

# A DNS-hibaelkerülő útvonalak szabályozásának genetikai vizsgálata

Doktori értekezés tézisei

**Gervai Judit Zsuzsanna**

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,  
Biológiai Doktori Iskola, Szerkezeti Biokémia Program



Doktori Iskola vezetője: Prof. Erdei Anna, D.Sc., egyetemi tanár

Programvezető: Prof. Kovács Mihály, D.Sc., egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Szüts Dávid, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi Kutatóközpont,  
Enzimológiai Intézet, Genomstabilitás kutatócsoport



Budapest

2017

## BEVEZETÉS

Az élő sejt zavartalan működéséhez nélkülözhetetlen az ép, sérülésmentes örökítő anyag. Ugyanakkor belső (endogén) és külső (exogén) tényezők hatására számos DNS-hiba keletkezhet, melyeknek köszönhetően sérülhet a DNS-szálak kölcsönhatása, torzulhat a DNS szerkezete. Sokszor – a hibajavító folyamatok hatékony működése ellenére is – a károsodás a DNS-ben marad, mely a replikáció megakadásához vezethet. Az ennek következtében összeomló replikációs villa kettősszálú DNS-törést (*double strand break*, DSB) okozhat, mely a sejtciklus leállítását és a genom instabilitását idézi elő (Cortez, 2015). A DNS-hibaelkerülő útvonalak lehetővé teszik, hogy a DNS-károsodás ellenére a replikáció továbbhaladjon, megakadályozva a DSB kialakulását, ezzel megőrizve a genom integritását. Ezek a folyamatok azonban nem minden esetben hibamentesek, mutációkat eredményezhetnek és betegségek kialakulásához is vezethetnek. Éppen ezért, a sejtproliferáció és a genomstabilitás egyensúlyának fenntartása érdekében létfontosságú a DNS-hibaelkerülő útvonalak precíz szabályozása, mely fehérjék sokaságának összehangolt működése által valósul meg. Három összetett folyamatot különböztetünk meg: a transzléziós szintézist (*translesion synthesis*, TLS), a templátváltást (*template switching*, TSw) és a homológ rekombinációt (*homologous recombination*, HR).

A DNS-hibaelkerülő folyamatok egyik kulcsfontosságú résztvevője a replikációhoz nélkülözhetetlen PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), mely poszttranszlációs módosulása révén tölti be szabályozó szerepét. A fehérje 164. pozíciójú lizin oldallánca ubikvitilációs és szumoilációs hely (Chen et al., 2011). A K164 pozícióban monoubikvitilált PCNA a TLS-t, míg a poliubikvitilált PCNA a TSw-t aktiválja. Míg a monoubikvitilált PCNA és annak funkciója széles körben és alaposan vizsgált élesztőtől humán sejtekig, addig a poliubikvitilált PCNA pontos szabályozó szerepe magasabb eukariótákban máig nem tisztázott.

A DNS-hibaelkerülő útvonalak másik fontos eleme a BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*), melynek feladata komplex. A homológia alapú DNS-hibajavító és hibaelkerülő útvonalak (pl. HR, TSw) egyik kulcsfontosságú enzime (Huen et al., 2010). A TLS-ben betöltött szerepe azonban az irodalmi adatok alapján ellentmondásos. Néhány kutatócsoport úgy gondolja, hogy a BRCA1 gátolja a TLS-t (Pathania et al., 2011; Xie et al., 2010), mások szerint viszont hozzájárul a PCNA ubikvitilációjához, ezáltal a transzléziós polimerázok DNS-hibához toborzásához (Tian et al., 2013).

## CÉLKITŰZÉSEK

A DNS-hibaelkerülő útvonalak alaposabb feltérképezése hozzájárul a mutációk keletkezésének megértéséhez és a gyógyászatban alkalmazva lehetővé teheti a daganatok kialakulásához vezető káros mutációk elkerülését. Számos kemoterápiás szer DNS-hibák előidézése révén fejt ki hatását. A károsodások átírásában, ezáltal a rezisztencia kialakulásában többek között a DNS-hibaelkerülő útvonalak is részt vesznek (Salehan and Morse, 2013). A szabályozásuk megismerésével potenciálisan megelőzhetjük a kemoterápiás szerek elleni rezisztencia kialakulását.

Doktori munkám során célul tűztem ki a poliubikvitilált PCNA, valamint a BRCA1 DNS-hibaelkerülő folyamatokban betöltött szabályozó szerepének tisztázását izogenikus DT40 sejtvonal modell rendszer segítségével.

Az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- A PCNA poliubikvitilációja szükséges-e különféle DNS-károsító ágensek (UV, MMS, ciszplatin) hatására keletkező léziók átírásához?
- A PCNA poszttranszlációs módosulása hogyan befolyásolja a spontán és az MMS által indukált mutagenezist?
- A BRCA1 részt vesz-e a DNS-hibaelkerülő folyamatok szabályozásában?
- Hogyan befolyásolja a BRCA1 a mutációs spektrumot?
- A TLS polimerázok és a PCNA poszttranszlációs módosulásai hozzájárulnak-e a BRCA1 fenotípusához?

## A KÍSÉRLETI MEGKÖZELÍTÉS ÉS A MODELL RENDSZER

Kérdéseink megválaszolásához izogenikus DT40 csirke B limfocita sejtvonalakat használtunk, melyekben könnyű a megcélzott gének egyes szakaszainak eltávolítása, ezáltal az egész gén kiütése. A DT40 további előnye, hogy a génállománya stabil, ezért alkalmas rövid és hosszútávú genetikai vizsgálatokra. Munkám során a laboratóriumunkban korábban előállított mutáns sejtvonalakat használtam fel, valamint újakat hoztam létre.

A mono- és poliubikvitilált PCNA hatásmechanizmusának vizsgálatához géntechnológiai módszerekkel különféle vad típusú és mutáns PCNA-ubikvitin fúziós konstrukciókat hoztam létre, melyeket stabilan, random integrációval juttattam a *PCNA*<sup>K164R</sup> sejtvonal genomjába.

A BRCA1 szerepének vizsgálatához kettősmutáns sejtvonalakat hoztam létre (a TLS-ben szerepet játszó fehérjék és a BRCA1 fehérje együttes mutációjával vagy hiányával), homológ rekombináción alapuló géncélzó technikával.

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- Molekuláris klónozással állítottam elő a PCNA-ubikvitin fúziós konstrukciókat.
- *In vitro* ubikvitilációs esszé segítségével vizsgáltam a PCNA-ubikvitin konstrukciók további ubikvitilációra való képességét.
- Áramlási citometriával és Western blot technikával ellenőriztem a PCNA-ubikvitin konstrukciók kifejeződési szintjét.
- Kolónia túlélési kísérlettel teszteltem a sejtvonalak különféle DNS-károsító szerekre való érzékenységét.
- Lézió tartalmú ingázó plazmid esszével nyomon követtem egy szintetikus előállított UV fototermék replikációját, különféle genetikai háttérű sejtvonalakban.
- Kétdimenziós sejtciklus analízis segítségével vizsgáltam az UV hatására bekövetkező sejtciklus változást.
- Immunfluoreszcens jelöléssel detektáltam a DSB és a replikációs villa megakadásának korai markerét, különféle genotípusú sejtvonalakban.
- Teljes genom szekvenálással elemeztem az egyes sejtvonalak spontán és DNS-károsító ágensek hatására kialakuló mutációs mintázatait.

## ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK (TÉZISEK)

1. Új genetikai modell kifejlesztése a mono- és poliubikvitilált PCNA egyértelmű elkülönítésére és vizsgálatára.
2. A PCNA poliubikvitilációja nem vesz részt az UV, az MMS és a ciszplatin hatására keletkező léziók átírásához DT40 sejtekben.
3. A PCNA poszttranszlációs módosításainak hiánya (PCNA<sup>K164R</sup>) csökkenti a spontán mutagenezist.
4. A monoubikvitilált PCNA által közvetített TLS hozzájárul az MMS léziók hibamentes átírásához.
5. A homológia alapú templátváltás rekombinációs fehérjék (BRCA1, XRCC3) közreműködésével, a PCNA poliubikvitilációjától független úton valósul meg.
6. A BRCA1 hiánya növeli a spontán és az MMS által indukált mutációk számát.
7. A PCNA K164R mutációja, valamint a POL $\eta$  hiánya a BRCA1 együttes hiányában nem csökkenti a spontán mutagenezist. A REV1 azonban részlegesen hozzájárul a BRCA1 hiányában bekövetkező magas mutációs ráta kialakulásához.

## ÖSSZEFOGLALÁS

DT40 csirke B limfocita sejtvonalon PCNA-ubikvitin fúziós konstrukciók expressziójával egy olyan modell rendszert fejlesztettem ki, mellyel genetikailag elkülönítve tanulmányozhatóak a PCNA mono- és poliubikvitilált formája által közvetített DNS-hibaelkerülő folyamatok. A rendszer segítségével igazoltam, hogy az UV, az MMS és a ciszplatin által okozott léziók átírásához a monoubikvitilált PCNA által aktivált TLS elegendő, a poliubikvitilált PCNA által közvetített TSw nem szükséges.

Kimutattam, hogy a PCNA<sup>K164R</sup> mutáns csökkenti a spontán mutagenezist, vagyis a PCNA poszttranszlációs módosulása hozzájárul az endogén faktorok hatására kialakuló léziók hibás átírásához. Az MMS által indukált mutagenezis a PCNA<sup>K164R</sup> jelenlétében nő, a PCNA<sup>K164R</sup>-Ub<sup>K63R</sup> konstrukció jelenlétében visszacsökken, tehát a monoubikvitilált PCNA által közvetített TLS hozzájárul az MMS által okozott léziók hibamentes elkerüléséhez.

Eredményeim arra utalnak, hogy a homológia alapú templátváltás rekombinációs fehérjék (BRCA1, XRCC3) közreműködésével, a PCNA poliubikvitilációjától független úton történik. A BRCA1 hiányában – a homológia alapú folyamatok drasztikus csökkenésének köszönhetően – megnő a spontán és az MMS által indukált mutagenezis. A fenotípus mögött rejlő mechanizmus felderítéséhez a TLS-ben szerepet játszó (PCNA<sup>K164R</sup>, REV1, POL $\eta$ )

gének és a BRCA1 kettősmutáns sejtvonalaiknak spontán mutációs mintázatát vizsgáltam. Bebizonyítottam, hogy míg a PCNA és a POL $\eta$  nem, addig a REV1 részlegesen hozzájárul a BRCA1 hiányában tapasztalt mutációk számának növekedéséhez.

Eredményeim hozzájárulnak a PCNA és a BRCA1 szabályozó szerepének alaposabb megértéséhez, és akár újfajta, személyre szabott daganat terápiás lehetőségek kiinduló pontja is lehet.

## **A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT PUBLIKÁCIÓK**

**Gervai, J.Z.**, Gálicza, J., Szeltner, Z., Zámorszky, J., and Szüts, D. (2017). A genetic study based on PCNA-ubiquitin fusions reveals no requirement for PCNA polyubiquitylation in DNA damage tolerance. *DNA Repair (Amst)* 54, 46-54.

Zámorszky, J., Szikriszt, B., **Gervai, J.Z.**, Pipek, O., Póti, A., Krzystanek, M., Ribli, D., Szalai-Gindl, J.M., Csabai, I., Szállási, Z., Swanton, C., Richardson, A.L., Szüts, D. (2017). Loss of BRCA1 or BRCA2 markedly increases the rate of base substitution mutagenesis and has distinct effects on genomic deletions. *Oncogene* 36, 746-755.

## **A DOLGOZAT TÉMÁJÁBAN SZÜLETETT KONFERENCIA KIVONATOK**

2017. **Gervai J.Z.**, Szüts D. (poszter) Monoubiquitylation is the only PCNA modification required for DNA damage tolerance. *6<sup>th</sup> EU-US Conference on Repair of endogenous DNA damage*, Udine, Olaszország
2016. Zámorszky, J., Szikriszt, B., **Gervai, J.Z.**, Pipek, O., Póti, A., Krzystanek, M., Ribli, D., Szalai-Gindl, J.M., Csabai, I., Szállási, Z., Swanton, C., Richardson, A.L., Szüts, D. (poszter) Markedly increased base substitution mutagenesis upon loss of BRCA1 or BRCA2 suggests a central role for these proteins in error-free replicative lesion bypass. *ICGEB meeting*, Trieszt, Olaszország
2016. Zámorszky, J., Szikriszt, B., **Gervai, J.Z.**, Pipek, O., Póti, A., Krzystanek, M., Ribli, D., Szalai-Gindl, J.M., Csabai, I., Szállási, Z., Swanton, C., Richardson, A.L., Szüts, D. (poszter) Loss of BRCA1 or BRCA2 markedly increases the rate of base substitution mutagenesis and has distinct effects on genomic deletions. *DNA repair workshop*, Smolenice, Szlovákia

2016. Zámorszky, J., Szikriszt, B., **Gervai, J.Z.**, Pipek, O., Póti, A., Krzystanek, M., Ribli, D., Szalai-Gindl, J.M., Csabai, I., Szállási, Z., Swanton, C., Richardson, A.L., Szüts, D. (poszter) Loss of BRCA1 or BRCA2 markedly increases the rate of base substitution mutagenesis and has distinct effects on genomic deletions. *Budapest Breast Think Tank*, Budapest, Magyarország
2015. **Gervai J.Z.**, Szüts D. (előadás) Study of DNA damage bypass mechanisms in DT40 cells. *6<sup>th</sup> Central European DNA Repair Meeting*, Szeged, Magyarország
2015. **Gervai J.Z.**, Szüts D. (előadás) A PCNA fehérje poszt-transzlációs módosításainak szerepe a DNS-hibaelkerülő útvonalakban. *XIV. Genetikai Műhelyek Magyarországon*, Szeged
2015. **Gervai J.Z.**, Szüts D. (poszter) Genetic evidence of the role of PCNA post-translational modifications in DNA damage tolerance. *40. FEBS Congress & 15. FEBS Young Scientists' Forum*, Berlin, Németország
2015. **Gervai J.Z.**, Szüts D. (poszter) The importance of K63-linked PCNA polyubiquitylation in DNA damage bypass. *Magyar Molekuláris Élettudományi Konferencia*, Eger, Magyarország
2015. **Szikriszt B.**, **Gervai J.Z.**, Zámorszky J., Póti Á., Nagy Cs., Pipek O., Molnár J., Tusnády G.E., Csabai I., Szüts D. (poszter) The function of BRCA1 in chicken DT40 cells in the response to alkylating DNA damage. *Magyar Molekuláris Élettudományi Konferencia*, Eger, Magyarország
2014. **Gervai J.Z.**, Szüts D. (poszter) The importance of K63-linked PCNA polyubiquitylation in DNA damage bypass. *Third meeting of the Croatian Association for Cancer Research*, Zagreb, Croatia

#### **A DOLGOZATHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓ**

Calcutt, M.J., Szikriszt, B., Póti, A., Molnár, J., **Gervai, J.Z.**, Tusnády, G.E., Foecking, M.F., and Szüts, D. (2015). Genome Sequence Analysis of *Mycoplasma* sp. HU2014, Isolated from Tissue Culture. *Genome Announc* 3.

## IRODALOMJEGYZÉK

Chen, J., Bozza, W., and Zhuang, Z. (2011). Ubiquitination of PCNA and its essential role in eukaryotic translesion synthesis. *Cell Biochem Biophys* 60, 47-60.

Cortez, D. (2015). Preventing replication fork collapse to maintain genome integrity. *DNA Repair (Amst)* 32, 149-157.

Huen, M.S., Sy, S.M., and Chen, J. (2010). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 138-148.

Pathania, S., Nguyen, J., Hill, S.J., Scully, R., Adelmant, G.O., Marto, J.A., Feunteun, J., and Livingston, D.M. (2011). BRCA1 is required for postreplication repair after UV-induced DNA damage. *Mol Cell* 44, 235-251.

Salehan, M.R., and Morse, H.R. (2013). DNA damage repair and tolerance: a role in chemotherapeutic drug resistance. *Br J Biomed Sci* 70, 31-40.

Tian, F., Sharma, S., Zou, J., Lin, S.Y., Wang, B., Rezvani, K., Wang, H., Parvin, J.D., Ludwig, T., Canman, C.E., *et al.* (2013). BRCA1 promotes the ubiquitination of PCNA and recruitment of translesion polymerases in response to replication blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 13558-13563.

Xie, J., Litman, R., Wang, S., Peng, M., Guillemette, S., Rooney, T., and Cantor, S.B. (2010). Targeting the FANCD1-BRCA1 interaction promotes a switch from recombination to polyploid-dependent bypass. *Oncogene* 29, 2499-2508.