

Az élesztő Rad18 fehérje szerkezeti és funkcionális vizsgálata

Ph.D. értekezés

Frittmann Orsolya

Témavezető: Dr. Unk Ildikó

Biológia Doktori Iskola

Eötvös Lóránd Kutatási Hálózat

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

SZTE Természettudományi és Informatikai Kar

2021.

Tartalomjegyzék

I. Bevezető	4
I.1. A Rad6-Rad18 irányított DNS-hiba tolerancia útvonal működése	5
I.2. PCNA	6
I.3. A transzléziós szintézis.....	7
I.3.1. Rad30, vagy másnéven polimeráz éta (Pol η).....	8
I.3.2. Rev3 és Rev7	9
I.3.3. Rev1	9
I.3.4. Def1.....	10
I.4. Villa-visszafordításon/ templátváltáson alapuló DDT alútvonal	10
I.4.1. Rad5, nem csak egy egyszerű E3 ubikvitin ligáz.....	11
I.4.2. Mms2-Ubc13	12
I.5. Rad6.....	13
I.6. Rad18, a DNS-hiba tolerancia útvonal központi fehérjéje	14
II. Célkitűzések	19
III. Anyagok és módszerek	20
III.1. Törzsek és plazmidok	20
III.1.1. Baktérium törzsek.....	20
III.1.2. Élesztő törzsek.....	20
III.1.3. Felhasznált plazmidok	20
III.2. Tápoldatok, lemezek.....	21
III.2.1. YPD	21
III.2.2. LB.....	21
III.2.3. Szintetikus tápoldat és táptalaj	21
III.2.4. Szelektív szintetikus tápoldat	22
III.2.5. MMS lemezek	22
III.2.6. HU lemezek	22
III.2.7. Bleomycin lemezek	22
III.2.8. CAN lemezek	22
III.3. Módszerek.....	22
III.3.1. <i>Escherichia coli</i> kompetens sejtek transzformálása	22
III.3.2. Plazmid preparálás	23
III.3.3. Genomi DNS izolálás élesztő sejtekből	23
III.3.4. Polimeráz lánreakció	23
III.3.5. A <i>RAD18</i> pontmutánsok létrehozása PCR alapú helyspecifikus mutagenezissel.....	24
III.3.6. Élesztő törzsek érzékenységének vizsgálata UV és más mutagén ágensek hatására	24
III.3.7. Élesztő sejtek transzformálása.....	25
III.3.8. Spontán mutagenezis mérése.....	25
III.3.9. Indukált mutagenezis mérése	26
III.3.10. Irányított génkiütés.....	26

III.3.11. Fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatása élesztő kettős hibrid rendszerrel	27
III.3.12. GST-fúziós fehérje tisztítása, GST pull-down	27
III.3.13. A deléciós és pontmutáns fehérjék expressziós szintjének vizsgálata	28
III.3.14. DNS-fehérje kötési vizsgálatok.....	29
IV. Eredmények.....	30
IV.1. A tervezett deléciók bemutatása	30
IV.2. A Rad18 fehérje C-terminális régiójának szerepe a DNS-hiba tolerancia útvonal működésében	32
IV.2.1. C-terminális deléciót hordozó mutánsok elkészítése	32
IV.2.2. C-terminális deléciós mutánsok vizsgálata	34
IV.3. A Rad18 fehérje N-terminális régiójának vizsgálata a DNS-hiba tolerancia útvonal működésében.....	37
IV.3.1. N-terminális részen (RING és Cink-ujj domének között) deléciót hordozó mutánsok elkészítése	37
IV.3.2. A legnagyobb N-terminális deléciót tartalmazó törzs vizsgálata....	38
IV.3.3. A 115-190. és 155-190. aminosavig terjedő deléciót tartalmazó törzsek vizsgálata	43
IV.3.3.1. Indukált és spontán mutagenézis vizsgálata	49
IV.3.3.2. Az N2 és N3 Rad18 fehérje által kialakított fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata élesztő kettős hibrid módszerrel .	49
IV.4. A cink-ujj pontmutáns Rad18 fehérje elkészítése és a domén szerepének jellemzése.....	54
IV.4.1. A cink-ujj pontmutáns elkészítése	54
IV.4.2. A Zn* pontmutáció szerepének vizsgálata a DNS-hiba tolerancia folyamatában	55
IV.4.2.1. Spontán mutagenézis vizsgálata	57
IV.4.2.2. A Zn* Rad18 fehérje által kialakított fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata élesztő kettős hibrid módszerrel	58
IV.5. A SAP domén vizsgálata	59
IV.5.1. A SAP domén deléciójának előállítása	59
IV.5.2. A SAP deléciós törzs vizsgálata.....	60
IV.6. A 211-273 aminosavig terjedő régió szerepének meghatározása.....	65
IV.6.1. Az M deléciós mutáns elkészítése.....	65
IV.6.2. Az M deléciós törzs vizsgálata.....	66
V. Eredmények megvitatása.....	70
VI. Rövidítések jegyzéke.....	76
VII. Köszönetnyilvánítás	78
VIII. Irodalomjegyzék	79
IX. Összefoglaló	85
X. Summary	88

I. Bevezető

A sejtek alapvető életfolyamata önmaguk reprodukálása és a túlélés, mely a genetikai állomány stabilitását feltételezi. A sejtek DNS-ét azonban számos celluláris és környezeti hatás károsíthatja, csökkentve a túlélési esélyt. Például az aerob anyagcsere során keletkező reaktív oxigénradikálok, a környezetből érkező UV és ionizáló sugárzás, valamint a különböző kémiai ágensek, melyek a nitrogén bázisokon, cukor-foszfát kötésekben fejtik ki károsító hatásukat.

A törzsfajlás során több, evolúciósan rögzült hibajavító útvonal alakult ki a túlélés biztosítása érdekében. Attól függően, hogy milyen típusú károsodás éri a DNS dupla helikális struktúráját, különböző hibajavító mechanizmusok - például a bázis kivágó (BER) vagy nukleotid kivágó (NER), homológ rekombináció (HR) alapuló vagy éppen a nem homológ végek összekapcsolását (NHEJ) végző reparációs útvonalak - lépnek életbe. Míg a BER, oxidáció, alkiláció, hidrolízis vagy deamináció útján károsodott bázisok eltávolítását végzi, addig a NER a hélixet torzító sérülések pl. timin-dimerek kivágásáért felelős. A kettős szálú DNS törések reparációja történhet a nem homológ végek összekapcsolásával a NHEJ által, vagy a homológ rekombinációs (HR) mechanizmussal, amely a testvér kromatida vagy a homológ kromoszóma megfelelő helyéről javítja az adott DNS szakaszt. Ha azonban a sejt olyan mértékű károsodást szenved, amit ezek a javítási mechanizmusok nem képesek eltávolítani a genomból, akkor a sejtciklus az S fázisban elakad, mert a replikatív polimeráz a hibás bázist nem képes átírni, s végül a replikációs villa eltörhet. Ilyen esetben lép működésbe a DNS-hiba tolerancia (DDT), és a sejt a DNS-károsodás ellenére is képes lesz a túlélésre. Ezek a hibajavító folyamatok evolúciósan konzerváltak, az élesztőgombák reparációs géneinek humán homológjai is szinte kivétel nélkül ismertek. Az élesztőben ezen a területen tett felfedezések ezért jó alapot szolgáltatnak a humán sejtek DNS-hibajavító folyamatainak megértéséhez.

Mivel a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő genomja ismert, gyors növekedésének, rövid életciklusának, haploid genomjának, könnyű keresztezhetőségének, a homológ rekombináció alapuló génkiütés lehetőségének és az alacsony fenntartási költségeknek köszönhetően vált a DNS-hibajavítási folyamatok kutatásának eukarióta modelljévé. Így nem meglepő, hogy élesztőben azonosították az első reparációs géneket. Ennek során a telepeket UV sugárzásnak tették ki, és az érzékeny törzseket RAD (radáció érzékeny) névvel illették. Később a felelős gének térképezése és azonosítása után a géneket genetikai vizsgálatoknak vetették alá, és fenotípusuk alapján genetikai csoportokba sorolták őket. A fő reparációs genetikai csoportok a Rad14, Rad52, és Rad6/Rad18 csoport. A Rad14 csoport a kivágó javításokért, a Rad52 csoport

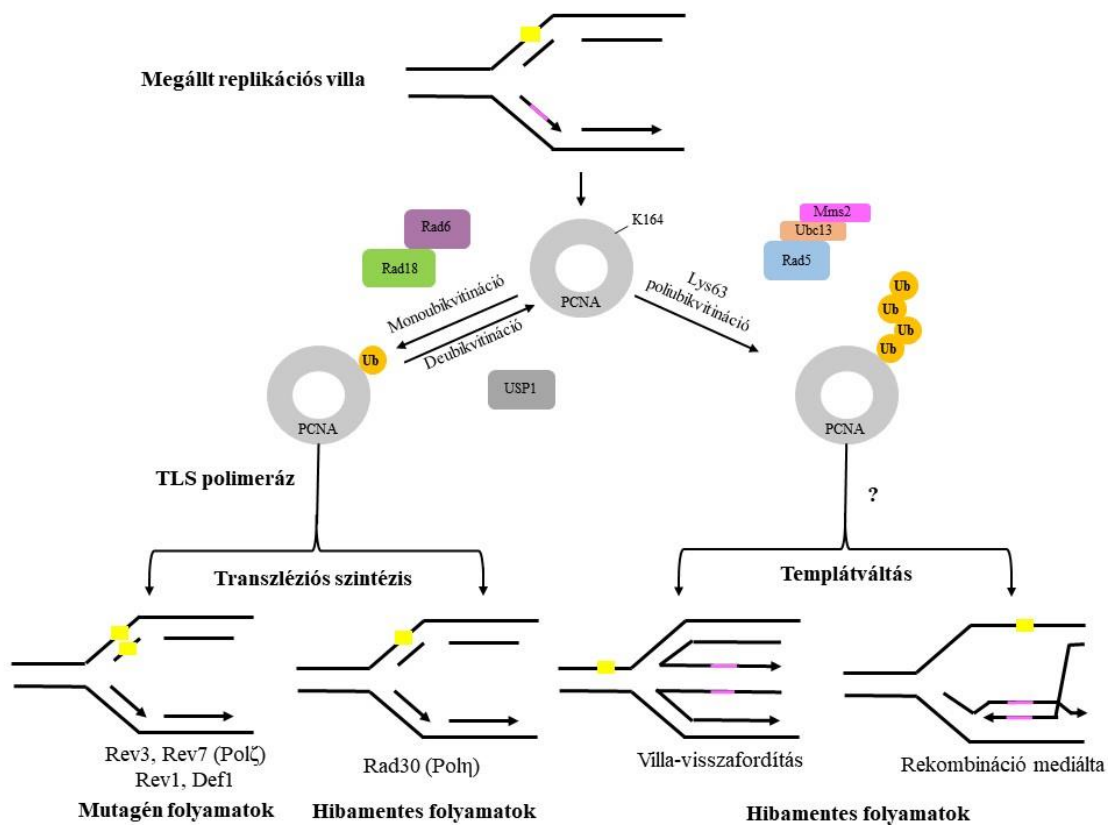
- mely a DNS-hiba tolerancia egyik ágát is képviseli - a kettős szálú DNS-törések javításáért felelős. A Rad6/Rad18 csoport működése pedig lehetővé teszi, a DNS-károsodásnál megakadt replikációs gépezet továbbhaladását a DNS szálon akár úgy is, hogy a hiba nem kerül kijavításra, és ebben az esetben mutációt tartalmazó újonnan szintetizált szál keletkezik.

I.1. A Rad6-Rad18 által irányított DNS-hiba tolerancia útvonal működése

A replikáció során előfordulhat, hogy a DNS-javító mechanizmusok nem távolítják el a hibát a genomból, a replikatív polimeráz nem képes a hibás bázison áthaladni, ami végül a replikációs villa elakadását eredményezi az S fázisban. Ha a villa megakad egy nem megfelelő bázis jelenléte miatt, és szétesik, az nagyfokú genomi átrendeződéshez vagy a sejt halálához vezethet.

Léteznek azonban olyan mechanizmusok, melyek a károsodott szálon is továbbsegítik a replikációs gépezetet a károsodott bázisok eltávolítása nélkül. Ennek megfelelően ezeket az útvonalakat DNS-hiba tolerancia útvonalaknak vagy röviden DDT-nek nevezzük. Csoportunk a Rad6/Rad18 fehérjekomplex által irányított útvonal vizsgálatával foglalkozik, mely három alútvonalra osztható: a transzléziós polimerázokon keresztül megvalósuló mutagén (*REVI*, *REV3*, *REV7*, *DEF1*) és hibamentes (*RAD30*) tolerancia alútvonalra, valamint a hibamentes villa-visszafordítást/templátváltást végző (*RAD5*, *MMS2-UBC13* géneket tartalmazó) ágra (1. ábra). Ezek közös jellemzője, hogy a Rad18 fehérje jelenléte nélkül nem léphetnének életbe. A Rad18 (E3 ubikvitin ligáz) a Rad6 (E2 ubikvitin konjugáz) fehérjével komplexet alkotva van jelen a sejtekben és a Proliferating Cell Nuclear Antigene (PCNA) nevű fehérje monoubikvitinálódását elősegítve irányítja a megakadt replikációs villa mentését.

A PCNA gyűrű alakú, homotrimer szerkezetű fehérje, mely a replikatív polimerázt a DNS szárhoz rögzíti. Amikor a replikációs gépezet a károsodott bázisnál megáll, a Rad18 és a Rad6 közreműködésével megtörténik a PCNA monoubikvitinációja a 164-es lizin oldalláncon. Feltételezéseink szerint, ez a transzléziós polimerázok által megvalósuló transzléziós szintézis működését aktiválja, és elősegíti a replikatív polimeráz leválását a DNS szárról melynek helyére így a transzléziós polimeráz tud csatlakozni. A monoubikvitinált PCNA poliubikvitinációja a DDT másik ágát, a replikációs villa visszafordításával megvalósuló hibamentes templátváltást aktiválja. A Rad18 enzim a folyamat első lépésénél jelen van, nélküle nem jöhet létre az első ubikvitin kapcsolódása, hiányában inaktív marad a teljes hibatolerancia útvonal.

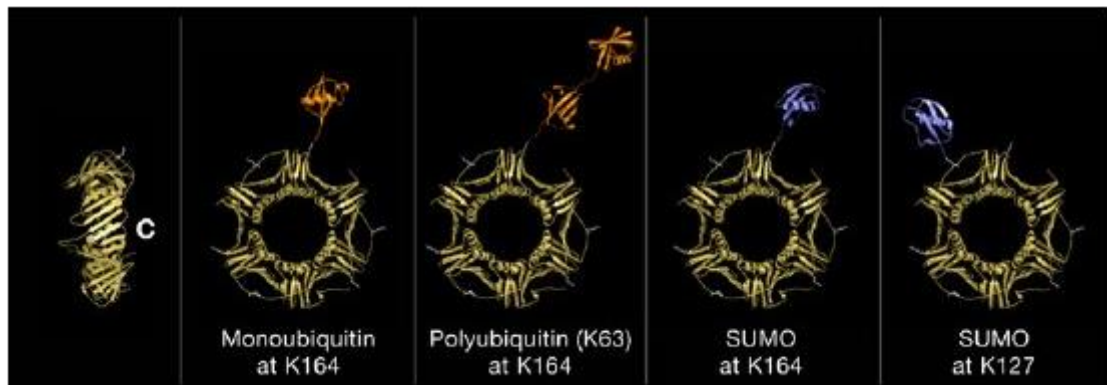


1. ábra: A DNS-hiba tolerancia útvonal működésének sematikus ábrázolása. Sárga téglalap a DNS-károsodást, a lila DNS darab pedig a hibát tartalmazó szállal komplementer hibátlan testvérkromatidát jelöli. (Ghosal és mtsai, 2013)

I.2. PCNA

A PCNA a replikáció során aktív DNS-hiba tolerancián túl (Torres-Ramos és mtsai, 1996) számos más folyamatban is nélkülözhetetlen szereppel rendelkezik, úgy, mint maga a replikáció (Eissenberg és mtsai, 1997), sejtciklus szabályozás (Koundrioukoff és mtsai, 2000) DNS-hibajavítás (Bowers és mtsai, 2001, Clark és mtsai, 2000), és a homológ rekombináció gátlása (Watts és mtsai, 2006). Az elmúlt évek kutatásai során azonban világossá vált, hogy a PCNA a DDT kulcsszabályozója. A replikáció során a PCNA 164-es lizinjéhez egy SUMO jelölő molekula kapcsolódik, ami a homológ rekombinációs folyamatokat gátolja (2. ábra). DNS-károsodás hatására ugyanehhez az aminosavhoz ubikvitin molekula kapcsolódik, és a folyamatokat a replikáció irányából a DNS-hiba tolerancia mechanizmusok felé tereli (Hoegge és mtsai, 2002). Ismert az is, hogy a PCNA monoubikvitinált formája a transzléziós szintézis folyamatát indítja be, míg további ubikvitin molekulák kapcsolódásával a poliubikvitinált PCNA a Rad5 közvetítette templátváltáson alapuló útvonalat aktiválja. A monoubikvitinált PCNA az, ami a megakadt replikációs villához vonzza a TLS polimerázokat, méghozzá

ubikvitinkötő motívumokon keresztül, melyek mindegyik Y-családba tartozó polimeráz felszínén megtalálhatók (Chang és mtsai, 2009).

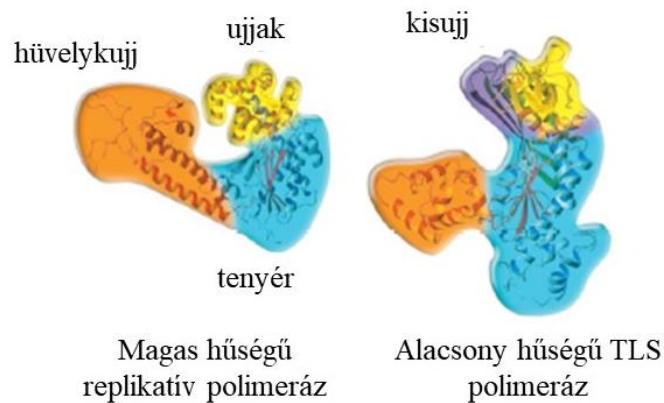


2. ábra: PCNA módosítások (Moldovan és mtsai, 2007)

A PCNA molekula ubikvitinálása három enzim meghatározott sorrendben történő működését igényli. Az első lépéshez nélkülözhetetlen egy E1 ubikvitin aktiváló enzim, (ez estünkben az Uba1) az E2 ubikvitin konjugáló enzimek (Rad6, Ubc13/Mms2) és az E3 ubikvitin ligázok, amelyek a Rad18 és a Rad5 a DDT folyamataiban. Először a Rad6/Rad18 komplex monoubikvitinnel látja el a 164-es lizinjén a PCNA-t, majd az Ubc13/Mms2 és Rad5 fehérjék komplexe az ubikvitin 63-as lizinjén építi tovább az ubikvitin láncot. A folyamat igen dinamikus, a monoubikvitinált PCNA-ról az Usp1 ubikvitin proteáz emészti le az ubikvitint (1. ábra).

I.3. A transléziós szintézis

A transléziós szintézis evolúciósan konzervált folyamat, mely egy alacsony hűségű DNS-polimerázt használva segíti elő a replikációs gépezet továbbhaladását a hibás szakaszon. Ezeknek az Y-családba tartozó alacsony hűségű TLS polimerázoknak nincsen 5' → 3' irányú exonukleáz aktivitásuk és az aktív centrumuk sokkal nagyobb, mint a B-családba tartozó magas hűségű DNS polimerázoknak, így a károsodott bázisok is beleférnek. Ugyanakkor mindkét polimeráz családban ugyanazok a speciális struktúrák figyelhetők meg a fehérjék szerkezetében: ún. ujjak, hüvelykujj és tenyér. A flexibilisebb aktív centrum miatt a TLS polimerázok ezeken felül még egy extra kisujj régióval is kiegészültek (3. ábra).



3. ábra A magas és alacsony hűségű DNS-polimerázok struktúrája. (Chang és mtsai, 2009)

A TLS polimerázokat gyakran nevezik mutagénnek, hiszen nagyobb valószínűséggel építenek be rossz nukleotidot a nem károsodott DNS templátba. Ha például a Rev1, Rev3 vagy Rev7 mutagén TLS polimerázok hiányoznak a sejtekből, akkor a DNS-károsodás ellenére csökken a mutagenézis, hiszen ebben az esetben a hiba nélkül működő DDT útvonalak lépnek életbe. Léteznek azonban olyan TLS polimerázok is, amelyek bizonyos hibákat mutáció generálása nélkül képesek átírni. Ilyen például élesztő esetében a Rad30/Pol η , amely a leggyakoribb UV fény okozta termékkel, a timin dimerrel szemben a helyes adenint építi be. A csak emberben előforduló TLS polimerázok között is találunk hasonlót, a Polk például képes a benzopirén károsította guaninokon hibamentesen átsegíteni a replikációs gépezetet (Jha és mtsai, 2016). A transzléziós szintézis élesztőben az aktiválódott polimerázoktól és a hiba típusától függően tehát két alútvonalra különíthető el: lehet mutáció mentes (Rad30) és mutációt rögzítő (Rev1, Rev3, Rev7, Def1).

I.3.1. Rad30, vagy másnéven polimeráz éta (Pol η)

A transzléziós polimerázok közül talán a Rad30, vagy más néven polimeráz éta (Pol η) a legjobban ismert és kutatott, mivel a humán homológjának hiánya vagy mutációja egy nagyon súlyos betegség, a xeroderma pigmentosum okozója. Katalitikus doménje, mely szekvenciahomológiát mutat az Y-családba tartozó polimerázokkal, a fehérje N-terminális részén található (Ohmori és mtsai, 2001). Ezen kívül tartalmaz egy Polymerase Associated Domain (PAD) nevezetű motívumot, mely a DNS-kötésért és más fehérjékkel való interakcióért felelős (Jung és mtsai, 2010, Trincao és mtsai, 2001). A DNS-hez való kapcsolódását a 100-200 aminosavnyi C-terminális régió teszi lehetővé, ahol nukleáris lokalizációs szignál (NLS), PCNA-vel kölcsönható régió (PIP) és ubikvitin kötő cink ujj

motívum kap helyet (UBZ) (Bienko és mtsai, 2005, Bienko és mtsai, 2010, Plosky és mtsai, 2006).

A Rad6/Rad18 által vezérelt DNS-hiba tolerancia útvonal egy különleges alágát képviseli, mert a többi TLS polimerázzal ellentétben hibamentes átírásra képes az UV okozta timin dimerek esetében. Aktív centrumában a kovalensen keresztkötött ciklobután pirimidin bázispárok számára is van elég hely. A timin dimerekkel szemben tud a Watson-Crick szabályt követve két adenint beépíteni (Johnson és mtsai, 2000, Washington és mtsai, 2000). Más UV okozta károsodásokat azonban hibásan ír át, például a 6-4 fotoproduktum esetében a 3' pirimidintől függetlenül mindig guanint helyez be, ez esetben a Pol η sem hibamentes (Prakash és mtsai, 2002).

I.3.2. Rev3 és Rev7

A Rev3 és Rev7 fehérjék alkotják a Pol ζ -ként ismert DNS polimeráz komplexet. Sokkal kisebb a processzivitása, mint a többi ismert B-családba tartozó polimeráznak, valamint a 3' \rightarrow 5' irányú exonukleáz aktivitás sincs meg a Pol ζ esetében. Habár a Rev3 fehérje egyedül is képes polimerizációra, a Rev7 fehérjével alkotott komplexe sokkal stabilabb és a polimeráz aktivitását is felerősíti, mely miatt a Rev7 fehérjét a Rev3 processzivitási faktorának is nevezik. A Pol ζ magas hűségű enzim, nem képes a sérült bázisokkal szemben bázist beilleszteni, de amennyiben ezt egy másik enzim már megtette, onnan folytatja a szintézist, akkor is, ha a behelyezett bázis nem a templát komplementere. A Pol ζ folytatja az átírást, így rögzítve a hibát a genomban (Sharma és mtsai, 2012).

I.3.3. Rev1

Habár a Rev1 nélkülözhetetlen a Pol ζ -függő TLS működéséhez, DNS szintetizáló képessége elhanyagolható a hibák nagy részén való továbbjutás szempontjából. A Rev1 egy templát függő, citozin-specifikus polimeráz, más néven deoxicitidil transzferáz, mely a szintézis során dCTP-t képes beépíteni a DNS abázikus helyeivel szemben. A fehérje N-terminális részén hordoz egy BRCT domént, amivel a PCNA molekulához tud kapcsolódni. C-terminálisa ugyanakkor alkalmassá teszi a Pol η -val és a Pol ζ Rev7 alegységével való kölcsönhatás kialakítására. Bár pontos szerepe még nem tisztázott, a mutagenézis folyamataihoz nélkülözhetetlen (Sharma és mtsai, 2012).

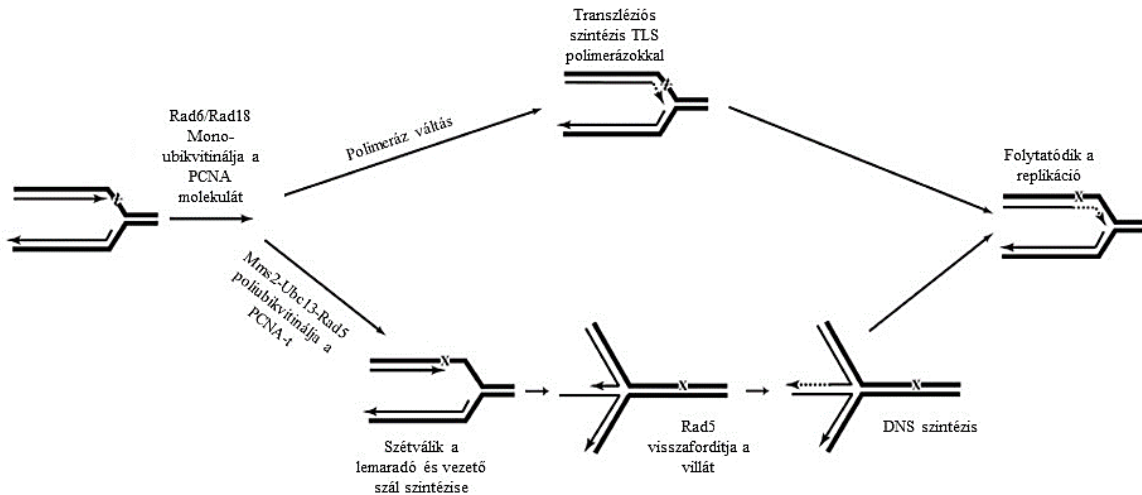
I.3.4. Def1

A Def1 fehérje az RNS-polimeráz II degradációs faktora, mely ubikvitinációval jelöli ki a megfelelő fehérjét a proteolitikus lebomlásra. A citoplazmában lokalizálódik, stressz hatására szállítódik a sejtmagba a C-terminálisán található lokalizációs szignálnak köszönhetően. Nélkülözhetetlen szereppel bír a mutagenézisben is, ahogy azt kutatócsoportunk korábban bizonyította (Daraba és mtsai, 2014). DNS-károsodás hatására elősegíti a replikatív polimeráz katalitikus alegységének proteolitikus lebomlását, amelynek helyét a jelenlegi modellek szerint egy transzléziós DNS-polimeráz veheti át, amely végül képes bizonyos DNS-károsodásokat mutációk képzésével átírni.

I.4. Villa-visszafordításon/templátváltáson alapuló DDT alútvonal

A transzléziós szintézishez képest sokkal kevesebb az ismeretünk a villa-visszafordításon/templátváltáson alapuló hiba mentes átírást biztosító DDT alútról. Élesztőben az útvonal felfedezéséhez episztázis-analízis vizsgálatok járultak hozzá.

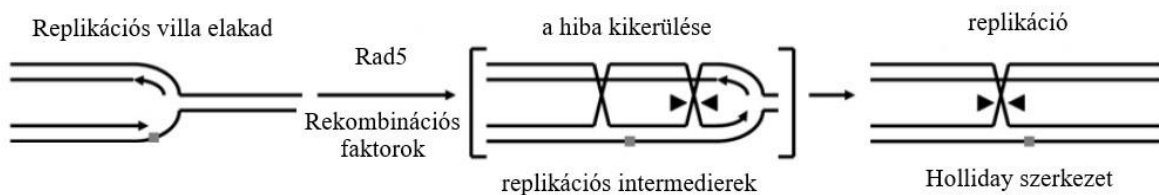
Ennek során az útvonal inaktiválása esetében megnövekedett az indukált mutációk száma a vizsgált törzsekben, mely a TLS polimerázok túlműködése miatt következett be. Valószínűsítik, hogy ez az útvonal a nem károsodott komplementer DNS-szálat használja templátul a hibás szálon való továbbhaladás biztosításához. Az erős genetikai bizonyítékok ellenére, melyek a poliubikvitinált PCNA-t a templátváltás mechanizmusához kötik, az útvonal aktiválásának molekuláris mechanizmusa még ma is csak igen kevésbé világos. Egy lehetséges magyarázat szerint a poliubikvitin lánc blokkolja a TLS polimerázok hozzáférését a DNS-hez, így más fehérjék számára válik elérhetővé. Másik lehetőség, hogy a poliubikvitin PCNA vonz magához fontos fehérjéket, melyek a templátváltás folyamatát irányítják (Chang és mtsai, 2009). Ha a hiba a vezető szálon keletkezik, akkor a replikációs villa megakadása után a két szál szintézise szétkapcsolódik (4. ábra). A Rad5 az újonnan szintetizált szálakat letekeri, s ezzel lehetővé teszi, hogy hibridizáljanak egymással, így a hibával szemben lévő szál replikációja a már újonnan megsintetizált testvér kromatidáról történik. Az átírás után a folyamat eredményeként létrejövő úgynevezett csirkeláb struktúra feloldódik, az új szál a hibás szakaszt lefedi, így a replikáció folytatódhat tovább (Blastyák és mtsai, 2007).



4. ábra: Templátváltás mechanizmusa (Blastyák és mtsai, 2007)

Az előbbieken ismertetett mechanizmuson túl létezik egy másik is a Rad5 vezérelte út működésére, mely rekombinációs folyamatok részvételét feltételezi.

Ebben az esetben is a két szál szintézise szétválik, amikor a replikációs villa a hibánál megáll és a Rad5 rekombinációs fehérjékkel együtt koordinálja a templátváltás folyamatát. Ennek eredményeként Holliday-szerkezet jön létre a testvér kromatidák között, mely később kerül feloldásra, valamint a hiba is későbbi lépésben aktiválódó javító mechanizmusok által távolítódik el (5. ábra) (Minca és mtsai, 2010).



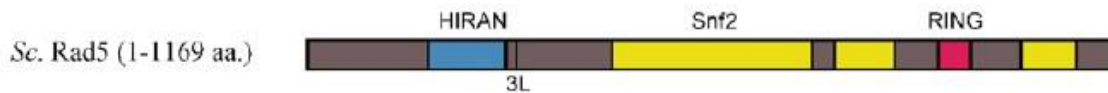
5. ábra: A rekombináció segített templátváltás mechanizmusa (Minca és mtsai, 2010)

I.4.1. A Rad5 nem csak egy egyszerű E3 ubikvitin ligáz

A Rad5 a SWI/SNF ATPáz családkhoz tartozik, a maga 1169 aminosavával és 134 kDa-nyi méretével a DDT útvonal egyik legnagyobb fehérjéje.

A Rad5 doménstruktúrája különleges, a konzervált helikáz doménjei közé ékelődve hordoz egy, az ubikvitin ligáz fehérjékre jellemző RING domént, melyen keresztül az Ubc13

fehérjével képes kölcsönhatásba lépni (6.ábra). N-terminális részén található továbbá a HIRAN domén, mely speciális DNS struktúrák kötésére alkalmas. Rendelkezik ezen túl leucin zipzár motívummal is, mely a homodimer képzéséhez, a Rad18-cal való interakcióhoz szükséges, valamint ezen keresztül is képes a DNS kötésére (Johnson és mtsai, 1992).



6. ábra: Az élesztő Rad5 doménszerkezete: Kékkel a HIRAN domént láthatjuk mögötte a 3L a leucin zipzár motívumot jelöli. A sárga szín az Snf2 családra jellemző helikáz doméneket a rózsaszín pedig a RING domént mutatja. (Unk és mtsai, 2010)

A Rad5 kettősszálú DNS-transzlokáz aktivitásának köszönhetően képes a replikációs villa megfordítására. Létezik olyan tanulmány, miszerint a Rad5 fehérjének szerepe van a TLS alútvonalban is, hiszen az N-terminális részén képes kölcsönhatni a Rev1 fehérjével, függetlenül az Mms2-Ubc13 komplex funkciójától (Fan és mtsai, 2018). DNS-károsodás hatására S fázisban központot formál a magban, melyhez szintén a HIRAN doménjére van szüksége.

I.4.2. Mms2-Ubc13

Az *MMS2* gén termékeként képződő fehérje szekvenciahomológiát mutat az ubikvitin konjugáló enzimekkel, de hiányzik belőle a konszenzus szekvencia, ami nélkül nem tud konjugázként funkcionálni. A fehérje polipeptid lánc 137 aminosavból épül fel (15,2 kDa) és globuláris szerkezetet vesz fel a sejtben (Broomfield és mtsai, 1998, Hofmann és mtsai 1999).



7. ábra: Mms2-Ubc13 komplex és az ubikvitinek interakciójának modellje. Az ubikvitint a lila szalag jelképezi. (Tsui és mtsai, 2005)

Az Mms2-nek az Ubc13 ubikvitin konjugázzal alkotott heterodimere a felelős a K63-hoz kapcsolt poliubikvitin láncok kialakításáért, mely a hibamentes DDT alútvonal működésének feltétele (Brusky és mtsai, 2000).

A komplex két ubikvitin molekula megkötésére képes, az Ubc13-hoz kapcsolódik a donor ubikvitin, az Mms2 felszínéhez pedig az akceptor, amelynek 63-as lizinje szolgáltatja a poliubikvitin lánc alapját (7. ábra). Az Mms2 57-es izoleucinja köti meg az ubikvitint, amely a fehérjét alkotó három β -redő elején helyezkedik el (Tsui és mtsai, 2005).

Mindkét fehérje alapvetően a citoplazmában található, csak károsodás hatására szállítodnak a magba. Az Ubc13 képes interakcióba lépni a Rad5 fehérjével (Ulrich és mtsai, 2000), míg az Mms2 nem. A DNS-hiba tolerancia útvonalban betöltött szerepükhöz nélkülözhetetlen a Rad5-tel való kölcsönhatás, hiszen a Rad5 az ubikvitin ligáz, mely segítségével az Ubc13-Mms2 heterodimer poliubikvitinálni képes a PCNA fehérjét (Torres-Ramos és mtsai, 2002).

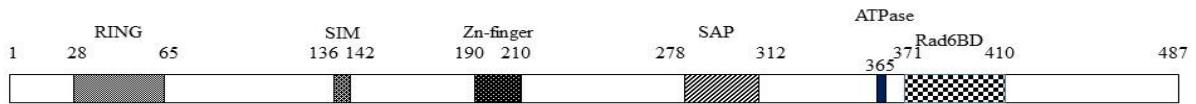
I.5. Rad6

A *RAD6* gén terméke egy igen konzervált enzim, melyet ma ubikvitin konjugázként (E2) ismerünk (Jentsch és mtsai, 1987). Az ubikvitin jelölő fehérjét tartalmazó molekuláról köztudott, hogy proteoszómális lebontásra jelölik ki a fehérjéket. Valójában azonban nem csak ezt az információt hordozza magában az ubikvitin jelenléte egy fehérjén. A Rad6 ubikvitin konjugázként három másik ubikvitin ligázzal képes interakcióba lépni és ubikvitint csatolni a célfehérjére úgy, hogy mind más információ tartalommal bír. Ubr1-gyel alkotott komplexe N-terminális degradációra jelöl ki fehérjéket (Dohmen és mtsai, 1991), míg a Rad6-Bre1 dimer a kromatin módosításában játszik szerepet azzal, hogy a H2B hiszton fehérjére helyez ubikvitint, melynek a génextpresszió szabályozásában van szerepe (Khao és mtsai, 2004). A Rad6-Rad18 páros pedig a DNS-hiba tolerancia útvonal processzivitási faktorának, a PCNA molekulának az ubikvitinálását végzi, így indítva be a transzléziós szintézisen keresztül megvalósuló alútvonalat (Hoegge és mtsai, 2002).

A Rad6 egy rendkívül kicsi fehérje, mindössze 172 aminosav építi fel, melyekből az első 149 a globuláris domén kialakításában vesz részt, a maradék 23 pedig a savas farok régiót alkotja (Bailly és mtsai, 1997). A *Δrad6* null mutáns törzsek extrém érzékenységet mutattak DNS-károsító ágensek hatására, ezen kívül növekedési és sporulációs defektust is produkáltak (Bailly és mtsai, 1994). Kimutatták, hogy a fehérje a Rad18-cal nagyon stabil, direkt interakcióra képes, és hogy ez a kapcsolat nélkülözhetetlen a DDT működéséhez. A Rad6 C-

terminálisának 10-22 aminosavig terjedő része, valamint az N-terminálison a 141 és 149 közötti 8 aminosav az, ami kell a Rad6-Rad18 komplex kialakításához.

I.6. Rad18, a DNS-hiba tolerancia útvonal központi fehérjéje



8. ábra: A Rad18 fehérje domén szerkezetének sematikus ábrázolása (a számok aminosavakat jelölnek).

A Rad18, mely E3 ubikvitin ligáz aktivitású fehérje, a Rad6 E2 ubikvitin konjugáz fehérjével komplexet alkotva vesz részt a hibatolerancia útvonalban. A Rad18 fehérje öt azonosított doménje között így megtaláljuk a Rad6 fehérjével való kölcsönhatásért felelős domént és egy 40 aminosavat felölelő helix-loop-helix motívumot a fehérje C-terminális részén, mely a Rad6 fehérje két amfipatikus α -hélix struktúrájával hidrofób interakció kialakítása által eredményezi a Rad6-Rad18 komplex stabilitását (8. ábra) (Bailly és mtsai, 1997). Bizonyos szerzők humán fehérjékkal végzett kísérletek alapján két Rad18 és egy Rad6 molekula alkotta komplex jelenlétét feltételezik *in vivo* a sejtekben (Mashuda és mtsai 2011). Ez az eredmény még megerősítésre vár, de az biztos, hogy a Rad6 fehérje nélkül nem tudja ellátni feladatát a DNS-hiba tolerancia útvonalban, a kölcsönhatás létrejötte esszenciális az útvonal működéséhez.

A Rad18-at először ATPáz-ként azonosították a C-terminális részén található nukleotid kötő Walker-A típusú motívuma alapján (Bailly és mtsai, 1997). Kiderült, hogy csak DNS kofaktor jelenlétében képes az ATP hidrolízisére (kettős szálú DNS is stimulálja a reakciót, noha az egyszálúval sokkal nagyobb hatékonyságú), de a DNS kötéséhez nincs szükség az ATPáz aktivitásra. Azt feltételezik, hogy amikor a Rad18 felismeri a szubsztrátját a DNS hiba környezetében - amit ubikvitinálnia kellene - akkor a fehérje-fehérje interakció létrejöttéhez van szükség az ATP hidrolízisre.

A Rad18 fehérje N-terminális részén (28-65) azonosítottak egy RING domént is, amely E3 ligázok körében gyakran megtalálható. A domén nem közvetlenül az E2-vel, esetünkben a Rad6-tal való interakcióért felelős (Mashuda és mtsai, 2011), hanem az ubikvitinnak a célfehérjére való áthelyezésében van nélkülözhetetlen szerepe. Ha a két Rad18 fehérje alkotta komplexben az egyik RING domént elrontották, akkor létrejött a kölcsönhatás a Rad6 fehérjével, így a PCNA molekulára is rákerült az ubikvitin. Ha azonban mindkét RING

funkcióját veszítette, akkor a Rad6-ot ugyan megkötötte a komplex, hiszen a C-terminálison lévő Rad6-kötő domén érintetlen maradt, a PCNA azonban nem tudott ubikvitinálódni (Mashuda és mtsai, 2011). Mások szerint (Huang és mtsai, 2011) a Rad6 kötése egy RING domén és egy Rad6-kötő domén együttes részvételével valósul meg a két Rad18 alkotta dimerben, és akár külön monomeren is elhelyezkedhetnek a kölcsönható domének.

A fehérje N-terminális részén a RING és cink-ujj domének között, a 136-142 aminosavig terjedő régióban található a SIM motívum (8. ábra), mely a SUMO poszttranszlációs módosító fehérjével való kölcsönhatásért felelős. A DNS-hibajavítás és genom stabilitás megőrzésében szerepet játszó fehérjék körében találhatóak meg olyan ubiquitin ligázok, amelyek sumoilált célfehérjéket ismernek fel és ubikvitinálnak (Prudden és mtsai, 2007). Így történik ez a Rad18 E3 ubiquitin ligáz esetében is. A SIM motívumon keresztül felismeri a replikáció során elakadt, sumoilált PCNA molekulát, mint szubsztrátot, és ubikvitinálja azt (Parker és mtsai, 2012).

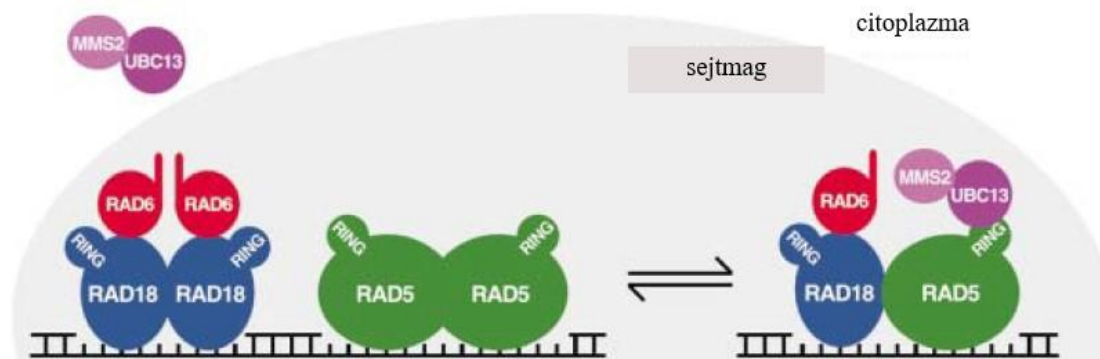
A Rad18 szekvenciájában más fehérjékkel való szekvenciahomológia alapján egy úgynevezett ciszteinben gazdag C2HC cink-ujj domént (Jones és mtsai, 1988) (190-210) is azonosítottak, amelynek szerepe az ubiquitin kötése lehet, bár az eredmények ellentmondásosak e tekintetben. A cink-ujj jelenléte elengedhetetlen a Rad18 megfelelő működéséhez, hiszen már az egyik cinkkötő cisztein fenilalaninra történő módosítása is a Rad18 fehérje DNS-hiba körüli lokalizációját (Nakajima és mtsai, 2006), valamint auto-ubikvitinációját gátolja, ahogy azt egy humán Rad18 fehérjével foglalkozó tanulmány említi (Miyase és mtsai, 2005). Ennek ellentmond Tateishi és munkatársainak eredménye (Tateishi és mtsai, 2000), amely szerint a kísérletekben alig érzékenyebb a mutáns a vad típusú fehérjénél, valamint Notenboomék következtetése, akik nem láttak különbséget az *in vitro* auto-ubikvitinációban és a PCNA ubikvitinációjában sem (Notenboom és mtsai, 2007). Debbie J. Chang (Chang és mtsai, 2009) cikkében arra a következtetésre jut, hogy a Rad18 ubikvitinált formája az inaktív, majd károsodás indukálta deubikvitinációval válik aktívvá, és ezáltal képes kölcsönhatni a DDT útvonal fehérjéivel. Érdekes, hogy élesztőben az endogén Rad18 nem ubikvitinált, ez csak a magasabbrendű eukarióta szervezetekre érvényes (Ulrich és mtsai, 2000). Az ellentmondásos eredmények miatt továbbra is fontos és megválaszolatlan kérdés marad, hogy a Rad18 fehérje ubikvitinált formában működik-e a DDT folyamataiban, és ha igen, akkor a cink-ujjnak van-e szerepe ebben.

A SAP domén a fehérje középső részén helyezkedik el, két hélix motívumból áll, melyet egy hosszú hurok választ ketté (Okubo és mtsai 2004). Nevét arról a három fehérjéről kapta, melyekben először azonosították ezt a domént, ezek pedig a SAF-A/B, Acinus és Pias voltak. A humán Rad18 fehérjével végzett kísérletek alapján a SAP domén a hosszú, egyes szálú DNS-

sel és a villa struktúrát formáló DNS templáttal való kölcsönhatásban játszik szerepet (Tsuji és mtsai 2008). A SAP domén két hélix motívuma felelős a DNS-sel való interakcióért, az ezek között elhelyezkedő hurok régióknak nincsen jelentős kihatása a kölcsönhatás létrejöttére. Egy másik tanulmány azonban ennek pont az ellenkezőjét állítja. Notenboom és munkatársai szerint a hélixeket összekötő régió az, amelyik kell ahhoz, hogy a Rad18 fehérje megkösse az egyes szálú DNS-t. Ők a kísérleteiket csak a SAP domént, illetve pontmutáns SAP domént tartalmazó fehérje részlettel végezték el, nem pedig a teljes hosszúságú Rad18-at tartalmazó rendszerrel, és ez magyarázatot adhat az ellentmondásra. A SAP doménnek a Pol η DNS-károsodás körüli lokalizációjában is szerepet tulajdonítanak a humán fehérje esetében (Nakajima és mtsai, 2006). Genotoxikus szerek hatására a Rad18 és a Pol η központokat formál a sejtmagban, míg a teljes SAP domén hiányában, vagy annak hélix mutáns formáiban ez a központformálás elmarad. Ez annak köszönhető, hogy a SAP deléciós törzsből a PCNA molekula monoubikvitinálása nem történik meg, így természetesen a replikatív polimeráz nem tud lecserélődni transzlációs polimerázra. Humán fehérjével végzett kísérletek alapján arra a következtetésre jutottak japán kutatók, hogy a SAP domén mintegy hídként játszik szerepet a RING és a Rad6-kötő domén között, a ligáz funkció működéséhez pedig szükség van erre a hídra (Masuda és mtsai, 2012). Amint láthatjuk az eredmények ellentmondásosak a SAP domén funkcióját illetően, élesztőben pedig nem is vizsgálták részletesen ennek a motívumnak a szerepét.

Az előzőekben leírt eredmények ellenére Rad18 fehérjével kapcsolatban ma még sok a megválaszolatlan kérdés. Azt tudjuk ugyan, hogy például képes dimerizálódni a fehérje és a Rad5 és a PCNA molekulával is kölcsönhatásba tud lépni, azt azonban nem ismerjük, hogy ezekhez a funkciókhoz a fehérje mely területeire van szükség. Pontosan nem sikerült még meghatározni ezeket az interakciós felszíneket, mindössze annyi ismert a humán fehérjével végzett kísérletekből, hogy a dimer kialakulásához az N-terminális régió nélkülözhetetlen (Notenboom és mtsai, 2007), mely élesztőben a 83-248 aminosavig terjedő szekvencia részletnek felel meg (Ulrich és mtsai, 2000).

Hasonló módon az sem világos az élesztő fehérje esetében, hogy valóban dimerként van-e jelen a Rad18 a DDT folyamatában. Humán Rad18-cal végzett dimerizációval foglalkozó kutatásból többet ismerünk és egyetértenek abban, hogy dimerként vesz részt a folyamatokban, ellentmondásosak viszont abban a tekintetben, hogy hány Rad6 molekula kapcsolódik a Rad18 alkotta dimerhez (9. ábra) (Notenboom és mtsai, 2007, Huang és mtsai, 2011, Masuda és mtsai, 2012). Jelenleg úgy gondolják, hogy a monomerek a citoplazmában lokalizálódnak, majd DNS-károsodás hatására a sejtmagban már dimerként működnek.



9. ábra: Modell a DNS-hiba tolerancia útvonalban résztvevő fehérjék komplexképzéséről a folyamat működése során (Ulrich és mtsai, 2000).

Egy másik fontos interakciós felszíne a Rad18-nak a PCNA kötéséért felelős régiója, de majdnem 40 év kutatómunka nem volt elég ahhoz, hogy ezt meghatározzák. Tudjuk, hogy kölcsönhatás létrejön a Rad18 és a PCNA között mind élesztő, mind humán sejtekben, sőt utóbbi esetében az N-terminális 16-366 aminosavig terjedő régióra helyezik a kölcsönható felszínt (Notenboom és mtsai, 2007). Még annyi ismert ebben a kérdésben, hogy a RING, cink-ujj, SAP és cink-ujj+SAP domének egyedül nem tudják kötni a PCNA molekulát, tehát vagy a köztes szekvenciák, vagy pedig az általuk kialakított harmadlagos struktúra teszi lehetővé a kölcsönhatás létrejöttét.

A PCNA-t kötő felszínhez hasonlóan a Rad5-tel kölcsönható felszín sincs behatárolva pontosan, itt is egy nagyobb, N-terminális régióról, a 83-248 aminosavig terjedő részről feltételezik a kötetést (Ulrich és mtsai, 2000). Mivel a dimerizációhoz is erre a részre van szükség, úgy gondolják, hogy a Rad5 kötése és a dimer kialakulása nem mehet végbe egyszerre. E modell szerint, amikor a mutagén alútvonal működésére van szükség, akkor a Rad18 dimerként van jelen, míg a hibamentes alútvonal életbe lépéséhez a Rad18-Rad5 heterodimernek kell létrejönnie.

Az előzőekben leírtak alapján jól látható, hogy a Rad18 fehérje ismert doménjeinek funkcióit tekintve ellentmondásokba ütközünk, nem beszélve arról, hogy meglepő módon három olyan, fontos kölcsönhatások létrejöttéhez szükséges régió is van még, melyeket nem sikerült annál pontosabban behatárolni, minthogy a fehérje N-terminális része kell a működésükhöz. A Rad18 a DNS-hiba tolerancia útvonal központi fehérjéje, így a pontos szerepének, működési mechanizmusának a megismerése elengedhetetlen ahhoz, hogy magát a DDT-t megértsük. Kutatásaink az élesztő Rad18 fehérje feltérképezetlen régióinak vizsgálatára, a már ismert domének pontos szerepének megismerésére irányultak.

II. Célkitűzések

Annak ellenére, hogy a DNS-hiba tolerancia útvonalban nélkülözhetetlen és sokoldalú szereppel bíró Rad18 fehérjét 40 éve intenzíven vizsgálják, az eddig megismert doménjeinek szerepe még ma sem tisztázott, így a fehérje jelentős részeihez ma sem tudunk funkciót rendelni. Ezért célul tűztük ki, hogy a Rad18 fehérje azon részeit, melyek funkciója eddig még nem ismert feltérképezzük, és a behatárolt domének pontos szerepét meghatározzuk.

Ehhez a következő feladatok elvégzését terveztük:

1. Deléciós és pontmutáns *RAD18* gének elkészítése.
2. A mutánsokat, mint egyedüli Rad18 forrást tartalmazó élesztő törzsek előállítása.
3. A létrehozott mutánsok közül kiszűrni azokat, amelyek DNS-károsító hatásokra mutatott fenotípus alapján a DNS-hiba tolerancia útvonalában betöltött szerepében befolyásolják a Rad18 működését.
4. Genetikai analízissel az adott mutációk hatását valamelyik episztázis csoportba besorolni, vagyis kideríteni, hogy a deléció/pontmutáció melyik alútvonal működését befolyásolja.
5. A mutáns fehérjék interakciós viszonyait feltérképezni a jól ismert kölcsönható partnerek tekintetében. Megvizsgálni, hogy az eltávolított régióknak van-e szerepe a Rad18 fehérje által kialakított kölcsönhatások létrejöttében.
6. Megvizsgálni a kérdéses mutáns fehérjék aktivitását DNS kötés tekintetében.

III. Anyagok és Módszerek

III.1. Törzsek és plazmidok

III.1.1. Baktérium törzsek

A klónozáshoz és a konstruktok előállításához az *E. coli* **DH5 α** kompetens baktérium törzset használtuk, mely ampicillinre és kanamicinre is érzékeny.

III.1.2. Élesztő törzsek

- **EMY 747:** *MATa, his3-D1 leu2-3 leu2-112 trp1D ura3* genotípusú vad típusú élesztő törzs. A Rad18 deléciós törzseket ezen a genetikai háttéren állítottuk elő és a továbbiakban az érzékenységi vizsgálatokhoz, episztázis analízisekhez, spontán- és indukált mutagenézis kísérletekhez ezt a törzset használtuk.
- **PJ69-4A:** *MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4D gal80D GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ* genotípusú élesztő törzs. Az élesztő kettős hibrid kísérleteket az említett törzsben végeztük el.
- **BJ5464:** *MATa, ura3-52 trp1 leu2-1 his3-200 pep4::HIS3 prb1-D1.6R can1 GAL* genotípusú, proteáz hiányos törzset használtuk a fehérjék túltermelésére, melyből a PEP1 és PRB6 vakuoláris proteázok hiányoznak.

III.1.3. Felhasznált plazmidok

- **pUC19, pUC18 *E. coli* klónozó vektor:** Magas kópiaszámú, kisméretű 2686 bp hosszúságú plazmid. A klónozási lépésekhez és a deléciós konstruktok előállításához ezt a vektort használtuk.
- **YCplac33 *E. coli*/*S. cerevisiae* élesztő centromeres inga vektor,** melyben a szelekciót az URA3 (Orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gén biztosítja. Kísérleteink során erről a vektorról fejeztettük ki a klónozással létrehozott deléciós Rad18 fehérjét, azok saját promóterével, a genomi Rad18-hoz hasonló mennyiségben.
- **pGAD424(+1) aktivációs domén vektor, élesztő kettős hibrid kísérletekhez.** Inga vektor, mely *E. coliban* és *S. cerevisiae*ben is képes autonóm replikációra, az élesztőben a szelekciót a *LEU2* (Beta-isopropylmalate dehydrogenase) gén biztosítja. A vektor a GAL4 (DNS-kötő transzkripció faktor) fehérje aktivációs

doménjének (AD) szekvenciáját kódolja a multiklónozó régióban (MCS) egyedi restriktív endonukleáz felismerő helyekkel a gén 3' végén. A hibrid fehérje létrejöttéhez a *RAD18* gén deléciós formáit a MCS-re megfelelő orientációba és leolvasási keretbe klónoztuk. A Rad18-GAL4 fúziós fehérje magas szinten expresszálódik a gazda sejtben konstitutív ADH1 promóterről, majd a sejtmagba szállítódik egy nukleáris lokalizációs szignálnak köszönhetően, ami az AD szekvenciája mögött helyezkedik el.

- **pGBT9(+1) GAL4 DNS-kötő domén vektor, élesztő kettős hibrid kísérletekhez.** Inga vektor, mely *E. coli*-ban és *S. cerevisiae*-ben is képes autonóm replikációra, élesztőben a szelekciót a *TRP1* gén biztosítja. A vektor a GAL4 fehérje DNS-kötő doménjének (BD) szekvenciáját kódolja az MCS-ben egyedi restriktív endonukleáz felismerő helyekkel a gén 3' végén. A hibrid fehérje létrejöttéhez a *RAD18* gén deléciós formáit az MCS-be klónoztuk megfelelő orientációban és leolvasási keretben. A fúziós fehérje magas szinten expresszálódik a gazda sejtben konstitutív ADH1 promóterről, majd a sejtmagba irányítódik egy NLS-nek köszönhetően, ami a BD szekvenciájában helyezkedik el.
- **pBJ842 GST fúziós inga vektor, fehérje túltermeléshez,** mely *E. coli*-ban és *S. cerevisiae*-ben is képes autonóm replikációra, élesztőben a szelekciót a *LEU2* gén biztosítja. A vad típusú és deléciós Rad18 fehérjéket erről a vektorról termeltettük a glutation-S-transzferáz peptiddel N-terminális fúzióban (Johnson és mtsai, 2006).

III.2. Tápanyagok, lemezek

III.2.1. YPD (teljes élesztő tápanyag/tápanyag) szelekciót nem igénylő törzsek növesztésére: 10 g élesztő extraktum (MERCK), 20 g pepton (MERCK), 20 g D-glükóz (Molar Chemicals Kft.), 1 liter steril vízben feloldva, majd autoklavozva. Szilárd talaj esetén +17 g agar por/1 liter víz.

III.2.2. LB (Luria Bertani baktérium tápanyag/tápanyag): 10 g tripton, 5 g élesztő extraktum, 10 g NaCl/1 liter víz. Szilárd talaj esetén 17 g agar por/1 liter víz.

III.2.3. Szintetikus tápanyag és tápanyag: 2% D-glükóz, 0.17% élesztő nitrogén bázis (aminosav nélküli, ammónium szulfátot tartalmazó, Difco) és aminosav keverék porban (Sigma Aldrich). Az aminosavakat por formájában adagoltam egyenként bemérve autoklavozás előtt.

Az egyes aminosavak mennyisége: adenin 40 mg/liter, L-arginin 30 mg/liter, L-uracil 20 mg/liter, L-histidin 20 mg/liter, L-izoleucin 20 mg/liter, L-leucin 30 mg/liter, L-lizin 30 mg/liter, L-metionin 20 mg/liter, L-fenilalanin 50 mg/liter, L-triptofán 30 mg/liter, L-tirozin 30 mg/liter, L-valin 100 mg/liter (az összes aminosavat a SIGMA gyártotta).

III.2.4. Szelektív szintetikus tápoldat: Szintetikus tápoldat összetevőit tartalmazza a szelekciót biztosító aminosav kivételével.

III.2.5. MMS (metil-metanoszulfonát) lemezek: a táptalajhoz közvetlenül polimerizációja előtt különböző koncentrációkban (0.0025-0.03 %) adagolt 99 %-os metil-metanoszulfonát törzsoldat (SIGMA) felhasználásával készültek.

III.2.6. HU (hidroxy-urea) lemezek: a táptalajhoz polimerizációja előtt különböző koncentrációkban (20 mM, 50 mM, 100 mM) adagolt 76 g/mol-os hidroxy-urea (SIGMA) törzsoldat hozzáadásával készültek.

III.2.7. Bleomycin lemezek: a táptalajhoz polimerizációja előtt különböző koncentrációkban (0.5 µg, 2 µg) adagolt 2 mg-os Bleomycin (SIGMA) törzsoldat hozzáadásával készültek.

III.2.8. CAN (kanavanin) lemezek: a táptalaj fent felsorolt komponensét tartalmazza, avval a különbséggel, hogy ez a szelekciós táptalaj L-arginin helyett L-kanavanint tartalmaz 80 mg/1 liter táptalaj koncentrációban.

III.3. Módszerek

III.3.1. *Escherichia coli* kompetens sejtek transzformálása

Egy 100 µg/ml ampicilin tartalmú, LB táptalajt tartalmazó Petri-csészét szobahőmérsékletre tettünk melegedni kb. 30 percig. Ezzel egy időben 200 µl CaCl₂-dal kompetenssé tett *Escherichia coli* sejtet tartalmazó Eppendorf csövet jégen tartottunk kb. 5 percig. 50-200 ng plazmidot adtunk az inkubált sejtekhez, és további 30 percig jégen tartottuk őket, majd 42 °C-on 1 percig hősokkoltuk, ezután 2 percig ismét jégen inkubáltuk őket. Ezután a felmelegített táptalajra szélesztettük a baktérium sejteket, majd a lemezeket egy éjszakán át 37 °C-on növesztettük.

III.3.2. Plazmid preparálás

3 ml 100 µg/ml ampicilin tartalmú LB tápoldatba leoltottunk egy baktérium telepet. A kultúrát egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk, majd másnap reggel a felnőtt kultúrákat Eppendorf csőben lecentrifugáltuk. A kiülepített sejteket 100 µl SOLI (1 M Tris-t (pH8), 0,5 M EDTA-t) oldatban szuszpendáltuk majd 200 µl SOLII (10 N NaOH-t, 10 % SDS-t) oldat hozzáadása után összekevertük. Ezt követően 150 µl (pH4,8-as 147 g K-acetátot) oldatot adtunk az elegyhez és keverés után 10 percig 13000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszót új Eppendorfba vittük át, majd 400 µl fenol-kloroform elegyet mértünk rá. A 10 perces centrifugálást követően a felülúszóból a DNS-t 100 %-os izopropanollal csaptuk ki (400 µl) ezt követően ismét centrifugáltuk. A csapadékot egy újabb lépésben 70 %-os etanollal (300 µl) mostuk. Az etanol eltávolítása és a DNS beszáradása után a mintákat RNáz-zal kiegészített TE oldatban (10 mM Tris, 1 mM EDTA) szuszpendáltuk fel.

III.3.3. Genomi DNS izolálás élesztő sejtekből

Leoltottunk 1 ml szelektív szintetikus tápoldatba élesztő sejteket az adott lemezről. Másnap lecentrifugáltuk a sejteket, majd a felülúszó leszívása után a sejteket 100 µl 200 mM-os LiAc és 1 %-os SDS tartalmú oldatban szuszpendáltuk fel. Ezt követően 5 percig 70 °C-on tartottuk őket, majd 300 µl 100 %-os etanol hozzáadásával csaptuk ki a DNS-t. A mintákat egy további lépésben 70 %-os etanollal mostuk, majd a beszáradás után 100 µl desztillált vízben oldottuk fel.

III.3.4. Polimeráz láncreakció

Polimeráz láncreakció során egy kiválasztott DNS szakasz amplifikálása válik lehetővé, melyhez a DNS szakaszra komplementer 20-30 bázispár nagyságú oligonukleotidok tervezése szükséges első lépésben.

Reakcióelegy tartalma: amplifikálni kívánt szakasz, primerek, dezoxiribonukleotidok, DNS-polimeráz, MgCl₂, víz/puffer.

A PCR reakció lépései: 1. rész: denaturáció (92-95 °C, 1-5 perc)

2. rész: három ciklusból áll, mely ismétlődik a reakció során 32-szer denaturáció (95 °C), primerek bekötődése (52 °C), elongáció (72 °C)

III.3.5. A *RAD18* pontmutánsok létrehozása PCR alapú helyspecifikus mutagenezissel

A pontmutációkat egy olyan vektoron hoztuk létre, amely 2400 bp hosszúságú genomi *RAD18* szekvenciát tartalmaz, mely 300 bázispár promóter régióból, a gén kódoló szekvenciájából és a transzlációs stop kodon utáni 600 bázispáros szakaszból adódik össze. Olyan oligonukleotidokat terveztünk, amelyek a megváltoztatni kívánt bázisoknál mutációkat hordoznak, de egyébként komplementerek az adott szakasszal. Ezen primerek olvadási pontja a PCR DNS-szintézisének hőmérséklete felett kell legyen 10 °C-kal, GC tartalmuk jó ha nagyobb, mint 40 %, hosszuk pedig 25 és 45 bázispár között az ideális. Magas húsége miatt a PCR alapú mutagenezishez a HiFi polimerázt (PCRBIO) használtuk, a program pedig a következő volt:

- denaturáció hőmérséklete 95 °C, időtartama 30 másodperc
- renaturáció hőmérséklete 55 °C, időtartama 1 perc,
- DNS szintézis hőmérséklete 68 °C, időtartama 8 perc.

A PCR reakció termékei között a kiindulási DNS is megtalálható, amely metilált, így egy metilációt felismerő specifikus endonukleázzal (DpnI, Thermo Fischer) elemészthető. Az így kapott terméket *E. coli* DH5 α kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd a megjelenő egyedi baktérium telepekből tisztított plazmidokon szekvenálással ellenőriztük a módosított szekvencia részletet és a környező régiót. Mivel az egész gént, illetve a hordozó plazmidot nem ellenőriztük végig, a pontmutációt és az azt felölelő hibátlanak bizonyult DNS darabot restriktív endonukleázokkal emésztve átklónoztuk egy genomi *RAD18*-at tartalmazó vektorba, így biztosak lehettünk benne, hogy csak az általunk vizsgálni kívánt mutációt tartalmazza a plazmidunk.

III.3.6. Élesztő törzsek érzékenységének vizsgálata UV és mutagén ágensek hatására Kvalitatívan (spot assay)

Az élesztő sejteket leoltottuk 3 ml szelektív szintetikus tápoldatba. Másnap Bürker-kamra segítségével megszámoltuk a sejteket, és 4 lépcsős hígítási sort készítettünk. A legtöményebb sejt kultúra koncentrációját 10^7 sejt/ml-re állítottuk be, minden további sejt kultúra egy-egy nagyságrenddel kisebb koncentrációjú. Minden vizsgált törzs esetében a leghígabb sejt kultúrától a legtöményebb felé haladva 10-10 μ l-t cseppentettünk ki sorban a különböző mutagén ágenszt tartalmazó táptalajokra. UV érzékenységi vizsgálatánál a törzseket szelektív szintetikus táptalajra csepegtettük, majd a beszáradás után a vizsgálni kívánt dózissal sugároztuk be őket. A lemezeket 3 napig 30 °C-on inkubáltuk. A kísérletnek köszönhetően

összehasonlíthatóvá válik a vizsgált törzsek érzékenysége az adott ágensre, hiszen az egymás alatt elhelyezkedő cseppek ugyanannyi sejtet tartalmaznak minden összehasonlított törzs esetében.

Kvantitatívan (killing curve)

Az élesztő sejteket leoltottuk 3 ml szelektív szintetikus tápoldatba. Másnap Bürker kamra segítségével megszámoltuk a sejteket, és a szelekciós lemezekre meghatározott számú sejtet lemezeltünk ki. A különböző dózisu UV sugárzásnak kitett lemezeken megjelenő telepek számából túlélési görbe szerkeszthető. A kísérleteket legalább háromszor ismételtük.

III.3.7. Élesztő sejtek transzformálása

Az élesztő sejteket a megfelelő táptalajba leoltottuk és egy éjszakán át nőni hagytuk. Másnap a starter kultúrákat kihígítottuk, úgy, hogy az optikai denzitásuk $A_{600} \sim 0.2$ legyen és addig hagytuk őket növekedni, amíg elérték az $A_{600} \sim 0.8$ -as optikai denzitást. Ezt követően 5 perces centrifugálással leüleptítettük a sejteket 3000 rpm-en. A sejteket 1 ml desztillált vízben szuszpendáltuk fel, majd asztali centrifugán 1 percig centrifugáltuk. A felülúszó leszívása után 1 ml 100 mM-os LiAc-ban szuszpendáltuk fel a sejteket, majd ismét 1 percig újra centrifugáltuk őket. A sejteket ezután 400 μ l 100 mM-os LiAc-ban oldottuk fel. Ebből a szuszpenzióból 50 μ l-nyi mennyiségeket mértünk ki egy-egy transzformáláshoz. A 400 μ l-nyi szuszpenzió tehát 8 különböző DNS-sel történő transzformáláshoz elegendő. Az 50 μ l kultúrát kiüleptítettük és a sejtekre 240 μ l 50 %-os PEG-et mértünk, valamint 37 μ l 1M-os LiAc-ot, 10 μ l heringsperma DNS-t, 1 μ l plazmidot, 49 μ l steril vizet adtunk hozzá, végül az alapos vortexelés után 20 percig 42 °C-on inkubáltuk a sejteket. A hősokkolás után 1 percig centrifugáltuk az elegyet, majd a kapott sejteket 150 μ l steril ultratisztított vízben vettük fel és a megfelelő táptalajt tartalmazó petri csészére szélesztettük. 3 napig 30 °C-on inkubáltuk a lemezeket.

III.3.8. Spontán mutagenézis mérése

A kísérlet során az élesztő egy adott markergénjében spontán keletkező mutációk száma válik mérhetővé, 10^7 sejtre vonatkoztatva. Az élesztő törzs 50-50 sejtjét tartalmazó kultúrából kiindulva tíz párhuzamos 500 μ l térfogatú kultúrát 3 napig 30 °C-on növesztettünk. Osztódás közben folyamatosan képződnek a spontán mutációk. Az inkubáció lejártával a tíz kultúrát tíz kanavanin tartalmú, arginint nem tartalmazó lemezre szélesztettük ki. A kanavanin aminosav az arginin analógja, így a fehérjeszintézis enzimeit arginin helyett beépítik a polipeptidláncba. Az ily módon képződő aberráns fehérjék nem képesek ellátni feladatukat és a sejt pusztulásához vezetnek. Az arginin és kanavanin felvételéért a *CAN1* gén által kódolt arginin-permeáz a

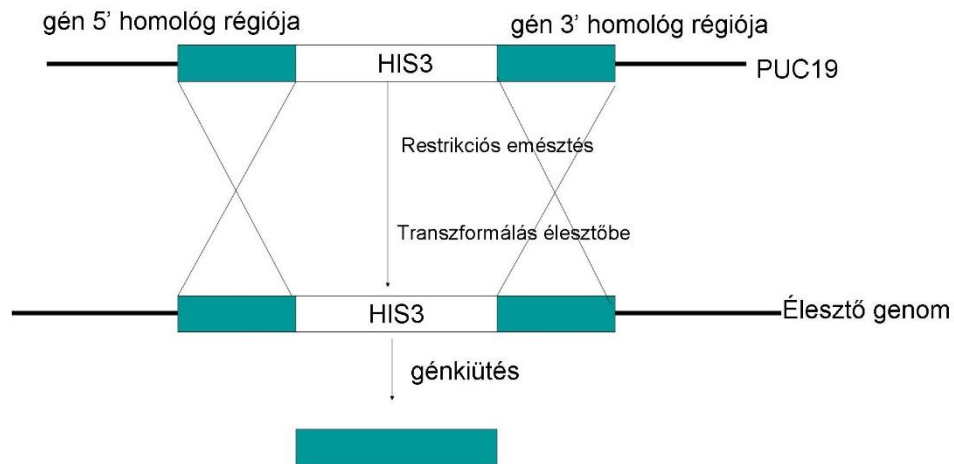
felelős. Ha a sejtben a *CAN1* lókuszt inaktiváló pontmutáció keletkezik a kanavanin nem tud bejutni a sejtbe, így az életképes marad. A kinőtt telepek tehát egy-egy a kanavanin génben létrejött funkcióvesztéssel járó mutációs eseményt jelölnek, így a tíz párhuzamos kanavanin lemez telepszámát átlagolva kiszámítható a spontán mutációs ráta (Lea és mtsai, 1949).

III.3.9. Indukált mutagenézis mérése

A kísérlet során az élesztő egy adott markergénjében UV károsodás által indukált mutációk száma válik mérhetővé. A leoltott élesztő starter kultúrákból hígítást készítünk és nagy mennyiségű sejtet (10^7 - 10^8 sejt/ lemez nagyságrendben) szélesztünk ki kanavanin tartalmú arginint nem tartalmazó lemezekre. Ezeket a lemezeket egyenként különböző dózisu UV fényel kezeljük közvetlenül a beszáradás után. A dolgozatban tárgyalt kísérletekben a kezeletlen kontroll mellett 20, 40, 50, 60 J/m²-t használtunk. Az UV károsító hatását az adott dózison úgy vettük figyelembe, hogy kanavanint nem tartalmazó kontroll lemezekre is szélesztettünk a vizsgált törzsekből és ellenőriztük a túlélésüket. A kanavanin lemezeken kinövő telepszámokból az adott dózison tapasztalható túlélés figyelembe vételével kiszámítható a dózisa jellemző mutációs gyakoriság. Ezt a mutációs gyakoriságot egy törzs esetében 10^7 (UV-t) túlélő sejtre adjuk meg.

III.3.10. Irányított génkiütés

A homológ rekombináción alapuló génkiütés során először DNS primereket kell tervezni a kiütni kívánt génre. A gént két oldalról körül fogó szekvenciát restriktions hasító helyeket tartalmazó primerekkel amplifikáljuk és az így kapott két fragment közé a PCR primerekkel beépített helyekre egy szelekciós markert klónozzunk. Az így elkészült génre specifikus konstruktot klónozó vektorban tartjuk fenn. Génkiütéshez a konstruktból a génspecifikus régiókat az általuk közrefogott szelekciós markerrel együtt kihalítjuk és ezt a linearizált fragmentet transzformáljuk az élesztő sejtekbe (10.ábra), ahol a sejt saját homológ rekombinációs gépezete beépíti a marker gént a kiütni kívánt gén helyére.



10. ábra: Irányított génkiütés.

III.3.11. Fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatása élesztő kettős hibrid rendszerrel

A kölcsönhatás szempontjából vizsgálni kívánt géneket beklónoztuk a transzaktivációs domént illetve a DNS-kötő domént kódoló kettős hibrid vektorokba úgy, hogy a leolvasási keret ne sérüljön és fúziós fehérje képződjön. Az elkészített konstruktot betranszformáltuk az élesztő kettős hibrid vizsgálatra használt PJ69-4A élesztő törzsbe (James és mtsai. 1996), majd –Leu/Trp lemezekre szélesztettük ki. Ezt követően a felnőtt telepeket –Leu/Trp táptalajban növesztettük egy éjszakán át. Az így kapott kultúrát 1×10^7 sejt/ml legnagyobb töménységűre hígítottuk majd –Leu/Trp, -Leu/Trp/His, -Leu/Trp/His/Ade tartalmú lemezekre cseppentettük ki, és 3-5 napot növesztettük 30 °C-on.

A transzformációt követően a két fúziós fehérje termelése megkezdődik az élesztő sejtekben, önmagában azonban egyik sem képes a riporter gén expressziójának aktiválására, így –Leu/Trp/His tartalmú lemezeken csak azok a telepek képesek szaporodni, ahol a két vizsgált fehérje kölcsönhatásának köszönhetően aktiválódik a *HIS3* (Histidinolphosphatase) gén és hisztidin termelődik a sejtekben.

III.3.12. GST-fúziós fehérjék tisztítása, GST pull-down

A vizsgálni kívánt fehérjék génjei - esetünkben ez a vad típusú és deléciós mutáns Rad18, a PCNA- a pBJ842-es vektorba lettek klónozva úgy, hogy a leolvasási keret sérülése nélkül N-terminálisan fuzionáljanak a GST-vel. Ezután 2 % galaktózzal indukálható a fehérjék termelése az említett vektorról. A kísérletek során általában 2 liter élesztő kultúrából indulunk ki, melyből 5-7 g sejtet lehet összegyűjteni és -70 °C-on tárolni. A fehérjék tisztítása száraz jégben, mechanikusan történik, majd 5-10 ml 1xPBS (50 mM TrisHCl pH 7, 1 mM EDTA pH8, 3M

KCl, szacharóz, 150 mM NaCl, 5-10 mM β -merkaptoetanol, 1 Roche proteáz inhibitor tableta/50 ml puffer) oldatban kerülnek feloldásra. Ezt követően 16000 rpm-mel 4 °C-on 20 perc, majd 35000 rpm-mel 4 °C-on 90 perc centrifugálást követően a tiszta felülúszót GST gyöngyöt tartalmazó oszlopba töltjük. A lizátumot legalább kétszer átfolyatjuk az oszlopon, majd 5-5 ml magas (HSB) és alacsony (LSB) sótartalmú pufferrel mossuk (HSB: 50 mM TrisHCl pH 7.5, 1M NaCl, 10 % glicerin; 0,01 % NP40, LSB: 50 mM TrisHCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 % glicerin, 0,01 % NP40). Végül 2 ml Precision proteáz pufferrel (PCB: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 % glicerin, 0.01 % Nonidet P-40) is átmoszuk. A fehérjénket tartalmazó GST gyöngyöket ezután 100 μ l PCB-ben vesszük fel és egy éjszakán át 4 °C-on 0.1 μ g Precision proteázzal inkubáljuk. Ennek során a proteáz lehasítja a fehérjénket úgy, hogy a GST tag a gyöngyhez kötve marad, így a felülúszóban csak a keresett, tiszta fehérjénk található meg.

Fehérjék közötti kölcsönhatás *in vitro* kimutatása során (GST pull down) az egyik fehérjét a gyöngyhez kötve hagyjuk (0.5 μ g fehérje, kb. 5-10 μ l gyöngy) és a tisztított fehérjét adjuk hozzá 0.5 μ g mennyiségben. A fehérjénket a komplex kialakulásához egy éjszakán át 4 °C-on inkubáljuk, majd a gyöngyök alapos átmosása után 20 mM-os redukált glutationnal leszorítjuk a komplexet a gyöngyről. Az elúciós lépés Precision proteázzal is elvégezhető. Az interakció kimutatása akrilamid gélen történik, melyet Coomassie festékkel teszünk láthatóvá. A gélen vizsgált minták közül az ún. bemeneti frakciót az interakciót vizsgáló reakcióból az elején, míg a felülúszó mintát a reakcióidő letelte után vesszük. Ezen kívül, egy mosás frakciót és az interakciós frakciót kell legyűjteni.

A vizsgált fehérjék esetleges nem specifikus kikötődésének vizsgálatára egy párhuzamos negatív kontrollt is összemérünk, melyben GST fehérjét kötünk a gyöngyre és ehhez adjuk a feltételezett interakciós partnert.

III.3.13. A deléció és pontmutáns fehérjék expressziós szintjének vizsgálata

A deléció/pontmutáns Rad18 fehérjék expressziós szintjének vizsgálatához a 3xHemagglutinin (3HA) jelölő molekulát használtuk. A 3HA-t plazmidról, PCR-rel sokszoroztuk fel úgy, hogy a használt oligonukleotidok tartalmaznak egy 3HA taggal homológ régiót és 40 bázispárt, mely a *RAD18* gén STOP kodonja előtti és utáni szekvenciával egyezik meg. A PCR terméket betranszformáltuk az egyes deléció *RAD18* törzsekbe, ahol a homológ rekombinációs folyamatoknak köszönhetően a 3HA beépül a *RAD18* gén STOP kodonja elé.

A 3HA jelöléssel ellátott különböző Rad18 molekulákat tartalmazó törzsekből a jól ismert triklór ecetsavas (TCA) módszerrel készítettünk fehérje extraktumot és vizsgáltuk meg a

fehérjék sejten belüli szintjét. Ehhez 1 ml A_{600} : ~1 optikai denzitású kultúrából összegyűjtött sejtekhez 1 ml hideg steril vizet és 150 μ l lízis puffert (1.85 M NaOH, 7.5 % β -merkaptoetanol) adtunk, majd alaposan felvortexeltük a leülepedett sejteket. Ezután 15 percig jégen tartottuk és minden ötödik percben ismét felkevertük az eppendorf cső tartalmát. Ezt követően 200 μ l 55 %-os TCA oldatot adtunk a mintákhoz és óvatosan összeforgattuk a már lizált sejteket tartalmazó oldattal, majd 20 percet jégen tartottuk őket. 13 000 rpm-en 10 perc centrifugálás következett melynek eredményeként az eppendorf cső aljában megjelent a csapadék. A felülúszó eltávolítása után 200 ml 100 %-os acetonnal mostuk a pelletet. A minták 10 perces levegőn szárítását követően ~ 20 μ l 2 x Laemli pufferben szuszpendáltuk fel, 100 °C-on 5 perc forralás után egyenlő mennyiségeket szeparáltunk el poliakrilamid gél segítségével. A fehérjéket Western blot eljárással tettük láthatóvá, amelyhez a következő ellenanyagokat használtuk: anti-HA 5000-szeres hígításban (GeneTex, GTX29110) és anti-PGK 10.000-szeres hígításban (Invitrogen, A6457) elsődleges ellenanyagok, anti-nyúl 10.000-szeres hígításban (Invitrogen, A32734) és anti-egér 10.000-szeres hígításban (Thermo Scientific, 31430) másodlagos ellenanyagok.

III.3.14. DNS-fehérje kötési vizsgálatok (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

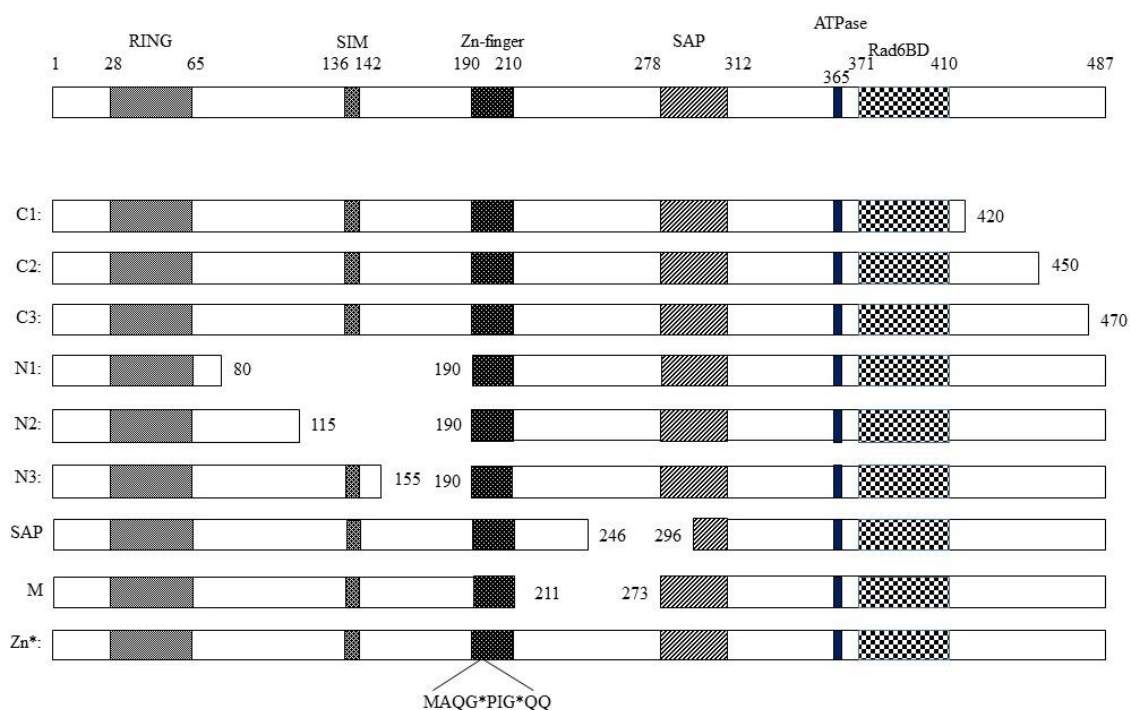
A vizsgálni kívánt fehérjénk DNS kötési képességének vizsgálatára kiváló módszer az EMSA, mely nem denaturáló poliakrilamid gélen teszi láthatóvá a szabad DNS, és valamennyivel magasabb tartományban a fehérje által kötött DNS helyzetét.

A 3.11.-es pontban részletezett tisztítási módszerrel kapott fehérjéket 0.7 pmol Fluorescein jelölt DNS szubsztráttal inkubáltuk R pufferben (25 mM TRIS pH 7.5, 1 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 10% glycerol, 20 ng/ μ l BSA) 4 °C-on, 30 percen át. Ezután a mintákat 6 %-os, nem denaturáló poliakrilamid gélen, 0.5 %-os TB pufferben futtattuk meg, majd a reakciókat a Typhoon Trio Imager készülékkel tettük láthatóvá.

IV. Eredmények

IV. 1. A tervezett deléciók bemutatása

A Rad18 fehérje 487 aminosavból áll, sematikus képe a 11. ábrán látható. Eddig hat domént azonosítottak a szerkezetében, melyek közül csak négynek ismerjük pontosan a jelentőségét a Rad18 szerepének kialakításában. Ide tartozik a RING domén (28-65), SIM (136-142), ATPáz (365) és a Rad6-kötő domén (371-410). A cink-ujj (190-210) és a SAP (278-312) domén szerepe azonban nem tisztázott, az erre vonatkozó szakirodalomban ellentmondásokba ütközünk.



11. ábra: A deléciók Rad18 fehérjék sematikus ábrázolása. A számok aminosavakat jelentenek.

A sematikus ábrán jól látszik, hogy az ismert doméneken kívül a Rad18 nagy részei maradnak hozzárendelt funkció nélkül. Ha a fehérje C-terminális részét megnézzük, láthatunk egy 77 aminosavból álló régiót (410-487), melynek szerepéről nem rendelkezünk információval. Az N-terminális részén a RING és cink-ujj motívum között egy szembetűnően nagy, 125 aminosavból álló fehérje részletre lettünk figyelmesek, melynek jelentőségéről semmilyen adat nem állt rendelkezésünkre. Munkánk tervezésekor a SIM motívum, mely ezt a hatalmas régiót kettészeli még nem volt ismert, csak később került azonosításra. A cink-ujj és

a SAP domén között is egy nagyobb, 64 aminosavból álló darabja marad karakterizálatlanul a fehérjének.

Azért, hogy ennek a sokoldalú fehérjének az eddigieknél jobban megismerjük a működését, célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az említett részletek jelentőségét a DNS-hiba tolerancia mechanizmusában, valamint fényt derítünk a SAP és a cink-ujj domén szerepére a Rad18 működésében. Ezért a Rad18 C-terminális részének vizsgálatához három, egyre kisebb C-terminális darabot eltávolító konstrukciót terveztünk meg. Az általunk C1-nek elnevezett mutáns Rad18 fehérjéből az utolsó 67 aminosav hiányzik, a C2-ből 37, a C3 pedig 17 aminosavval rövidebb, mint a vad típusú fehérje (11. ábra). Mind a három mutáns a Rad6-kötő domén után hiányos, hiszen ez esszenciális a Rad18 működéséhez, így nem lett volna értelme elrontani.

A Rad18 karboxiterminális véghez hasonlóan az N-terminális régiót is három különböző méretű deléziós konstrukció segítségével vizsgáltuk meg. A legnagyobb deléziós fehérje az N1, melyből 110 aminosav hiányzik, így szinte egymás mellé kerül a RING és a cink-ujj motívum (11. ábra). Az N2-ből 75 aminosavat távolítottunk el. Az N3-ból csak 35 aminosav hiányzik, közvetlenül a cink-ujj motívum előtt, így a később azonosított SIM-et még tartalmazza a fehérje.

A cink-ujjat, mely közvetlenül az N-terminális deléziók után található, a C2HC motívum két ciszteinjének glicinre cserélésével rontottuk el (CC190,193GG), nem töröltük ki az egész domént (Zn^{*}). A pontmutációk miatt a doménre jellemző struktúra nem tud kialakulni, így vizsgálhatóvá válik a fehérje működésében betöltött szerepe.

A fehérje középső részén, a cink-ujj és a SAP között, egy 62 aminosavból álló fehérje részletet találunk, melynek funkciójáról szintén nem rendelkezünk információval, így ezt is szeretnénk volna feltérképezni. A vizsgálatokhoz létrehoztunk egy olyan deléziós fehérjét, melyben a cink-ujj és a SAP domén közvetlenül egymás mellé kerül a delézió által és M-nek neveztük el (Middle).

A SAP domén szerepének pontosabb meghatározásához eltávolítottuk a domént felépítő hélix-loop-hélix motívum első hélixét, valamint az előtte található 32 aminosavat, így ez a delézió (SAP) részben átfed az M-ből hiányzó darabbal.

IV.2. A Rad18 fehérje C-terminális régiójának szerepe a DNS-hiba tolerancia útvonal működésében

IV.2.1. C-terminális deléció hordozó mutánsok elkészítése

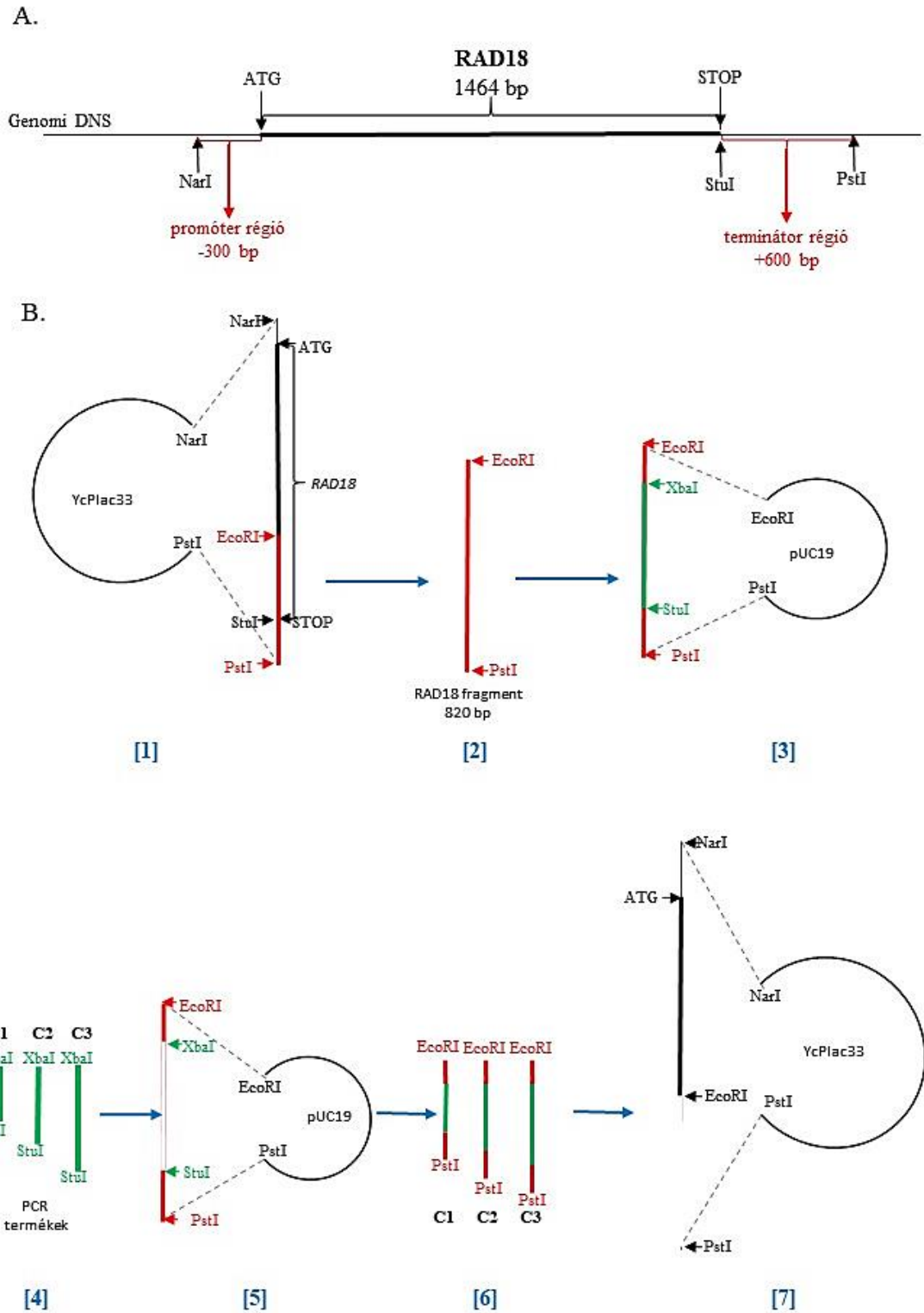
A kiindulási konstrukciónk a 300 bázispárnyi promóter régiót, vad típusú *RAD18* gént és a stop kodon utáni 600 bázispár (12. A.) hosszúságú szakaszt tartalmazó, YCplac33 élesztő centromeres vektor (pID466, 12. B. [1]). Ebből EcoRI+PstI enzimekkel történő kettős emésztés után a keletkező, a *RAD18* gént kódoló szekvencia második felét tartalmazó 820 bp-os fragmentet (12. B. [2.]) a pUC19 vektor azonos hasítási helyeire klónoztuk. Az így létrejött konstruktot XbaI+StuI enzimekkel emésztettük, ugyanis ezen helyek segítségével a konstruktból eltávolítható volt a fehérje C-terminális végét kódoló régió (12. B. [3]), és helyére XbaI+StuI helyeket tartalmazó oligonukleotidokat használva, PCR-rel előállított tetszőleges hosszúságú *RAD18* C-terminális fragmentek voltak klónoozhatók (12. B. [4]). Az XbaI helyet hordozó szensz oligó az eredeti XbaI helyhez hibridizált, ehhez háromféle stop kodont és StuI helyet hordozó antiszensz oligót terveztünk, melyek az XbaI helyhez egyre közelebbi részhez hibridizáltak és építették be a STOP kodont. A három deléciós PCR fragmentet visszaklónoztuk a *RAD18* gént tartalmazó pUC19 konstruktba (12. B. [5]) majd az így kapott szubklónokból a már deléciós *RAD18* gént EcoRI+PstI-gyel (12. B. [6]) az eredeti vad típusú *RAD18* gént tartalmazó élesztő centromeres vektorba klónoztuk (12. B. [7]). A szekvenálást követően meggyőződünk arról, hogy a leolvasási keret nem csúszott el, így a *RAD18* deléciós konstruktok felhasználhatók transzformáláshoz és a genomi *RAD18* gén deléciójának komplementációjához (12. ábra).

Az így létrehozott C-terminális deléciós konstruktok jelölései:

pID479: Rad18 Δ (420-487) C1

pID495: Rad18 Δ (450-487) C2

pID501: Rad18 Δ (470-487) C3



12. ábra: A RAD18 gén és genomi környezete (A.) C-terminális deléciós mutánsok elkészítésének lépései (B).

IV.2.2. C-terminális deléciós mutánsok vizsgálata

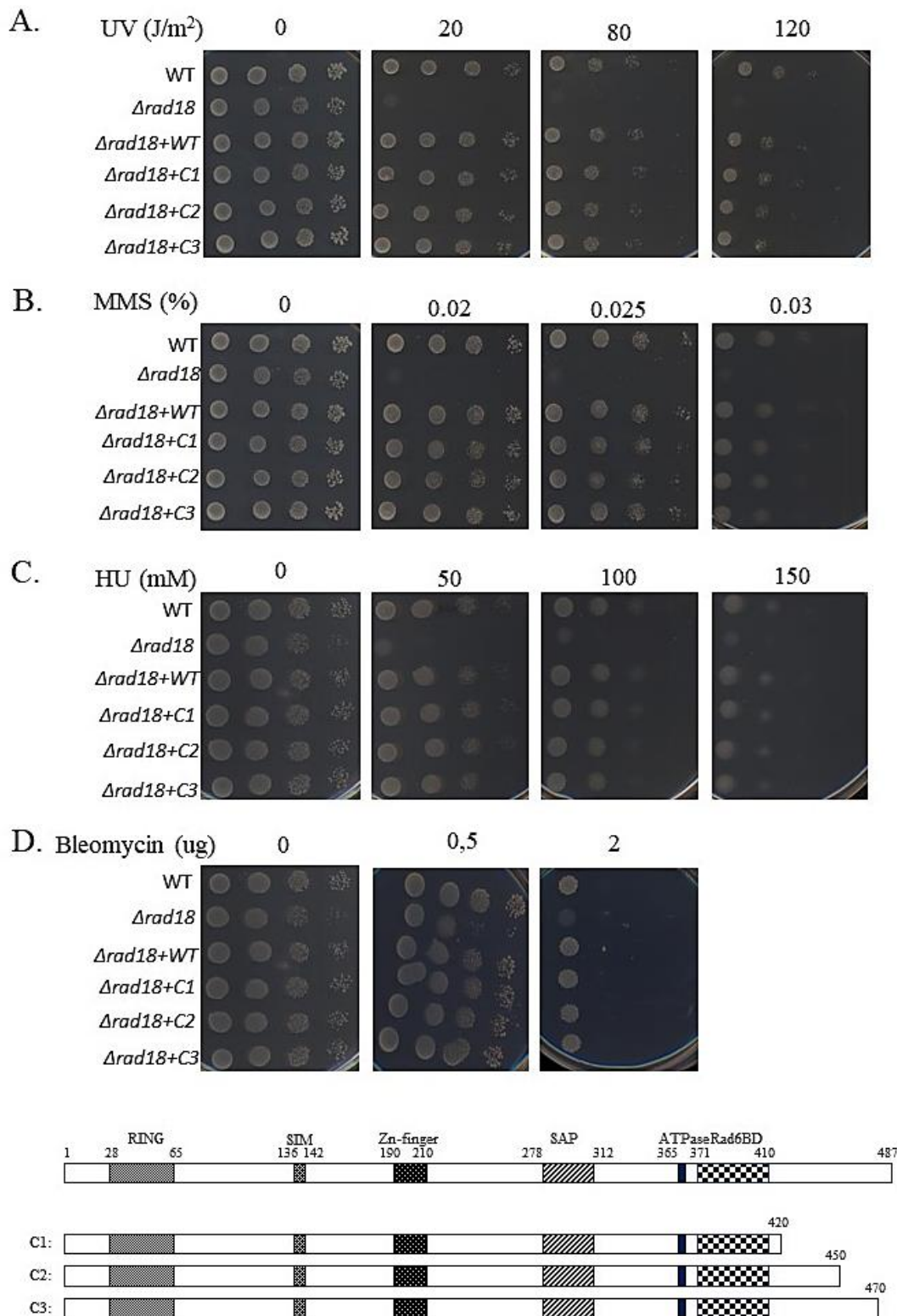
Egy fehérje DNS-hiba tolerancia útvonalban betöltött szerepének vizsgálatához, az adott deléciós fehérjét kódoló törzset DNS-károsító hatásoknak tesszük ki. Amennyiben a fehérje részt vesz a hibatolerancia folyamatokban, a törzs megnövekedett érzékenységet mutat a DNS károsító szerekre a vad típusú kontrollhoz képest. Az általunk előállított *RAD18* deléciós konstruktot - mint egyedüli Rad18 forrást - tartalmazó törzset is ilyen vizsgálatoknak vetettük alá.

Elsőként UV kezelésnek tettük ki a vizsgálni kívánt törzseket, hogy kiderüljön a deléciók érintik-e a Rad18 fehérje funkcióját az UV okozta károsodások kijavításában. UV hatására a szomszédos pirimidin bázisok között kovalens keresztkötések jönnek létre, így pirimidin dimerek keletkeznek, a legismertebb talán a timin dimer. Élesztőben működik egy látható fény hatására aktiválódó fotoliáz nevű enzim, ami képes az UV okozta sérüléseket kijavítani, elhasítja a timin dimernél lévő kettős kötést, ezért az UV-val kezelt törzseket sötétben kell tartani, hogy az általunk vizsgálni kívánt reparációs útvonalak működését tudjuk megfigyelni. Ugyancsak fény hatására a pirimidinek között keletkezik a 6-4 fotoproduktum, amely mutagénebb a timin dimereknél. Ahogyan azt a 13. ábra A. képe mutatja a deléciós törzsek a teljes *RAD18* delécióval ellentétben - amelynél extrém érzékenységet figyelhattunk meg - nem mutatnak fokozott érzékenységet az UV sugárzásra, a vad típusú *RAD18* gént hordozó kontrollal azonos módon viselkednek.

A következő DNS-károsító ágens, melynek alávetettük a Rad18 fehérje C-terminális részén deléciót hordozó mutáns törzseket a metil-metanoszulfát (MMS), mely a bázisok metilációjával fejt ki károsító hatását. A kísérlet eredményeként megállapíthattuk, hogy a C-terminális *RAD18* deléciós konstruktot hordozó törzsek ugyanúgy viselkednek MMS kezelésre, mint a vad típusú *RAD18* gént hordozó kontroll törzs (13. ábra B. képe).

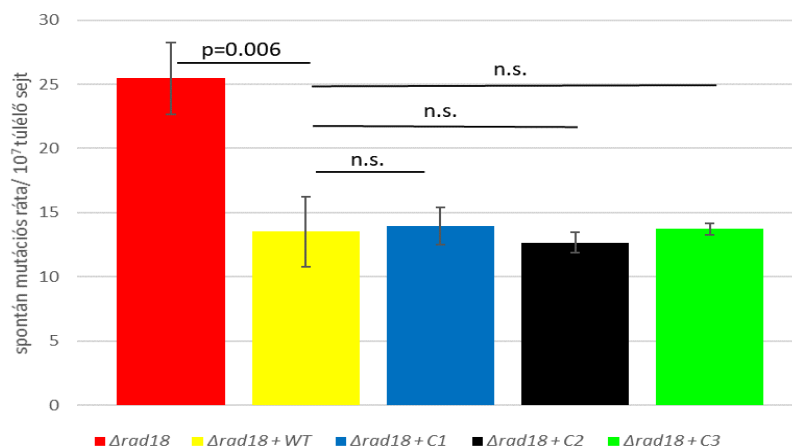
A hydroxi-urea (HU) ribonukleotid-reduktáz inhibitor és a replikációs apparátust a dCTP szint csökkentésével blokkolva fejt ki károsító hatását. Ezt a szert alkalmazva lehetőségünk nyílik a csonkolt fehérjék replikációban betöltött szerepének vizsgálatára. A mutáns törzseket HU kezelésnek vetettük alá és megvizsgáltuk, hogy a *RAD18* gén különböző deléciói hatással vannak-e a törzsek túlélésére. Kísérleteink azt mutatták, hogy az előállított deléciók nem befolyásolják a Rad18 fehérje replikációban betöltött szerepét (13. ábra C. képe).

Ugyanez a fenotípus figyelhető meg bleomycin – kemoterápis szer, mely a DNS szál törését idézi elő - kezelés hatására is, tehát a deléciós fehérjék nem érzékenyítik a törzset kettős szálú DNS-törések hatására (13. ábra D. képe).



13. ábra: C-terminális deléciós törzsek érzékenységének vizsgálata. Érzékenységi vizsgálat UV (A.), MMS (B.), hidroxy-urea (C.) és bleomycin (D.) kezelés hatására. *WT*: vad típusú élesztő törzs. $\Delta rad18$: *RAD18* gén genomi delécióját tartalmazó törzs. $\Delta rad18 + WT$: *RAD18* gén genomi delécióját tartalmazó, vad típusú *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. $\Delta rad18 + C1$: *RAD18* gén genomi delécióját tartalmazó, C1 deléciós *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. $\Delta rad18 + C2$: *RAD18* gén genomi delécióját tartalmazó, C2 deléciós *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. $\Delta rad18 + C3$: *RAD18* gén genomi delécióját tartalmazó, C3 deléciós *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. A rajz a kísérletben használt Rad18 mutánsok szerkezetét ábrázolja.

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a Rad18 fehérje C-terminális részének eltávolítása nem befolyásolja a Rad18 funkcióját a DNS-hiba tolerancia útvonalban. Lehetséges az, hogy egy ilyen fontos szabályozó fehérje, mint a Rad18, utolsó 67 aminosavának ne legyen jelentősége a DNS-hiba tolerancia folyamatában? Hogy ebben biztosak lehessünk, spontán mutagenesis kísérleteket is végeztünk. Ezek során mind a három C-terminális deléciót hordozó törzs a vad típusú kontroll törzssel közel azonos spontán mutációs rátát mutatott, tehát kijelenthetjük, hogy a hiányzó szakaszok nem okozzák a mutagén útvonal túlműködését (14. ábra).



14. ábra: Spontán mutagenesis kísérlet. Az oszlopok három kísérlet átlagait és az ebből számolt szórás valamint szignifikancia értékeket (p) mutatják. Ha a p-érték <0.05 akkor az eredmény szignifikánsnak tekinthető, ha a p-érték > 0.05, akkor nem szignifikáns (n.s.). $\Delta rad18$: a *RAD18* gén genomi delécióját tartalmazó törzs, $\Delta rad18+WT$: vad típusú *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. $\Delta rad18+C1$: C1 deléciós *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs, $\Delta rad18+C2$: C2 deléciós *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs, $\Delta rad18+C3$: C3 deléciós *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs.

IV.3. A Rad18 fehérje N-terminális régiójának vizsgálata a DNS-hiba tolerancia útvonal működésében

IV.3.1. N-terminális részen (RING és cink-ujj domén között) deléciót hordozó mutánsok elkészítése

A 300 bázispárnyi promóter régiót, vad típusú *RAD18* gént és a stop kodon utáni 600 bázispár hosszúságú szakaszt tartalmazó, YCplac33 élesztő centromeres vektor (pID466) (15.[1]) NarI+PstI enzimekkel történő emésztése után a keletkező 2700 bp-os fragmentumot (15.[2]) a YCplac33 módosított – NdeI restriktív enzim felismerő helyet nem tartalmazó (15.[3]) - élesztő vektor ugyanezen hasítási helyeire klónoztuk. Az így létrejött konstrukciót MscI+NdeI enzimekkel emésztettük (15.[5]), ugyanis ezen helyek segítségével a konstruktból eltávolítható a fehérje RING és cink-ujj domének közé eső részt kódoló régiója és helyére MscI+NdeI helyeket tartalmazó, a *RAD18* gén N-terminálisán egyre rövidebb részt amplifikáló oligonukleotidokat használva, PCR-rel előállított *RAD18* fragmentumok klónoozhatók (15.[4]). Az MscI helyet hordozó szensz oligó az eredeti MscI helyhez hibridizált, ezzel párban a másik három antiszensz oligó NdeI helyet hordozott az MscI-től különböző távolságra. A három deléciós PCR fragmentumot visszaklónoztuk a *RAD18* gént tartalmazó pUC19 konstrukta, majd az így kapott szubklónból a már deléciós *RAD18* gént NarI+PstI-gyel élesztő centromeres vektorba klónoztuk. A szekvenálás azt igazolta, hogy nem történt eltolódás a leolvasási keretben így a *RAD18* deléciós konstruktok felhasználhatók transzformáláshoz és a genomi *RAD18* gén deléciójának komplementációjához (15. ábra).

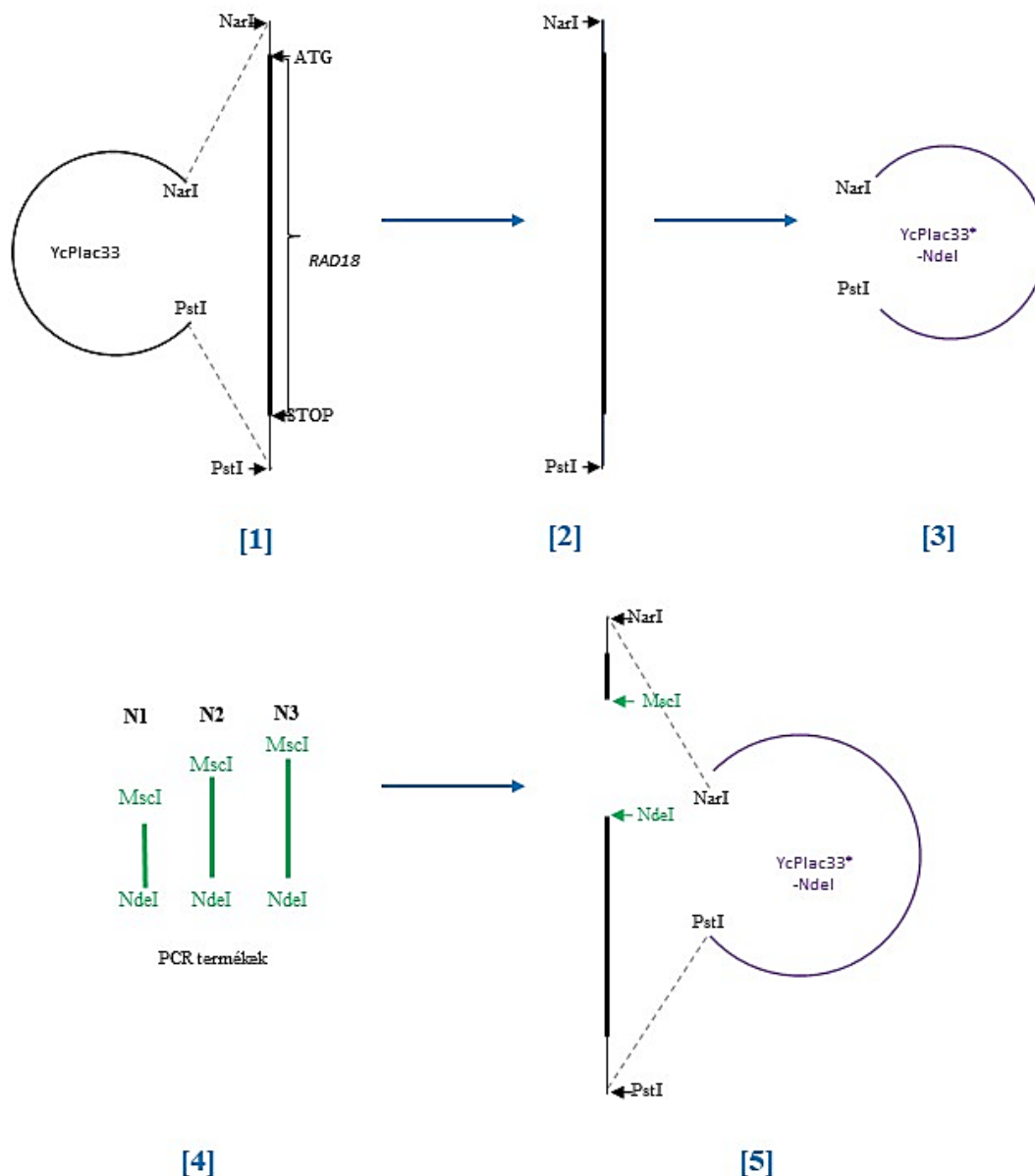
Az így létrehozott N-terminális deléciós konstruktok jelölései:

pID524: Rad18 Δ (80-190) N1

pID523: Rad18 Δ (115-190) N2

pID525: Rad18 Δ (155-190) N3

Ezt követően érzékenységi vizsgálatot végeztünk a deléciós konstruktokat tartalmazó törzsekkel.



15. ábra: Sematikus ábra a Rad18 fehérje N-terminális részén delécióit hordozó mutánsok klónozásáról.

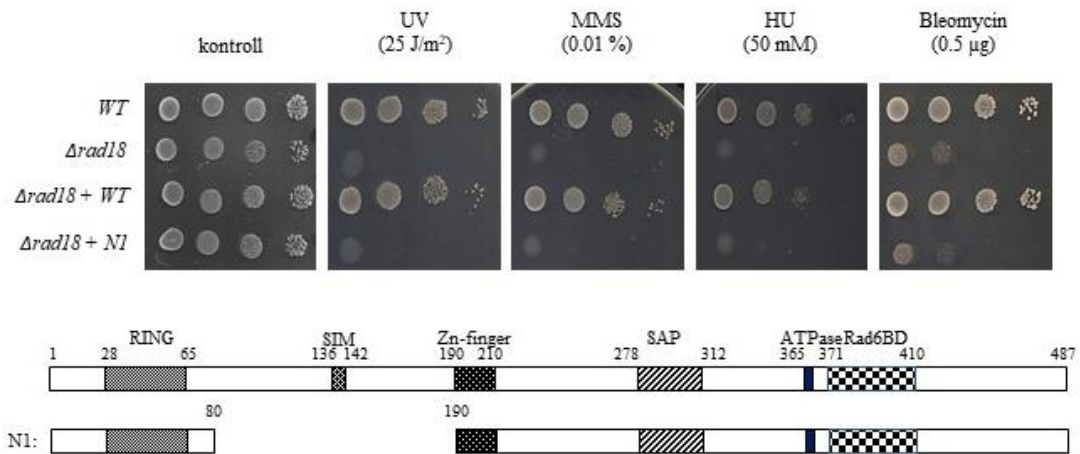
IV.3.2. A legnagyobb N-terminális delécióit tartalmazó törzs vizsgálata

Az érzékenységi vizsgálatokhoz eltávolítottuk a genomi *RAD18* szekvenciáját, így az általunk létrehozott konstrukció biztosítja az egyedüli *RAD18* forrást a sejtnek.

Annak érdekében, hogy kiderítsük, az eltávolított 110 aminosavnak van-e szerepe a Rad18 működésében, itt is érzékenységi vizsgálatokat végeztünk el, akár csak a C-terminális mutánsok esetében. A lemezre kicseppentett különböző töménységű sejteket először besugároztuk egyre növekvő dózissal ultraibolya fényvel, majd megvizsgáltuk őket HU, MMS

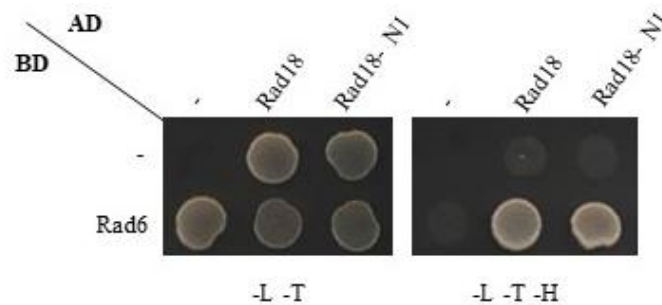
és bleomycin tartalmú lemezeken is (16. ábra). Ahogyan azt az ábra mutatja az N1 törzs a teljes *RAD18* delécióval megegyező, extrém érzékenységet mutat már alacsony dózisú UV kezelésre és az általunk használt károsító ágensek hatására is (16. ábra).

Az érzékenységi vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy az eltávolított régió a Rad18 fehérje működéséhez nélkülözhetetlen. De hogyan befolyásolhatja ez a 110 aminosav az egész hibatolerancia útvonalat?



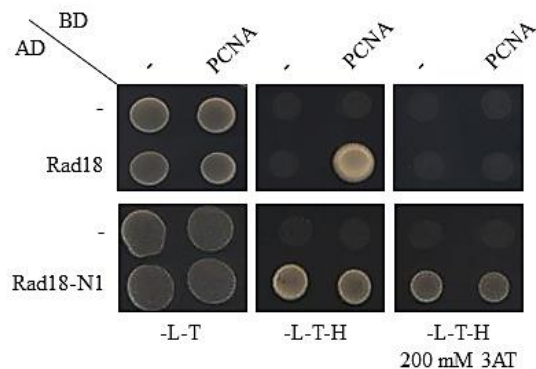
16. ábra: Az előállított N1 törzs érzékenysége különböző mutagén ágensek hatására. *WT*: vad típusú élesztő törzs, *Δrad18*: a *RAD18* gén genomi delécióját tartalmazó törzs, *Δrad18+WT*: vad típusú *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs, *Δrad18+N1*: N1 deléciós *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. A rajz az N1 mutáns Rad18 szerkezetét ábrázolja.

Mivel a Rad18 ubikvitin ligázként a Rad6 fehérjével komplexet alkotva az útvonal első lépéséért felelős, így felmerült a kérdés, hogy vajon ez a kapcsolat létre tud-e jönni a mutáns fehérje és E2 ubikvitin konjugáz párja, a Rad6 között is vagy esetleg az interakció hiánya okozhatná az N1 törzs mutagén kezelésre mutatott extrém érzékenységet. Előző tanulmányokból tudjuk, hogy a fehérje C-terminális részén található egy Rad6 kötésért felelős domén (Bailly és mtsai, 1997), mely az N1 esetében érintetlen. Előfordulhat azonban, hogy a fehérje különböző részei a megfelelő térszerkezet kialakítása után közel kerülve egymáshoz, együtt vesznek részt bizonyos kölcsönhatások kialakításában. Ahhoz, hogy megerősítsük vagy kizárjuk, hogy a hiányzó régió szükséges-e a Rad18-Rad6 komplex kialakulásához, élesztő kettős hibrid kísérletet végeztünk. Amint azt a 17. ábrán láthatjuk, a kísérlet eredménye egyértelműen igazolta, hogy a Rad18 N1 deléciós formája ugyanúgy képes kölcsönhatásba lépni a Rad6 fehérjével, akár csak a vad típusú fehérje.



17. ábra: Élesztő kettős hibrid kísérlet Rad6-Rad18 kölcsönhatás kimutatására. (AD: activation domain, BD: binding domain, -:üres vektorok) Kontroll –L-T (leucin és triptofán aminosavak nélküli) lemezen mindegyik törzs felnő, míg a –L-T-H (leucin, triptofán és hisztidin aminosavak nélküli) táptalajon csak a pozitív, kölcsönhatást mutató telepek tudnak.

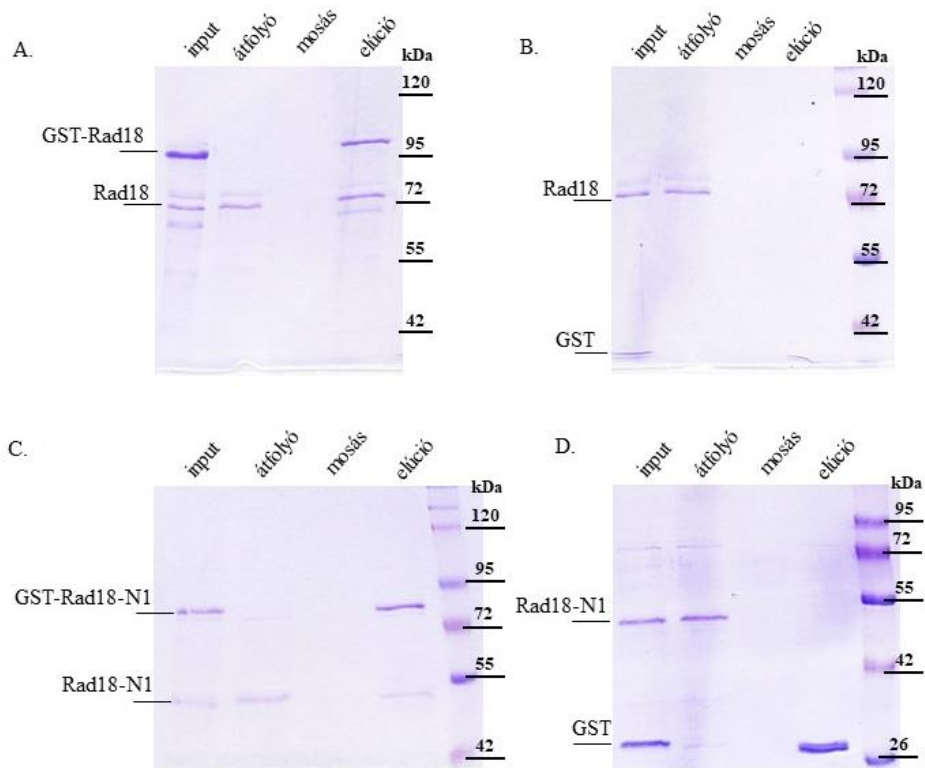
Hasonló extrém érzékenységet okoz az is, ha a DNS-károsodás hatására a PCNA molekula nem tud ubiquitinálódni a Rad6/Rad18 komplex által. Ismert, hogy a Rad18 kölcsönhat a PCNA-val, de hogy ez az interakció a fehérjén belül hol jön létre, még nem tisztázott. Szerettük volna megvizsgálni élesztő kéthibrid kísérletben, hogy az N1 kialakítja-e a kölcsönhatást a PCNA-val. Sajnos az interakciós partnert nem tartalmazó törzs is felnőtt a hármas szelektációs lemezen, mert a *HIS3* gén terméke ki tudott fejlődni, vagyis az N1 mutáns Rad18 erős önaktiválást mutatott az üres AD vektorral. Az önaktiválást 3AT (3-Amino-1,2,4-triazole) segítségével sem sikerült megszüntetni, pedig ez a drog a *HIS3* riportter gén termékének kompetitív inhibitora. A számos próbálkozás, optimalizálás ellenére sem tudtuk használni végül ezt a kísérleti rendszert a kölcsönhatás vizsgálatára. Természetesen más kísérleti eljárásokkal is próbálkoztunk (GST pull down és koimmunoprecipitáció), de ezekkel sem sikerült tisztázni, hogy az N1-PCNA kölcsönhatás kialakul-e. Így továbbra is nyitott kérdés marad tehát, hogy mi áll az N1 esetében megfigyelt extrém érzékenység mögött.



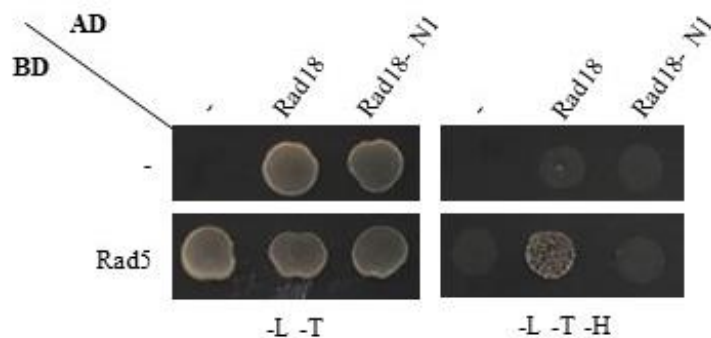
18. ábra: Élesztő kettős hibrid kísérlet PCNA-N1-Rad18 kölcsönhatás kimutatására. (AD: activation domain, BD: binding domain, -:üres vektorok) Kontroll –L-T (leucin és triptofán aminosavak nélküli) lemezen mindegyik törzs felnő, míg a –L-T-H (leucin, triptofán és hisztidin aminosavak nélküli) táptalajon csak a pozitív, kölcsönhatást mutató telepek tudnak felnőni.

Ismert, hogy a Rad18 fehérje képes önmagával dimert alkotni, de a dimerképzés pontos funkcióját, valamint a kölcsönhatás kialakításáért felelős régiót még nem sikerült meghatározni. Vannak olyan elméletek, miszerint a DNS-hiba tolerancia útvonal első lépésénél a fehérje még dimert képez, majd amikor a villa-visszafordításon alapuló útvonalnak kell működésbe lendülnie, akkor a Rad5 fehérjével lép interakcióba (Jentsch és mtsai, 2000). Kísérleteinkből kiderült (19. ábra), hogy a Rad18-Rad18 dimer kialakulásában nem okoz problémát az N1-ből hiányzó 110 aminosavnyi darab. A 19. ábra A. és B. képen a vad típusú Rad18-cal, a C. és D. ábrán pedig az N1 deléciós fehérjével végzett kísérleteket láthatjuk. Az akrilamid gélek első oszlopaiban (input) láthatóvá válik a két vizsgált fehérje mérete és mennyisége a reakcióban. A kísérletben a GST-vel jelölt Rad18 fehérjék 30 kDa-nal feljebb jelennek meg eredeti méretüknél, mivel a GST képes a glutation szefaróz gyöngyökhöz kötődni. A gyöngyön átfolyó frakcióban a GST nélküli tisztított fehérje jelenik meg, mely nem lép kölcsönhatásba a reakció során a gyöngyökkel. A több lépcsős mosás utolsó frakciójából felvitt minta („mosás”) kontrollként szolgál, ha itt nem jelennek meg a vizsgált fehérjék, akkor biztosak lehetünk abban, hogy az elúció során a specifikus kölcsönhatások válnak csak láthatóvá. A 19. A. ábrán jól látható, hogy az elúciós frakcióban a GST-vel jelölt forma mellett megjelenik a vele kölcsönhatásba lépett fehérje is, ami maga a Rad18. A 19. B. kép a kontroll kísérletet foglalja össze, amelyben a GST-Rad18 helyett csak GST-t kötöttünk gyöngyre, és ehhez adtuk hozzá a Rad18 fehérjét. Az ábrán az látható, hogy az elúcióban a tisztított Rad18 fehérje nem jelenik meg a GST mellett, tehát az A. panelen tapasztalt kölcsönhatás specifikusan a két Rad18 fehérje között jön létre. A GST-N1 és N1 fehérjék reakcióját vizsgálva (19. C. ábra) az elúciós frakcióban ismét megjelenik mindkét fehérje, tehát a dimer ki tud alakulni a két deléciós fehérje

között is. A D. ábra ez utóbbi kísérlet kontrollját ábrázolja, ahol az elúciós frakcióban csak a GST fehérjét láthatjuk, tehát nincsen aspecifikus kötődés a GST és az N1 fehérje között.



19. ábra: A vad típusú Rad18 és GST-Rad18 (A.), valamint N1 Rad18 és GST-N1 Rad18 (C.) fehérjék kölcsönhatásának kimutatása GST pull-down kísérletben. Az N1 fehérje a hiányzó 110 aminosavnak köszönhetően 50 kDa magasságban (C., D.), míg a vad típusú fehérje 70 kDa-nál látható a képen (A., B.). Az N1 GST-vel fuzionált párja 80 kDa (C.) körül, míg a vad típusú Rad18+GST 100 kDa méretű (A.).

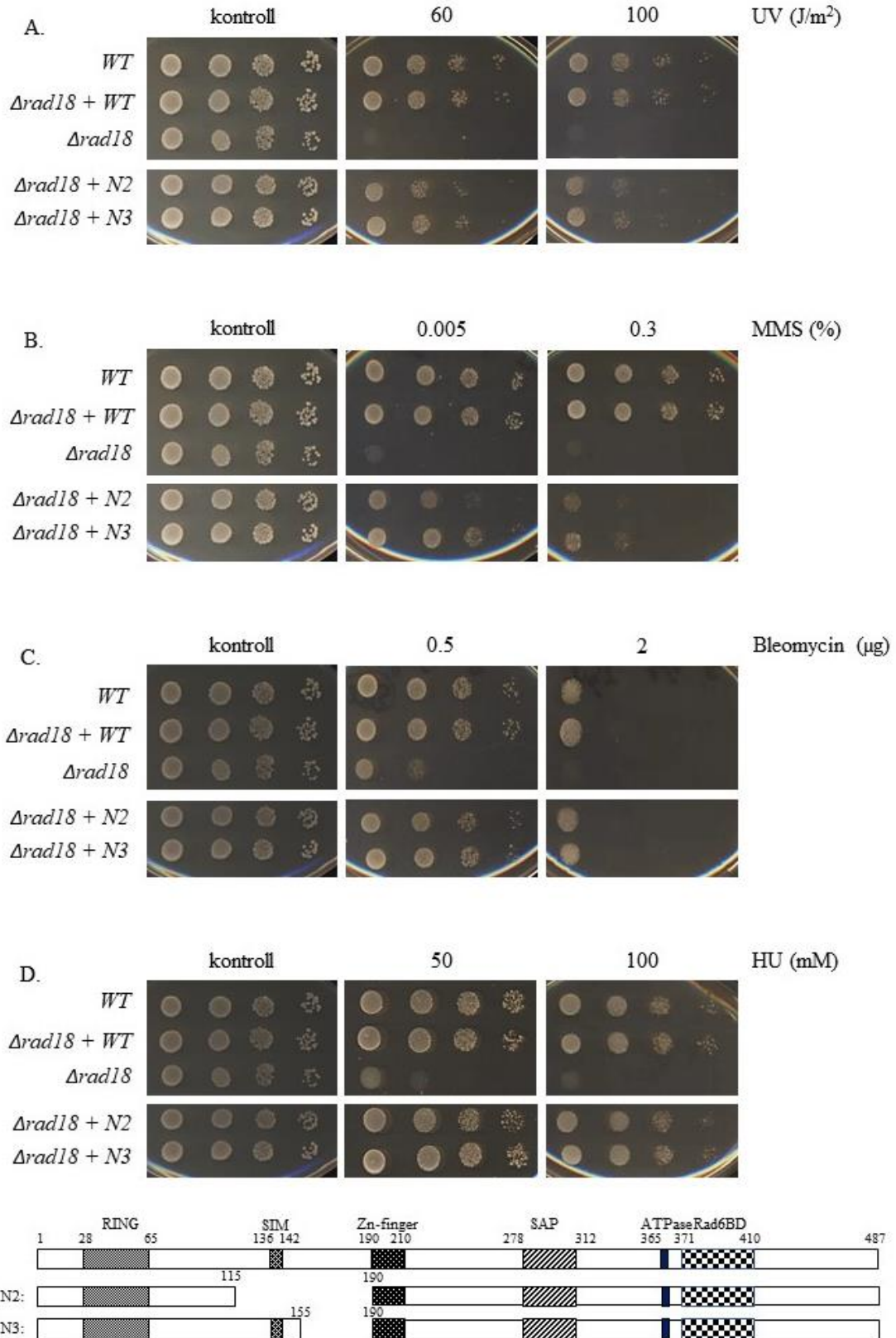


20. ábra: Élesztő kettős hibrid kísérlet Rad5-Rad18 kölcsönhatás kimutatására. (AD: activation domain, BD: binding domain, -: üres vektorok) Kontroll -L-T (leucin és triptofán aminosavak nélküli) lemezen mindegyik törzs felnő, míg a -L-T-H (leucin, triptofán és hisztidin aminosavak nélküli) táptalajon csak a pozitív, kölcsönhatást mutató telepek tudnak.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy képes-e az N1 mutáns Rad18 fehérje a Rad5-tel kölcsönhatás kialakítására. Bár az N1-Rad5 kölcsönhatás hiánya nem magyarázná az N1 törzs extrém érzékenységét, melyet a különböző drogokkal való kezelésnél tapasztaltunk, de segítene a kölcsönható felület részletesebb feltérképezésében. Ismert ugyanis, hogy ha a villa-visszafordításon alapuló útvonal nem működik, melynek a Rad5 nélkülözhetetlen eleme, akkor az csak egy mérsékelt érzékeny fenotípust okoz UV kezelés hatására, az N1 esetben viszont a Rad18 DDT-ben betöltött teljes funkcióját gátoltuk. A Rad18 fehérjében korábban azonosítottak egy nagyobb régiót a 83.-tól a 248. aminosavig, amely elegendő a Rad5-tel való kölcsönhatás létrejöttéhez (Ulrich és mtsai, 2000). Ez a szakasz felöleli az N1-ből hiányzó darabot és még az utána elhelyezkedő cink-ujj domént is. A 20. ábrán bemutatott élesztő kettős hibrid kísérlet eredményéből jól látszik, hogy az N1 mutáns Rad18 nem tud interakcióba lépni a Rad5-tel, tehát a kölcsönhatáshoz szükséges régiót le tudjuk szűkíteni a 80-190. aminosavig terjedő darabra.

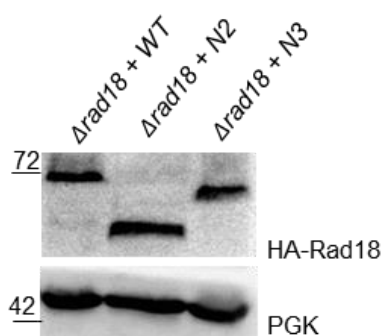
IV.3.3. A 115-190. és 155-190. aminosavig terjedő deléció tartalmazó törzsek vizsgálata

Annak érdekében, hogy kiderítsük a Rad18 fehérje 115-190. és 155-190. aminosavig terjedő régióinak érintettségét a DNS-hiba tolerancia útvonalban, érzékenységi vizsgálatoknak vetettük alá a deléciós fehérjéket kifejező törzseket, ahogy eddig is tettük a C-terminális mutánsok és az N1 deléciós Rad18 esetében. A 100 J/m^2 dózisú UV sugárzásnak kitett lemezen láthatjuk (21. ábra B.), hogy az N2 és N3 mutáns érzékenyebb fenotípust mutatott, mint a vad típusú kontroll törzs. Az UV okozta károsodások kijavításában tehát hibásan ugyan, de működnek a deléciós fehérjék. Az UV-hoz hasonlóan MMS kezelés hatására is megfigyelhető volt a két mutáns törzs vad típustól eltérő, érzékenyebb fenotípusa, sőt a két mutáns közötti kis különbség is láthatóvá vált (21. ábra C.): az N2 érzékenyebb, mint az N3. Különböző koncentrációjú bleomycint (21. ábra D.) és HU-t tartalmazó (21. ábra E.), lemezeken is elvégeztük a kísérletet, azonban ezekben az esetekben nem tapasztaltunk különbséget a mutánsok és a vad típusú törzs között. Ez alapján kijelenthetjük, hogy a hiányzó fehérje részletek nem befolyásolják a Rad18 fehérjének a replikációban és a DNS-szálltörések javításában betöltött szerepét.



21. ábra: Érzékenységi vizsgálatok UV (A.), MMS (B.), bleomycin (C.) és hidroxy-urea (D.) tartalmú lemezekon. *WT*: vad típusú élesztő törzs, *Δrad18*: a *RAD18* gén genomi delécióját tartalmazó törzs, *Δrad18+WT*: vad típusú *RAD18*-at plazmidről kifejező törzs, *Δrad18+N2*: N2 deléciós *RAD18*-at plazmidről kifejező törzs, *Δrad18+N3*: N3 deléciós *RAD18*-at plazmidről kifejező törzs. A rajz az N2 és N3 Rad18 mutáns fehérjék szerkezetét ábrázolja.

Az MMS és UV kezelés esetén tapasztalt érzékeny fenotípus az N2 és N3 deléciós Rad18 törzsek esetében arra utal, hogy a hiányzó régióknak (115-190, 155-190) szerepe van a Rad18 fehérje DDT-n belüli működésében. Azonban ki kellett zárunk annak a lehetőségét, hogy a mutáns fehérjék expressziós szintjében bekövetkezett változás okozza az érzékeny fenotípusokat DNS károsító ágensek hatására. Ennek érdekében az érzékenységi vizsgálat során használt törzsekbe a hemagglutinin (HA) jelölő fehérje szekvenciáját építettük be a vad és mutáns *RAD18*-at hordozó expressziós vektorokba a gén stop kodonja elé néhány bázispárral, majd HA specifikus ellenanyaggal ellenőriztük a fehérjék termelődését. Amint azt a 22. ábrán láthatjuk, nincsen lényeges különbség a fehérjék mennyiségében, tehát a tapasztalt érzékenység inkább valamilyen részleges funkcióvesztésre utal a DDT működésében.

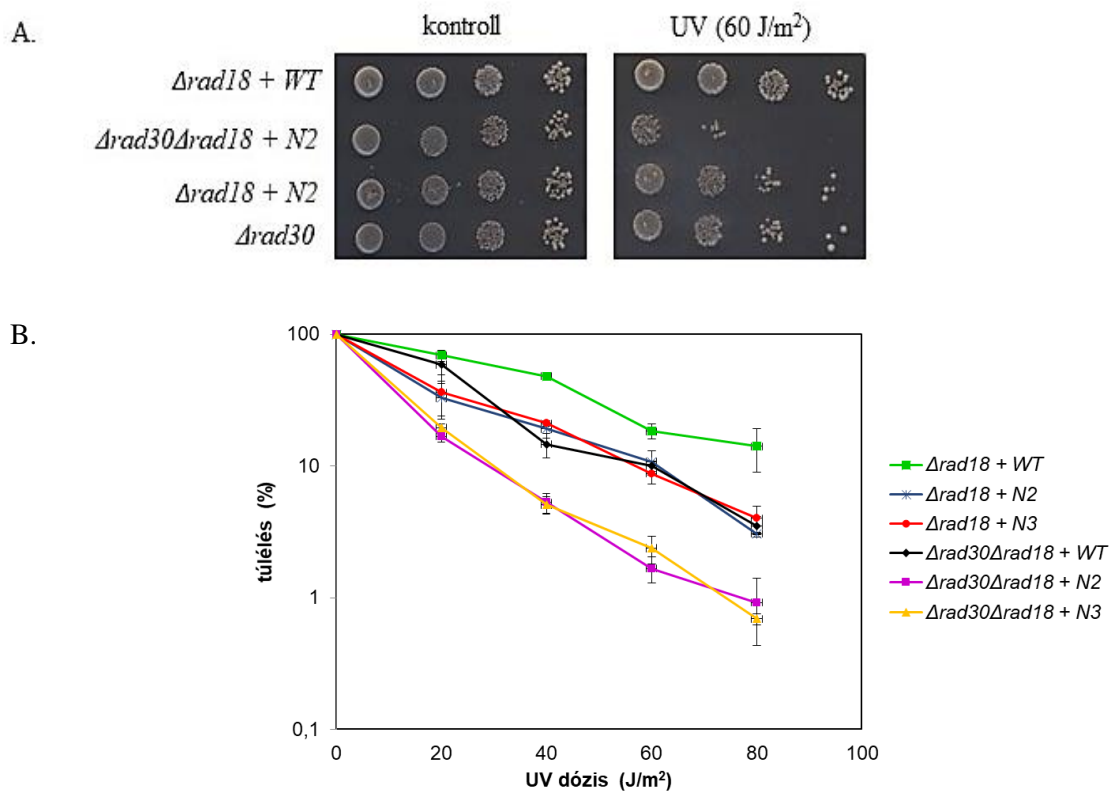


22. ábra: Western-blot kísérlet a deléciós fehérjék expressziós szintjének ellenőrzésére. A mutáns fehérjéket 10 %-os akrilamid gélen választottuk el. Az anti-HA elsődleges ellenanyagot 5000-szeres hígításban, míg az anti-PGK ellenanyagot 10.000-szeres hígításban alkalmaztuk.

Mivel a DNS-hiba tolerancia útvonal központi fehérjéről, a Rad18-ról van szó, a megváltozott érzékenység oka lehet valamelyik alútvonal nem megfelelő működése. Annak érdekében, hogy kideríthessük, hogy a hiányzó régió (115-190, 155-190) hogyan befolyásolja a Rad18 funkciójának kialakítását, genetikai vizsgálatot, episztázis analízist végeztünk el.

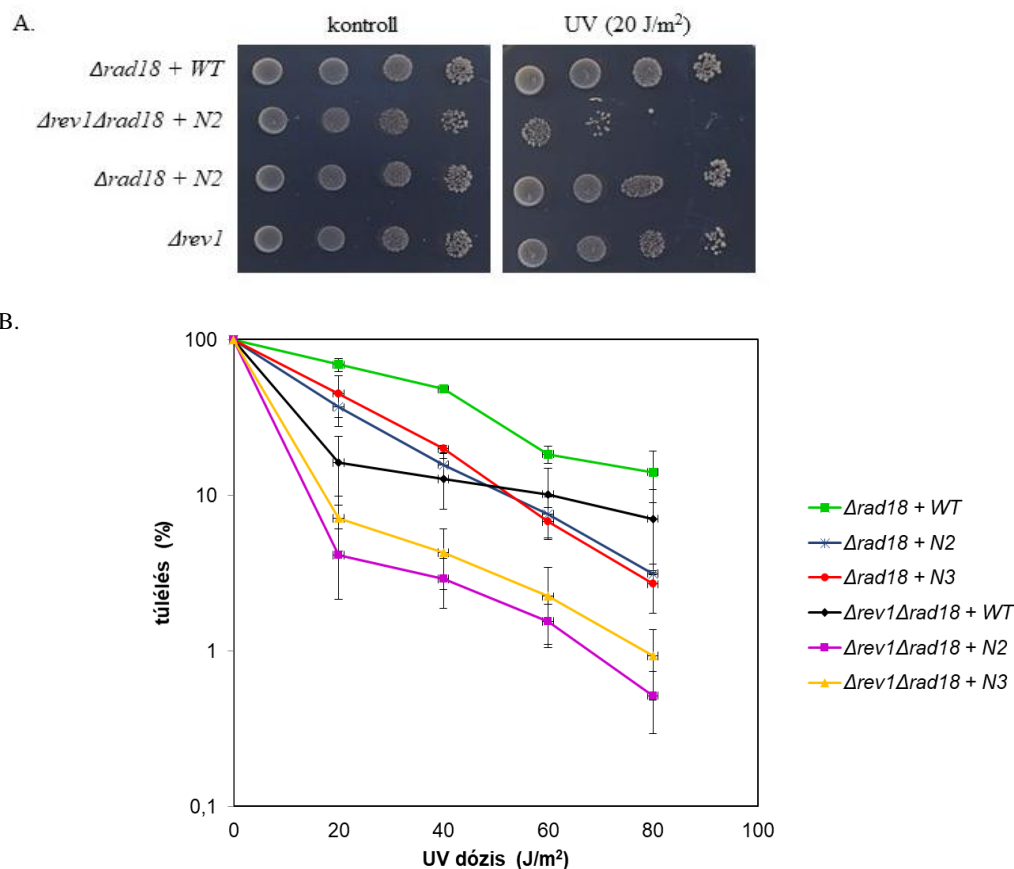
Az episztázis analízis lényege, hogy a vizsgálni kívánt gén deléciója mellett ismert funkciójú DNS-hibajavító géneket távolítunk el a genomból, és a kettős deléciós törzsek adott károsító szerekre mutatott érzékenységét összevetjük az egyes deléciós törzsek érzékenyégével. Amennyiben a kettős deléciós törzs érzékenysége nem nő az egyes deléciós törzssel szemben, akkor a két vizsgált fehérje egy útvonalban működik, ellenkező esetben két különálló útvonalban helyezkednek el. Az N2 és N3 mutánsban előállítottuk a DDT útvonal három különböző ágát inaktiváló gének (*RAD30*, *REVI*, *MMS2*) delécióját és a fent ismertetett logikát követve megvizsgáltuk a kettős deléciós vonalak UV sugárzásra mutatott érzékenységét.

A *RAD30*, mint azt már az I.3.1. fejezetben részleteztem, a Rad6/Rad18 fehérjekomplex által vezérelt DNS-hiba tolerancia külön útvonalát alkotja. Érdekesnek tartottuk tehát megvizsgálni, hogy az általunk létrehozott N2 és N3 mutáns a *RAD30*-cal egy episztázis csoportba sorolható-e. A 23. ábra A. képen láthatjuk, hogy a $\Delta rad30\Delta rad18 + N2$ törzs sokkal érzékenyebb az UV kezelésre, mint a $\Delta rad18 + N2$ vagy a $\Delta rad30$ törzsek. A 23. B ábrán bemutatott, a növekvő UV dózis hatását vizsgáló túlélési kísérletben láthatjuk, hogy az N2 és a *RAD30* gén, valamint az N3 és *RAD30* gén delécióját tartalmazó kettős mutáns törzsek mutatják a legalacsonyabb túlélési százalékot. Az episztázis analízis és a túlélési kísérlet is arra enged következtetni, hogy az N2-es mutánsból hiányzó 115-190 aminosavig, valamint az N3-ből hiányzó 155-190-ig terjedő régió nem a Rad30 fehérjét magába foglaló alútvonal működését befolyásolta.



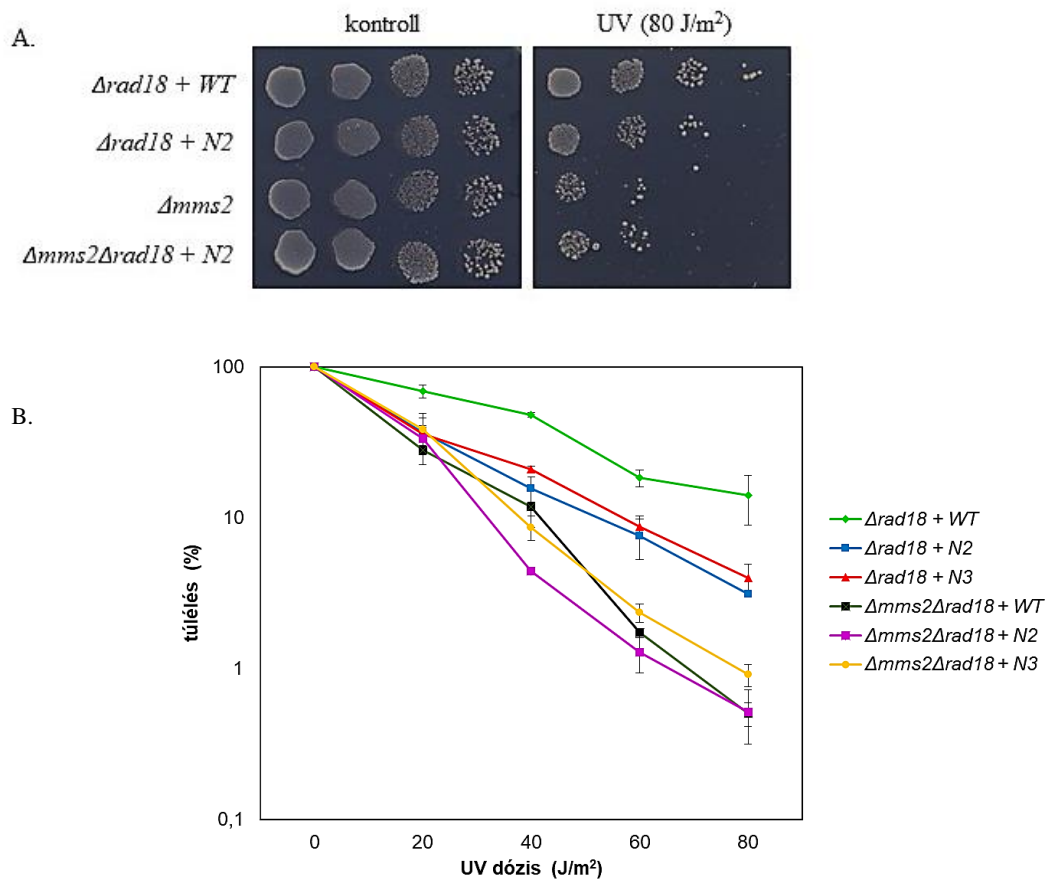
23. ábra: Episztázis analízis a *RAD30* génnel (A.). UV kezeléssel túlélési kísérlet (B.). $\Delta rad18 + WT$: vad típusú *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. $\Delta rad18\Delta rad30 + N2$: *RAD18* és *RAD30* gének genomi delécióját tartalmazó és az N2 delécióval *RAD18*-at plazmidról termelő törzs. $\Delta rad18\Delta rad30 + N3$: *RAD18* és *RAD30* gének genomi delécióját tartalmazó és az N3 delécióval *RAD18*-at plazmidról expresszáló törzs. $\Delta rad18\Delta rad30 + WT$: *RAD18* és *RAD30* gének genomi delécióját tartalmazó és a vad típusú *RAD18*-at plazmidról termelő törzs. $\Delta rad18 + N2$: N2 delécióval *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs, $\Delta rad18 + N3$: N3 delécióval *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs.

A DNS-hiba tolerancia útvonal transzléziós polimerázok által működő mutagén ágához tartozik a *REV1* gén, mely a következő episztázis analízis szereplője volt. A kísérlet eredményeit bemutató 24. ábrán jól látható, hogy az általunk előállított N2-es mutáns a Rev1 fehérjét tartalmazó alútvonal működését nem befolyásolta, hiszen a $\Delta rev1\Delta rad18 + N2$ kettős mutáns sokkal jobban érzékenyítette az élesztő törzset UV kezelés hatására, mint az egyes mutánsok önállóan. A 24. B. ábrán bemutatott túlélési kísérleti adatok pedig azt is jól szemléltetik, ahogyan az N2 és N3 mutánsok tovább érzékenyítik a $\Delta rev1$ törzset növekvő dózisú UV kezelés hatására, ami tovább erősíti az episztázis vizsgálatban kapottakat.



24. ábra: Episztázis analízis a *REV1* génnel (A.). Túlélési kísérlet UV kezelés hatására (B.). $\Delta rad18 + WT$: vad típusú *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. $\Delta rad18\Delta rev1 + N2$: *RAD18* és *REV1* gének genomi delécióját tartalmazó és az N2 deléciós *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. $\Delta rad18\Delta rev1 + N3$: *RAD18* és *REV1* gének genomi delécióját tartalmazó és az N3 deléciós *RAD18*-at plazmidról termelő törzs. $\Delta rad18\Delta rev1 + WT$: *RAD18* és *REV1* gének genomi delécióját tartalmazó és a vad típusú *RAD18*-at plazmidról expresszáló törzs. $\Delta rad18 + N2$: N2 deléciós *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs, $\Delta rad18 + N3$: N3 deléciós *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs.

A következőkben a *RAD5* út inaktiválását hajtottuk végre az *MMS2* gén deléciójával. Az *MMS2*, mint azt az I.4. fejezetben említettem, a Rad6/Rad18 fehérjekomplex által vezérelt DDT gépezetét a hiba mentes átírás felé irányítja. Az Ubc13-mal alkotott dimerjének ubikvitin konjugáló szerepe van, és egy poliubikvitin láncot hoz létre a PCNA fehérjén, mely azután a hibamentes átírást eredményezi.



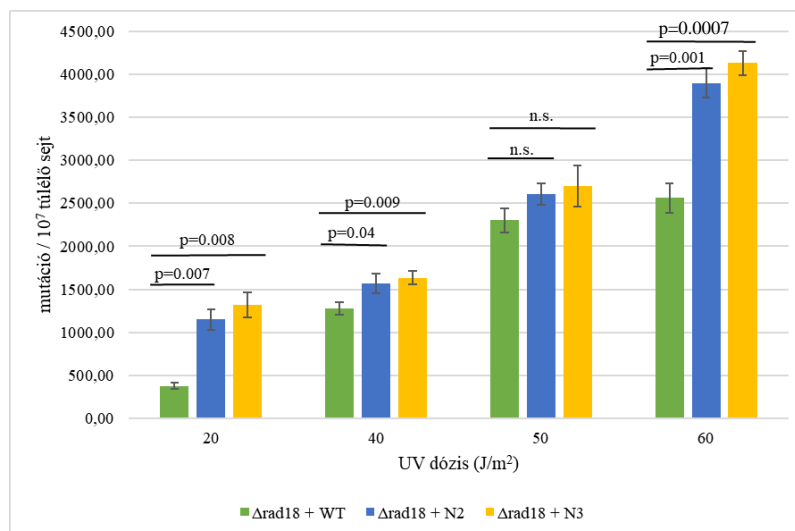
25. ábra: Episztázis analízis az *MMS2* génnel (A.). Túlélési kísérlet UV kezelés hatására (B.) *Δrad18+WT*: vad típusú *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. *Δrad18Δmms2+N2*: *RAD18* és *MMS2* gének genomi delécióját tartalmazó és az N2 deléciós *RAD18*-at plazmidról termelő törzs. *Δrad18Δmms2+N3*: *RAD18* és *MMS2* gének genomi delécióját tartalmazó és az N3 deléciós *RAD18*-at plazmidról termelő törzs. *Δrad18Δmms2+WT*: *RAD18* és *MMS2* gének genomi delécióját tartalmazó és a vad típusú *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. *Δrad18+N2*: N2 deléciós *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs, *Δrad18+N3*: N3 deléciós *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs.

Ahogy azt a 25. A. ábrán láthatjuk, az N2 és *MMS2* deléciót egyszerre hordozó mutáns azonos érzékenységet mutat az *Δmms2* törzssel. Ezt olvashatjuk le a 25. B. ábráról is: az *Δmms2Δrad18+WT* közel azonos mértékű túlélést mutat, mint a *Δmms2Δrad18+N2* vagy a *Δmms2Δrad18+N3* törzs, tehát kijelenthetjük, hogy az episztázis analízis logikája alapján

ugyanazon hibajavítási útvonalba sorolhatók. Ez számunkra azt jelenti, hogy a kérdéses Rad18 régió szerepet játszhat a DNS-hiba tolerancia útvonal hibamentes ágának működésében.

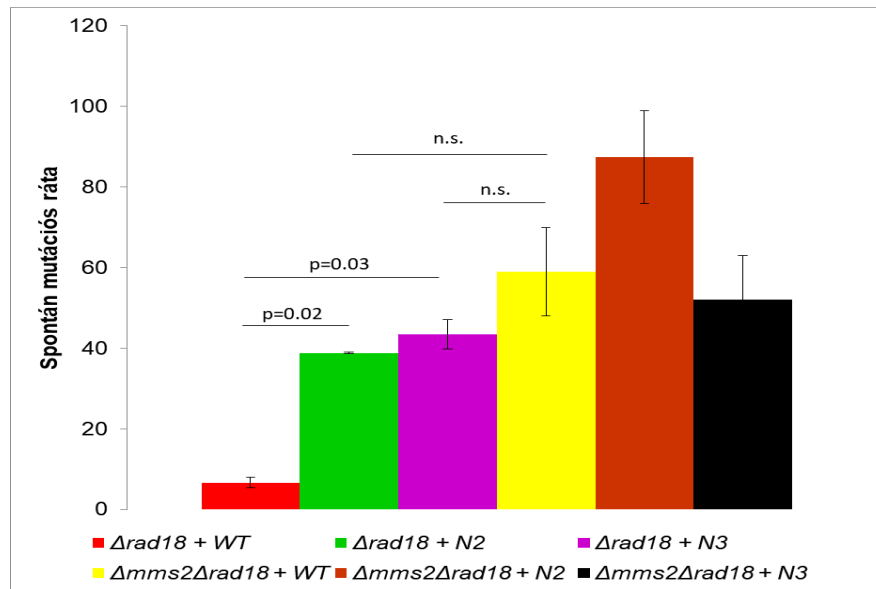
IV.3.3.1. Indukált és spontán mutagenézis vizsgálata

Mint azt az előző fejezetekben láthattuk, a különböző genetikai vizsgálatok szerint az általunk létrehozott N2 és N3 mutáns Rad18 fehérje a DNS-hiba tolerancia útvonal - *RAD5* és *MMS2-UBC13* alkotta - hibamentes javítást biztosító ágának működésében érintett. A kapott eredmény megerősítésére ellenőriztük a Rad6/Rad18 útvonal mutagén ágának működését az előállított N2 és N3 N-terminális deléció hordozó törzsekben, oly módon, hogy meghatároztuk a deléciós törzs spontán illetve indukált mutációs rátáját (ld. 3.8. és 3.9. fejezet). Ha a deléció a mutagén útvonal működését érinti, akkor kísérleteinkben csökkent mutációs gyakoriságot mutatna. Ha a deletált régió a Rad6/Rad18 útvonal hibamentes ágát inaktíválja, az növeli az UV indukált mutációs gyakoriságot a vad típusú Rad18 törzshöz képest, hiszen az inaktív hibamentes reparáció szerepét a továbbra is jól működő mutagén ág veszi át (Minesinger és mtsai, 2005). A 26. ábrán jól látható, ahogy a magasabb dózisú UV kezelés hatására az N2 és N3 deléciós mutáns Rad18 fehérjéket tartalmazó törzsekben megnő a mutációs ráta a vad típusú törzshöz képest.



26. ábra: Indukált mutagenézis kísérlet. *Δrad18+WT*: vad típusú RAD18-at plazmidról kifejező törzs. *Δrad18+N2*: N2 deléciós RAD18-at plazmidról kifejező törzs, *Δrad18+N3*: N3 deléciós RAD18-at plazmidról kifejező törzs. Az oszlopok három kísérlet átlagait és az ebből számolt szórás valamint szignifikancia értékeket mutatják. Ha a p-érték <0.05 akkor az eredmény szignifikánsnak tekinthető, ha a p-érték > 0.05, akkor nem szignifikáns (n.s.).

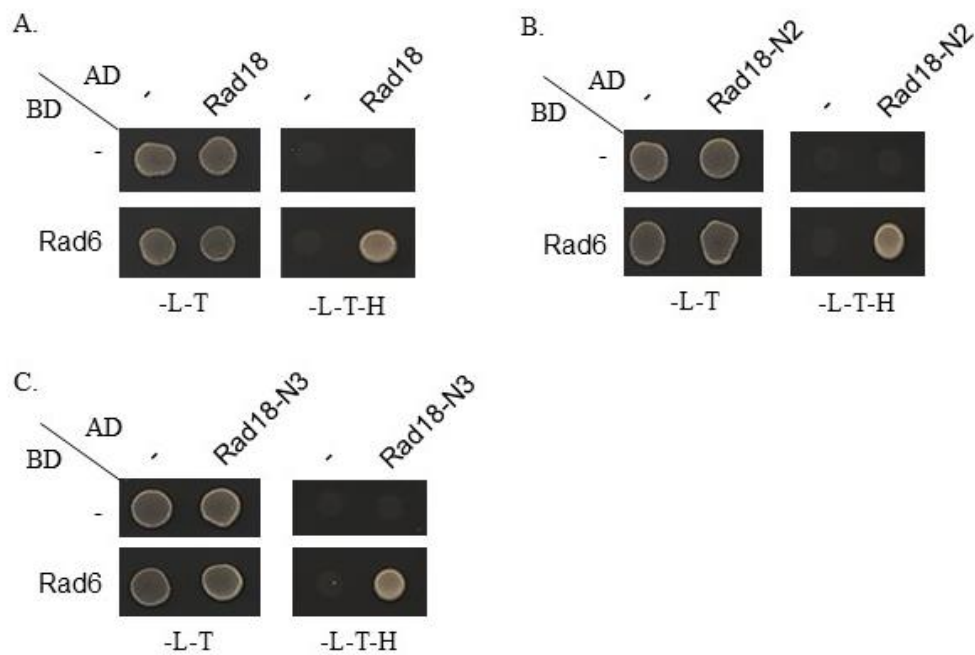
A Rad18 deléciós konstruktot hordozó törzsekben megemelkedett a spontán mutációk száma is a vad típusú *RAD18* gént tartalmazó kontrollhoz képest a teljes *MMS2* gén delécióját hordozó törzssel összevethető módon (27. ábra). Ez az episztázis analízis eredményeivel összhangban további bizonyíték arra, hogy a kérdéses Rad18 régió nélkülözhetetlen a hibamentes DNS-hiba tolerancia útvonal működéséhez.



27. ábra: Spontán mutagenézis kísérlet eredménye. $\Delta rad18+WT$: vad típusú RAD18-at plazmidról kifejező törzs. $\Delta rad18+N2$: N2 deléciós RAD18-at plazmidról kifejező törzs, $\Delta rad18+N3$: N3 deléciós RAD18-at plazmidról kifejező törzs. $\Delta rad18\Delta mms2+WT$: *RAD18* és *MMS2* gének genomi delécióját tartalmazó és az vad típusú RAD18-at plazmidról termelő törzs. $\Delta rad18\Delta mms2+N2$: *RAD18* és *MMS2* gének genomi delécióját tartalmazó és az N2 deléciós RAD18-at plazmidról termelő törzs. $\Delta rad18\Delta mms2+N3$: *RAD18* és *MMS2* gének genomi delécióját tartalmazó és az N3 deléciós RAD18-at plazmidról expresszáló törzs. Az oszlopok három kísérlet átlagait és az ebből számolt szórás valamint szignifikancia értékeket mutatják. Ha a p-érték <0.05 akkor az eredmény szignifikánsnak tekinthető, ha a p-érték >0.05 , akkor nem szignifikáns (n.s.).

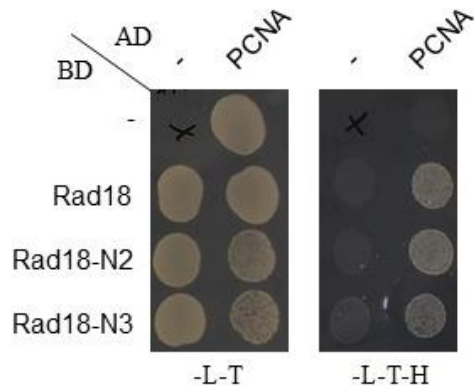
IV.3.3.2. Az N2 és N3 mutáns Rad18 fehérje által kialakított fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata élesztő kettős hibrid módszerrel

Mint azt az előzőekben láthattuk, az N-terminális mutánsok mindegyike valamilyen zavart idézett elő a Rad18 fehérje hibatolerancia útvonalban betöltött szerepében. Kísérleteink azt mutatták, hogy az N1 fehérje nem képes kötődni a Rad5-höz (20. ábra). Mivel az N1 fehérjében lévő deléció átfed az N2-ben és az N3-ban létrehozott rövidebb deléciókkal, megvizsgáltuk, hogy az N2 és N3 deléciós mutánsok kölcsönhatásba tudnak-e lépni a Rad5 fehérjével. Ezekben a kísérletekben az élesztő kettős hibrid rendszert alkalmaztuk.

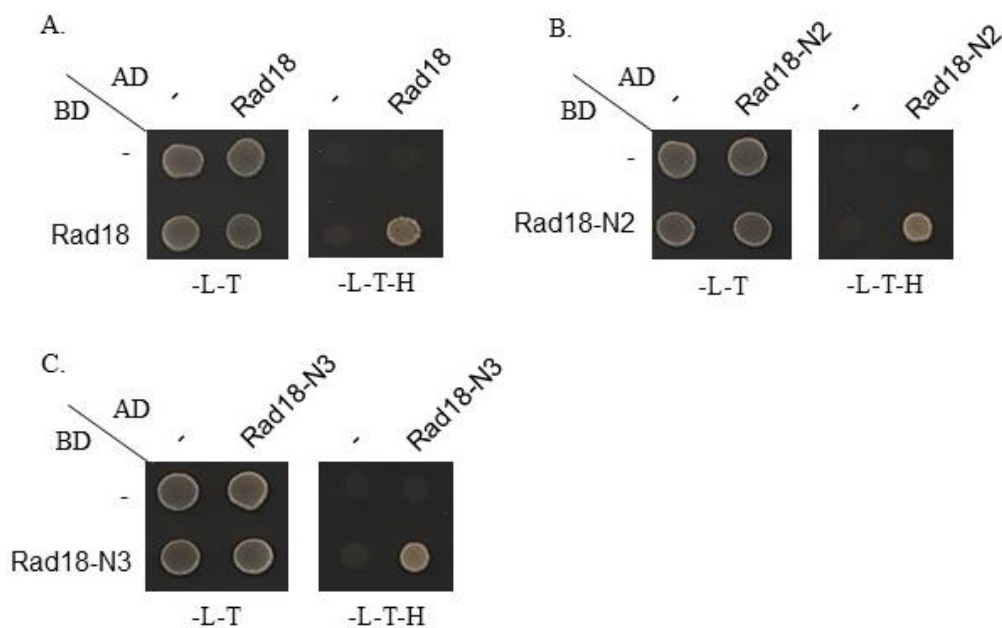


28. ábra: Élesztő kettős hibrid kísérlet Rad6-Rad18 kölcsönhatás kimutatására. A vad típusú fehérjével (A.), az N2-vel (B.) és az N3 (C.). (AD: activation domain, BD: binding domain, -:üres vektorok) Kontroll -L-T (leucin és triptofán aminosavak nélküli) lemezen mindegyik törzs felnőtt, míg a -L-T-H (leucin, triptofán és hisztidin aminosavak nélküli) táptalajon csak a pozitív, kölcsönhatást mutató telepek tudnak felnőni.

Kontrollként használtuk az élesztő kettős hibrid kísérletek során a Rad6-tal, illetve a PCNA-val való kölcsönhatásokat (28., 29. ábra). Ha ezek a kölcsönhatások nem tudnának létrejönni a két fehérje között, akkor az extrém érzékeny fenotípust okozna DNS-károsító hatásokra. Mivel a vizsgált törzsek csak mérsékelt érzékenységet mutattak UV kezelés hatására, biztosak lehettünk benne, hogy ezek az interakciók létrejönnek. Ahogy azt a 28. ábrán is láthatjuk, a Rad18 fehérje N-terminális régiójában létrehozott deléciók egyike sem befolyásolta a Rad18-Rad6 stabil komplex kialakulását, a két fehérje kötődött egymáshoz, ezt a -L-T-H tartalmú táptalajon növekvő telepek bizonyítják. Hasonlóan pozitív eredményt kaptunk a PCNA-Rad18 interakció vizsgálatánál is, vagyis ez esetben is mind a vad, mind pedig az N2 és N3 deléziós mutáns Rad18 fehérje is képes volt a kölcsönhatás kialakítására. Mivel a Rad6 kötőhely a Rad18 C-terminális felén, a PCNA kötőhely pedig valahol az N-terminális részén található, a kontrollokkal igazoltuk a kettős hibridhez használt fúziós fehérjék működőképességét.



29. ábra: Élesztő kettős hibrid kísérlet PCNA-Rad18 kölcsönhatás kimutatására. A vad típusú fehérjével, az N2 és az N3 mutánsal is egyaránt kialakul az interakció. (AD: activation domain, BD: binding domain, -:üres vektorok) Kontroll -L-T (leucin és triptofán aminosavak nélküli) lemezen mindegyik törzs felnő, míg a -L-T-H (leucin, triptofán és hisztidin aminosavak nélküli) táptalajon csak a pozitív, kölcsönhatást mutató telepek tudnak felnőni.

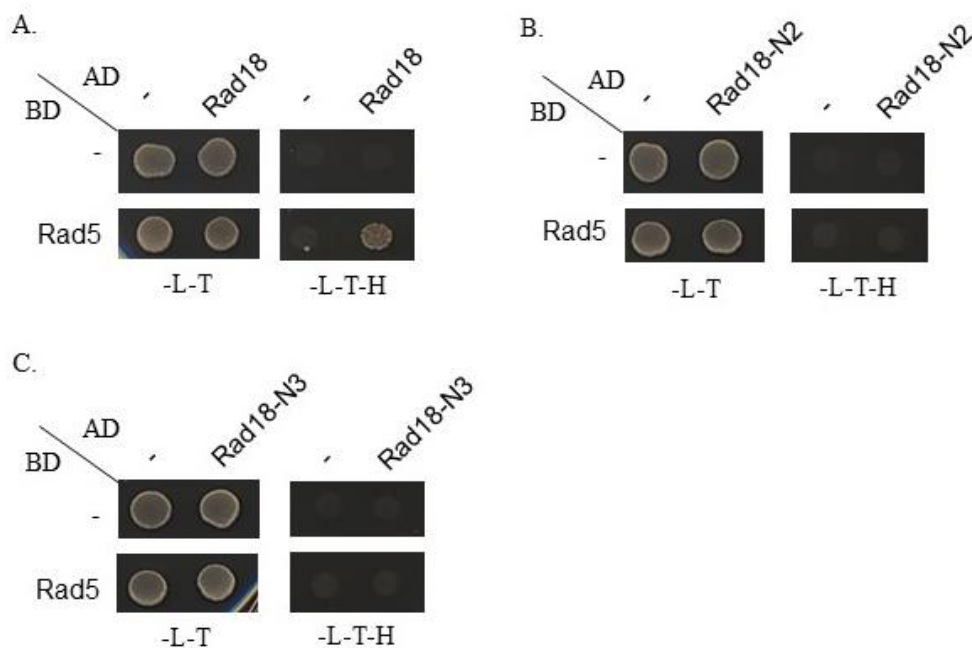


30. ábra: Élesztő kettős hibrid kísérlet dimerizáció kimutatására. A vad típusú fehérje (A.), az N2 (B.) és az N3 (C.). (AD: activation domain, BD: binding domain, -:üres vektorok) Kontroll -L-T (leucin és triptofán aminosavak nélküli) lemezen mindegyik törzs felnő, míg a -L-T-H (leucin, triptofán és hisztidin aminosavak nélküli) táptalajon csak a pozitív, kölcsönhatást mutató telepek tudnak nőni.

A következő lépésben azt vizsgáltuk meg, hogy az N2 és N3 mutáns Rad18 fehérjék képesek-e dimert alkotni. Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy ebben a képességben nem károsodott sem az N2, sem az N3 deléciós fehérje (30. ábra), képesek a homodimer

kialaktítására hiszen a hármasszelektációs lemezen felnőnek a kölcsönható fehérjéket tartalmazó törzsek.

Ezután megvizsgáltuk, hogy az N2 és N3 fehérje képes-e komplexet alkotni a Rad5 fehérjével. Amint az a 31. ábrán látható az élesztő két hibrid kísérletben, a vad típusú Rad18-tól eltérően, egyik N-terminális mutáns sem tudott kölcsönhatni a Rad5 fehérjével. Míg a kontroll lemezen (-L/-T) a törzsek kivétel nélkül felnőnek, addig a -L/-T/-H lemezen csak azok képesek, ahol interakció van a két fehérje között, esetünkben csak a vad típusú Rad18 és Rad5 fehérje között detektálható kölcsönhatás (31. ábra A kép). Ennek a kölcsönhatásnak a hiánya okozhatja a hibamentes ág inaktiválását mutánsainkban, miként azt a genetikai kísérleteink mutatták. Élesztő kettős hibrid kísérletekkel így bebizonyítottuk, hogy a 155-190 aminosavig terjedő szakaszra szükség van a Rad18-Rad5 kölcsönhatás kialakulásához (31. ábra C kép), hiszen a legkisebb N-terminális deléciót tartalmazó fehérje is képtelen az interakcióra.



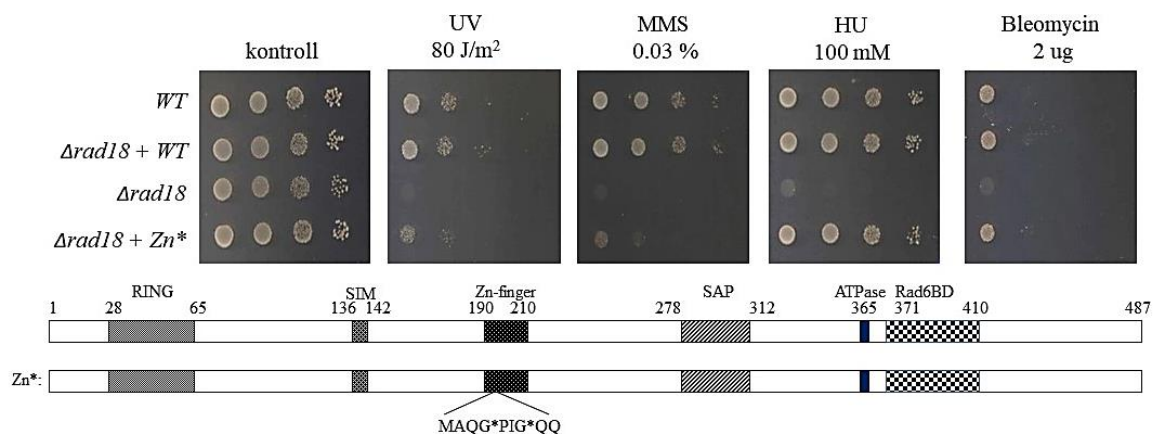
31. ábra: Élesztő kettős hibrid kísérlet Rad5-Rad18 kölcsönhatás kimutatására. A vad típusú fehérjével (A.) interakcióba lép a Rad5, míg az N2-vel (B.) és az N3 (C.) mutánsal nem képes erre. (AD: activation domain, BD: binding domain, -:üres vektorok) Kontroll -L-T (leucin és triptofán aminosavak nélküli) lemezen mindegyik törzs felnő, míg a -L-T-H (leucin, triptofán és hisztidin aminosavak nélküli) táptalajon csak a pozitív, kölcsönhatást mutató telepek tudnak nőni.

IV.4. A cink-ujj pontmutáns Rad18 fehérje elkészítése és a domén szerepének jellemzése

A Rad18 fehérje cink-ujj doménje közvetlenül az N-terminális delécióink után helyezkedik el, 190-től 210 aminosavig tart. A cink-ujj szerepéről élesztő Rad18 fehérje esetében nem sok információ áll rendelkezésünkre. Más fehérjék vizsgálata alapján feltételezett funkciója az ubikvitin kötése, illetve élesztő Rad18 esetében szerepe lehet a Rad5 kötésében is, de, utóbbit nem közvetlenül a cink-ujj, hanem egy nagyobb N-terminális régióval végzett kísérletekre alapozzák, melybe belesik ez a domén is (Ulrich és mtsai, 2000). Szerettünk volna fényt deríteni a domén funkciójára a DNS-hiba tolerancia útvonalban, ezért az ismert szekvencia motívum két cisztein aminosavát rontottuk el, így meggátolva a domén jellegzetes harmadlagos struktúrájának kialakulását.

IV.4.1. A cink-ujj pontmutáns elkészítése

Helyspecifikus, PCR alapú mutagenézissel a III.3.5. fejezetben leírt módon állítottuk elő a *RAD18* gén pontmutáns változatát, amely a 190-es és 193-as cisztein aminosav helyett glicint eredményező pontmutációt hordoz. A glicin ugyanis a legegyszerűbb aminosav, biológiai funkcióját tekintve kevésbé hangsúlyos. A pontmutánsra a dolgozatban Zn*-ként fogok hivatkozni.

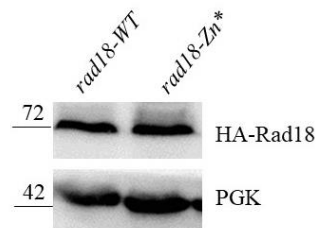


32. ábra: A Zn* mután Rad18 törzs érzékenysége különböző mutagén ágensek hatására. WT: vad típusú törzs, $\Delta rad18$: a *RAD18* genomi delécióját tartalmazó törzs, $\Delta rad18 + WT$: a vad típusú RAD18-at plazmidról termelő törzs, $\Delta rad18 + Zn^*$: az Zn* deléciós fehérjét, mint egyedüli Rad18 forrást tartalmazó törzs. A rajz a Zn* mutáns RAD18 fehérje szerkezetét ábrázolja.

IV.4.2. A Zn* pontmutáció szerepének vizsgálata a DNS-hiba tolerancia folyamatában

A 32. ábra B. képén láthatjuk a Zn* pontmutánst, mint egyedüli Rad18 forrást kifejező törzs érzékenységét különböző DNS-károsító ágensek hatására. Nagy dózisu UV sugárzásnak kitett, valamint MMS-t tartalmazó lemezen (az N2 és N3-hoz hasonlóan) a vad típushoz képest érzékenyebb fenotípust mutat a Zn* pontmutáns Rad18 fehérjét kifejező törzs, míg HU és bleomycin hatására nincs különbség a vad és a pontmutáns Rad18 fehérjét tartalmazó törzs érzékenysége között. Úgy tűnik, hogy a két aminosav cseréjével ismét a Rad18 egy fontos funkcióját érintettük, melynek következtében nem tud megfelelően működni a DNS-hiba tolerancia folyamataiban.

Ki kellett zárunk azt az eshetőséget, hogy a mutáns fehérjék expressziós szintjében bekövetkezett változás okozza az érzékeny fenotípusokat. Ismét HA jelölő fehérjét kódoló gént klónoztunk a vad és mutáns Rad18-at hordozó expressziós vektorokba, ahogy azt az N2 és N3 esetében is tettük. Amint azt a 33. ábrán láthatjuk nincsen különbség a fehérjék szintjében, tehát a tapasztalt érzékenység valamilyen részleges funkcióvesztésre utal az útvonal működésében.



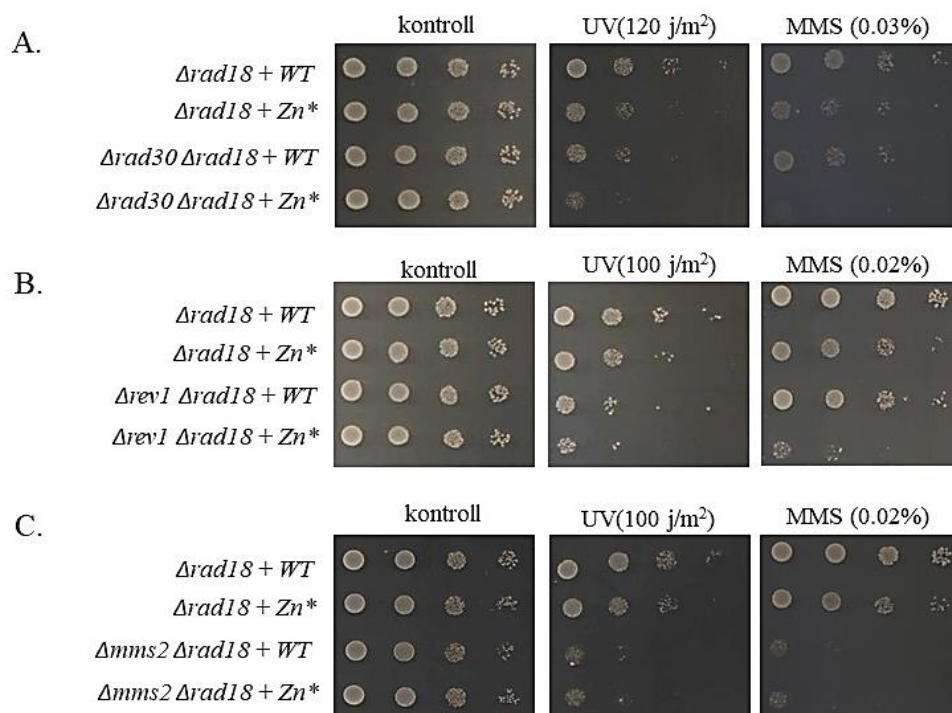
33. ábra: Western blot kísérlet a deléciós fehérjék expressziós szintjének vizsgálatára. A mutáns fehérjéket 10 %-os akrilamid gélen választottuk el. Az anti-HA elsődleges ellenanyagot 5000-szeres hígításban, míg az anti-PGK ellenanyagot 10.000 x-es hígításban alkalmaztuk.

Annak érdekében, hogy kideríthessük, a lecserélt aminosavak hol kapcsolódnak be a Rad18 funkciójának kialakításába, episztázis analízist végeztünk el az N2 és N3 deléciós mutáns Rad18 esetében ismertetett logikát követve.

A Zn* mutánsban előállítottuk a DDT útvonal három különböző ágát inaktiváló gének (*RAD30*, *REV1*, *MMS2*) delécióját és megvizsgáltuk a kettős mutáns törzsek UV sugárzásra és MMS kezelésre mutatott érzékenységét. Elsőként megvizsgáltuk, hogy az általunk létrehozott Zn* pontmutáns a *RAD30*-cal egy episztázis csoportba sorolható e. A 34./A. képen láthatjuk, hogy a $\Delta rad30\Delta rad18 + Zn^*$ törzs érzékenyebb UV és MMS kezelés hatására, mint az $\Delta rad18 + Zn^*$ vagy a $\Delta rad30$ törzs egyedül. Ez arra enged következtetni, hogy a két aminosav, amit

lecseréltünk, nem a Rad30 útvonal működéséhez járul hozzá. A 34. ábra azt mutatja, hogy az általunk előállított Zn* mutáns a *REVI* útvonalat sem károsította, hiszen a kettős mutáns sokkal jobban érzékenyítette az élesztő törzset UV és MMS kezelés hatására is, mint az egyes mutánsok önállóan.

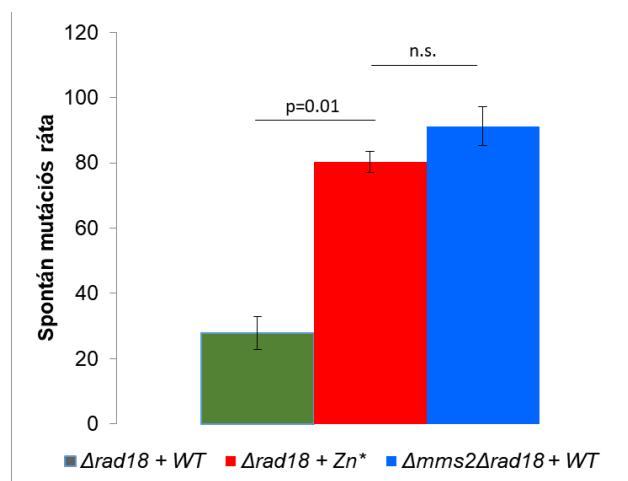
A következő lépésben az *MMS2* gént távolítottuk el, hogy a *RAD5* út inaktiválását érjük el. Ahogyan azt a 34./C. ábrán láthatjuk, a Zn* és *MMS2* delécióát egyszerre hordozó mutáns azonos érzékenységet mutat az $\Delta mms2$ törzssel. Tehát kijelenthetjük, hogy az episztázis analízis logikája alapján ugyanazon hibajavítási útvonalba sorolhatók. Ez számunkra azt jelenti, hogy a két lecserélt aminosav által a DNS-hiba tolerancia útvonal hibamentes ágának működését rontottuk el.



34. ábra: Episztázis analízis a Zn* és a DDT három alútvonalának képviselőjével. *RAD30* (A.), *REVI* (B.), *MMS2* (C.) és a Zn* kapcsolata. $\Delta rad18+WT$: vad típusú *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. $\Delta rad18+Zn^*$: Zn* deléció *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. $\Delta rad18\Delta rad30+WT$: *RAD18* és *RAD30* gének genomi delécióját tartalmazó és a vad típusú *RAD18*-at plazmidról termelő törzs. $\Delta rad18\Delta rad30+Zn^*$: *RAD18* és *RAD30* gének genomi delécióját tartalmazó és a Zn* deléció *RAD18*-at plazmidról termelő törzs. $\Delta rad18\Delta rev1+WT$: *RAD18* és *REVI* gének genomi delécióját tartalmazó és a vad típusú *RAD18*-at plazmidról termelő törzs. $\Delta rad18\Delta rev1+Zn^*$: *RAD18* és *REVI* gének genomi delécióját tartalmazó és a Zn* deléció *RAD18*-at plazmidról expresszáló törzs. $\Delta rad18\Delta mms2+WT$: *RAD18* és *MMS2* gének genomi delécióját tartalmazó és a vad típusú *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. $\Delta rad18\Delta mms2+Zn^*$: *RAD18* és *MMS2* gének genomi delécióját tartalmazó és a Zn* deléció *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs.

IV.4.2.1. Spontán mutagenézis vizsgálata

Mint azt az előzőekben láthattuk, a különböző genetikai vizsgálatok szerint az általunk létrehozott Zn^* kettős pontmutáns Rad18 fehérje szintén a DNS-hiba tolerancia útvonal *RAD5* és *MMS2-UBC13* alkotta hibamentes javítást biztosító ág működésében érintett. A kapott eredmény megerősítésére ellenőriztük a Rad6/Rad18 útvonal mutagén ágának működését az előállított Zn^* kettős pontmutáns Rad18 fehérjét hordozó törzsekben, oly módon, hogy meghatároztuk a deléciós törzs spontán mutációs rátáját. A Rad18 pontmutációs konstruktot hordozó törzsben megemelkedett a spontán mutációk száma a vad típusú *RAD18* gént tartalmazó kontrollhoz képest a teljes *MMS2* gén delécióját hordozó törzssel összevethető módon (35. ábra), hiszen a mutagén ág túlműködik az inaktív hibamentes reparációs alútvonal miatt. Ez az episztázis analízis kísérleteivel összhangban további bizonyíték arra, hogy a lecserélt aminosavak nélkülözhetetlenek a hibamentes DNS-hiba tolerancia alútvonal működéséhez.



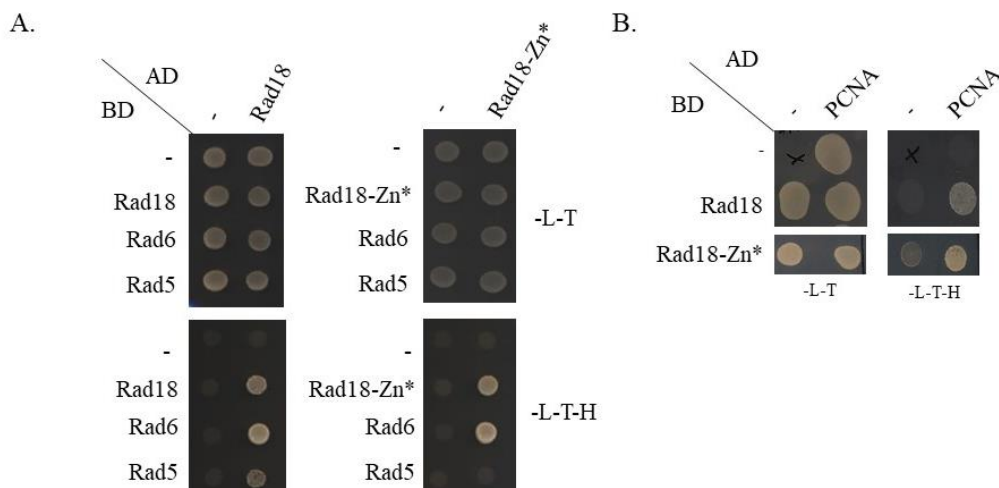
35. ábra: Spontán mutagenézis. $\Delta rad18 + WT$: vad típusú *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. $\Delta rad18 + Zn^*$: Zn^* deléciós *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. $\Delta rad18\Delta mms2 + WT$: *RAD18* és *MMS2* gének genomi delécióját tartalmazó és a vad típusú *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs. Az oszlopok három kísérlet átlagait és az ebből számolt szórás valamint szignifikancia értékeket mutatják. Ha a p-érték <0.05 akkor az eredmény szignifikánsnak tekinthető, ha a p-érték > 0.05 , akkor nem szignifikáns (n.s.).

IV.4.2.2. A Zn* Rad18 fehérje által kialakított fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata élesztő kettős hibrid módszerrel

Megvizsgáltuk, hogy a genetikailag jól jellemzett Zn* Rad18 pontmutáns kölcsönhatásba tud-e lépni a Rad18 fehérje ismert kölcsönható partnereivel. Fenti eredményeink, és az irodalmi adatok alapján elsősorban a Rad5-tel való asszociációt kívántuk vizsgálni.

A kölcsönhatások vizsgálatánál a Rad6 és PCNA interakciót kontrollként alkalmaztuk, csakúgy, mint az N-terminális mutánsoknál tettük (28., 29. ábra). Láthatjuk a 36. ábrán, hogy sem a Rad6, sem a PCNA kötés nem sérült a Zn* pontmutáns Rad18 fehérje esetében. A vad típusú és Zn* fehérjét tartalmazó törzsek kivétel nélkül felnőnek a hármasszelektációs lemezen, ha a PCNA, illetve Rad6 molekulát is tartalmazza a kéthibrid rendszer. A következő lépésben azt vizsgáltuk meg, hogy a Zn* mutáns fehérje képes-e homodimert alkotni. Azt tapasztaltuk, hogy ebben a képességben sem károsodott a Rad18 fehérje az aminosavcserék által (36. ábra A. kép).

Azonban, amint az a 36. ábrán látható, a Zn* Rad18 mutáns nem tudott kölcsönhatni a Rad5 fehérjével. Míg a kontroll lemezen (-L/-T) a törzsek kivétel nélkül felnőnek, addig a -L/-T-H lemezen csak azok képesek, ahol interakció van a két fehérje között, esetünkben csak a vad típusú Rad18 és Rad5 fehérje között detektálható kölcsönhatás (36. ábra A kép). Élesztő kettős hibrid kísérletekkel így meghatároztuk, hogy a 190-es és 193-as ciszteinek, illetve a cink-ujj motívum nélkülözhetetlenek a Rad18-Rad5 heterodimer kialakulásához.



36. ábra: Élesztő kettős hibrid kísérlet az Zn* mutáns által kialakított kölcsönhatások vizsgálatára. Rad18-Rad6 interakció, dimerképzés, Rad18-Rad5 interakció (A.) Rad18-PCNA interakció (B.), vizsgálata. (AD: activation domain, BD: binding domain, -: üres vektorok) Kontroll -L-T (leucin és triptofán aminosavak nélküli) lemezen mindegyik törzs felnő, míg a -L-T-H (leucin, triptofán és hisztidin aminosavak nélküli) táptalajon csak a kölcsönhatást mutató telepek tudnak felnőni.

IV.5. A SAP domén vizsgálata

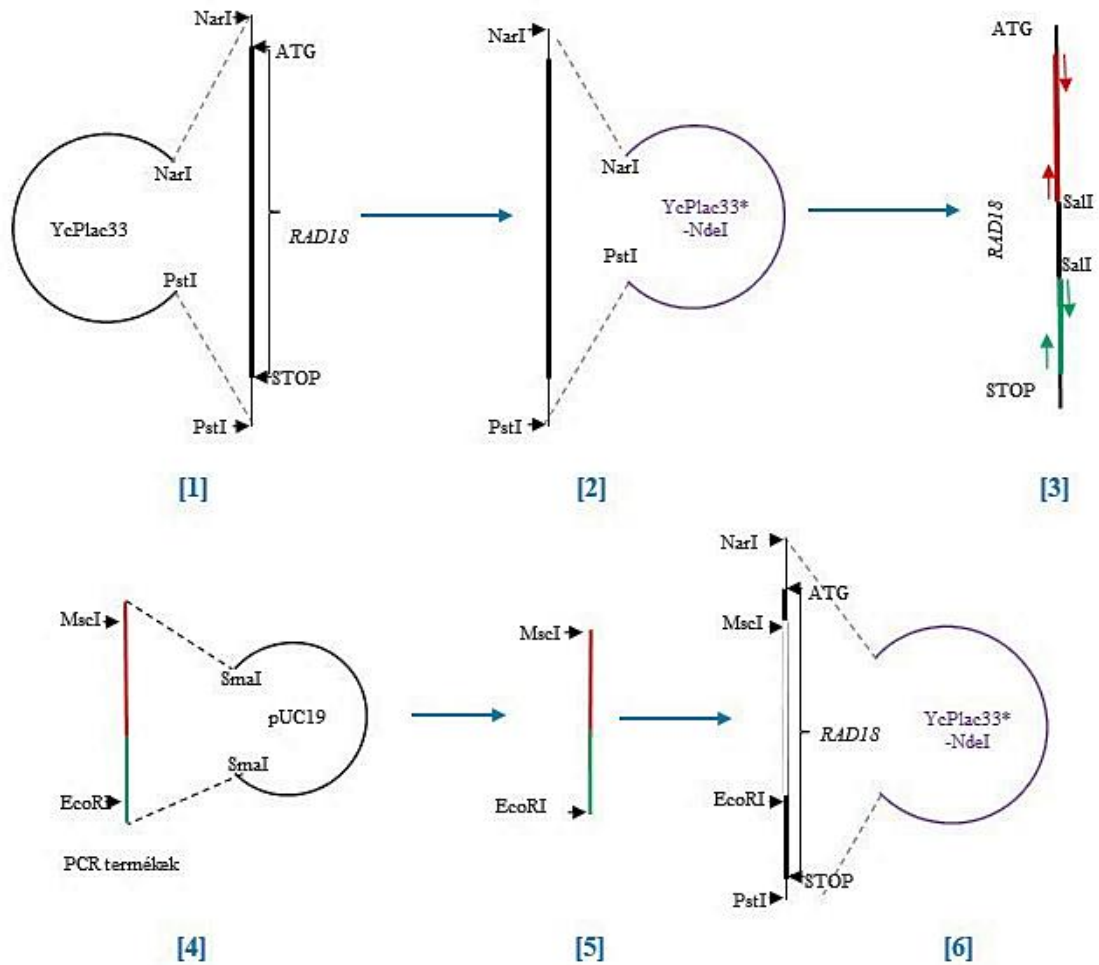
A SAP domén feltételezett funkciója az egyszálú DNS kötése lehet. Munkánk során a SAP-ot kialakító két hélix egyikét távolítottuk el a delécióval, és vizsgáltuk meg a csonkolt fehérje működését a DDT folyamatában.

IV.5.1. A SAP domén deléciójának előállítása

A SAP mutáns fehérje előállításához először a vad típusú *RAD18* gént tartalmazó élesztő centromeres vektort (pID466) *NarI*+*PstI* enzimekkel hasítottuk el, majd a keletkező 2700 bp-os fragmentumot a *YCplac33* módosított élesztő vektor – *NdeI* restrikciós enzim felismerési helyét nem tartalmazó - azonos hasítási helyeire klónoztam. Az így létrejött konstrukciót *MscI*+*EcoRI* enzimekkel emésztettem, ugyanis ezen helyek segítségével a konstruktból eltávolítható volt a fehérje SAP domént kódoló régiója. A kivágott régió helyére ezután *MscI*+*EcoRI* helyeket tartalmazó oligonukleotidokat használva tetszőleges *Rad18* fragmentum beépíthetővé vált. Az *MscI* helyet hordozó szensz oligó az eredeti *MscI* helyhez hibridizált, míg az antiszensz párja *SalI* helyet hordozott az eltávolítani kívánt szakasz ATG-hez közelebbi végénél. A másik oligonukleotid párból a szensz tartalmazta a *SalI* enzim felismerési szekvenciáját és az eltávolítandó szakasz STOP-hoz közelebbi végénél hibridizált, míg az antiszensz párja a STOP kodon előtt kötődött. A két PCR fragmentumot így *SalI* emésztést követően összeligálva a pUC19 vektor *SmaI* helyére klónoztuk. A ligálásokat követő szekvenálás azt mutatta, hogy a leolvasási keret nem sérült a deléció és a PCR által. Az így kapott szubklónból a már deléciós *RAD18* gént *MscI*+*EcoRI* enzimek segítségével a vad típusú *RAD18* gént tartalmazó élesztő centromeres vektorba klónoztuk át. Az így elkészített *RAD18* deléciós konstrukt már alkalmas volt az élesztőbe transzformálására és a tervezett komplementációs kísérletek elvégzésére (37. ábra).

Az így létrehozott SAP deléciós konstrukt jele:

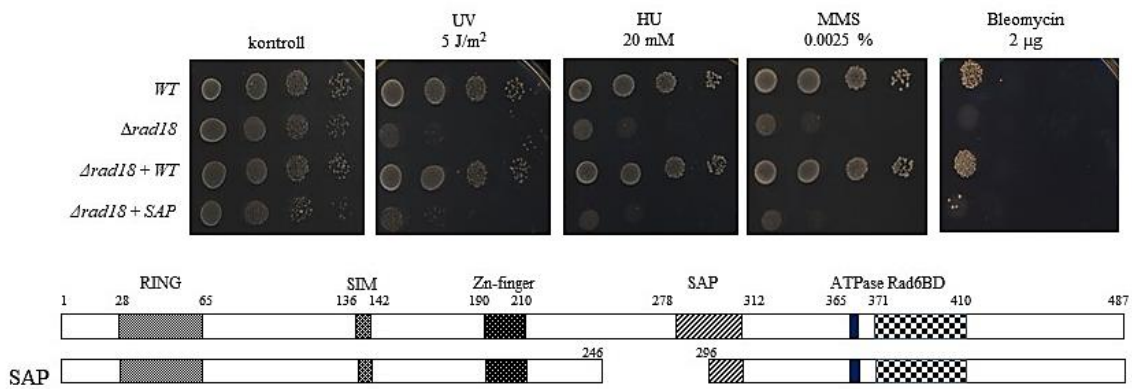
pID795: *Rad18*Δ(246-296) SAP



37. ábra: Sematikus ábra a SAP deléciós konstrukt klónozásának lépéseiről.

IV.5.2. A SAP deléciós törzs vizsgálata

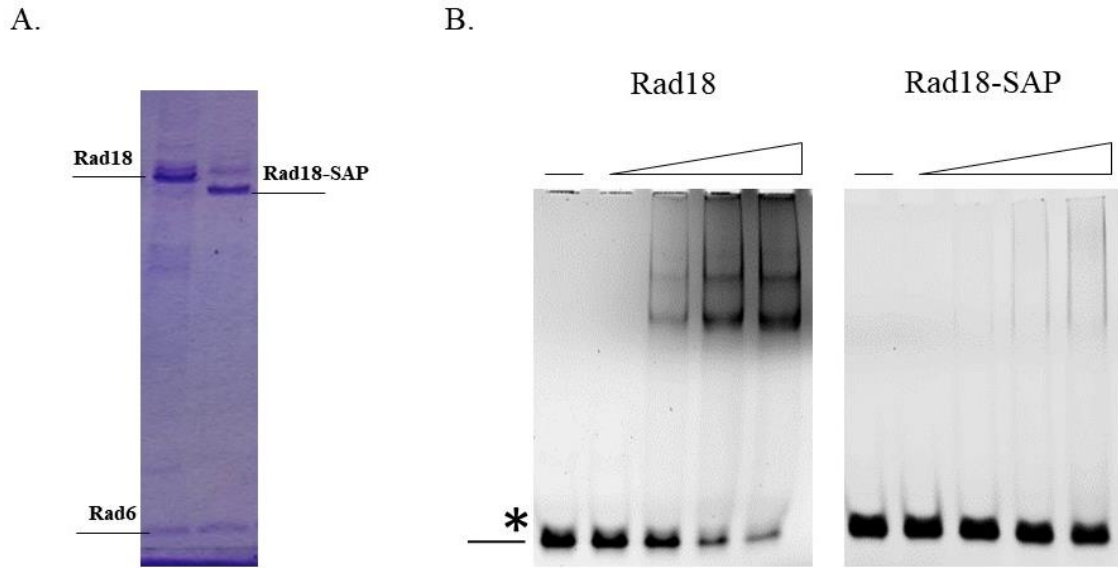
A SAP deléciós törzsnek a különböző DNS károsító szerekkel szemben mutatott érzékenységi vizsgálatát a 38. kép foglalja össze. Ezen megfigyelhetjük, hogy a $\Delta rad18 + SAP$ törzs olyan extrém érzékeny fenotípust mutat minden szer esetében, mint a $\Delta rad18$ null mutáns törzs. Ebből arra következtethetünk, hogy az eltávolított szakasszal gyakorlatilag inaktívtuk a Rad18 fehérjét.



38. ábra: A SAP deléciós törzs érzékenységi vizsgálata különböző DNS károsító ágensek alkalmazásával. Az egy sorban látható pöttyök ugyanazon törzs hígítási lépcsőit mutatják. *WT*: vad típusú törzs, *Δrad18*: a *RAD18* genomi delécióját tartalmazó törzs, *Δrad18 + WT*: a vad típusú *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs, *Δrad18 + SAP*: a SAP deléciós fehérjét, mint egyedüli Rad18 forrást tartalmazó törzs.

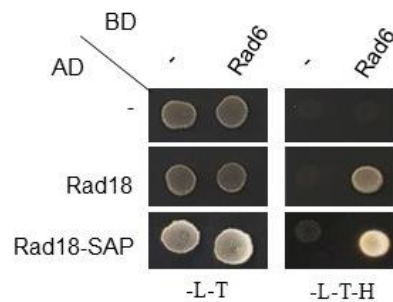
A humán Rad18 fehérje SAP doménjéről tudjuk, hogy hiányában a PCNA ubikvitinációja elmarad és a sejtek nagyon érzékenyek lesznek DNS-károsító drogokra. Kiderült az is, hogy humán fehérje esetében ez a domén felelős az egyesszálú DNS (ssDNS) kötésért. Ezért a következőkben mi is megvizsgáltuk, hogy az általunk SAP mutánsnak nevezett fehérje képes-e megkötni az ssDNS-t.

A kérdés megválaszolásához először szükségünk volt a mutáns és a vad típusú Rad18 fehérjére tisztított formában. A 39. ábra A. képen láthatjuk, ahogy a III.3.12. fejezetben leírt módszerrel tisztított fehérjéket denaturáló poliakrilamid gélen való futtatással láthatóvá tettük. A tisztítási folyamat során a két fehérjét közel azonos arányban sikerült kinyerni a sejtekből. A gélképen halványan láthatóvá válnak más fehérjék is ezek jelenléte azonban nem befolyásolja a preparátumok viselkedését a kísérletekben, így a következőkben elvégeztük a DNS kötés kísérletet, melynek eredménye a 39. ábra B. képen látható. A fluoreszcensen jelölt 75 nukleotid hosszúságú ssDNS a natív gél alján látható, míg a fehérje-DNS komplexek magasabb tartományban jelennek meg. Jól látható, hogy a vad típusú fehérjével ellentétben, ahol szinte az összes szabad DNS eltűnik a reakció során, a Zn* pontmutáns Rad18 fehérje nem tudja a ssDNS-t megkötni. Ezek a kísérletek tehát megerősítik, hogy a Rad18 SAP doménje felelős az ssDNS kötésért.



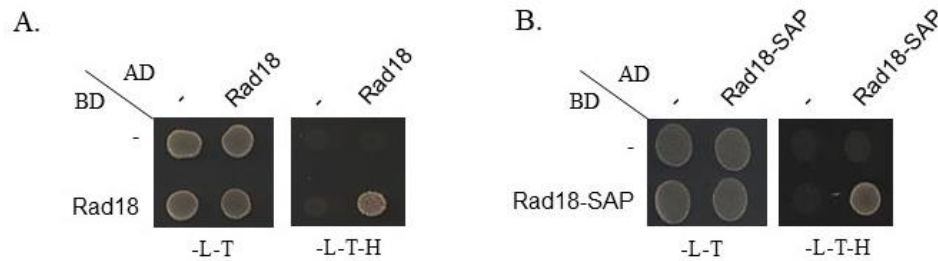
39. ábra: Tisztított fehérjék (A.) poliakrilamid gélen, Coomassie brillant kék festékkal előhívva. Az erősebb csíkok azonos mennyiségű fehérjét jelölnek (~200 ng/μl). A Rad6 fehérje az erős interakció miatt együtt tisztul a Rad18-cal. DNS-kötési kísérlet (B.) a vad típusú és a SAP mutáns fehérjével. ___*: 75 nukleotid hosszú fluorescein jelölt ssDNS (0.25 pmol). Az első oszlopok nem tartalmaznak fehérjét, ezt egy alulvonás (—) jelöli, a többi pedig emelkedő koncentrációban tartalmaz 100, 500, 1000, 1500 ng-ot.

A molekula szerkezetében bekövetkező változások hatással lehetnek a fehérje interakciós képességére is. Ezért a következő kísérletekben megvizsgáltuk a SAP deléciós fehérje által kialakított interakciókat. Először azt ellenőriztük le, hogy a SAP deléciós fehérje és a Rad6 közötti kölcsönhatás ki tud-e alakulni. Amint azt a 40. ábrán láthatjuk ebben a tekintetben nem sérült a Rad18 funkciója, a hiányzó 50 aminosav ellenére sem.



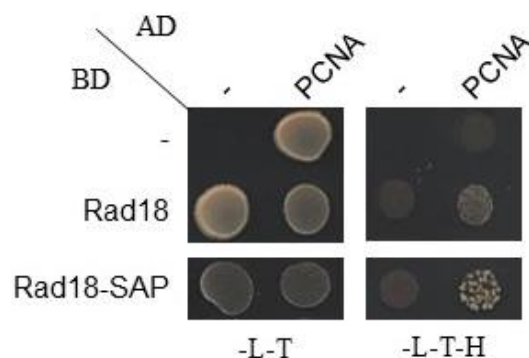
40. ábra: Élesztő kettős hibrid kísérlet a Rad6 és a SAP mutáns fehérje közötti interakció kimutatására. (AD: activation domain, BD: binding domain, -:üres vektorok) Kontroll -L-T (leucin és triptofán aminosavak nélküli) lemezen mindegyik törzs felnő, míg a -L-T-H (leucin, triptofán és hisztidin aminosavak nélküli) táptalajon csak a kölcsönhatást mutató telepek tudnak felnőni.

Az élesztő kettős hibrid kísérlet eredményei ezen túl azt is megmutatták, hogy a vad típusú fehérjéhez hasonlóan (41. ábra A.) a SAP deléciós fehérje is képes dimert alkotni önmagával (41. ábra B. kép).

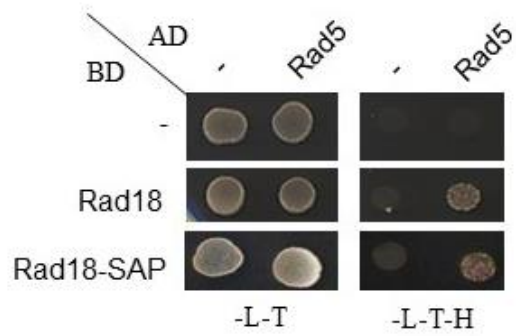


41. ábra: Élesztő kettős hibrid kísérlet amelyben a homodimer kialakulását láthatjuk. (AD: activation domain, BD: binding domain, -:üres vektorok) Kontroll –L-T (leucin és triptofán aminosavak nélküli) lemezen mindegyik törzs felnő, míg a –L-T-H (leucin, triptofán és hisztidin aminosavak nélküli) táptalajon csak a kölcsönhatást mutató telepek tudnak felnőni. Két vad típusú fehérje között kialakuló kölcsönhatás (A.). SAP mutáns fehérjék interakciója (B.).

Az ismert interakciós partnerekkel való kapcsolat vizsgálata azt bizonyította, hogy a vad típusú Rad18 molekulához hasonlóan a SAP mutáns mind a PCNA-val (42. ábra), mind a Rad5-tel (43. ábra) képes közvetlen molekuláris interakció kialakítására. Mivel a SAP domén hiánya nem befolyásolta az általunk vizsgált, fő interakciós partnerekkel való kölcsönhatás kialakítását, ezért ebből arra következtethetünk, hogy a fehérjének ez a része nem vesz részt ezekben a molekuláris kapcsolatokban.



42. ábra: Élesztő kettős hibrid kísérlet a PCNA és a SAP mutáns fehérje közötti interakció kimutatására. (AD: activation domain, BD: binding domain, -:üres vektorok) Kontroll –L-T (leucin és triptofán aminosavak nélküli) lemezen mindegyik törzs felnő, míg a –L-T-H (leucin, triptofán és hisztidin aminosavak nélküli) táptalajon csak a kölcsönhatást mutató telepek tudnak felnőni.



43. ábra: Élesztő kettős hibrid kísérlet a Rad5 és a SAP mutáns fehérje közötti interakció kimutatására. (AD: activation domain, BD: binding domain, -:üres vektorok) Kontroll –L-T (leucin és triptofán aminosavak nélküli) lemezen mindegyik törzs felnő, míg a –L-T-H (leucin, triptofán és hisztidin aminosavak nélküli) táptalajon csak a kölcsönhatást mutató telepek tudnak felnőni.

IV.6. A 211-273 aminosavig terjedő régió szerepének meghatározása

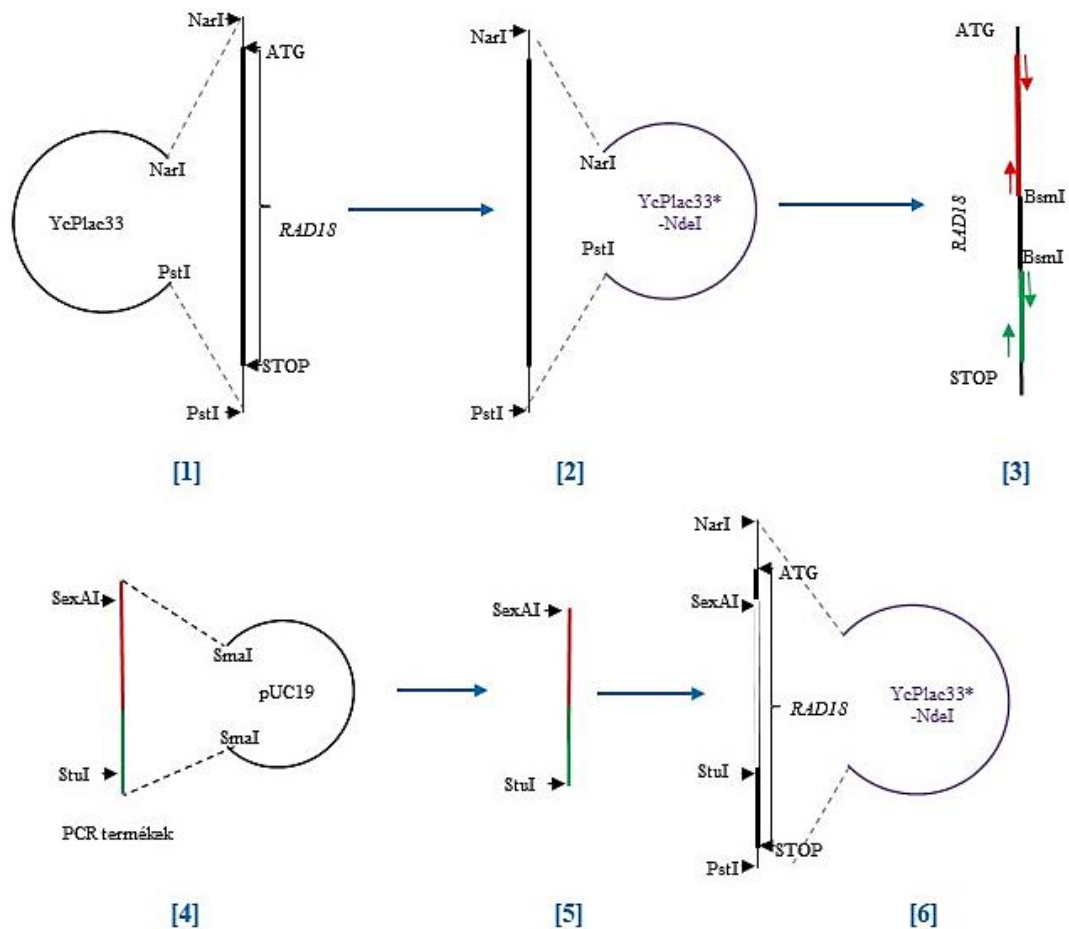
Az M mutánsnak elnevezett fehérjében a cink-ujj és a SAP domén közötti 62 aminosavat felölelő szakaszt távolítottuk el a Rad18 fehérjéből. Ez egy viszonylag nagyobb darabját jelenti a fehérjének, amihez funkciót még senki nem tudott kapcsolni. A munka további részében ezért célul tűztük ki, hogy fényt derítsünk ennek a régióknak a szerepére is.

IV.6.1. Az M deléciós mutáns elkészítése

A vad típusú *RAD18* gént tartalmazó élesztő centromeres vektor (44. ábra [1]) (pID466) NarI+PstI enzimekkel történő emésztése után a keletkező 2700 bp-os fragmentumot a YCplac33 módosított élesztő vektor ugyanezen hasítási helyeire klónoztuk (44. ábra [2]). Az így létrejött konstrukciót SexAI+StuI enzimekkel emésztettük, és helyére SexAI+StuI helyeket tartalmazó, a *RAD18* gén egy rövidebb részét felamplifikáló oligonukleotidokat használva, PCR-rel előállított tetszőleges *RAD18* fragmentumok klónozhatók (44. ábra). A SexAI helyet hordozó szensz oligó az eredeti SexAI helyhez hibridizált, míg az antiszensz párja BsmI helyet hordozott a deletálni kívánt szakasz (44. ábra [3]) ATG-hez közelebbi végénél. A másik oligonukleotid párból a szensz tartalmazta a BsmI enzim felismerési szekvenciáját és az eltávolítandó szakasz STOP-hoz közelebbi végénél hibridizált, míg az antiszensz párja a STOP kodon előtt kötődött. A két PCR fragmentumot így BsmI, SexAI és StuI emésztést követően összeligálva pUC19 SexAI+StuI helyére klónoztam (44. ábra [4]). Szekvenálással meggyőződünk arról, hogy a leolvasási keret nem sérült a deléció és a PCR által. Az így kapott szubklónból a már deléciós *RAD18* gént SexAI+StuI-gyel az eredeti vad típusú *RAD18* gént tartalmazó élesztő centromeres vektorba klónoztuk. Ez a *RAD18* deléciós konstruktt felhasználható élesztőbe transzformáláshoz és a genomi *RAD18* gén deléciójának komplementációjához.

Az így létrehozott M deléciós konstruktt jelölése:

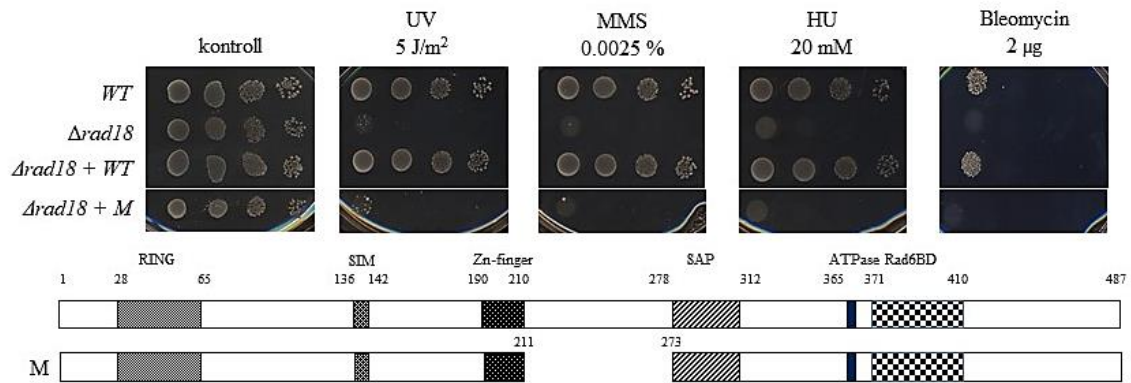
pID804: Rad18 Δ (209-273) M



44. ábra: Sematikus ábra az M deléciós konstrukt klónozásának lépéseiről.

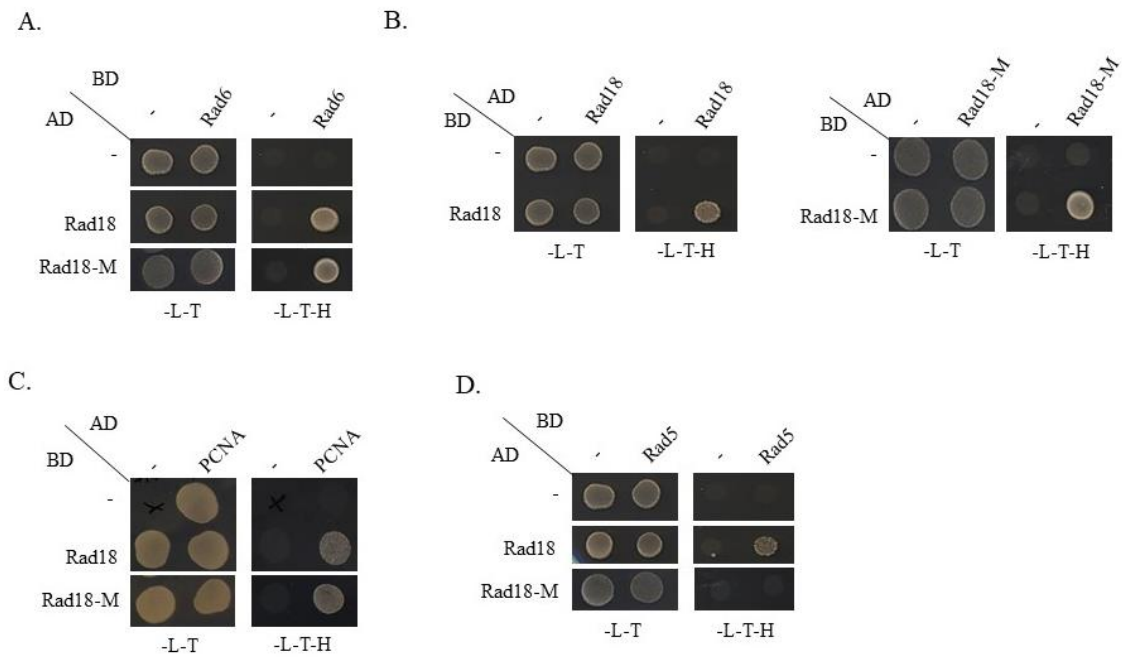
IV.6.2. Az M deléciós törzs vizsgálata

Az M deléciós fehérje esetében is érzékenységi vizsgálatokkal kezdtük a DNS-hiba tolerancia útvonalban betöltött szerepének vizsgálatát. Az általunk előállított Rad18 deléciós konstruktot - mint egyedüli Rad18 forrást - tartalmazó törzset DNS-károsító hatásoknak vetettük alá. A 45. képen, mely az M deléciós törzs érzékenységi vizsgálatának eredményét ábrázolja, megfigyelhetjük, hogy a $\Delta rad18 + M$ törzs olyan extrém érzékeny fenotípust mutat, mint a $\Delta rad18$ törzs. Ez egyértelműen arra utal, hogy az eltávolított szakasszal a Rad18 fehérje működésében esszenciális funkciót szüntettünk meg.



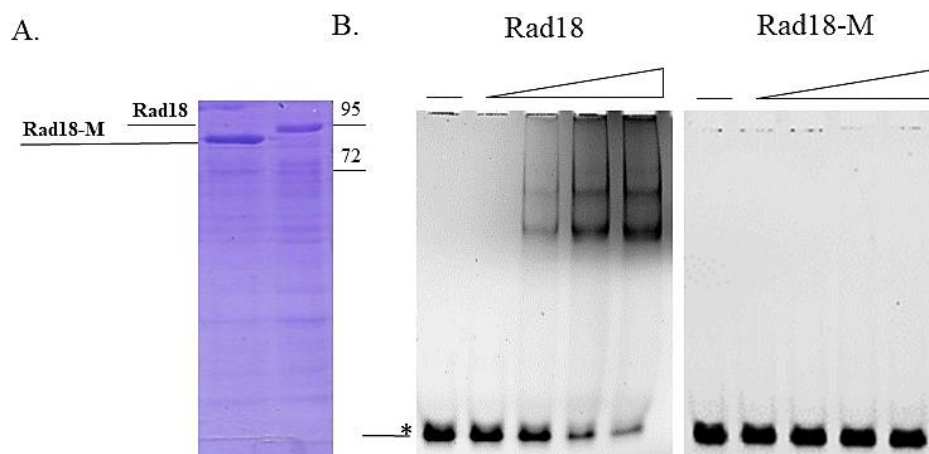
45. ábra: Az M deléciós törzs érzékenységi vizsgálata különböző DNS károsító ágensek alkalmazásával. Az egy sorban látható pöttyök ugyanazon törzs hígítási lépcsőit mutatják. *WT*: vad típusú törzs, *Δrad18*: a *RAD18* genomi delécióját tartalmazó törzs, *Δrad18 + WT*: a vad típusú *RAD18*-at plazmidról kifejező törzs, *Δrad18 + M*: az M deléciós fehérjét, mint egyedüli Rad18 forrást tartalmazó törzs.

A továbbiakban itt is hasonlóképpen jártunk el, mint a többi deléciós fehérje esetében, azaz megvizsgáltuk, hogy a jól ismert interakciós partnerekkel képes-e kölcsönhatni. Amint azt a 46. ábrán láthatjuk, a hiányzó 62 aminosav ellenére sem sérült a Rad18 funkciója a Rad6-tal (46. A. kép), önmagával (46. B. kép) és a PCNA (46. C. kép) fehérjével való kölcsönhatás kialakításában. Egyedül a Rad5-Rad18 heterodimer kialakulását gátolja a hiányzó régió, ez viszont nem okozhatja az extrém érzékeny fenotípust (46. D. kép). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a Rad5 kötéséért felelős régió továbbnyúlik a cink-ujj doménon is, és az M mutánsból hiányzó szekvencia részlet egy darabja is szükséges lehet hozzá.



46. ábra: Élesztő kettős hibrid kísérlet az M mutáns által kialakított kölcsönhatások vizsgálatára. Rad18-Rad6 interakció (A.), dimerképzés (B.), Rad18-PCNA interakció (C.), Rad18-Rad5 interakció (D.) vizsgálata. (AD: activation domain, BD: binding domain, -:üres vektorok) Kontroll –L-T (leucin és triptofán aminosavak nélküli) lemezen mindegyik törzs felnő, míg a –L-T-H (leucin, triptofán és hisztidin aminosavak nélküli) táptalajon csak a kölcsönhatást mutató telepek tudnak felnőni.

Az M mutánsból hiányzik a cink-ujj és a SAP domén közötti szakasz, mely 62 aminosavat foglal magába. Érintetlen benne a SAP domén, mely az egyszálú DNS kötéséért felelős, mégis érdekesnek láttuk megvizsgálni DNS-kötési kísérletben a mutáns fehérje viselkedését, hiszen a Rad5 kötés hiánya nem vezet a tapasztalt extrém érzékeny fenotípushoz. A 47. ábra A. képen láthatjuk a III.3.12. fejezetben leírt módszerrel tisztított fehérjéket denaturáló poliakrilamid gélen megfuttatva. A DNS kötési kísérlet eredménye a 47. ábra B. képe foglalja össze. A fluoreszcensen jelölt 75 nukleotid hosszúságú ssDNS a natív gél alján látható, míg a fehérje-DNS komplexek magasabb tartományban jelennek meg. Jól látható, hogy a vad típusú fehérjével ellentétben ahol szinte az összes szabad DNS eltűnik a reakció során, a mutáns nem tudja a ssDNS-t megkötni.

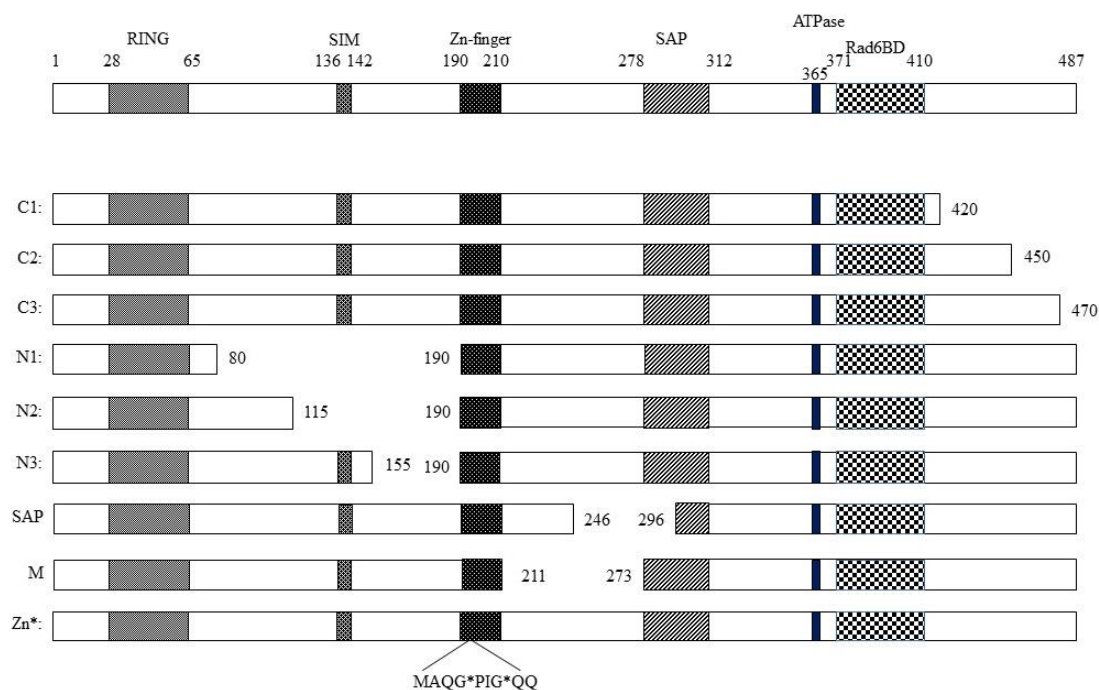


47. ábra: Tisztított fehérjék (A.) poliakrilamid gélen, Coomassie brillant kék festékkal előhívva. DNS-kötési kísérlet (B.) a vad típusú és az M mutáns fehérjével. ___*: 75 nukleotid hosszú fluorescein jelölt ssDNS (0.25 pmol). Az első oszlopok nem tartalmaznak fehérjét, ezt egy alulvonás (—) jelöli, a többi pedig emelkedő koncentrációban tartalmaz 100, 500, 1000 illetve 1500 ng-ot.

V. Eredmények megvitatása

Csoportunk a DNS-hiba tolerancia útvonal (DDT) részletes vizsgálatával foglalkozik, célunk, hogy megértsük a pontos mechanizmusokat az egyes lépések mögött. Ez a munka a DDT központi fehérjéjét a Rad18-at vette célba.

A Rad18 ubikvitin ligázként a Rad6 ubikvitin konjugázzal alkot dimert, és a PCNA molekula ubikvitinálásán keresztül indítja be a hiba tolerancia útvonalat. Mivel a hibatolerancia első, kritikus lépésénél nélkülözhetetlen szereppel bír, mégis ismereteink meglepően hiányosak a Rad18 működéséről, ezért vált kutatásaink célpontjává. Ismerjük ugyan a fehérje doménszerkezetét, de nem minden domén esetében tudjuk a pontos funkciót, illetve nagy régiók maradnak jellemzetlenül a fehérje N- és C-terminális részein.



48. ábra: Sematikus ábra az elkészített deléciós fehérjék szerkezetéről

Munkánk során 8 deléciós és egy pontmutáns Rad18 fehérje DNS-hiba tolerancia folyamatában betöltött szerepét vizsgáltuk meg. A fehérje N-, és C-terminálisán is rendelkezik két nagyobb régióval, melyhez funkciót a munkánk tervezésekor még senki nem tudott rendelni, így mi 3-3 delécióval fedtük le ezeket a részeket. Idő közben az N-terminálison, a RING és cink-ujj domének között, egy SUMO-val kölcsönható motívumnak nevezett régiót (SIM,

SUMO interacting motif) azonosítottak. A SAP domén szerepéről élesztő fehérje esetében szinte semmi információ nem állt rendelkezésünkre, így a SAP domén felének és az előtte elhelyezkedő 42 aminosavnak az eltávolításával szeretnénk volna fényt deríteni a domén funkciójára. A cink-ujj és a SAP közötti 62 aminosavat is eltávolítottuk, hogy ennek a darabnak a lehetséges szerepére is rátaláljunk. A cink-ujj, C2HC szekvencia motívumú régió, mely sok fehérje esetében konzervált. Ebben az esetben csak pontmutációval rontottuk el, így meggátolva a domén jellegzetes harmadlagos struktúrájának kialakulását.

A C-terminális mutánsok mindegyike a Rad6-kötő domén utáni szekvencia részletekben hiányos, hiszen a Rad6 kötése esszenciális a fehérje működéséhez, így nem lett volna értelme elrontani ezt a nélkülözhetetlen kölcsönhatást. Kísérleteinkből egyértelműen látszik, hogy a Rad18 fehérje utolsó 67 aminosavának semmi funkciója nincsen a fehérje megfelelő működésében a DNS-hiba tolerancia útvonalban, hiszen különböző DNS-károsító ágensek hatására is úgy viselkednek a deléciós fehérjét tartalmazó törzsek, mint a vad típusú.

Az N-terminális mutánsokkal való munka sokkal érdekesebb eredményeket hozott és új, eddig még feltérképezetlen funkció azonosításához vezetett. A fehérje N-terminálisán található a RING domén, mely az ubikvitin ligázok körében gyakran megtalálható szekvencia motívum, és az ubikvitinnek a célfehérjére való kapcsolásában van szerepe, s mely esszenciálisnak bizonyult a Rad18 működéséhez. Ezt a régiót nem is érintettük a deléciók tervezésekor, viszont a mögötte található - a fehérje szerepében ismeretlen funkciót betöltő - szekvencia részletet három, egyre nagyobb darab eltávolításával terveztük megvizsgálni. A legnagyobb deléciót (N1 = 80-190 aminosav) hordozó törzs rendkívül érzékeny fenotípust mutatott a különböző DNS-károsító ágensek hatására, úgy viselkedett, mint az a törzs melynek genomjából eltávolítottuk a *RAD18* gént. Ez azt jelenti, hogy az eltávolított régió nélkülözhetetlen szerepet tölt be a fehérje funkciójában. Ilyen szintű funkcióvesztést többek között az okozhat, ha megszűnik a kölcsönhatás a Rad6 és a Rad18 között, valamint ha a PCNA molekulára nem kerül rá az ubikvitin. Kísérleteinkből szépen látszik, hogy a Rad6-Rad18 kölcsönhatás nem sérült. A PCNA-val sajnos semmilyen általunk használt módszerrel nem sikerült interakciót vagy akár annak a hiányát a megfelelő módon kimutatni, így ezt az eshetőséget nem tudjuk kizárni vagy megerősíteni. E tekintetben további vizsgálatokra lenne szükség. Érdekes azonban, hogy a Rad5 és a mutáns fehérje közötti interakció nem tudott megvalósulni, ami ugyan nem vezethet a tapasztalt extrém érzékeny fenotípushoz.

A két kisebb (N2 = 115-190 és N3 = 155-190 aminosav) deléciót hordozó törzs vizsgálata során érdekes eredményt kaptunk. A DNS-károsító hatásokra mutatott közepesen érzékeny fenotípus ismét a hiányzó szakaszok DNS-hiba tolerancia útvonalban való érintettségére utaltak. Feltűnt

azonban, hogy az N2 mutáns, mely a nagyobb deléciókat tartalmazza, egy kicsivel érzékenyebb fenotípust mutatott, mint az N3. A 48. ábrán láthatjuk, hogy a két törzs között a különbség 40 aminosav, amely a SIM motívumot is felöleli. A SIM-SUMO interakció segíti a PCNA, mint szubsztrát hatékonyabb felismerését és ubikvitinálását a DDT folyamataiban, mely az N2 esetében elmarad, valószínűleg ennek köszönhető a tapasztalt kismértékű érzékenység növekedés az N3-hoz képest. A fő kérdés azonban továbbra is az, hogy mi okozza a tapasztalt fenotípusokat a vad típusú törzshöz viszonyítva. Úgy gondoltuk, hogy valamelyik alútvonal működésében károsodhattak a törzsek, melyek ezeket a mutáns fehérjéket hordozzák. Annak érdekében, hogy kiderítsük, pontosan melyik alútvonal nem működik, a deléciós *RAD18* gént tartalmazó törzsek genomjából eltávolítottuk a különböző útvonalakban érintett ismert fehérjéket kódoló géneket. Azt az eredményt kaptuk, hogy mindkét delécióval a hibamentes, Rad5 által vezérelt, villa-visszafordításon alapuló útvonal működésében okoztunk fennakadást. De hogyan befolyásolhatják ezek a hiányzó szakaszok egy egész alútvonal működését? Az élesztő kettős hibrid vizsgálatainkból kiderül, hogy egyedül a Rad5-tel való kölcsönhatás kialakításában sérültek a mutáns fehérjék. A kettős hibrid kísérletek eredményei összhangban vannak a genetikai eredményeinkkel. Ezek alapján tehát sikerült azonosítani a Rad18 fehérjének egy régióját, a 155-190 aminosavig terjedő szekvencia részlet, ami a Rad5-tel való kölcsönhatás kialakításához szükséges.

A cink-ujj domén (190-210) rendkívül konzervált C2HC motívuma általában az ubikvitin kötésért felelős. Ezt az eredményt mi nem tudtuk megerősíteni, az ez irányban tett próbálkozásaink nem jártak sikerrel. A cink ujj domént a C2HC motívum két ciszteinjének pontmutációjával rontottuk el. A tapasztalt érzékenység ismét valamilyen funkció elvesztésére utalt. Ennek vizsgálata során ellentmondásba ütköztünk Nakajima és munkatársainak eredményeivel (Nakajima és mtsai, 2006), akik humán fehérjén rontották el az egyik ciszteint, és ennek következtében a Rad18 nem tudott a DNS-hiba körül lokalizálódni. Mi - hasonlóan Tateishi kísérleteihez (Tateishi és mtsai, 2000) - az érzékenységi vizsgálatok során csak egy mérsékelten érzékeny fenotípust figyeltünk meg, tehát a pontmutációnk nem okozott ilyen drámai változást. Az eredményeink szerint a Zn* mutáció is a Rad5 útvonal működését gátolta. Kísérleteink alátámasztják, sőt pontosítják egy élesztő Rad18 fehérjével foglalkozó közlemény állítását (Ulrich és mtsai, 2000), mely szerint a 83-248 aminosavig terjedő fehérje darab, ami tartalmazza a cink-ujj motívumot is felelős a Rad5-Rad18 kölcsönhatásért. Ez egy elég nagy régió, ami felöleli ugyan a cink-ujj domént, de az általunk meghatározott Rad5 kölcsönható régiót is (155-190).

A SAP doménről az élesztő Rad18 fehérje esetében homályosak az ismereteink, az irodalmi adatok főleg a humán fehérje esetében elemzik a domén szerepét, de ott is ellentmondásos eredményekre jutnak. Mi a deléciókat úgy terveztük meg, hogy a SAP domént alkotó két hélix közül az elsőt és az előtte található 32 aminosavat távolítottuk el. Az érzékenységi vizsgálatokból kiderült, hogy ezzel is esszenciális funkciót érintettünk, a SAP deléciós törzs a teljes genomi *RAD18* deléciót hordozó törzssel azonos érzékenységet mutatott károsító anyagok hatására. Az ismert interakciós partnerekkel való kölcsönhatása nem sérült a mutáns fehérjének, ezért rendkívül kíváncsiak voltunk, hogy valóban a DNS-kötési funkció elrontása okozza-e a SAP mutáns törzs extrém érzékenységét. Azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú fehérjével ellentétben a SAP deléciós fehérjénk nem tudta megkötni az egyes szálú DNS-t. Ez megmagyarázza a tapasztalt érzékenységet, hiszen a DNS kötése nélkül nem tud a hibához lokalizálódni a Rad18 fehérje, ezáltal az egész DNS-hiba tolerancia útvonal gátolva van. Ezekkel az eredményeinkkel sikerült tehát bebizonyítanunk, hogy a SAP domén hélix-loop-hélix struktúrája teszi képessé a Rad18-at a DNS megkötésére.

Az általunk M-nek hívott deléciós mutánsból a cink-ujj és a SAP domén közötti 62 aminosav hiányzik. Ez azokhoz a fehérje részletekhez tartozik, amelyekhez funkciót még senki nem társított. Mi ezt a régiót is megvizsgáltuk, a többi mutáns esetében alkalmazott módon, és meglepően érzékeny fenotípust tapasztaltunk. Meg tudtuk állapítani továbbá azt is, hogy a SAP domén mutánsunkhoz hasonlóan az M mutáns is kölcsönhatott a jól ismert partnerekkel, az egyetlen Rad5 kivételével. Ez arra utal, hogy a cink-ujj utáni régió is nélkülözhetetlen a kölcsönhatás kialakításához, azonban a Rad18-Rad5 kölcsönhatás hiánya nem okoz ilyen mértékű érzékenységet DNS-károsító anyagok hatására. Ebben az esetben is a DNS-kötést vizsgáltuk meg a következő lépésben, hiszen a deléció közvetlenül a SAP domén előtt ér véget, így befolyásolhatja a DNS kötését. Azt tapasztaltuk, hogy az M mutáns Rad18 sem volt képes megkötni a ssDNS-t, tehát a 211-től 273. aminosavig terjedő szakasznak is szerepe van a Rad18 DNS-kötő képességének kialakításában.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a Rad18-nak a Rad5-höz kötődéséért a fehérjének nem egyetlen jól behatárolt szekvencia részlete/doménje a felelős. Az N2 és N3 mutáns nem köti a Rad5 fehérjét, holott a cink-ujj és az utána található régió érintetlen bennük. A Zn* mutáns sem köti a Rad5-öt, pedig az a szekvencia részlet, ami az N2 és N3-ból hiányzik, ebben a fehérjében jelen van. Az M mutáns, ami rögtön a cink-ujj után kezdődik, szintén nem képes a heterodimer kialakítására a Rad5-tel, még úgy sem, hogy a cink-ujjat és az előtte található régiót nem módosítottuk. Ezek a részletek valószínűleg együtt járulnak hozzá a Rad5 kötéséhez. Mivel elég nagy fehérje részletről van szó (155-246), valószínűleg a térbeli szerkezetének

kialakítása során a fehérje olyan konformációt vesz fel, hogy közel kerülve egymáshoz ezek a darabok képesek megkötni a Rad5 molekulát. Így alakítják ki a fehérje DNS-hiba tolerancia útvonal hibamentes alágának működéséhez szükséges térbeli konformációját. Eredményeinkkel mi is alá tudjuk támasztani a cink-ujj részvételét a Rad5-Rad18 kölcsönhatás kialakításában. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a Zn* pontmutánsnál, valamint az N2 és N3 mutánsok esetében az *MMS2* gén genomi delécióját tartalmazó törzs érzékenyebb fenotípust mutatott a DNS-károsító drogokra. Ebben a törzsben a Rad5-Rad18 kölcsönhatás létre tud jönni, de a hibamentes alútvonal mégsem lép életbe, hiszen nincsen ott az *Mms2*, ami nélkülözhetetlen a poliubikvitin lánc kialakításához. Feltételezzük, hogy az *Mms2*-nek van egy Rad18-tól független funkciója is, aminek hiányában megnő az UV és MMS érzékenység, hiszen a mutánsokban a Rad5-Rad18 kölcsönhatás létre sem tud jönni, az alútvonal első lépése akadályozott, mégis jobb túlélést tapasztalhattunk az érzékenységi vizsgálatok során, mint a $\Delta mms2$ törzsben.

A kísérletek során azt is megfigyeltük, hogy mindegyik vizsgált mutánsunk képes volt önmagával dimert képezni. Helle Ulrich és munkatársai úgy gondolják, hogy a Rad18 homodimerizációja kompetál a Rad5-Rad18 heterodimer kialakulásával. A mi eredményeink azonban másra utalnak, így ezzel a feltevessel nem értünk egyet. Ulrich és munkatársai kísérleteik során a Rad18 fehérje csonkolt darabjaival dolgozva azt az eredményt kapták, hogy a Rad18 fehérje 83-248. aminosavig terjedő darabja kell a hetero- és homodimer kialakulásához egyaránt. Tehát az ő logikájukat követve, azok a mutánsaink amik Rad5-tel nem hatnak kölcsön, önmagukkal sem szabadna, hogy dimert képezzenek. A mi eredményeinkből azonban világosan látszik, hogy a két kölcsönhatás egymástól független fehérje részekhez köthető, hiszen a Rad5-öt nem kötő N-terminális, Zn* és M mutánsok kivétel nélkül képesek a homodimer kialakítására.

Munkánkkal sikerült azt is megerősítenünk, hogy a SAP domén az élesztő Rad18 fehérje esetében is a DNS kötéséért felelős. A SAP domén két hélix doménjéből már az egyiknek a hiánya is azt eredményezi, hogy a fehérje képtelen az egyszálú DNS megkötésére. Meglepetésünkre a SAP és cink-ujj közötti fehérje darab hiánya is ugyan ezt idézte elő, holott a SAP domén érintetlen maradt ebben a mutáns fehérjében. Nem gondoljuk, hogy az egész régió kellene a DNS kötéséhez, sokkal inkább a nem megfelelő térbeli szerkezet kialakítása állhat a háttérben. A SAP domén és a cink-ujj túl közel kerül egymáshoz és lehetséges, hogy a SAP mutáns ezért nem tudja megfelelően kialakítani a működéséhez szükséges térbeli szerkezetet.

Összefoglalva tehát elmondható, hogy az élesztő Rad18 fehérje utolsó 67 aminosavának nincsen funkciója a DNS-hiba tolerancia irányításában. A cink-ujj domén ugyanakkor nélkülözhetetlen a Rad5-tel való kölcsönhatás kialakításához, csakúgy, mint az előtte és utána található szekvencia részletek. A cink ujj és SAP domének közötti régióknak pedig intaktnak kell lennie, hogy a DNS kötése megvalósuljon, és végül , hogy a SAP domén valóban az egyszálú DNS kötésért felelős.

VI. Rövidítések jegyzéke

AD	- Activation domain	- aktivációs domén
ADH1	- Alcohol dehydrogenase 1	- alkohol dehidrogenáz 1
ATP	- Adenosine triphosphate	- adenzin trifoszfát
BD	- Binding domain	- DNS kötő domén
BER	- Base excision repair	- bázis kivágó hibajavítás
CAN	- Canavanine	- kanavanin
DDT	- DNA damage tolerance	- DNS-hiba tolerancia
DNS	- Dezoxi-ribonukleinsav	
dNTP	- Deoxyribonucleotide triphosphate -	- deoxiribonukleotid trifoszfát
E1	- Ubikvitin activating enzyme	- ubikvitin aktiváló enzim
E2	- Ubikvitin konjugase enzyme	- ubikvitin konjugáz enzim
E3	- Ubikvitin ligase enzyme	- ubikvitin ligáz enzim
EDTA	- Ethylenediaminetetraacetic acid	- etilén-diamin-tetraecetsav
EMSA vizsgálat	- Electrophoretic mobility shift assay -	- elektroforetikus mobilitás eltolódás
GAL4	- DNA-binding transcription factor	-DNS kötő transzkripció faktor
GST	- Glutathione Sepharose Transferase -	- glutation szefaróz transzferáz
HA	- Hemagglutinin	
HIS3	- Histidinolphosphatase	- hisztidinol foszfatáz
HU	- Hydroxy urea	- hidroxy-urea
HRR	- Homologous recombination repair -	- homológ rekombinációs hibajavítás
LEU2	- Beta-isopropylmalate dehydrogenase –	- béta-izopropilmalát-dehidrogenáz
LiAC	-Lithium-acetate	- lítium acetát
MCS	- Multiple cloning site	-multiklónozó hely
MMR hibajavítás	- Mismatch repair	- nem párosodó bázisokat eltávolító
MMS	- Methyl methanosulfonate	-metil-metanoszulfát

MMS2	-Methyl methanosulfonate sensitive 2	- metil-metanoszulfát érzékeny fehérje
NER	- Nucleotide excision repair	- nukleotid kivágó hibajavítás
NHEJ	- Non homologous end joining	- nem homológ végek összekapcsolása
NLS	- Nuclear localization signal	- nukleáris lokalizációs szignál
OD	- Optical density	- optikai denzitás
PAD	- Polymerase associated domain	
PCNA	- Proliferating cell nuclear antigene	
PCR	- Polymerase chain reaction	- polimeráz lánreakció
PEG	- Polyethylene glykol	- polietilén-glikol
PGK	- Phosphoglycerate kinase	- foszfoglicerát kináz
PIP	- PCNA interacting protein	- PCNA kötő fehérje
Rad	- Radiation sensitive protein	- sugárzásra érzékeny fehérje
Rev	- REVersionless protein	
RING	- Really interesting new domain	
SAP	- SAF-A/B, Acinus és Pias	
SDS	- Sodium dodecyl sulfate	- nátrium dodecil szulfát
SIM	- SUMO interacting motif	- SUMO-val kölcsönható motívum
SUMO	- Small ubiquitin like modifier	- ubikvitinszerű módosító fehérje
SWI/SNF	- SWItch/Sucrose Non-Fermentable	
TLS	- Translesion synthesis	- transzléziós szintézis
TRP1	- Phosphoribosylanthranilate isomerase	
Ubc13	- Ubikvitin carrier protein 13	
UBZ	- Ubiquitin binding zinc finger domain -	- ubikvitin kötő cink ujj domén
URA3	- Orotidine-5'-phosphate decarboxylase	
UV	- ultraviolet light	- ultraviola fény

VII. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Unk Ildikónak**, hogy már B.Sc hallgatóként szívesen fogadott a csoportjában, ezzel is támogatva a téma iránti elszántságomat. Sokat segített nekem a kutatás megtervezésében, és a felmerülő problémák esetén együtt gondolkodtunk a megoldáson.

Köszönöm **Dr. Vamsi Krishna Galinak** a rengeteg időt, amit arra fordított, hogy megtanítsa nekem a labor munka minden részletét, kihívását, így készítve fel az önálló gondolkodásra és kutató munkára.

Köszönöm **Dr. Bálint Évának** és **Dr. Halmai Miklósnak**, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel, mindig szívesen segítettek.

Minorits Szilvia, a DNS repair csoport asszisztense volt segítségemre a rengeteg táptalaj, lemez készítésénél. Köszönöm szépen.

Köszönöm a barátaimnak, **Tóth Ágnesnek**, **Sági-Zsigmond Eszternek** és **Dr. Balogh Dávidnak**, hogy mindig támogattak és vidám környezetet biztosítottak a dolgozó hétköznapokon is.

Hálával tartozom a családomnak, akik mindig támogattak a tanulmányaim során, ösztönöztek, hogy magamból a legtöbbet tudjam kihozni és kutatóvá válhassak.

Köszönöm férjemnek a támogatást, a megértését többek között a sok hétvégi munka és késő esti hazaérkezés miatt.

A munka elkészültét a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal GINOP-2.3.2-15-2016-00001 és GINOP-1.3.2-15-2016-00024 pályázatai támogatták.

VIII. Irodalomjegyzék

Bailly Veronique, John Lamb, Patrick Sung, Satya Prakash, and Louise Prakash (1994) Specific complex formation between yeast RAD6 and RAD 18 proteins: a potential mechanism for targeting RAD6 ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites
GENES & DEVELOPMENT **8**:811-820

Bailly Veronique, Scott Lauder, Satya Prakash, and Louise Prakash (1997) Yeast DNA Repair Proteins Rad6 and Rad18 Form a Heterodimer That Has Ubiquitin Conjugating, DNA Binding, and ATP Hydrolytic Activities
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY *Vol. **272**, No. 37, pp. 23360–23365,

Bailly V, Prakash S, Prakash L (1997) Domains required for dimerization of yeast Rad6 ubiquitin-conjugating enzyme and Rad18 DNA binding protein.
Mol Cell Biol.; **17**(8):4536-43. PMID:PMC232307

Bienko M, Green CM, Crosetto N, Rudolf F, Zapart G, Coull B, Kannouche P, Wider G, Peter M, Lehmann AR, Hofmann K, Dikic I (2005) Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis.
Science **310**: 1821-1824 DOI:10.1126/science.1120615

Bienko M, Green CM, Sabbioneda S, Crosetto N, Matic I, Hibbert RG, Begovic T, Niimi A, Mann M, Lehmann AR, Dikic I (2010) Regulation of translesion synthesis DNA polymerase η by monoubiquitination.
Mol Cell **37**: 396-407 DOI: 10.1016/j.molcel.2009.12.039

Blastyák A, Pintér L, Unk I, Prakash L, Prakash S, Haracska L. (2007) Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression.
Mol Cell. **28**(1):167-75. DOI:10.1016/j.molcel.2007.07.030

Bowers J, Tran PT, Joshi A, Liskay RM, Alani E. (2001) MSH-MLH complexes formed at a DNA mismatch are disrupted by the PCNA sliding clamp.
J Mol Biol.;**306**(5):957-68. DOI:10.1006/jmbi.2001.4467

Broomfield S, Chow BL, Xiao W (1998) MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway.
Proc Natl Acad Sci U S A. May 12;**95**(10):5678-83. PMID:PMC20438

Brusky Janna, Yu Zhu, Wei Xiao (2000), UBC13, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*
Curr Genet (2000) **37**: 168±174

Chang Debbie J. and Karlene A. Cimprich, (2009), DNA Damage Tolerance: When It's OK to Make Mistakes
Nat Chem Biol. **5**(2): 82–90. doi:10.1038/nchembio.139

Clark AB, Valle F, Drotschmann K, Gary RK, Kunkel TA, (2000), Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 complexes. *J Biol Chem.* **275**(47):36498-501. DOI:10.1074/jbc.C000513200

Daraba A, Gali VK, Halmai M, Haracska L, Unk I. (2014) Def1 promotes the degradation of Pol3 for polymerase exchange to occur during DNA-damage--induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol.* **12**(1):e1001771. doi: 10.1371/journal.pbio.1001771

Davies Adelina A., Diana Huttner, Yasukazu Daigaku, Shuhua Chen, and Helle D. Ulrich (2008). Activation of Ubiquitin-Dependent DNA Damage Bypass Is Mediated by Replication Protein A *Molecular Cell* **29**, 625–636

Dohmen R J , K Madura, B Bartel, and A Varshavsky, (1991), The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**(16): 7351–7355

Eissenberg JC, Ayyagari R, Gomes XV, Burgers PM, (1997) Mutations in yeast proliferating cell nuclear antigen define distinct sites for interaction with DNA polymerase delta and DNA polymerase epsilon. *Mol Cell Biol.* **17**(11):6367-78. DOI: 10.1128/MCB.17.11.6367

Fan Q, Xu X, Zhao X, Wang Q, Xiao W, Guo Y, Fu YV, (2018) Rad5 coordinates translesion DNA synthesis pathway by recognizing specific DNA structures in *saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* **64**(4):889-899. doi: 10.1007/s00294-018-0807-y

Ghosal Gargi and Junjie Chen, (2013) DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome *Transl Cancer Res.* **2**(3): 107–129. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.01

Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature.*; **419**(6903):135-41. DOI:10.1038/nature00991

Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S., (2002), RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature.* **419**(6903):135-41.

Hofmann RM, Pickart CM. (1999) Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell.* **96**(5):645-53. PMID:10089880

Huang A, Hibbert RG, de Jong RN, Das D, Sixma TK, Boelens R (2011) Symmetry and asymmetry of the RING-RING dimer of Rad18. *J Mol Biol.*, **410**(3):424-35. doi: 10.1016/j.jmb.2011.04.051.

James Philip, John Halladay and Elizabeth A. Craig (1996) Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast
GENETICS **144**(4):1425-1436

Jentsch S, McGrath JP, Varshavsky A (1987) The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme.
Nature.; **329**(6135):131-4. DOI:10.1038/329131a0

Jha Vikash, Bian Chuanbing, Guangxin Xing, Hong Ling (2016) Structure and mechanism of error-free replication past the major benzo[a]pyrene adduct by human DNA polymerase κ
Nucleic Acids Research, **44**(10):4957–4967 doi: 10.1093/nar/gkw204

Johnson RE, Henderson ST, Petes TD, Prakash S, Bankmann M, Prakash L (1992) *Saccharomyces cerevisiae* RAD5-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome.
Mol Cell Biol.; **12**(9):3807-18.

Johnson RE, Washington MT, Prakash S, Prakash L (2000) Fidelity of human DNA polymerase ϵ .
The Journal of biological chemistry **275**: 7447-7450, DOI:10.1038/sj.emboj.7601178

Johnson RE, Prakash L, Prakash S. (2006) Yeast and human translesion DNA synthesis polymerases: expression, purification, and biochemical characterization.
Methods Enzymol. **408**:390-407.

Jones JS, Weber S, Prakash L. (1988) The *Saccharomyces cerevisiae* RAD18 gene encodes a protein that contains potential zinc finger domains for nucleic acid binding and a putative nucleotide binding sequence.
Nucleic Acids Res.; **16**(14B):7119-31. PMID: PMC338355

Jung YS, Liu G, Chen X (2010) Pirh2 E3 ubiquitin ligase targets DNA polymerase ϵ for 20S proteasomal degradation.
Molecular and cellular biology **30**: 1041-1048 DOI: 10.1128/MCB.01198-09

Kao Cheng-Fu , Cory Hillyer, Toyoko Tsukuda, Karl Henry, Shelley Berger, and Mary Ann Osley (2004) Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B
Genes Dev. **18**(2): 184–195.
doi: 10.1101/gad.1149604

Koundrioukoff S, Jónsson ZO, Hasan S, de Jong RN, van der Vliet PC, Hottiger MO, Hübscher U. (2000) A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation.
J Biol Chem. **28**;275(30):22882-7. DOI:10.1074/jbc.M0011850200

Lea DE, Coulson CA. (1949) The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations.
J Genet. **49**(3):264-85.

Masuda Y, Suzuki M, Kawai H, Suzuki F, Kamiya K (2012) Asymmetric nature of two subunits of RAD18, a RING-type ubiquitin ligase E3, in the human RAD6A-RAD18 ternary complex.

Nucleic Acids Res.; **40**(3):1065-76. doi: 10.1093/nar/gkr805.

Masuda Yuji , Miki Suzuki, Hidehiko Kawai, Fumio Suzuki, and Kenji Kamiya (2012) Asymmetric nature of two subunits of RAD18, a RING-type ubiquitin ligase E3, in the human RAD6A–RAD18 ternary complex

Nucleic Acids Res. **40**(3): 1065–1076. doi: 10.1093/nar/gkr805

Minca EC, Kowalski D. (2010) Multiple Rad5 activities mediate sister chromatid recombination to bypass DNA damage at stalled replication forks.

Mol Cell. **38**(5):649-61. doi: 10.1016/j.molcel.2010.03.020.

Minesinger Brenda K., Sue Jinks-Robertson (2005) Roles of *RAD6* Epistasis Group Members in Spontaneous Pol ζ -Dependent Translesion Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*

Genetics. **169**(4): 1939–1955. doi: 10.1534/genetics.104.033894

Miyase S, Tateishi S, Watanabe K, Tomita K, Suzuki K, Inoue H, Yamaizumi M. (2005) Differential regulation of Rad18 through Rad6-dependent mono- and polyubiquitination.

J Biol Chem.; **280**(1):515-24.

DOI:10.1074/jbc.M409219200

Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S., (2007), PCNA, the maestro of the replication fork.

Cell., **129**(4):665-79. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.003

Nakajima S, Lan L, Kanno S, Usami N, Kobayashi K, Mori M, Shiomi T, Yasui A. (2006) Replication-dependent and -independent responses of RAD18 to DNA damage in human cells.

J Biol Chem.; **281**(45):34687-95.

DOI:10.1074/jbc.M605545200

Notenboom V, Hibbert RG, van Rossum-Fikkert SE, Olsen JV, Mann M, Sixma TK (2007). Functional characterization of Rad18 domains for Rad6, ubiquitin, DNA binding and PCNA modification.

Nucleic Acids Res.; **35**(17):5819-30

Ohmori H, Friedberg EC, Fuchs RP, Goodman MF, Hanaoka F, Hinkle D, Kunkel TA, Lawrence CW, Livneh Z, Nohmi T, Prakash L, Prakash S, Todo T, Walker GC, Wang Z, Woodgate R (2001) The Y-family of DNA polymerases.

Mol Cell **8**: 7-8 DOI: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00278-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00278-7)

Okubo S, Hara F, Tsuchida Y, Shimotakahara S, Suzuki S, Hatanaka H, Yokoyama S, Tanaka H, Yasuda H, Shindo H. (2004) NMR structure of the N-terminal domain of SUMO ligase PIAS1 and its interaction with tumor suppressor p53 and A/T-rich DNA oligomers.

J Biol Chem. **279**(30):31455-61. DOI:10.1074/jbc.M403561200

Parker JL, Ulrich HD. (2012) A SUMO-interacting motif activates budding yeast ubiquitin ligase Rad18 towards SUMO-modified PCNA.

Nucleic Acids Res.;**40**(22):11380-8. doi: 10.1093/nar/gks892

Plosky BS, Vidal AE, Fernandez de Henestrosa AR, McLenigan MP, McDonald JP, Mead S, Woodgate R (2006) Controlling the subcellular localization of DNA polymerases iota and eta via interactions with ubiquitin.

The EMBO journal **25**: 2847-2855 DOI:10.1038/sj.emboj.7601178

Prakash S, Prakash L, (2002) Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair.

Genes Dev. **16**(15):1872-83. DOI:10.1101/gad.1009802

Prudden J, Pebernard S, Raffa G, Slavin DA, Perry JJ, Tainer JA, McGowan CH, Boddy MN. (2007) SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability.

EMBO J. **26**(18):4089-101. DOI:10.1038/sj.emboj.7601838

Sharma S, Canman CE. (2012) REV1 and DNA polymerase zeta in DNA interstrand crosslink repair.

Environ Mol Mutagen. **53**(9):725-40. doi: 10.1002/em.21736

Tateishi S, Sakuraba Y, Masuyama S, Inoue H, Yamaizumi M. (2000) Dysfunction of human Rad18 results in defective postreplication repair and hypersensitivity to multiple mutagens.

Proc Natl Acad Sci U S A.;**97**(14):7927-32.

Torres-Ramos Carlos A. , Satya Prakash, and Louise Prakash (2002) Requirement of *RAD5* and *MMS2* for Postreplication Repair of UV-Damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*

Mol Cell Biol. **22**(7): 2419–2426. doi: 10.1128/MCB.22.7.2419-2426.2002

Torres-Ramos C A , B L Yoder, P M Burgers, S Prakash, and L Prakash (1996) Requirement of proliferating cell nuclear antigen in RAD6-dependent postreplicational DNA repair.

Proc Natl Acad Sci U S A.; **93**(18): 9676–9681. PMID:PMC38488

Trincao J, Johnson RE, Escalante CR, Prakash S, Prakash L, Aggarwal AK (2001) Structure of the catalytic core of *S. cerevisiae* DNA polymerase eta: implications for translesion DNA synthesis.

Mol Cell **8**: 417-426 DOI: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00306-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00306-9)

Tsui C, Raguraj A, Pickart CM (2005) Ubiquitin binding site of the ubiquitin E2 variant (UEV) protein Mms2 is required for DNA damage tolerance in the yeast RAD6 pathway.

J Biol Chem. May 20;**280**(20):19829-35. DOI:10.1074/jbc.M414060200

Tsuji Y, Watanabe K, Araki K, Shinohara M, Yamagata Y, Tsurimoto T, Hanaoka F, Yamamura K, Yamaizumi M, Tateishi S. (2008) Recognition of forked and single-stranded DNA structures by human RAD18 complexed with RAD6B protein triggers its recruitment to stalled replication forks.

Genes Cells. **13**(4):343-54. doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01176.x

Ulrich Helle D., Stefan Jentsch, (2000), Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair
The EMBO Journal Vol. **19** No. 13 pp.3388-3397

Unk I, Hajdú I, Blastyák A, Haracska L. (2010), Role of yeast Rad5 and its human orthologs, HLTF and SHPRH in DNA damage tolerance.
DNA Repair (Amst). **9**(3):257-67. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.12.013.

Washington MT, Johnson RE, Prakash S, Prakash L (2000) Accuracy of thymine-thymine dimer bypass by *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase eta.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**: 3094-3099 DOI:10.1073/pnas.050491997

Watts FZ., (2006) Sumoylation of PCNA: Wrestling with recombination at stalled replication forks.
DNA Repair (Amst)., **5**(3):399-403. DOI:10.1016/j.dnarep.2005.11.002

Xiao W , B L Chow, S Broomfield, and M Hanna (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways.
Genetics. **155**(4): 1633–1641. PMCID: PMC1461201

IX. Összefoglaló

A sejtek örökítő anyagát számos károsító hatás éri, mely származhat a környezetből, de a sejtek alapvető életfolyamataiból is. A hibák kijavításának és a DNS információ tartalmának hibátlan megőrzése érdekében számos mechanizmus jött létre az evolúció során. Mégis vannak olyan károsodások, amik nem kerülnek kijavításra a sejtciklus S fázisáig és ott a replikációs villa megakadását, kettős szálú töréseket, kromoszómális átrendeződéseket okoznak. A genom stabilitásának megőrzésére olyan mechanizmusok jöttek létre, melyek biztosítják a replikációs gépezet továbbhaladását a károsodott bázison. Ezeket a folyamatokat nevezzük összefoglalóan DNS-hiba tolerancia útvonalaknak (DDT).

A DDT sokféle útvonala közül csoportunk a Rad6/Rad18 vezérelte DDT útvonal működésének pontos megértésével foglalkozik. Az útvonal működése során az elakadt replikációs villában a Rad6/Rad18 komplex ubikvitinálja a PCNA molekulát a 164-es lizinjén, melynek hatására a replikatív DNS-polimeráz helyét egy transzléziós polimeráz veszi át. A TLS polimeráz flexibilis aktív centrumának köszönhetően átsegíti a replikációs apparátust a hibás DNS szakaszon, majd a replikatív polimeráz folytatja a DNS szintézisét. Ha a monoubikvitinált PCNA molekula az Mms2/Ubc13-Rad5 komplex által poliubikvitinálódik, akkor a hibamentes átírást biztosító villa-visszafordításon/templátváltáson alapuló alútvonal lép életbe.

A Rad6/Rad18 komplex nélkül a DDT útvonal nem lép működésbe. Annak ellenére, hogy a Rad18 fehérje jelenléte és hibátlan működése esszenciális, s ezért intenzíven kutatott, mégsem ismerjük működésének és szerkezetének minden részletét ma még. A hosszú évek kutató munkájának eredményeként hat domént azonosítottak a Rad18 fehérjén. Az első Rad18-cal foglalkozó közleményekben még ATPáz-ként írták le, a C-terminális részén meg is találjuk a Walker-A típusú nukleotid kötő motívumot. Szintén a C-terminálison találjuk a Rad6 ubikvitin konjugázzal való interakcióért felelős régiót. Az N-terminális részén az E3 ubikvitin ligázokra jellemző RING domént és a SUMO molekulával kölcsönható motívumot (SIM) is tartalmazza a fehérje. A középső részen helyezkedik el a cink-ujj motívum és a SAP domén is, melyek pontos szerepe a mai napig nem tisztázott. Ezért célul tűztük ki, hogy a már ismert domének szerepeit tisztázzuk az élesztő Rad18 fehérje esetében, és a még funkció nélküli nagyobb fehérjerészleteket megvizsgáljuk a DNS-hiba tolerancia mechanizmus tekintetében.

A C-terminális rész vizsgálatát három különböző méretű C-terminális deléciót hordozó konstrukció segítségével végeztük el. Azonban azt tapasztaltuk, hogy a C-terminális részéhez

semmilyen funkció nem kapcsolódik, a deléciós Rad18 fehérjék hibátlanul működnek a DNS-hiba tolerancia útvonal folyamataiban.

Az N-terminális vég vizsgálatához is három, különböző méretű szakaszt eltávolító konstrukciót hoztunk létre. Az ezekkel végzett kísérletekben a legnagyobb deléciót hordozó fehérjét tartalmazó törzs extrém érzékenységet mutatott DNS-károsító hatásokra, tehát a hiányzó régióknak nélkülözhetetlen szerepe van a DDT működésében. Élesztő kettős hibrid és GST pull down kísérletekben ezután megvizsgáltuk azt is, hogy képes-e a fehérje kölcsönhatni az ismert interakciós partnerekkel. Azt találtuk, hogy Rad6-tal képes a komplex kialakítására, önmagával is tud dimert alkotni, viszont a Rad5 fehérjével nem képes kölcsönhatásba lépni. Ez azonban önmagában nem magyarázza a tapasztalt nagymértékű érzékenységet. Ezért arra gondoltunk, hogy a PCNA és a Rad18 között nem tud létrejönni a kapcsolat, és ez áll a megfigyelt nagy érzékenység mögött. Az általunk elvégzett kísérletek azonban ezt nem igazolták, így továbbra is nyitott kérdés marad, hogy mi áll a tapasztalt fenotípus hátterében.

A másik két N-terminális deléciót hordozó törzs közepes érzékenységet mutatott a használt DNS-károsító ágensekre, tehát ezekben az esetekben a Rad18 funkciója sérült a DDT folyamatában. Episztázis analízissel bebizonyítottuk azt is, hogy a hiányzó részlet a villa-visszafordításon/templátváltáson alapuló alútvonal működését érintette. Élesztő kettős hibrid kísérletben pedig világossá vált, hogy a deléciós Rad18 fehérje nem tud a Rad5-tel interakcióba lépni, ami az említett alútvonalnak nélkülözhetetlen eseménye. A deléciós konstrukttal sikerült a Rad5 kölcsönhatásért felelős régiót a 155-190. aminosavig terjedő fehérjerészletre behatárolni. Lehetséges, hogy a legnagyobb deléciós fehérje esetében a 80-115. aminosavig terjedő részlet hiánya okozza az extrém érzékenységet, ide kötődik egy olyan alapvető funkció, ami nélkülözhetetlen a Rad18 működéséhez.

Közvetlenül az N-terminális deléciók után találjuk a Rad18 fehérjében cink-ujj motívumot, melyet pontmutációval rontottunk el (CC190,193GG). A cink-ujj pontmutáns hasonlóan viselkedett, mint a két N-terminális deléciós törzs: közepesen érzékeny fenotípust mutatott UV hatására és episztatikus kapcsolatban állt a Rad5 alútvonallal. Élesztő kettős hibrid kísérletben pedig a Rad5 kivételével az összes ismert interakciós partnerrel kölcsönhatott. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a cink-ujj is nélkülözhetetlen a Rad5-Rad18 kölcsönhatás kialakításához, tehát az interakcióhoz szükséges fehérjerégiót kibővíthetjük a 155-210 aminosavig terjedő szakaszra.

A fehérje középső részét a cink-ujj és SAP domén közötti részt deletáló (M) valamint a fél SAP doménben hiányos konstrukciókat tartalmazó törzsekkel vizsgáltuk meg. Mind az M és SAP deléciós törzs a teljes *RAD18* gén deléciójával megegyező érzékenységet mutatott a

mutagén ágensek hatására. A SAP domén funkciójaként az irodalom DNS kötést feltételez. Ezzel összhangban a DNS-kötési kísérletben azt tapasztaltuk, hogy a SAP doménjében hiányos fehérje nem tudta megkötni az egyszálú DNS-t, ami pedig nyilvánvalóan vezethet a tapasztalt fenotípushoz. Ezen túl leellenőriztük a SAP mutáns fehérje kölcsönhatási mintázatát is, hiszen a fehérje szerkezetében bekövetkező változás hatással lehet a kialakított interakciókra is. A mutáns azonban kivétel nélkül kölcsönhatott a jól ismert interakciós partnerekkel.

Az M mutáns vizsgálata ezzel szemben meglepő eredményt hozott. A deléciós fehérje nem tudott interakcióba lépni a Rad5 molekulával, valamint az egyszálú DNS szubsztrátot sem volt képes megkötni. Ebből arra következtethetünk, hogy a cink-ujj és a SAP domén közötti régió mintegy hídként funkcionál, megfelelő távolságot tart a két domén között, hogy azok a helyes térbeli konformációt kialakítva el tudják látni a feladatukat.

Eredmények:

1. A Rad18 C-terminális része nem vesz részt a DNS-hiba tolerancia útvonal működésében.
2. A cink-ujj motívumot is tartalmazó, 155-246. aminosavig terjedő régió a felelős a Rad5 fehérjével való kölcsönhatás kialakításáért.
3. A SAP domén hélix-loop-hélix motívuma szükséges a DNS kötéséhez.
4. A cink-ujj és SAP domén közötti rész a helyes konformáció kialakításával egyaránt hozzájárul a Rad5 és az egyszálú DNS kötésének megvalósulásához.

X. Summary

The DNA in the cells is continuously affected by several damaging agents which come from the environment or from internal cellular processes. Therefore, several mechanisms evolved to repair the damaged DNA and to keep the information encoded in the DNA safe. If the damage is not corrected until the S phase of the cell cycle, it causes replication fork collapse, double stranded DNA breaks, and chromosomal aberrations. A few mechanisms formed during evolution which can preserve the genome stability and help the replication machinery to bypass the damage even in mutagenic manner. The DNA damage tolerance pathway (DDT) is one of these mechanisms.

Our study focuses on the better understanding of the Rad6/Rad18 guided DDT pathway. When the replication fork stops at the damage site, the Rad6/Rad18 complex ubiquitinates the PCNA molecule at the 164 lysine residue. This facilitates the switching of the replicative polymerase to the translesion polymerase. The flexible active centre of the TLS polymerase helps the replication machinery to bypass the damaged site, then the replicative polymerase takes back its place and continues the synthesis. The Mms2/Ubc13-Rad5 complex activates the error free template switch/fork regression subpathway by the polyubiquitination of the monoubiquitinated PCNA.

The DNA damage tolerance pathway cannot function without the Rad6/Rad18 complex. Rad18 is the key regulator in the DDT pathway however, our knowledge about the mechanism underlying its activity and how the different surfaces regulate its role, is incomplete. In the last 40 years only six domains of the Rad18 polypeptide were characterized. In the first publications on Rad18, it was considered an ATPase because of the Walker-A type nucleotide binding motif which is located at the C-terminus of the protein. The Rad6 binding domain, responsible for the interaction with the E2 conjugase Rad6, is also located at the carboxy-terminal end. At the N-terminus, Rad18 contains a RING domain (that is common in the group of E3 ligases) and it also contains a SUMO interacting motif (SIM). The SAP and Zn-finger domains, whose function are not clear yet, are located at the middle part of the protein. Our goal was to better understand the role of the previously characterized domains and analyse those larger parts of the protein whose function have not been described in the DDT processes.

To investigate the C-terminal part of the protein we designed three different C-terminal deletion constructs. Based on our results we think that there is no function which can be

connected to the C-terminus because the Rad18 deletion proteins work properly in the mechanisms of the DDT.

We designed three different deletion constructs to study the N-terminal part of Rad18. The strain containing the biggest deletion shows an extreme sensitivity upon DNA damaging agents so we can conclude that the missing part is essential in the DDT pathway. Next, we asked whether the mutant protein is able to interact with its well-known partners to check this we applied yeast two hybrid and GST pull down experiments. We found that it can interact with the Rad6 and it can form a dimer with itself but the Rad18-Rad5 interaction is abolished however it cannot be the explanation of the extreme sensitivity. We thought that maybe the interaction between the PCNA and the Rad18 is inhibited by the deletion and this is the reason behind the high sensitivity. Unfortunately, we were not able to prove our hypothesis so it remains an open question. The two other deletion constructs show an intermediate sensitivity upon DNA damaging agents which means that the function of the Rad18 in the DDT mechanisms is affected. We proved with epistasis analysis that the Rad5 governed fork regression/ template switching subpathway is inhibited by the deletions. We have found that the Rad18-Rad5 heterodimer cannot be formed in this case which would be necessary for the working of the Rad5 subpathway. With these deletion constructs we are able to determine the region between 155-190 amino acid responsible for the Rad5 interaction. That the Rad5 interacting surface is between the 155-190 amino acid region. Upon these findings we suggest that in the case of the biggest deletion construct the deletion of the 80-115 amino acid causes the extreme sensitivity. In this region an essential function is located, which is necessary for the Rad18 role in the DDT pathway.

Right after the N-terminal deletions we can find the Zn-finger domain what we modified by point mutations (CC190,193GG). The Zn-finger point mutant shows an intermediate sensitivity such as the N-terminal deletion strains. It is in epistatic relationship with the Rad5 subpathway. In yeast two hybrid experiments it can interact with the well-known partners except the Rad5. It seems that the Zn-finger is essential for the formation of Rad5-Rad18 heterodimer which means that the region responsible for the interaction is between the 155-210 amino acid.

To investigate the middle part of the protein we designed an M deletion (which deletes the part between the Zn-finger and the SAP) and a SAP domain deletion. Both the M and SAP domain deletion containing strains show a similar sensitivity to the strain where the whole *RAD18* is deleted. Other papers suggest that the role of the SAP domain could be the DNA binding. We investigated whether our mutant is capable of binding. Upon our results we

conclude that the SAP mutant protein can not bind the ssDNA which can lead to the experienced phenotype. Next we checked the interaction pattern of the mutant and our results showed that the SAP mutant is able to interact with the well-known partners.

During the experiments with the M mutant we got interesting results. The mutant protein cannot interact with the Rad5 molecule and bind the ssDNA. We can conclude that the region between the Zn-finger and the SAP domain functions like a bridge. It keeps the distance between the two domains which helps to build the desired conformation.

Main results:

1. The C-terminal part of the Rad18 protein has no role in the DNA damage tolerance pathway.
2. The region between amino acid positions 155-246, which contains the Zn-finger motif, is responsible for the binding of the Rad5 protein.
3. The helix-loop-helix of SAP domain motif is essential for ssDNA binding.
4. The region between the Zn-finger and the SAP domains is involved in the interaction with both Rad5 and the DNA, most likely by facilitating the formation of the proper conformation of Rad18.