

## Zárójelentés (OTKA T043354)

Kutatási project: *Az UV-sugárzás által károsított DNS Rad6 ubiquitin-konjugáló enzim által irányított, mutációt okozó, illetve hibamentes replikációja Saccharomyces cerevisiae-ban*

Témavezető: Haracska Lajos

Kutatási célunk az volt, hogy mélyebben megismerjük a károsodott DNS replikációja során az eukarióta sejtekben lezajló molekuláris eseményeket és feltárjuk a mutációk kialakulásának a gyakoriságát befolyásoló mechanizmusok egy részét. Kutatásainkat az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) modellélőlyre alapoztuk, melyben mások és saját kutatásaink is a *RAD6*, *RAD18*, *MMS2*, *UBC13*, *RAD5*, *RAD30*, *REV1*, *REV3*, és *REV7* gének szerepét a károsodott DNS replikációjában és a mutagenézisben már korábban bizonyították. Elsősorban biokémiai és élesztő genetikai módszerek segítségével terveztük a fenti gének fehérjetermékei közötti funkcionális és fizikai kapcsolatokat megtalálni és szerepüket a károsodott DNS replikációjában meghatározni.

A fenti gének mutációit hordozó élesztőtörzsek episztázis analízise azt mutatta, hogy három különböző úton képesek az UV-károsodott DNS replikációját befolyásolni: 1. Mutációt generálva (*REV1*, *REV3*, *REV7* gének); 2. Hibamentes átírást biztosítva DNS polimeráz segítségével (*RAD30* gén); 3. Hibamentes átírást biztosítva, de specifikus DNS polimeráz nélkül (*RAD5*, *MMS2*, *UBC13* gének). A *RAD6* és *RAD18* gének működése mindhárom útvonalhoz elengedhetetlennek bizonyult.

Az OTKA-által támogatott kutatómunkánk során sikerült rekonstruálnunk egy replikációs fehérje, a PCNA, monoubiquitinálását a Rad6-Rad18 ubiquitin konjugáló komplex által katalizált reakcióban. Ez lehetőséget nyitott, hogy megvizsgáljuk az ubiquitinált PCNA hatását a DNS polimerázok hibaátíró aktivitására. Továbbá, sikerült kimutatnunk, hogy a Rad5 fizikailag stabil komplexet képez a Rad6-Rad18 és Mms2-Ubc13 komplexekkel és az így kialakult több-alegységes ubiquitin ligáz képes

poliubiquitinálni a már monoubiquitinált PCNA-t. Kimutattuk azt is, hogy a Rev1 fehérje komplexet képez a Rev7 fehérjével, melynek fontos szerepet tulajdonítunk a mutagenezisben.

Eredményeink új tudományos irányvonalakat is megalapoztak, melyek jó alapot jelentenek későbbi tudományos projektek elindításához. Sikerült az élesztő Rad5 replikációs fehérje és az Apn2 DNS reparációs fehérjék emberi homológjait azonosítanunk. Az új eredményekre alapozva már folyamatban vannak az emberi SHPRH tumor szuppresszor (élesztő Rad5 homológ) és Ape2 fehérje (élesztő Apn2 homológ) szerepének a további felderítését célzó kísérleteink, melyek reményeink szerint közelebb visznek majd a károsodott DNS replikációjának megértéséhez.

***Kutatási eredményeink részletes kifejtése az OTKA pályázatban megjelölt főbb kutatási célok alapján:***

1. *A Rad18, Ubc13, Rev1, és Rad5 fehérjékkel kölcsönható fehérjék azonosítása.*

A Rad18, Ubc13, Rev1, és Rad5 fehérjék új kölcsönható fehérje partnereinek azonosításához két különböző kísérleti megközelítést alkalmaztunk. Az egyik a tandem-affinitás kromatográfia (TAP) a másik az élesztő két-hibrid módszer.

A TAP módszerhez elsőként speciális élesztő törzseket állítottunk elő homológ rekombináció segítségével, melyek a Rad18, Ubc13, Rev1, és a Rad5 fehérjéket kettős affinitás jelölve, ProtA és calmodulin-kötő-doménnel fúzióban termelik. Ezt követően, ezen élesztőtörzsekből készített teljes fehérje-extraktumokból elsőként IgG-Sepharose majd calmodulin affinitás oszlopokon tisztítottuk a TAP-jelölt fehérjét és a vele interakcióba lépő más fehérjéket. A tisztított minták új komponenseinek azonosítását tömegspektroszkópiás analízissel illetve specifikus ellenanyagokkal végzett Western-blott kísérletekkel végeztük. A módszer segítségével sikerült kimutatnunk, hogy a Rad18, Ubc13, és a Rad5 fehérjék egymással kölcsönhatva egy meglehetősen stabil fehérje-komplexet alkotnak. Ezen kívül, egy teljesen új fehérjét is azonosítottunk, mely csak

DNS károsító hatásra lép kölcsönhatásba a Rad5 fehérjével. Az új RIP (Rad5 Interacting Protein) fehérje biokémiai és genetikai analízise folyamatban van. A Rev1 és a Rev7 fehérjék közötti fizikai kölcsönhatást is sikerült kimutatnunk. A Rev1 fehérje különböző szakaszait kiejtettük és pontmutáns formáit is tisztítottuk, melyek segítségével térképeztük a Rev1-Rev7 interakciót biztosító fehérje-motívumot.

Az élesztő két-hibrid kísérlet során a Rad18 és Ubc13 fehérjéket csaliként használva élesztő két-hibrid könyvtár szűrését végeztük. Mindkét fehérje kölcsönható partnereként a Rad5 fehérjét azonosítottuk, mely kísérleti eredmény tovább erősítette a fentiekben részletezett TAP-tisztítás során azonosított Rad5-Rad18 és Rad5-Ubc13 fehérje-fehérje kölcsönhatások valóságát. A Rev1 és Rev7 fehérjék közötti kölcsönhatást is sikerült élesztő két-hibrid módszerrel megerősítenünk.

2. *Az UV-sugárzással károsított DNS replikációjában szerepet játszó RAD5 gén genetikai analízise és fehérjetermékének biokémiai vizsgálata.*

A Rad5 fehérjében azonosítható egy RING és egy SWI/SNF fehérjemotívum is, melyekről kimutattuk, hogy a Rad5 fehérje ubiquitin-ligáz illetve ATPase aktivitásaiért felelősek. Célunk az volt, hogy meghatározzuk a Rad5 ubiquitin-ligáz, illetve ATPase aktivitásának szerepét a károsított DNS replikációjában. Elsőként a Rad5 fehérje fenti két aktivitását kívántuk szelektíven inaktíválni, melyhez a Rad5 RING és SWI/SNF fehérjemotívumaiba pontmutációkat szerkesztettünk. A pontmutációk hatását élesztő genetikai módszerek (episztázis-analízis és mutációs frekvencia mérés) segítségével vizsgáltuk. Kísérleteink azt mutatták, hogy a fenti mutációkat hordozó élesztő törzsek érzékenyekké váltak UV-sugárzásra és mind a Rad5 ATPase mutáns mind a RING mutáns nagymértékű zavart mutatott a károsított DNS kettőződésében. Kísérleteinkből azt következtettük, hogy a Rad5 ubiquitin ligáz és ATPase aktivitása is elengedhetetlen a károsított DNS hibamentes replikációjához.

A Rad5 cDNS-ét élesztő expressziós plazmidba klónoztuk, melynek segítségével sikerült a Rad5 fehérjét homogenitásig tisztítanunk. Jelenleg biokémia vizsgálatokat végzünk, melyek célja a Rad5 fehérje ubiquitin-ligáz és ATPase aktivitásának a jellemzése és molekuláris szerepének a felderítése a károsított DNS replikációjában.

3. *A Rad6-Rad18, illetve Mms2-Ubc13 enzimek által katalizált ubiquitinálási reakciók szubsztrátjainak azonosítása.*

Célunk a Rad6-Rad18 ubiquitináló komplex szubsztrátfehérjéinek azonosítása volt. Feltételeztük, hogy a Rad6-Rad18 enzim szubsztrátjait a Rad6-Rad18 episztázis csoportba térképeződő gének fehérjetermékei között találjuk majd meg, melyeket a DNS reparációs gének korábbi episztázis analízise már azonosított. Elsőként egy *in vitro* ubiquitinálási rendszert építettünk fel. Ehhez tisztítottuk az Uba1 ubiquitin aktiváló, a Rad6 ubiquitin konjugáló, és a Rad18 ubiquitin-ligáz enzimeket, illetve az összes ismert Rad6-Rad18 csoportba tartozó fehérjét élesztő expressziós rendszer segítségével. Ezek után ubiquitin, Uba1, Rad6-Rad18 enzimekkel végzett *in vitro* ubiquitinálási reakciókban teszteltük az egyes potenciális szubsztrátfehérjéket. Kísérleti eredményeink azt mutatták, hogy a Rad6-Rad18 enzim ubiquitinálja a PCNA replikációs fehérjét és a Rad5-fehérjét is. Lényegesnek gondoljuk, hogy a Rad6 ubiquitin-konjugáló enzim önmagában nem képes sem a PCNA-t sem a Rad5-öt ubiquitinálni és pozitív reakcióhoz feltétlenül szükség van a Rad18 ubiquitin-ligáz jelenlétére. Sikerült kimutatnunk, hogy a PCNA csak DNS kötött formában ubiquitinálódik, mely azt sugallja, hogy a PCNA ubiquitin módosításának a DNS károsodásnál megakadt replikációs villában van jelentősége. A PCNA-ról már kimutatták, hogy *in vivo* is szubsztrátja a Rad6-Rad18 enzimnek míg az ubiquitinált Rad5 *in vivo* kimutatására már elkezdtek a vizsgálatokat. Sikerült azt is felfednünk, hogy a Rad5 ubiquitin-ligázként működve képes a monoubiquitinált PCNA további ubiquitinálását katalizálni melyhez az Mms2-Ubc13 ubiquitin-konjugáló enzim aktivitására is szükség van. Továbbá kimutattuk, hogy a Rad5 katalizálja önmaga többszörös ubiquitinálását. Úgy gondoljuk, hogy a fenti ubiquitinálási reakciók szabályozó szerepet töltenek be a hibamentes és mutációt generáló replikációs utak aktiválásában és ezáltal a mutációs események gyakoriságának szabályozásában. Jelenlegi kísérleteinkkel ezt a feltételezést teszteljük.

4. Az UV-sugárzással károsított DNS mutációkat előidéző, illetve hibamentes replikációjának *in vitro* rekonstruálása.

A károsított DNS hibamentes, illetve mutációt előidéző replikációját tisztított fehérjekomponensek segítségével kívántuk rekonstruálni. A kísérlet fő célja annak megvizsgálása volt, hogy az ubiquitinált PCNA képes-e a traszléziós szintézist biztosító DNS polimerázokkal kölcsönhatni és így a károsodott DNS replikációját elősegíteni. Elsőként különböző DNS hibákat, mint pl. abázikus hely, T-T dimer, és 8-oxoG tartalmazó DNS szubsztrátokat készítettünk. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy különböző DNS polimerázok mint pl. Poléta és Poldelta milyen mértékben képesek a károsított DNS átírására *in vitro* és különböző faktorokat adva a reakcióhoz ez hogyan módosul. Sikerült kimutatnunk, hogy a monoubiquitinált PCNA képes a polimeráz delta és polimeráz éta aktiválására, illetve a RPA replikációs fehérje gátló hatást fejt ki a DNS hibák átírására képes polimerázokra.