

**DNS reparációs és DNS hiba tolerancia folyamatokat
befolyásoló PCNA mutánsok genetikai elemzése**

Ph.D. értekezés tézisei

Halmai Miklós

Témavezető: Dr. Unk Ildikó,
tudományos főmunkatárs

**MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet**

**SZTE Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola**

**Szeged
2017**

Előzmények:

A DNS károsodásokat javító mechanizmusok eddig is népszerű kutatása a célzott tumor terápiák megjelenésével új lendületet vett.

Nem meglepő az érdeklődés, ugyanis a DNS reparációs és DNS hiba tolerancia folyamatok egyes génjei tumor szupresszorok, mások pedig onkogének.

A DNS stabilitását őrző folyamatokról szerzett ismeretek gyógyászatban történő alkalmazására jó példa a PARP inhibitorok alkalmazása *BRCA1* vagy *BRCA2* mutáns petefészek tumorok kezelésére. Az említett gének inaktiváló mutációját hordozó betegekben nem működik a kettős szálú DNS törések homológ rekombináción alapuló javítása, a PARP inhibitor viszont hozzájárul a kettős szálú törések keletkezéséhez, ugyanis gátolja az egyes szálú DNS törések javítását. Ily módon érzékeny pontján támadható az adott tumoros sejtpopuláció. Sajnos jelenleg kevés ilyen jó példával rendelkezünk.

A DNS reparáció és DNS hiba tolerancia vizsgálatok elsődleges modellszervezetének hosszú ideig az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) számított. Rendkívül konzervált folyamatokról lévén szó, az élesztő DNS reparációs gének többségének jól megfeleltethető humán homológja van. Haploid genomja könnyen, irányítottan módosítható.

A DNS reparációs és DNS hiba tolerancia folyamatok az élesztőgenetikai kutatásoknak köszönhetően mára jól elkülönülő útvonalakra oszthatók. Ezen útvonalak különböző típusú károsodásokat más és más hatékonysággal képesek felismerni és processzálni.

Megkülönböztethetünk DNS reparációs útvonalakat, amelyek kivágják a károsodást hordozó DNS szakaszt, valamint ún. DNS hiba tolerancia folyamatokat, amelyek nem távolítják el a károsodást, hanem képesek biztosítani a sejtek túlélését a károsodás okozta negatív hatások kivédésével (pl. a DNS töréseket kezelő rekombinációs mechanizmus, vagy a károsodásnál elakadt replikációs villa továbbsegítését végző ún. transzléziós DNS szintézis). Mivel a DNS hiba tolerancia folyamatok célja a sejteket fenyegető sejthalál kivédése, és nem a DNS információtartalmának hű megőrzése, némely mechanizmus (főleg a transzléziós DNS szintézis esetében) mutagén, azaz a DNS információtartalmában változást okozhat.

Mindegyik fent említett útvonalan közös, hogy a folyamat bizonyos pontján DNS szintézisre van szükség. A DNS szintézis elengedhetetlen eleme a PCNA fehérje, amely elsődleges funkcióját tekintve a replikatív DNS polimerázok processzivitási faktora. Ily módon a DNS károsodások helyén is gyakran jelen van, mitöbb mára elmondhatjuk róla, hogy a DNS reparáció és DNS hiba tolerancia egyik fő szabályozója.

A PCNA fehérje *in vivo* homotrimer formában gyűrűt képez a DNS körül különböző fehérjék (többek között a DNS polimerázok) dokkoló helyeként szolgálva. Több DNS reparációs fehérjével is kölcsönhat. Monoubiquitin általi poszttranszlációs módosulása aktiválja az

elakadt replikációs villát menekítő transzléziós DNS szintézis mechanizmust. Három jól jellemzett fehérjekötő régiója ismert, az N-terminális, a C-terminális, illetve a C és az N-terminális domént összekötő interdomén hurok, amely egyúttal a legnagyobb fehérjekötő felszín.

A fent említett régiók mellett további kiterjedt, hozzáférhető felszínek találhatóak a PCNA trimeren, amelyek eddig nem estek részletes genetikai és biokémiai kivizsgálás alá.

Munkámban ezen kevésbé ismert biológiai funkcióval rendelkező PCNA felszíneknek a DNS reparációban illetve DNS hiba toleranciában betöltött szerepét boncolgattam.

Célkitűzések:

Az előzmények fejezetben ismertetett PCNA fehérje a DNS reparációs és DNS hiba tolerancia folyamatok egyik fontos szabályozója. Mivel az ismert biológiai funkcióval rendelkező régiók a PCNA felületének csak kis részét fedik le, kísérleteink tervezésénél azt tűztük ki célul, hogy az eddig ismeretlen szerepű PCNA felszíneknek DNS reparációs és DNS hiba tolerancia folyamatokban való részvételét vizsgáljuk, mélyebb betekintést nyerve az említett folyamatok szabályozásába.

Pontokba szedve a munka célkitűzéseit, a következő lépések megvalósítását tűztük ki:

1. Előállítani általunk megválasztott PCNA régiókban megfelelő aminosavcseréket okozó pontmutációkat hordozó élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) *POL30* (PCNA) géneket.
2. Létrehozni olyan élesztő törzseket, amelyek egyedüli PCNA forrásként a kérdéses mutáns PCNA fehérjéket termelik.
3. Az előállított PCNA mutáns élesztő törzsek közül DNS károsító hatásra mutatott érzékenység alapján kiszűrni azokat, amelyekben a pontmutáció a PCNA fehérje DNS reparációs vagy DNS hiba tolerancia funkcióinak valamelyikét károsítja.
4. Genetikai analízissel a kérdéses pontmutáció hatását valamely ismert DNS reparációs vagy DNA hiba tolerancia útvonalba sorolni, azaz meghatározni, hogy melyik DNS reparációs útvonal működése sérült.
5. Funkcionális esszék segítségével bemutatni, hogy a vizsgált PCNA aminosavcserék az adott DNS reparációs útvonalon belül bizonyos biológiai folyamatot (DNS károsodás indukálta pontmutációképzés, spontán pontmutációképzés, NER etc.) befolyásolnak.
6. Biokémiai vizsgálatokkal magyarázni a PCNA pontmutációknak a kérdéses DNS reparációs útvonalakra gyakorolt lehetséges mechanisztikus hatását.

Alkalmazott módszerek:

Élesztő genetikai módszerek és DNS manipulációs technikák:

- PCR alapú helyspecifikus mutagenézis, pontmutációkat hordozó *POL30* (PCNA) gének létrehozásához.
- Homológ rekombináción alapuló gényiütés élesztő sejtekben.
- Molekuláris klónozások: a pontmutáns *POL30* gének élesztő centromeres vektorokba történő áthelyezése és egyéb a kísérletekhez szükséges konstruktok létrehozása.
- Pontmutáns *POL30* (PCNA) gének homológ rekombináción alapuló genomba integrálása.
- Kvalitatív szenzitivitási esszék (spot assay): élesztő törzsek különböző dózisu és típusu DNS károsító hatásokra (MMS, UV, RTG, HU, bleomycin) mutatott érzékenységeinek összehasonlító vizsgálata.
- Kvantitatív szenzitivitási esszék: Élesztő törzsek százalékban kifejezett túlélése az alkalmazott DNS károsítás (UV) dózisának függvényében.
- Spontán illetve UV károsítás által indukált mutációs ráta mérése L-canavanin tartalmú lemezeken.
- UV károsítás génextpresszióra gyakorolt hatásának mérése különböző genetikai háttéren *LacZ* riporter használatával.

Biokémiai eljárások:

- Címkézett fehérjék túltermelése és tisztítása
- Fehérje kölcsönhatások *in vitro* vizsgálata tisztított fehérjékkel (GST-pulldown assay)
- Natív (nem denaturáló körülmények között végzett) grádiens akrilamid gélelektroforézis multimer stabilitás vizsgálatokhoz.

Eredmények és megvitatásuk:

1. PCR alapú helyspecifikus mutagenézissel létrehoztunk 10 pontmutációt hordozó *Saccharomyces cerevisiae* *POL30* (PCNA) gént, amelyekben a pontmutáció az általam megválasztott helyen lévő aminosavat alaninra cserélte.
2. A létrehozott géneket élesztő centromeres konstruktokban egyedüli PCNA forrásként fejeztettük ki a *POL30* gén genomi kópiáját nélkülöző általunk módosított élesztő törzsekben.
3. Az összes előállított PCNA változatot termelő törzs életképesnek bizonyult, közülük csupán kettő mutatott hőmérséklet szenzitív növekedést, ami arra utal, hogy az aminosavcserék a PCNA replikációban betöltött szerepét bolygatták meg. Ezeket a további vizsgálatokból kizártam, hiszen nem replikációs defektussal rendelkező, hanem a DNS reparációs és DNS hiba tolerancia útvonalak működésében károsult törzseket szeretnénk volna vizsgálni.
4. A fennmaradó nyolc törzs közül hat a vad típusú törzsekhez képest megnövekedett érzékenységet mutatott UV és MMS károsításra, azt sugallva, hogy a bennük található PCNA aminosav cserék valamely DNS reparációs illetve DNS hiba tolerancia útvonal működését gátolták.
5. Ezen hat mutáns törzs közül öt esetében a PCNA monomerek közötti kapcsolódási felszín közelében lévő kiterjedt béta redőkön található az előállított aminosavcsere (*pol30-II99,100AA*; *pol30-D109A*; *pol30-III181,182AA*; *pol30-DII09,167AA* és *pol30-FE103,104AA*), míg egy esetben a PCNA monomer belső, DNS felé néző alfa hélixének egyikén történt módosítás (*pol30-L154A*).
6. Genetikai (episztázis) analízis segítségével megpróbáltuk a meglévő DNS reparációs és DNS hiba tolerancia útvonalakba térképeztük az előállított pontmutációk hatását. Az aleggységek kapcsolódási felszínének közelében aminosavcsere okozó mutációk közül a *pol30-II99,100AA* hatása a Rad6/Rad18 DNS hiba tolerancia (DDT, egyes forrásokban PRR) útvonalba sorolható, a *pol30-III181,182AA* a homológ rekombinációs episztázis csoportba, míg a *pol30-D109A* a nukleotid excíziós reparációs útvonalba (NER) illeszthető. A DNS felé néző belső felszínen aminosavcsere előidéző *pol30-L154A* allél a *pol30-II99,100AA* allélhoz hasonlóan a Rad6/Rad18 DNS hiba tolerancia útvonal génjeivel mutat genetikai kölcsönhatást.

7. A mutáns törzsek funkcionális esszék általi vizsgálatával, illetve biokémiai kísérletekkel kimutattuk, hogy az II99,100AA PCNA aminosavcsere a Rad6/Rad18 DNS hiba tolerancia útvonal mutagén transzléziós szintézis (TLS) ágát inaktiválja, ugyanis a kérdéses változatot termelő törzsből UV általi DNS károsítással nem indukálható a pontmutációk képződése. A fenotípusát minden bizonnyal annak köszönheti, hogy a kísérleteim tanúsága szerint a mutáns PCNA fehérje a vad típusútól eltérően nem képes a Rev1 transzléziós DNS polimerázzal való kölcsönhatásra. A D109A PCNA változat a nukleotid excíziós reparáció aktiválódásának egyik mechanizmusát gátolja. Az L154A PCNA változat a teljes Rad6/Rad18 DNS hiba tolerancia útvonalat inaktiválja, a változatot hordozó törzsből DNS károsító hatással nem indukálható pontmutációk képződése. A kérdéses allél jelenléte szuppressálja a *rad18* gén deléciója által okozott erős UV és MMS érzékenységet, és ebben a tulajdonságában csupán egy az irodalomból ismert *POL30* változattal egyezik meg (*pol30-K164R*), amelyben fehérjeszinten az ubiquitilációs hely sérült. Az általunk vizsgált allél továbbá egy erős spontán mutátor fenotípust is mutat, amely a proofreading mutáns DNS polimerázt termelő törzsekben tapasztalható spontán mutációs rátához hasonló mértékű. Ez arra utal, hogy a PCNA változat befolyásolhatja a hozzá kapcsolódó replikatív DNS polimeráz templáthűségét.
8. Kísérleteink tanúsága szerint a PCNA monomerek kapcsolódási felszínének közvetlen környezete a DNS reparáció és DNS hiba tolerancia szempontjából egy kiemelten fontos felület, ahol egymáshoz közel lévő aminosavak egymástól eltérő folyamatok működéséhez nélkülözhetetlenek.

Összefoglalás:

Az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) *POL30* (PCNA) génjében, a DNS hiba tolerancia és DNS reparáció egyik fő szabályozójában irányított mutagenezissel aminosavcseréket előidéző pontmutációkat hoztunk létre. Az aminosavcserék helyének megválasztásakor igyekeztünk olyan felszíneket kiválasztani, amelyek funkciói kevésbé ismertek. A csere a kiválasztott aminosavak alaninra való változtatását jelentette.

A mutáns géneket hordozó, és a mutáns fehérjéket termelő élesztő törzsek vizsgálatával megállapítottuk, hogy a PCNA monomerek kapcsolódási felszínének közvetlen környezete a DNS reparáció és DNS hiba tolerancia fontos szabályozó régiója. Ezen lapos, β -lemezekből álló régió egymáshoz közeli részei különböző DNS reparációs és DNS hiba tolerancia útvonalak (NER, HR, transzléziós DNS szintézis) működését befolyásolják.

Leírtunk továbbá egy olyan aminosavcserét is, amely a Rad6/Rad18 DNS hiba tolerancia útvonalat (DDT) teljes egészében inaktiválja. Ez a monomerek kapcsolódási felszínétől távolabb, a molekula belső, DNS felé néző felszínén helyezkedik el.

Publikációk:

1. A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény:

Halmi M, Frittmann O, Szabó Z, Daraba A, Gali VK, Bálint E, Unk I. Mutations at the Subunit Interface of Yeast Proliferating Cell Nuclear Antigen Reveal a Versatile Regulatory Domain. PLoS One. 2016. doi: 101371/journal.pone.0161307. IF (2015/2016) 3,057

Daraba A, Gali VK, **Halmi M**, Haracska L, Unk I. Def 1 promotes the degradation of Pol3 for polymerase exchange to occur during DNA-damage-induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS Biol. 2014. doi: 10.1371/journal.pbio.1001771. IF (2014) 9,343

MTMT number: 10043539

Total IF: 12,40

2. Referált folyóiratban megjelent közlemények:

2.1 A disszertáció témájához kapcsolódó közlemény:

Halmi M, Frittmann O, Szabó Z, Daraba A, Gali VK, Bálint E, Unk I. Mutations at the Subunit Interface of Yeast Proliferating Cell Nuclear Antigen Reveal a Versatile Regulatory Domain. PLoS One. 2016. doi: 101371/journal.pone.0161307. IF (2015/2016) 3,057

2.2 Egyéb közlemények:

Daraba A, Gali VK, **Halmi M**, Haracska L, Unk I. Def 1 promotes the degradation of Pol3 for polymerase exchange to occur during DNA-damage-induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS Biol. 2014. doi: 10.1371/journal.pbio.1001771. IF (2013) 11,771

3. Egyéb szakmai tevékenységek:

Konferencia részvételek:

Miklós Halmi, Zoltán Szabó and Ildikó Unk. PCNA at the crossroad of DNA repair pathways. Straub-Napok, Szeged, 2016.

Miklós Halmi, Orsolya Frittmann, Zoltán Szabó, Vamsi K. Gali, Éva Bálint and Ildikó Unk. Genetic analysis of PCNA mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. 6th Central European Genome Stability and Dynamics Meeting, Szeged, 2015.

Andreea Daraba, Vamsi K. Gali, **Miklós Halmi**, Lajos Haracska, Ildikó Unk. Polymerase exchange at replication forks stalled at DNA damage sites. 4th Central European Genome Stability and Dynamics Meeting, Vienna, 2013.

Andreea Daraba, Vamsi K. Gali, **Miklós Halmai**, Lajos Haracska, Ildikó Unk. DNA damage induced polymerase exchange at stalled replication forks. Hungarian Molecular Life Sciences, Siófok, 2013.

Andreea Daraba, Vamsi Krishna Gali, **Miklós Halmai**, Lajos Haracska and Ildikó Unk. Polymerase exchange at stalled replication forks in *Saccharomyces cerevisiae*. Straub-Napok, Szeged, 2012.

Halmi Miklós. A PCNA fehérje szerepe a mutagenézisben. Szegedi Biológus Doktorandusz Konferencia. Szekció előadói díj. 2011

Miklós Halmai, Vamsi Krishna Gali, Andreea Daraba, Ildikó Unk. Rescue of the stalled replication fork. Straub-Napok, Szeged, 2008.


Halmi Miklós, Daraba Andreea, Gali Vamsi Krishna, Unk Ildikó. DNS-hiba tolerancia utak szabályozása. "Genetikai Műhelyek Magyarországon" VII. Genetikai Minikonferencia, Szeged, 2008.

Poszterek:

Daraba Andreea, Gali Vamsi Krishna, **Halmi Miklós**, Unk Ildikó. Polymerase exchange at replication forks stalled at sites of DNA damage in *Saccharomyces Cerevisiae*. 38th FEBS Congress „Mechanisms in Biology”. Saint Petersburg, Russia, 2013

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Unk Ildikó, Halmai Miklós Ph.D. munkájának témavezetőjeként igazolom, hogy a jelölt tézisei az általa végzett munka eredményeit tükrözik és ezen eredmények a Ph.D. értekezéshez felhasznált közlemény létrehozásához jelentős mértékben hozzájárultak.




Dr. Unk Ildikó, témavezető
Kelt: Szeged, 2017.03.05

Társszerzői nyilatkozatok

1. Alulírott Dr. Unk Ildikó, nyilatkozom arról, hogy a

Halmai M, Frittmann O, Szabó Z, Daraba A, Gali VK, Bálint E, Unk I. Mutations at the Subunit Interface of Yeast Proliferating Cell Nuclear Antigen Reveal a Versatile Regulatory Domain. PLoS One. 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0161307. IF (2015/2016) 3,057

című közleményünkben a jelölt, Halmai Miklós szerepe meghatározó fontosságú. Felelős szerzőként hozzájárulok, hogy a jelölt a közleményünkben foglalt eredményeket felhasználja a Szegedi Tudományegyetem TTIK Biológiai Doktori Iskola keretében a Ph.D. fokozat megszerzésére benyújtott dolgozatában. Egyúttal kijelentem, hogy ezeket az eredményeket sem én, sem más szerző nem használta fel tudományos fokozat megszerzéséhez, és a jövőben sem fogja.




Dr. Unk Ildikó, felelős szerző
Kelt: Szeged, 2017

2. Alulírott Dr. Unk Ildikó felelős szerző, és Dr. Daraba Andreea első szerző, nyilatkozunk arról, hogy

Daraba A, Gali VK, Halmai M, Haracska L, Unk I. Def 1 promotes the degradation of Pol3 for polymerase exchange to occur during DNA-damage-induced mutagenesis in Saccharomyces cerevisiae. PLoS Biol. 2014. doi: 10.1371/journal.pbio.1001771. IF (2013) 11,771

című közleményünkben a jelölt, Halmai Miklós jelentős munkát végzett. Felelős szerzőként és első szerzőként hozzájárulunk, hogy a jelölt a fenti közleményünket felhasználja az SZTE TTIK Biológiai Doktori Iskolájának doktori eljárásához szükséges társszerzős publikációként. Egyúttal kijelentjük, hogy a fenti közleményt sem mi, sem más szerző társszerzős közleményként nem használta fel tudományos fokozat megszerzéséhez, és a jövőben sem fogja.



Dr. Unk Ildikó, felelős szerző
Kelt: Szeged, 2017.03.05



Dr. Daraba Andreea, első szerző
Kelt: Szeged, 2017.03.05