

Zárójelentés (OTKA 61921)

Kutatási projekt: *A károsodott DNS replikációjának mechanizmusa és szabályozása: a mutagenesis és karcinogenesis háttere*

Témavezető: Haracska Lajos

A károsított DNS replikációja komoly kihívást jelent a sejt számára mivel a replikációs polimeráz gyakran nem képes a károsodott bázissal szemben nukleotid beépítésre. Ennek következtében a károsított bázishoz érve a DNS szintézis megakadhat, amely a sejt halálához vezethet. Ennek elkerülésére az evolúció során ún. DNS hibatoleráló mechanizmusok fejlődtek ki. Ennek egyik formája a transzléziós DNS szintézis, melynek során a megakadt replikációs polimerázt hibaátírásra specializálódott transzléziós DNS polimerázok váltják le. Ezek a specializálódott DNS polimerázok flexibilis aktív centrumuknak köszönhetően képesek a károsodással szemben is szintézisre. Egy alternatív lehetőség a DNS hibák átírására az ún. posztreplikációs reparáció, amely a sejtek S-fázisának végén a DNS hibákkal szemben kialakult réseket foltozza be. A posztreplikációs reparáció valószínűsíthetően nem speciális DNS polimeráz közreműködésével történő direkt hibaátírás hanem mintaszál-váltás eredménye. A mintaszál-váltás során az újonnan szintetizálódott testvér szálra történő váltással azt mintaként használva feltételezhető a DNS szintézis. Ezt a modellt már több mint három évtizede felállították, de kísérletes bizonyítékokkal még nem sikerült megerősíteni.

Kutatási projektünk fő célja az volt, hogy (i) kísérletes bizonyítékokkal támasszuk alá vagy cáfoljuk a posztreplikációs reparációra felállított templátváltáson alapuló modellt; (ii) biokémiailag jellemezzük az élesztő posztreplikációs reparációjának kulcsszereplőjét, a Rad5-fehérjét; (iii) azonosítsuk és jellemezzük az élesztő Rad5 fehérje human homológját és bizonyítsuk annak szerepét a posztreplikációs reparációban.

Eredményeink alapján sikerült (i) biokémiai bizonyítékokkal alátámasztani, hogy a posztreplikációs reparáció templátváltáson keresztül az ún. "csirkeláb" DNS-intermediér struktúrán át valósul meg; (ii) a Rad5 fehérje egy új típusú DNS helikáz-szerű enzimaktivitását felfedezni, mely DNS struktúra-specifikusan megfordítja a replikációs villát; (iii) azonosítani a

human HLTF és SHPRH fehérjéket és bizonyítani róluk, hogy az élesztő Rad5-nek a funkcionális homológjai.

Befejezett kutatási projektünk eredményei alapot jelentenek további kutatási vonalak indítására is. A jövőben a projekt során azonosított a Rad5 fehérjével fizikai interakcióba lépő Def1 fehérje további részletes jellemzésére és a posztreplikációs reparációban betöltött potenciális szerepére kívánunk koncentrálni. Tervezzük az élesztő Rad5 homológjaként azonosított emberi HLTF fehérje részletes biokémia és sejtbiológiai jellemzését is.

Eredményeink közelebb visznek a sejt DNS hibatoleráló mechanizmusainak megértéséhez és további betekintést adnak a mutagenézis molekuláris szereplőinek működésébe.

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

I. Az élesztő Rad5 fehérjével fizikailag kölcsönható fehérjék azonosítása és jellemzése.

Homológ rekombináció segítségével létrehoztunk egy olyan élesztő törzset, mely saját promoterről tandem affinitás jelölt Rad5 fehérjét expresszál. Ebből az élesztő törzsből kiindulva végeztük a Rad5 fehérjekomplex tisztítását kettős affinitás kromatográfiával. Sikert értünk el, a Rad5 fehérjével stabil fizikai interakcióba lépő új fehérjét azonosítanunk, amely csak DNS károsító hatás következtében lépett kölcsönhatásba a Rad5-vel. A kölcsönható fehérjét tömegspektroszkópiás módszerrel a Def1 fehérjeként azonosítottuk. A Def1 fehérje kapcsolatát a Rad5-vel korábban még nem feltételezték. A *DEF1* jellemzéséhez létrehoztunk egy *def1Δ* élesztő törzset, melyet genetikai analízisnek vetettünk alá. A *def1* génkiütött élesztő nem letális, de jelentős növekedési rendellenességet mutat. A *def1Δ*-t kombináltuk más mutációkkal mint pl. *rad5Δ*, és a különböző DNS hibajavító utak egy-egy reprezentatív képviselőjével. A kettős mutánsokkal végzett episztázis analízisünk a *DEF1* gén regulátor szerepére enged következtetni és kapcsoló funkcióját vetíti fel a különböző DNS hibajavítási utak közötti választatokon.

Élesztő genetikai eredményeink szilárd alapot jelentenek egy új projekthez, amely a Def1 fehérje funkciójának pontosabb megértéséhez biokémiai elemzéssel kíván eljutni. Ehhez már klónoztuk a *DEF1* cDNS-t, majd elkészítettünk egy Def1 fehérjét a GST fehérjével fúzióban termelő élesztő vektort. A GST-Def1 fehérjét sikerült túltermelnünk élesztőben és homogenitással

kitisztítanunk. Szekvenciájából kiindulva a Def1 fehérje egy ún. CUE-motívumot tartalmaz, amely számos ubiquitin-kötő fehérjében megtalálható ubiquitin-kötő motívum. A Def1 fehérje biokémiai analizisét már elkezdtük. Előzetes vizsgálataink szerint a Def1 a DNS reparációban szerepet játszó enzimek ubiquitin-módosításokkal történő szabályozásában vehet részt.

II. A Rad5-függő reakcióút in vitro rekonstruálása tisztított fehérjék segítségével

Egyik fő célunk az élesztő Rad5-nek a károsodott DNS replikációjában betöltött szerepének a molekuláris jellemzése volt. Kimutattuk, hogy a Rad5 fehérje egy specifikus DNS helikáz aktivitással rendelkezik, amely képes a replikációs villa megfordítására. Ennek során a Rad5 elválasztja a két újonnan szintetizálódott szálát a minta szálaktól majd egymáshoz zárja a minta szálakat, és egymáshoz hibridizálja a két újonnan szintetizálódott szálát is. Az így kialakult csirkeláb-szerű visszafordított replikációs villában az újonnan szintetizálódott szál szolgálhat mintaként a DNS szintézishez, amely így biztosíthatja a replikációs villa DNS károsodáson történő hibamentes áthaladását. Kísérleteink során túltermeltük élesztőben és homogenitásig tisztítottuk az élesztő Rad5 vad típusú és Rad5ATPáz mutáns fehérjét. Ezt követően különböző replikációs-villa szerű DNS szubsztrátokat készítettünk, amelyeken a Rad5 DNS-kötő-, ATPáz, és DNS helikáz aktivitásait teszteltük. Megállapítottuk, hogy a Rad5 kétszálú DNS-függő ATPáz, amely ATP-hidrolízis kíséretében transzlokálódik a kétszálú DNS-en és eddig példa nélküli DNS helikáz aktivitással is rendelkezik, amely csirkeláb-szerű struktúrává alakítja a homológ replikációs villát.

Összegezve, a fenti kísérleti eredményeink jelentik az első biokémiai betekintést a Rad5 fehérje szerepére a DNS-károsodások hibamentes átírásában és a mutagenézis csökkentésében.

III. Az élesztő Rad5 human homológjának azonosítása és jellemzése

Az emberi HLTF és SHPRH fehérjék korábban tumor szuppresszorként kerültek leírása. A HLTF fehérje a vastagbélrákok mintegy negyven százalékában nem fejeződik ki a HLTF gén promoterének hipermetiláltságából adódóan. Az SHPRH gén a melanómák mintegy tíz százalékában hordoz pontmutációt. Aminosav sorrend szinten a HLTF és az SHPRH is mutat

bizonyos fokú homológiát az élesztő *RAD5* génnel, de funkcionális homológiájukat korábban még nem vizsgálták. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk vajon az emberi HLTF és SHPRH géneknek van-e szerepe az élesztő *RAD5*-höz hasonlóan a posztreplikációs hibajavításban. Azt találtuk, hogy az SHPRH nem, de a HLTF képes komplementálni *rad5Δ* mutáns UV-érzékenységét. *In vivo* és *in vitro* is sikerült kimutatnunk, hogy az élesztő Rad5-hoz hasonlóan mind a HLTF mind az SHPRH fizikailag képes az Mms2-Ubc13 fehérjekomplexhez kapcsolódni és egy több alegységes ubikvitin ligáz komplexet formálni, amely a PCNA replikációs fehérjét poliubikvitinálja. Ezek az eredmények bizonyítokot szolgálnak a Rad5 és a HLTF illetve SHPRH fehérjék funkcionális homológiájára.

Összegezve, eredményeink azt mutatják, hogy mind a HLTF mind az SHPRH gén a károsodott DNS hibamentes replikációjában vesz részt és így gátolja a mutagenezist. Ez a felfedezés magyarázatot szolgálhat a HLTF és az SHPRH tumor szuppresszor funkciójára.