격으로 나타낸 그래프로, micro-irradiation을 조사한 영역의 형광 강도 측정값을 micro-irradiation을 조사하지 않은 2개 영역의 형광 강도 측정값의 평균값으로 나눈 것이다. 그래프는 15개의 샘플에 대한 평균값을 나타낸 것이고, Error bar는 표준편차이다.

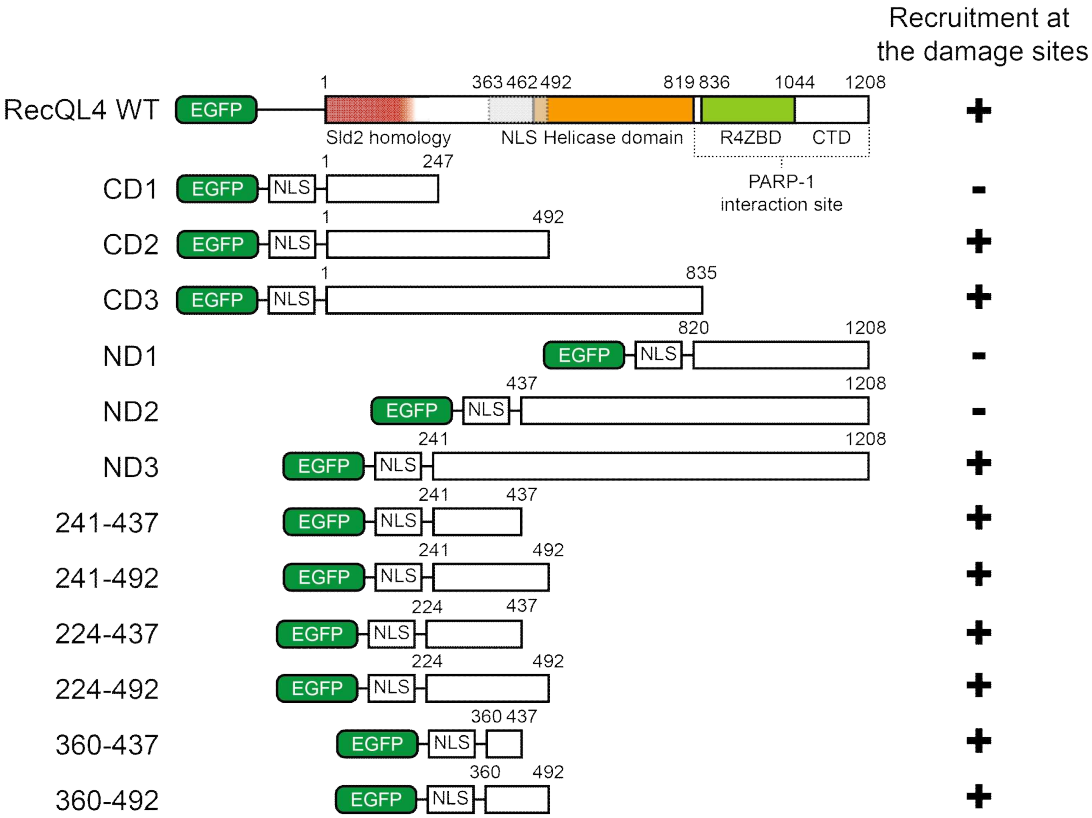


[그림 8] RecQL4 발현이 억제된 세포에서 RecQL4 돌연변이형의 DNA 손상 부위 결합 양상

A. U2OS 세포에 RecQL4 siRNA를 전기천공법으로 형질주입시키고 24시간 후, EGFP-RecQL4, EGFP-RecQL4 WA, EGFP-RecQL4 WB, EGFP-RecQL4 HT를 발현하는 플라스미드를 각각 형질주입 시켰다. 24시간 후 [그림 3]과 같이 micro-irradiation 조사 및 형광 강도를 측정하였다. **B.** A에서 U2OS에 RecQL4 siRNA를 형질주입한 세포의 일부와 GL-2 siRNA를 형질주입한 세포를 각각 배양하였다. 24시간 후, Western Blot을 수행하여 RecQL4 발현 억제 정도를 확인하였다. GL-2 siRNA는 Control siRNA이다. R4, RecQL4. **C.** A의 시간에 따른 형광 강도를 20초 간격으로 나타낸 그래프로, micro-irradiation을 조사한 영역의 형광 강도 측정값을 micro-irradiation을 조사하지 않은 2개 영역의 형광 강도 측정값의 평균값으로 나눈 것이다. 그래프는 15개의 샘플에 대한 평균값을 나타낸 것이고, Error bar는 표준편차이다.

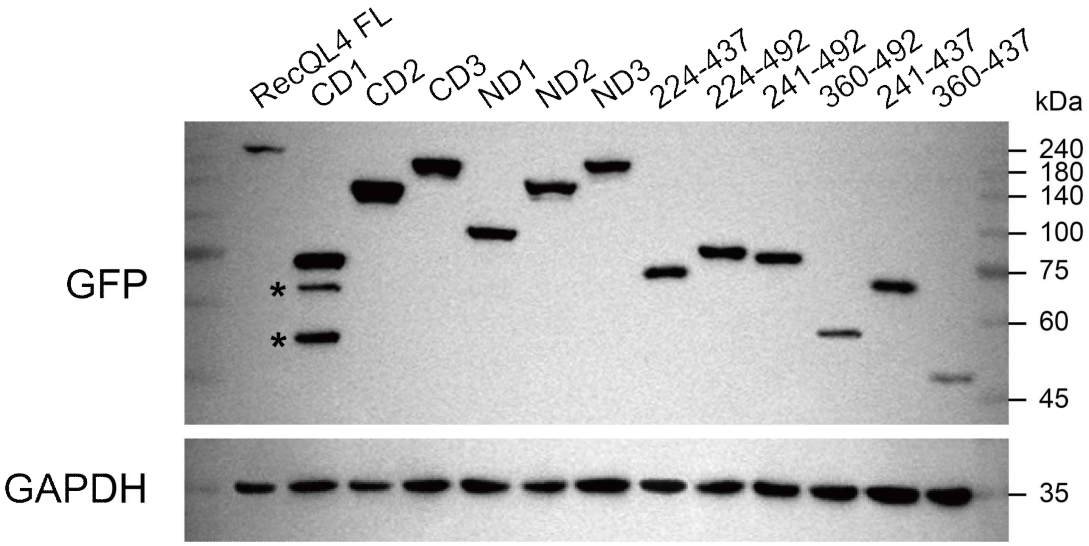
제 5 절 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 도메인 탐색

RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 중요한 역할을 하는 도메인을 탐색하기 위해 N-말단과 C-말단의 일부를 제거한 EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질 CD1(aa 1-247), CD2(aa 1-492), CD3(aa 1-835), ND1(aa 820-1208), ND2(aa 437-1208), ND3(aa 241-1208)를 발현하는 플라스미드를 제작하였다[그림 9]. 제작한 플라스미드는 DNA 염기 서열 결정(DNA sequencing)과 웨스턴 블롯 분석을 통해 설계한 영역을 가지는 EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질이 정상적으로 발현되는지 확인하였다[그림 10]. 제작한 플라스미드를 각각 U2OS 세포에 발현시키고 레이저를 조사하였을 때, EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질 중 CD2, CD3, ND3 만이 DNA 손상 부위에 결합하였다[그림 11A]. 이들의 공통적인 영역이 aa 241-492이므로 이 영역 안의 일부를 포함한 EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질 241-437, 241-492, 224-437, 224-492, 360-437, 360-492를 발현하는 플라스미드를 추가 제작하였다[그림 9]. 추가 제작한 플라스미드는 DNA 염기 서열 결정(DNA sequencing)과 Western blot 분석을 통해 설계한 영역을 가지는 EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질이 정상적으로 발현되는지 확인하였다[그림 10]. 실험 결과 추가 제작한 EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질 모두 DNA 손상 부위에 결합하였다[그림 11B]. 따라서 제작한 변이 단백질 중 가장 짧은 아미노산 360-437 영역이 DNA 손상 부위 결합에 중요한 도메인이다. 하지만 추가 제작된 EGFP-결합 RecQL4 변이 단백질들의 결합 양상이 야생형 RecQL4와는 차이가 존재하였다. RecQL4 변이 단백질 모두 DNA 손상 부위로 결합되었다가 해리되는 양상은 야생형 RecQL4와 유사하였으나, 손상 부위의 형광 강도의 최댓값은 야생형 보다 낮게 관찰되었다[그림 12A]. 추가 제작된 변이 단백질들의 손상 부위에서 형광 강도 최댓값은 ND3와 유사하였으며, CD2와 CD3 만이 야생형 RecQL4와 손상 부위에서 형광 강도의 최댓값이 유사하게 관찰되었다[그림 12B, 12C].



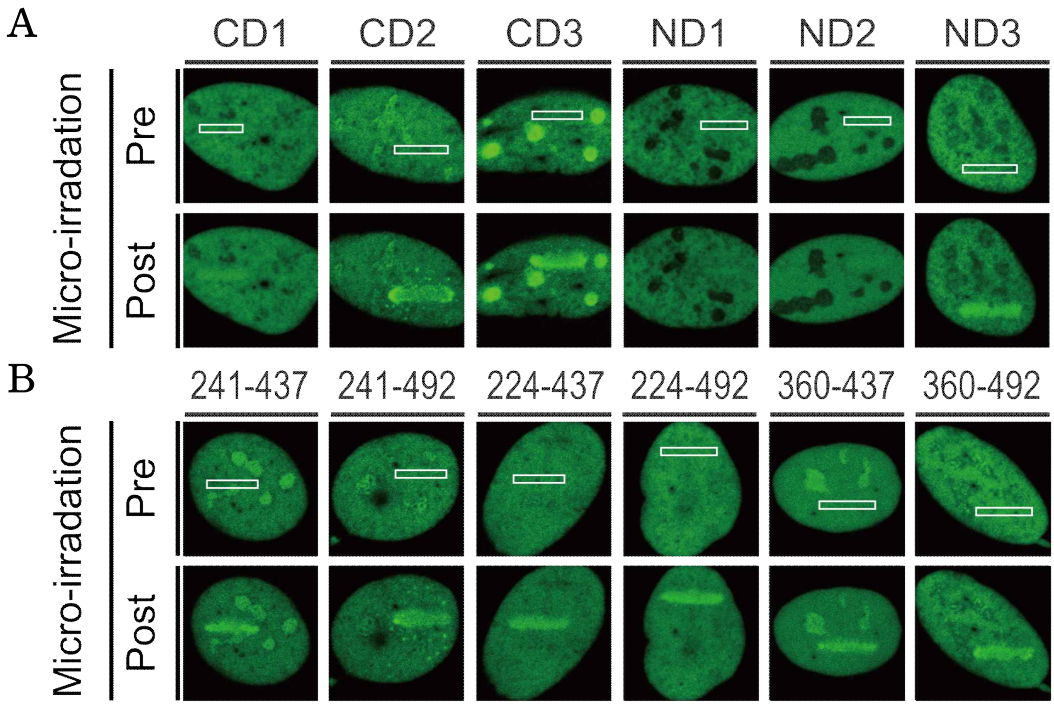
[그림 9] DNA 손상 부위 결합 도메인 탐색을 위해 제작한 EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질의 모식도

RecQL4 변이 단백질의 N-말단에 EGFP와 SV40(Simian virus 40)의 핵신호서열(NLS)이 결합되어 있다. CD1, RecQL4의 1번 아미노산부터 247번 아미노산까지의 영역을 포함하는 변이 단백질; CD2, RecQL4의 1번 아미노산부터 492번 아미노산; CD3, RecQL4의 1번 아미노산부터 835번 아미노산; ND1, RecQL4의 1번 아미노산부터 247번 아미노산; ND2, RecQL4의 1번 아미노산부터 247번 아미노산; ND3, RecQL4의 1번 아미노산부터 247번 아미노산; 241-437, RecQL4의 1번 아미노산부터 247번 아미노산까; 241-492, RecQL4의 241번 아미노산부터 492번 아미노산; 224-437, RecQL4의 224번 아미노산부터 437번 아미노산; 224-492, RecQL4의 1번 아미노산부터 492번 아미노산; 360-437, RecQL4의 360번 아미노산부터 437번 아미노산; 360-492, RecQL4의 360번 아미노산부터 492번 아미노산



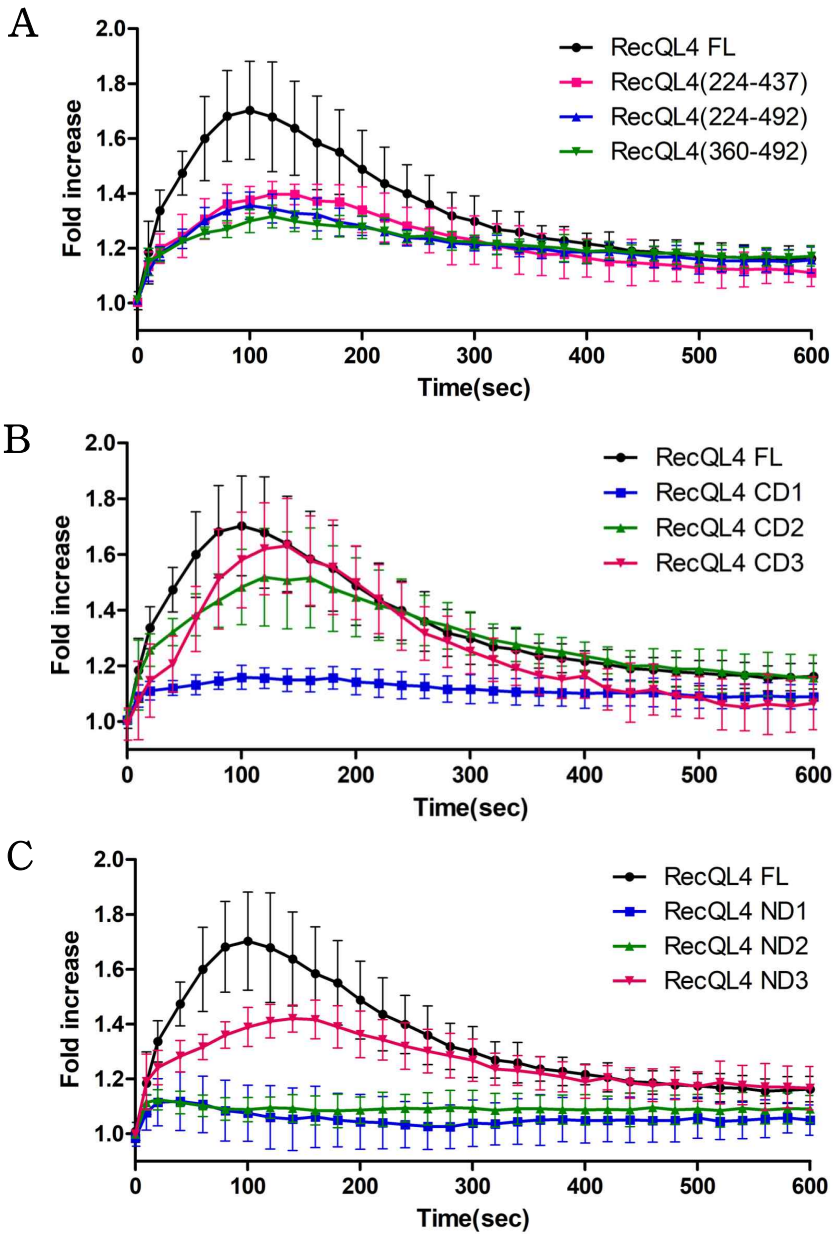
[그림 10] 제작된 EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질 Western blot 결과

U2OS 세포에 제작된 EGFP 융합 RecQL4와 EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질을 발현하는 플라스미드를 각각 형질주입하고 24시간 후, Western blot을 수행하여 형질주입 한 EGFP 융합 RecQL4 및 변이 단백질들의 발현을 확인하였다. GFP는 발현된 EGFP 융합 RecQL4 또는 변이 단백질들을 나타내며, GAPDH는 loading control이다. *는 CD1의 degradation 형태로 추정된다.



[그림 11] EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질의 DNA 손상 부위 결합 유무

U2OS 세포에 CD1, CD2, CD3, ND1, ND2, ND3, 241-437, 241-492, 224-437, 224-492, 360-437, 360-492를 발현하는 플라스미드를 각각 형질주입 하고, 24시간 후 [그림 3]과 같이 micro-irradiation 조사, 이미지 획득 및 형광 강도를 측정하였다. Pre는 Micro-irradiation 조사 전의 대표 이미지를, Post는 micro-irradiation 조사 후 100초 뒤의 대표 이미지를 나타낸 것이다.

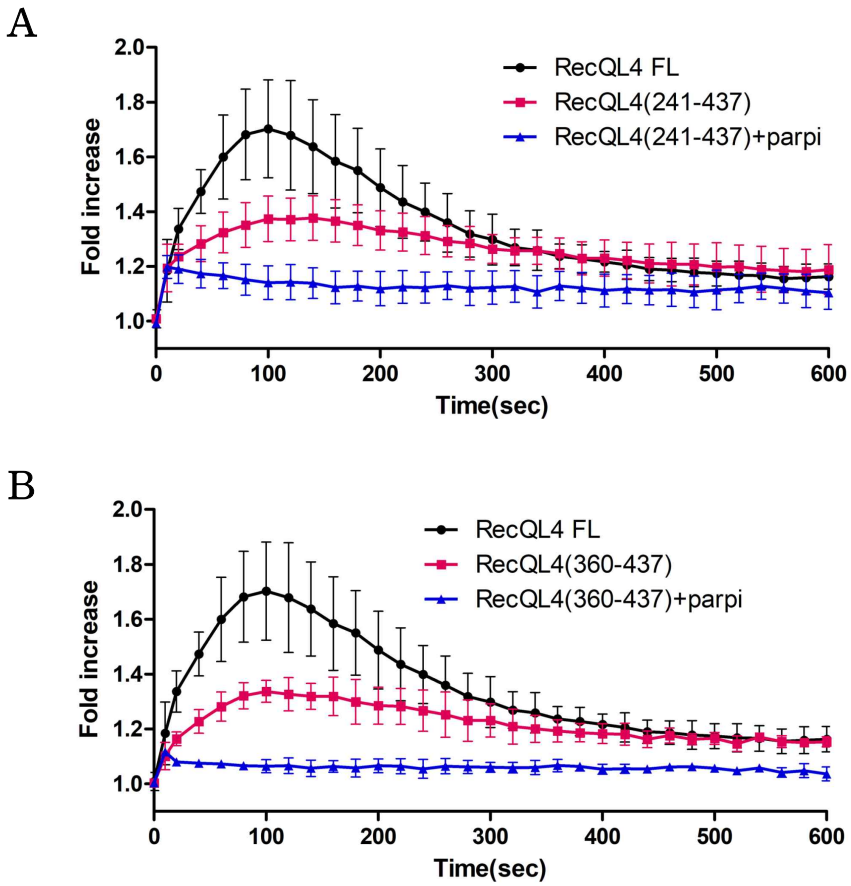


[그림 12] EGFP 융합 RecQL4 변이 단백질의 DNA 손상 부위 결합 양상

A-C [그림 11]의 시간에 따른 형광 강도를 20초 간격으로 나타낸 그래프로, micro-irradiation을 조사한 영역의 형광 강도 측정값을 micro-irradiation을 조사하지 않은 2개 영역의 형광 강도 측정값의 평균값으로 나눈 것이다. 그래프는 15개의 샘플에 대해 평균값을 나타낸 것이고, Error bar는 표준편차이다.

제 6 절 PARP 억제제가 DNA 손상 부위 결합 도메인에 미치는 영향

EGFP-RecQL4는 PARP 억제제를 처리한 경우 DNA 손상 부위로 결합되지 않았다[그림 5A]. 따라서 DNA 손상 부위 결합에 중요한 도메인만을 가지는 변이 단백질에서도 PARP 억제제에 의해 손상 부위 결합이 제한되는지 확인하였다. 그 결과 241-437, 360-437 모두 PARP 억제제를 처리하였을 때 DNA 손상 부위 결합이 제한되었다[그림 13]. 따라서 DNA 손상 부위 결합에 중요한 RecQL4 영역인 아미노산 360-437이 DNA 손상 부위에 결합하는 것에도 PARP의 활성이 필요하다. 이러한 결과는 RecQL4의 360-437 영역이 폴리 ADP 라이보실화가 일어나는 부분일 가능성, 폴리 ADP 라이보실화가 된 단백질과 상호작용하는 부분일 가능성, 폴리 ADP 라이보스에 결합하는 부분일 가능성을 암시한다.

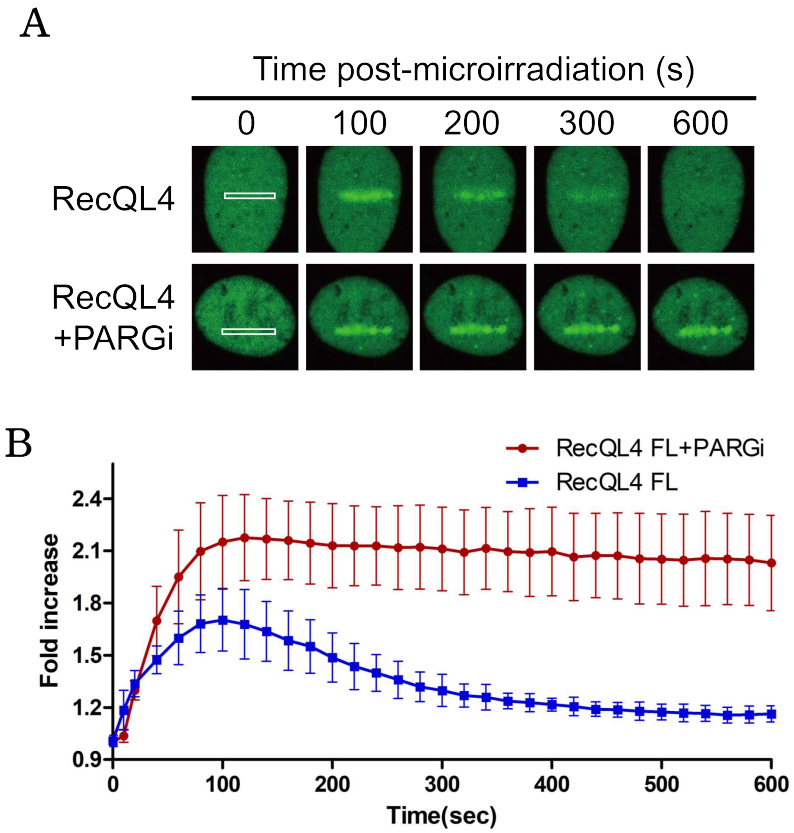


[그림 13] PARP 억제제 처리에 따른 DNA 손상 부위 결합 도메인의 DNA 손상 부위 결합 양상

[그림 3]과 같은 방법으로 micro-irradiation을 조사하였다. Laser를 조사하기 1시간 전에 PARP 억제제(PARPi, 10 μM)를 처리하였다. micro-irradiation 조사 후 10초 간격으로 형광세기를 측정하였다. micro-irradiation을 조사한 영역의 형광 강도 측정값을 micro-irradiation을 조사하지 않은 2개 영역의 형광 강도 측정값의 평균값으로 나눈 것이다. 그래프는 15개의 샘플에 대한 평균값을 나타낸것이고, Error bar는 표준편차를 나타낸다. A. RecQL4의 아미노산 241-437 영역을 발현하는 세포에서 Laser 조사 후 시간에 따른 형광 강도를 20초 간격으로 나타낸 그래프이다. B. RecQL4의 아미노산 360-437 영역을 발현하는 세포에서 Laser 조사 후 시간에 따른 형광 강도를 20초 간격으로 나타낸 그래프이다.

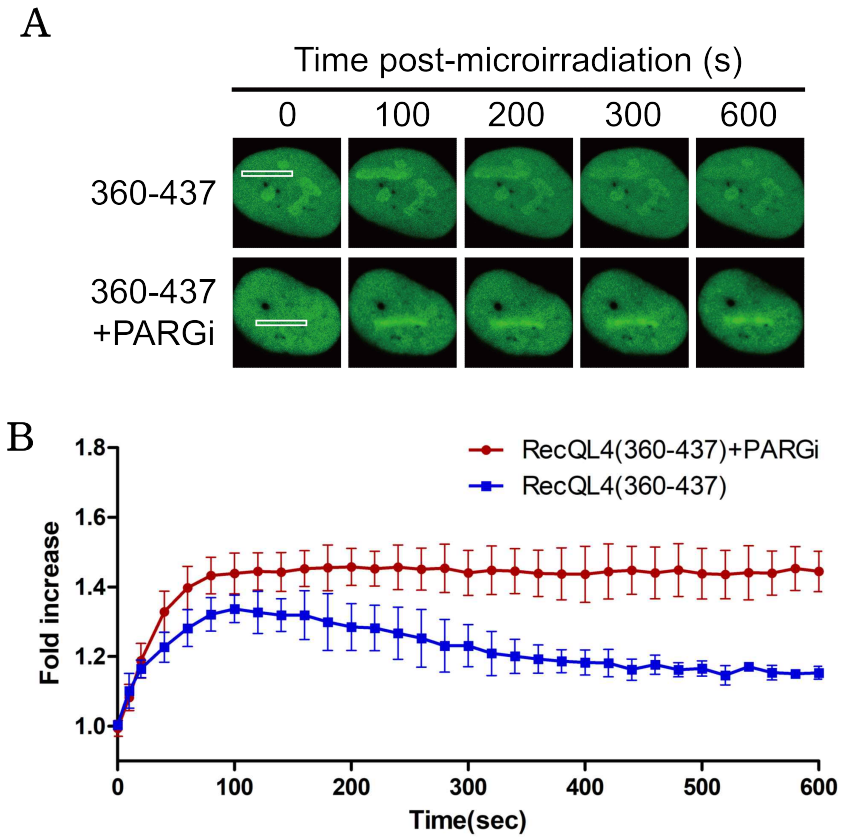
제 7 절 PARG 억제제가 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 미치는 영향

RecQL4는 PARP 활성 의존적으로 DNA 손상 부위에 결합하였다[그림 5]. PARP는 DNA의 손상 부위에서 폴리 ADP 라이보스(PAR)를 합성한다. PAR는 DNA 손상이 발생하면 관련 단백질에 일시적으로 첨가되었다가 poly(ADP-ribose) glycohydolase(PARG)와 같은 dePARylation 효소에 의해 빠르게 분해된다(Barkauskaite et al., 2015). RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 양상이 PARP 의존적이므로, 손상 부위에 결합 후 다시 해리되는 양상이 PAR의 제거에 의한 것일 가능성이 있다. 이러한 가설을 확인하기 위해 PARG 억제제(PDD000172273)를 처리하여 DNA 손상 후 생성된 PAR가 분해되지 않는 상황에서 RecQL4의 결합 양상을 확인하였다. 그 결과 PARG 억제제를 처리하였을 때, RecQ4가 DNA 손상 부위에 결합 후 해리되지 않고 측정 시간 동안 손상 부위에 계속 잔류하였다[그림 14]. 본 연구에서 확인한 RecQL4 DNA 손상 부위 결합 도메인 아미노산 360-437의 경우도 같은 결과가 관찰되었다[그림 15]. 이러한 결과는 DNA 손상 부위에서 합성된 PAR의 분해가 DNA 손상 부위에서 RecQL4의 해리를 유발하였음을 의미한다. 따라서 RecQL4가 DNA 손상 부위에 결합되고 해리되는데 PAR의 합성과 분해가 필요하다.



[그림 14] PARG 억제제 처리에 따른 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 양상

A. [그림 3]과 같은 방법으로 EGFP-RecQL4를 과발현 시킨 후, micro-irradiation을 조사하였다. Laser를 조사하기 1시간 전에 PARG 억제제(PDD00017273, 1 μM)를 처리하였다. 하얀색 사각형으로 표시된 영역이 micro-irradiation을 조사한 영역이다. 10초 간격으로 이미지를 획득하였으며, 그림은 제시된 시간에 획득한 이미지를 대표로 나타낸 것이다. RecQL4 FL, RecQL4의 전체 영역(Full length)을 가지는 야생형 RecQL4; PARGi, PARG 억제제. **B.** A의 시간에 따른 형광 강도를 20초 간격으로 나타낸 그래프로, micro-irradiation을 조사한 영역의 형광 강도 측정값을 micro-irradiation을 조사하지 않은 2개 영역의 형광 강도 측정값의 평균값으로 나눈 것이다. 그래프는 15개의 샘플에 대한 평균값을 나타낸 것이고, Error bar는 표준편차이다.



[그림 15] PARG 억제제 처리에 따른 DNA 손상 부위 결합 도메인의 DNA 손상 부위 결합 양상

A. [그림 1]과 같은 방법으로 EGFP-RecQL4(360-437)를 과발현 시킨 후, micro-irradiation을 조사하였다. Laser를 조사하기 1시간 전에 PARG 억제제(PDD00017273, 1 μM)를 처리하였다. 하얀색 사각형으로 표시된 영역이 micro-irradiation을 조사한 영역이다. 10초 간격으로 이미지를 획득하였으며, 그림은 제시된 시간에 획득한 이미지를 대표로 나타낸 것이다. RecQL(360-437), RecQL4의 360번 아미노산부터 437번 아미노산까지의 영역을 포함하는 변이형; PARGi, PARG 억제제. **B.** A에서 시간에 따른 형광 강도를 20초 간격으로 나타낸 그래프로, micro-irradiation을 조사한 영역의 형광 강도 측정값을 micro-irradiation을 조사하지 않은 2개 영역의 형광 강도 측정값의 평균값으로 나눈 것이다. 그래프는 15개의 샘플에 대한 평균값을 나타낸 것이고, Error bar는 표준편차이다.

제 4 장 논의

본 연구에서는 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합 특성을 밝혀 DNA 손상 수선 반응에서 RecQL4의 작용 기전을 밝혀내기 위한 연구 방향을 제안하고자 하였다. RecQL4는 초기에 DNA 손상 부위에 결합되었다가 해리되는 양상을 보인다[그림 1]. 이 결과는 RecQL4가 DNA 손상 수선 반응에 있어 초기에 관여하는 단백질들에 의해 영향을 받거나 혹은 영향을 줄 수 있음을 의미한다. RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 Helicase 도메인과 Helicase 활성, DNA 손상 수선 반응의 중요 단백질은 ATM과 DNA-PK의 활성은 필요하지 않았다[그림 5]. 또한 ATM과 DNA-PK의 활성을 동시에 억제하여 γH2AX의 형성을 제한하였을 때도 RecQL4는 DNA 손상 부위에 결합이 가능하였고, 결합 양상도 억제제를 처리하지 않았을 때와 유사하였다[그림 5]. 하지만 PARP 억제제를 처리 하였을 때 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합은 크게 억제되었으며[그림 5], 이는 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 PARP의 활성이 필요하다는 것을 의미한다. 따라서 RecQL4는 PARP의 기질이거나 PARP의 기질이 되는 단백질과 상호작용할 것이다. 또한 RecQL4의 아미노산 360-437의 영역만으로도 DNA 손상 부위의 결합이 가능하였고[그림 11], 이 영역도 PARP 억제제에 의해 DNA 손상 부위 결합이 억제되었다[그림 13], 이 결과는 아미노산 360-437의 영역에 PARP에 의해 폴리 ADP-라이보실화되는 부분 또는 폴리 ADP 라이보스를 인지하여 결합하는 도메인이 존재하거나, PARP의 기질이 되는 중개 단백질과의 상호작용에 중요한 도메인이 존재할 가능성을 암시한다. Woo 등(2006)은 RecQL4의 C-말단 영역(833-1208)이 PARP-1과 상호작용하며, 이 영역이 *in vitro*에서 폴리 ADP 라이보실화가 일어남을 증명하였다. 그러나 본 연구에서는 C-말단 영역(833-1208)이 없어도 RecQL4가 DNA 손상 부위에 결합할 수 있음을 확인하였고, 이는 C-말단의 폴리 ADP 라이보실화는 DNA 손상 부위에 결합에는 중요하지 않으며, RecQL4는 PARP-1과 물리적인 상호작용 없이 DNA 손상 부위 결합이 가능함을 알려준다. 게다가 Woo 등(2006)

의 연구는 RecQL4의 C-말단(833-1208) 영역만 폴리 ADP 라이보실화가 되는지 확인하였으므로, 본 연구에서 탐색한 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 중요한 영역인 아미노산 360-437에서 폴리 ADP 라이보실화가 일어날 가능성은 여전히 존재한다.

본 연구에서는 다양한 GFP 융합 RecQL4 변이형들을 이용하여 아미노산 360-437 영역이 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 중요한 영역임을 확인하였다. 이 과정에서 CD2(aa 1-492), CD3(aa 1-835), ND3(aa 241-1208) 영역이 DNA 손상 부위 결합 가능함을 확인하였고, 이 결과를 바탕으로 추가 실험을 통해 aa 241-437, aa 241-492, aa 224-437, aa 224-492, aa 360-437, aa 360-492 영역 모두 DNA 손상 부위 결합 가능함을 확인하였다. 그러나 CD2와 CD3 만이 RecQL4 야생형의 DNA 손상 부위 결합 양상이 유사하였고, ND3와 RecQL4의 중간 부분만을 가지는 나머지 영역들은 형광 강도의 최댓값이 야생형 RecQL4 보다 낮게 관찰되었다[그림 12]. 이러한 결과는 CD2와 CD3만이 가지고 있는 N-말단의 특성 때문일 것으로 생각된다. RecQL4의 N-말단에 있는 Sld homology에는 DNA 결합 모티프를 가지고 있으며(Sangrithi et al., 2005; Marino et al., 2013), 이 영역은 특히 guanine quadruplex(G4) DNA에 대한 친화력이 높다고 알려져 있다(Keller et al., 2014). 따라서 ND3와 RecQL4 중간 영역만 가지는 변이형들은 DNA 결합 모티프를 가지는 N-말단이 없기 때문에 야생형 RecQL4, CD2, CD3 보다 형광 강도의 최댓값이 낮게 나타났을 것으로 추측된다.

RecQL4의 DNA 손상 부위의 결합과 해리는 폴리 ADP-라이보스(PAR) 의존적이며[그림 5, 14], 또한 RecQL4의 아미노산 360-437 영역의 DNA 손상 부위의 결합과 해리도 PAR 의존적이다[그림 13, 15]. 특히 본 연구는 PAR가 제거되지 않으면, RecQL4가 DNA 손상 부위에서 해리되지 않음을 확인하여 RecQL4의 정상적인 DNA 손상 부위 결합 양상에 PAR의 형성 뿐 아니라 PAR의 제거도 중요함을 밝혔다는 점에서 기존 연구들과 큰 차별성을 갖는다. 게다가 PAR의 제거와 RecQL4의 DNA 손상 부위 해리의 관련성은 DNA 손상 수선 반응에서 PAR 제거

의 중요성을 시사한다. DNA 손상 수선 기구가 직접 손상 부위를 인지하고 수선하기 위해서 DNA 손상 후 추가된 PAR는 제거되어야 하며, 그렇지 않다면 PAR에 의해 DNA 손상 부위에 모인 손상 회복 기구들이 손상 부위에 묶여 DNA 수선을 위한 이동이 제한될 것이다(Fisher et al., 2007). 따라서 DNA 수선을 용이하게 함에 있어 DNA 손상 부위, 또는 관련 단백질의 폴리 ADP-라이보실화 후 PAR의 제거는 중요하다. 쥐에서 PARG의 제거가 세포 사멸과 배아 치사를 유발한다는 연구 결과(Koh et al., 2004)는 PARG에 의한 PAR의 제거의 중요성을 확인시켜준다. RecQL4는 DNA 이중 가닥 손상 반응에 있어 중요한 역할을 하며(Abe et al., 2011; Lu et al., 2016), 본 연구실에서도 RecQL4의 발현이 억제된 세포에서 MRN 복합체의 안정성이 감소하는 것을 확인하였다. 하지만 DNA 손상 부위에서 RecQL4의 구체적인 역할과 정확한 기작은 밝혀지지 않았다. 본 연구 결과들을 종합하여, DNA 손상 수선 반응에서 RecQL4의 작용 기전을 밝혀내기 위한 연구 방향을 다음과 같이 제안한다.

첫째, RecQL4 360-437 영역의 폴리 ADP 라이보실화 여부를 확인하는 연구가 필요하다.

둘째, RecQL4 360-437 영역의 폴리 ADP 라이보스를 결합 가능성을 확인하는 연구가 필요하다.

셋째, DNA 손상 반응 초기에 관여하며 폴리 ADP-라이보실화되거나 이를 인지하는 단백질 중 RecQL4와 상호작용을 하는 단백질들을 탐색하는 연구가 필요하다.

본 연구는 RecQL4의 DNA 손상 부위 결합에 중요한 도메인 탐색하였고, 손상 부위의 결합과 해리에 있어 PAR의 합성과 분해가 중요함을 밝혀 DNA 손상 수선 반응에서 RecQL4의 작용 기전 연구를 위한 방향을 제안하였다는 점에서 의의가 있다. 본 연구와 관련한 추가 연구 진행을 통해 DNA 손상 부위에서 RecQL4의 기능과 역할을 이해할 수 있을 것이라 생각된다.

참 고 문 헌

Aleksandrov, R., Dotchev, A., Poser, I., Krastev, D., Georgiev, G., Panova, G., Stoynov, S. S. (2018). Protein Dynamics in Complex DNA Lesions. *Molecular Cell, 69*(6), 1046-1061.

Alvarez-Gonzalez, R., & Jacobson, M. K. (1987). Characterization of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and in vivo. *Biochemistry, 26*(11), 3218-3224.

Aparicio, T., Baer, R., & Gautier, J. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair, 19*, 169-175.

Bai, P. (2015). Biology of poly (ADP-ribose) polymerases: the factotums of cell maintenance. *Molecular Cell, 58*(6), 947-958.

Barkauskaite, E., Jankevicius, G., & Ahel, I. (2015). Structures and mechanisms of enzymes employed in the synthesis and degradation of PARP-dependent protein ADP-ribosylation. *Molecular Cell, 58*(6), 935-946.

Brosh Jr, R. M., & Bohr, V. A. (2007). Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases. *Nucleic Acids Research, 35*(22), 7527-7544.

Burkle, A. (2005). Poly (ADP-ribose): the most elaborate metabolite of NAD^+. *FEBS Journal, 272*, 4576-4589.

Burks, L. M., Yin, J., & Plon, S. E. (2007). Nuclear import and retention domains in the amino terminus of RECQL4. *Gene, 391*(1-2), 26-38.

Capp, C., Wu, J., & Hsieh, T. (2009). Drosophila RecQ4 has a 3′-5′ DNA helicase activity that is essential for viability. *Journal of Biological Chemistry, 284*(45), 30845-30852.

Chaudhuri, A. R., & Nussenzweig, A. (2017). The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nature*

Reviews Molecular Cell Biology, 18(10), 610.

Croteau, D. L., Popuri, V., Opresko, P. L., & Bohr, V. A. (2014). Human RecQ helicases in DNA repair, recombination, and replication. *Annual Review of Biochemistry, 83*, 519-552.

Croteau, D. L., Rossi, M. L., Canugovi, C., Tian, J., Sykora, P., Ramamoorthy, M., Kasiviswanathan, R. (2012). RECQL4 localizes to mitochondria and preserves mitochondrial DNA integrity. *Aging Cell, 11*(3), 456-466.

Croteau, D. L., Singh, D. K., Hoh Ferrarelli, L., Lu, H., & Bohr, V. A. (2012). RECQL4 in genomic instability and aging. *Trends in Genet, 28*(12), 624-631.

De, S., Kumari, J., Mudgal, R., Modi, P., Gupta, S., Futami, K., Mohanty, D. (2012). RECQL4 is essential for the transport of p53 to mitochondria in normal human cells in the absence of exogenous stress. *Journal of Cell Science, 125*(10), 2509-2522.

Duan, S., Han, X., Akbari, M., Croteau, D. L., Rasmussen, L. J., & Bohr, V. A. (2020). Interaction between RECQL4 and OGG1 promotes repair of oxidative base lesion 8-oxoG and is regulated by SIRT1 deacetylase. *Nucleic Acids Research, 10*, 1093-1109.

Fang, H., Niu, K., Mo, D., Zhu, Y., Tan, Q., Wei, D., Balajee, A. S. (2018). RecQL4-Aurora B kinase axis is essential for cellular proliferation, cell cycle progression, and mitotic integrity. *Oncogenesis, 7*(9), 1-12.

Feng, X., & Koh, D. W. (2013). Roles of poly (ADP-ribose) glycohydrolase in DNA damage and apoptosis. *International Review of Cell and Molecular Biology, 304*, 227-281.

Ghosh, A. K., Rossi, M. L., Singh, D. K., Dunn, C., Ramamoorthy, M., Croteau, D. L., Bohr, V. A. (2012). RECQL4, the protein

mutated in Rothmund-Thomson syndrome, functions in telomere maintenance. *Journal of Biological Chemistry, 287*(1), 196-209.

Gupta, S., De, S., Srivastava, V., Hussain, M., Kumari, J., Muniyappa, K., & Sengupta, S. (2014). RECQL4 and p53 potentiate the activity of polymerase γ and maintain the integrity of the human mitochondrial genome. *Carcinogenesis, 35*(1), 34-45.

Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Molecular Cell, 28*(5), 739-745.

Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M., & Hottiger, M. O. (2006). Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 70*(3), 789-829.

Im, J.-S., Ki, S.-H., Farina, A., Jung, D.-S., Hurwitz, J., & Lee, J.-K. (2009). Assembly of the Cdc45-Mcm2-7-GINS complex in human cells requires the Ctf4/And-1, RecQL4, and Mcm10 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 106*(37), 15628-15632.

Kaiser, S., Sauer, F., & Kisker, C. (2017). The structural and functional characterization of human RecQ4 reveals insights into its helicase mechanism. *Nature Communications, 8*(1), 1-12.

Kass, E. M., & Jasin, M. (2010). Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Letters, 584*(17), 3703-3708.

Keijzers, G., Maynard, S., Shamanna, R. A., Rasmussen, L. J., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2014). The role of RecQ helicases in non-homologous end-joining. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 49*(6), 463-472.

Kim, J. J., Kumbhar, R., Gong, F., & Miller, K. M. (2019). In Time and Space: Laser Microirradiation and the DNA Damage Response. *DNA Repair* (pp. 61-74). New York, NY: Humana.

Kitao, S., Ohsugi, I., Ichikawa, K., Goto, M., Furuichi, Y., & Shimamoto, A. (1998). Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: biological significance of multiple species in higher eukaryotes. *Genomics, 54*(3), 443-452.

Kohzaki, M., Chiourea, M., Versini, G., Adachi, N., Takeda, S., Gagos, S., & Halazonetis, T. D. (2012). The helicase domain and C-terminus of human RecQL4 facilitate replication elongation on DNA templates damaged by ionizing radiation. *Carcinogenesis, 33*(6), 1203-1210.

Kraus, W. L. (2015). PARPs and ADP-ribosylation: 50 years… and counting. *Molecular Cell, 58*(6), 902-910.

Kumari, J., Hussain, M., De, S., Chandra, S., Modi, P., Tikoo, S., Sengupta, S. (2016). Mitochondrial functions of RECQL4 are required for the prevention of aerobic glycolysis-dependent cell invasion. *Journal of Cell Science, 129*(7), 1312-1318.

Larsen, N. B., & Hickson, I. D. (2013). RecQ helicases: conserved guardians of genomic integrity. *DNA helicases and DNA motor proteins* (pp. 161-184). New York, NY: Springer

Leung, A. K. (2014). Poly (ADP-ribose): an organizer of cellular architecture. *Journal of Cell Biology, 205*(5), 613-619.

Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry, 79*, 181-211.

Lu, H., Fang, E., Sykora, P., Kulikowicz, T., Zhang, Y., Becker, K., Bohr, V. (2014). Senescence induced by RECQL4 dysfunction contributes to Rothmund‐Thomson syndrome features in

mice. *Cell Death & Disease, 5*(5), e1226

Lu, H., Shamanna, R. A., de Freitas, J. K., Okur, M., Khadka, P., Kulikowicz, T., Davis, A. J. (2017). Cell cycle-dependent phosphorylation regulates RECQL4 pathway choice and ubiquitination in DNA double-strand break repair. *Nature Communications, 8*(1), 1-14.

Lu, H., Shamanna, R. A., Keijzers, G., Anand, R., Rasmussen, L. J., Cejka, P., Bohr, V. A. (2016). RECQL4 promotes DNA end resection in repair of DNA double-strand breaks. *Cell Reports, 16*(1), 161-173.

Lu, L., Jin, W., & Wang, L. L. (2017). Aging in Rothmund-Thomson syndrome and related RECQL4 genetic disorders. *Ageing Research Reviews, 33*, 30-35.

Macris, M. A., Krejci, L., Bussen, W., Shimamoto, A., & Sung, P. (2006). Biochemical characterization of the RECQ4 protein, mutated in Rothmund-Thomson syndrome. *DNA Repair, 5*(2), 172-180.

Marino, F., Vindigni, A., & Onesti, S. (2013). Bioinformatic analysis of RecQ4 helicases reveals the presence of a RQC domain and a Zn knuckle. *Biophysical Chemistry, 177*, 34-39.

Mazón, G., Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2010). SnapShot: Homologous recombination in DNA double-strand break repair. *Cell, 142*(4), 641-648.

Mojumdar, A., De March, M., Marino, F., & Onesti, S. (2017). The human RecQ4 helicase contains a functional RecQ C-terminal region (RQC) that is essential for activity. *Journal of Biological Chemistry, 292*(10), 4176-4184.

Mortusewicz, O., Fouquerel, E., Ame, J.-C., Leonhardt, H., & Schreiber, V. (2011). PARG is recruited to DNA damage sites

through poly (ADP-ribose)-and PCNA-dependent mechanisms. *Nucleic Acids Research, 39*(12), 5045-5056.

Neal, J. A., & Meek, K. (2011). Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 711*(1-2), 73-86.

Rossi, M. L., Ghosh, A. K., Kulikowicz, T., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2010). Conserved helicase domain of human RecQ4 is required for strand annealing-independent DNA unwinding. *DNA Repair, 9*(7), 796-804.

Sangrithi, M. N., Bernal, J. A., Madine, M., Philpott, A., Lee, J., Dunphy, W. G., & Venkitaraman, A. R. (2005). Initiation of DNA replication requires the RECQL4 protein mutated in Rothmund-Thomson syndrome. *Cell, 121*(6), 887-898.

Shamanna, R. A., Singh, D. K., Lu, H., Mirey, G., Keijzers, G., Salles, B., Bohr, V. A. (2014). RECQ helicase RECQL4 participates in non-homologous end joining and interacts with the Ku complex. *Carcinogenesis, 35*(11), 2415-2424.

Shin, G., Jeong, D., Kim, H., Im, J. S., & Lee, J. K. (2019). RecQL4 tethering on the pre-replicative complex induces unscheduled origin activation and replication stress in human cells. *Journal of Biological Chemistry, 294*(44), 16255-16265.

Siitonen, H. A., Sotkasiira, J., Biervliet, M., Benmansour, A., Capri, Y., Cormier-Daire, V., Kestila, M. (2009). The mutation spectrum in RECQL4 diseases. *European Journal of Human Genetics, 17*(2), 151-158.

Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Löbrich, M., & Jeggo, P. A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation.

Cancer Research, 64(7), 2390-2396.

Suwaki, N., Klare, K., & Tarsounas, M. (2011). RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Cell & Developmental Biology, 22*(8), 898-905

Suzuki, T., Kohno, T., & Ishimi, Y. (2009). DNA helicase activity in purified human RECQL4 protein. *Journal of Biochemistry, 146*(3), 327-335.

Symington, L. S. (2014). End resection at double-strand breaks: mechanism and regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 6*(8), a016436

Teloni, F., Altmeyer, M. (2015). Readers of poly (ADP-ribose): designed to be fit for purpose. *Nucleic Acids Research, 44*(3), 993-1006.

Vyas, S., Matic, I., Uchima, L., Rood, J., Zaja, R., Hay, R. T., Chang, P. (2014). Family-wide analysis of poly (ADP-ribose) polymerase activity. *Nature Communications, 5*(1), 1-13.

Walser, F., Mulder, M. P., Bragantini, B., Burger, S., Gubser, T., Gatti, M., Neri, D. (2020). Ubiquitin Phosphorylation at Thr12 Modulates the DNA Damage Response. *Molecular Cell, 80*(3), 423-436.

Wang, J. T., Xu, X., Alontaga, A. Y., Chen, Y., & Liu, Y. (2014). Impaired p32 regulation caused by the lymphoma-prone RECQ4 mutation drives mitochondrial dysfunction. *Cell Reports, 7*(3), 848-858.

Wei, H., & Yu, X. (2016). Functions of PARylation in DNA damage repair pathways. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 14*(3), 131-139.

Woo, L. L., Futami, K., Shimamoto, A., Furuichi, Y., & Frank, K. M. (2006). The Rothmund-Thomson gene product RECQL4

localizes to the nucleolus in response to oxidative stress. *Exp Cell Res, 312*(17), 3443-3457.

Yin, J., Kwon, Y. T., Varshavsky, A., & Wang, W. (2004). RECQL4, mutated in the Rothmund-Thomson and RAPADILINO syndromes, interacts with ubiquitin ligases UBR1 and UBR2 of the N-end rule pathway. *Human Molecular Genetics, 13*(20), 2421-2430.

Abstract

Characterization of RecQL4 recruitment on DNA damage site

Gyungmin Kim
Biology Major
Department of Science Education
The Graduate School
Seoul National University

Rothmund - Thomson syndrome(RTS) is an autosomal recessive hereditary disorder, which is characterized by skeletal abnormalities, genomic instability, osteosarcomas and predisposition to malignant tumors. The disease is associated with mutation in RECQL4 gene, a member of the human RecQ helicases. RecQL4 was found to be required for DNA double-strand break(DSB) response, but the precise role of RecQL4 in DSB response pathways is largely unknown.

Here, to understanding the role of RecQL4 in DSB response, I investigated how RecQL4 is recruit to the DNA damage site. For this purpose, I created truncated RecQL4 proteins which are fused to GFP.

After that I confirmed the RECQL4 domain responsible for its localization on DSB sites and measured the kinetics of recruitment of truncated RecQL4 proteins to laser-induced DNA damage sites in U2OS cells. As a result, I identified that N-terminal domain located in front of helicase domain is required for recruitment of RecQL4 to the DSB site. Futhermore, the C-terminal domain interacting with poly(ADP-ribose) polymerase 1(PARP-1) was unnecessary for recruitment of RecQL4 to the DSB site, but one thing to consider is that RecQL4 was not recruited to the damage site when PARP inhibitor was treated. Taken together, the results suggest that the poly(ADP-ribosylation) activity of PARP is required for RecQL4 recruitment to the DSB site rather than physical interaction with PARP. In addition, it was found that the synthesis and degradation of poly(ADP-ribose) was important for rectruitment and disssociation of RecQL4 into the DNA damage site through PARG inhibitor treatment.

keywords : RecQL4, DNA repair, DNA damage response, DNA damage site recruitment
Student Number : 2019-28744