

**A HLTF koordinált fehérje és DNS átrendezése és
aktivitásának összehasonlítása a Bloom szindróma
helikáz fehérjével**

Ph.D disszertáció tézisei

Yathish Jagadheesh Achar

Témavezető: **Dr. Haracska Lajos**

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatózpont
Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem

Szeged 2011

Bevezetés

Az emberi HLTF (Helicase-like transcription factor) a Swi2/Snf2 ATP-vezérelt molekuláris motorfehérjék családjának a tagja. Mint a Swi2/Snf2 család legtöbb tagjának, a HLTF-nek sincs kanonikus DNS helikáz aktivitása, de rendelkezik ATP-hidrolízis által vezérelt kettős szálú (ds) DNS transzlokáz aktivitással. A HLTF biológiai jelentőségét jelzi, hogy szerepet játszik a sérült DNS replikációjában és megakadályozza a genom átrendeződést, így egy tumor szupresszor fehérjének minősül. A HLTF replikációs villa-átalakító tevékenységének a felfedezése, különösen a villa visszafordító képessége, mechanikus magyarázatot nyújt a templát váltáson alapuló hiba mentes DNS átírására. Azonban az elakadt replikációs villához több egyszálú (ss) DNS-, és dsDNS-kötött fehérje kapcsolódik, mint például az RPA, RFC, PCNA, és a replikációs polimeráz. Eddig ismeretlen, hogy ezek a fehérjék milyen módon távolítódnak el, mielőtt a DNS templát váltás végbemegy.

Megvizsgáltuk, hogy a replikációs villa-szerű DNS struktúrához kötődő fehérjék gátolják-e két eltérő replikációs villa visszafordító enzim, név szerint a Swi2/Snf2 családba tartozó HLTF és a RecQ családba tartozó Bloom szindróma helikáz (BLM) aktivitását.

Bebizonyítottuk, hogy a HLTF specifikusan képes mind az ssDNS-, mind a dsDNS-kötő fehérjék által kötött replikációs villát visszafordítani, amely folyamat a HLTF egy új fehérje átrendező aktivitásának köszönhető. Megfigyeléseink rávilágítanak arra, hogyan kerül eltávolításra az elakadt replikációs villát körülvevő fehérjék sokasága a DNS-ről, ami új hiba tolerancia útvonalban szerepet játszó fehérjéknek adhat helyet.

Célkitűzések

A disszertáció fő célja két olyan fehérje összehasonlítása, név szerint a BLM és a HLTF, amelyek rendelkeznek villa-visszafordító aktivitással. Habár mindkét enzimnek van villa-visszafordító aktivitása modell replikációs villán, feltételeztük, hogy különböző mechanizmusok révén képesek a megállt replikációs villát visszafordítani.

Ezen elgondolások alapján az alábbi célokat tűztük ki:

- I. Különböző modell replikációs villák létrehozása a BLM és a HLTF aktivitásának összehasonlítása céljából
- II. Annak a mechanizmusnak a megértése, hogyan képesek a replikációs villa-visszafordító enzimek legyőzni a replikációs villában elhelyezkedő fehérje komplexek gátló hatását
- III. Megvizsgálni, vajon a HLTF DNS átrendező aktivitásán kívül rendelkezik-e fehérje átrendező aktivitással

Módszerek

Fehérjék

A HLTF tisztítása

A BLM tisztítása

Az *E. coli* E111Q EcoRI tisztítása

Human replication protein A (RPA) tisztítása

Oligonukleotid alapú replikációs villa-szerű struktúrák létrehozása

Fehérje-kötött replikációs villa-szerű struktúrák létrehozása

Villa visszafordító assay

Eredmények

A HLTF képes dsDNS-kötő fehérje által kötött model replikációs villa visszafordítására

Megvizsgáltuk, hogy a HLTF DNS átrendező aktivitását gátolják-e azok a fehérjék, amelyek kötődnek az elakadt replikációs villa-szerű DNS struktúrákhoz. Először is, szeretnénk volna kizárni a konkrét fehérje-fehérje közötti kölcsönhatást a HLTF és a DNS-kötő fehérje között, ezért az *E. coli* E111Q EcoRI endonukleáz mutáns fehérjéjét választottuk, mely nem képes a DNS hasítására, de megőrizte a szekvencia specifikus dsDNS kötő aktivitását. Különböző homológ replikációs villa-szerű DNS szubsztrátokat készítettünk, melyek EcoRI kötőhelyeket tartalmaznak a rövid karokon, amihez sztöchiometrikus mennyiségben sikerült kötnünk az E111Q mutáns EcoRI fehérjét, amint azt a gél mobilitás eltolódási kísérletünk is megerősítette. Ezen fehérje-kötött DNS struktúrák átrendeződését a reakció során megjelenő 75/75 vagy 30/30 nukleotid hosszú dupla szálú DNS-ek megjelenésével tudjuk követni. A kontroll kísérletben a Bloom helikázt (BLM) használtuk, melyről szintén bebizonyították, hogy rendelkezik replikációs villa-visszafordító aktivitással, és kimutattuk, hogy az E111Q mutáns EcoRI fehérje kötődése gátolta ezt az aktivitását. Ezzel szemben azt találtuk, hogy a HLTF megőrizte villa visszafordító képességét az EcoRI kötődése mellett, és csak kismértékű gátlás volt megfigyelhető. Ezen túlmenően, amikor a villa DNS-en csak az egyik kar tartalmazott EcoRI kötőhelyet, a HLTF mind a vezető, mind a lemaradó szálnak megfelelő karon egyformán jól működött.

A modell villa szubsztrátról történő fehérje eltávolításhoz a HLTF transzlokáz aktivitására van szükség

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a HLTF a replikációs villa visszafordítása közben egyaránt képes eltávolítani az E111Q EcoRI fehérjét a vezető és lemaradó szálról. Hogy megerősítsük az E111Q fehérje tényleges eltávolítását, és azt, hogy ez a HLTF dsDNS transzlokáz aktivitásától függ, figyelemmel kísértük az E111Q EcoRI fehérje modell replikációs villáról történő eltávolítását egy jelölt, EcoRI kötőhelyet tartalmazó dsDNS-hez való kötődésével. Az eltávolított E111Q EcoRI fehérjét gél mobilitás eltolódási kísérletben követtük nyomon, és a fehérje-kötött DNS-el mutattuk ki. A fehérje-kötött DNS csak a vad típusú HLTF-el jelent meg,

az ATPáz mutánsal nem, ami arra utal, hogy az EcoRI fehérje eltávolítása a modell replikációs villáról a HLTf ATP függő dsDNS transzlokáz aktivitásának köszönhető.

A HLTf képes az ssDNS-t kötő fehérje által burkolt gap-et tartalmazó replikációs villát átrendezni

A vezető és lemaradó szál szintézise a leggyakrabban különválnak akkor, ha a replikációs apparátus egy DNS hibához ér. Ez a folyamat ssDNS kialakulásához vezet, amit ssDNS-kötő fehérjék, mint az RPA és a Rad51 képesek megkötni. Korábbi adatok alapján ismerünk olyan helikázokat, mint például a BLM, melyek képesek eltávolítani az ssDNS-hez kötött Rad51 fehérjét, de nem tudunk olyan fehérjéről, mely ssDNS kötött fehérjét képes eltávolítani dsDNS transzlokáz aktivitása révén.. Annak vizsgálatára, hogy ilyen mechanizmusra képes a HLTf fehérje, létrehoztunk egy 15nt hosszú ssDNS régiót a modell replikációs villa vezető szálán, ahová az ssDNS kötő fehérjék, mint az RPA vagy az *E. coli* SSB kötődni tudnak. Villa visszafordító kísérletben kimutattuk, hogy mind a HLTf mind a BLM sikeresen visszafordította a villát ssDNS kötő fehérje jelenlétében. Ezen a speciális szubsztráton az RPA-t a HLTf dsDNS transzlokáz aktivitása révén képes eltávolítani ami összhangban áll azzal a modellel, mi szerint a villa visszafordítás során a HLTf az újonnan szintetizált szálakat leválasztja az anyai szálról, majd összehibridizálja azokat. Az RPA eltávolítás nem tulajdonítható a HLTf és RPA közötti kapcsolatnak, mivel a HLTf az *E. coli* SSB fehérjét is ugyan ilyen hatékonyan képes eltávolítani az azonos szubsztrátról.. Ez az eredmény azt jelzi, hogy bizonyos bonyolult DNS szubsztrátokon, a HLTf kettős szálú DNS transzlokáz aktivitása is képes az ssDNS-kötött fehérjék eltávolítására. Az eredményeket összevetve, kísérleteink bizonyítják, hogy a HLTf koordinált fehérje eltávolító/ DNS átrendező kettős funkcióval rendelkezik az elakadt replikációs villánál.

A HLTf képes eltávolítani a PCNA-RFC komplexet a replikációs villáról

Annak érdekében, hogy kimutassuk, hogy a HLTf valóban képes olyan fehérjék eltávolítására, amelyek a replikációs villában jelen vannak, megvizsgáltuk, hogy a PCNA és RFC komplex milyen hatással van a HLTf aktivitására modell villa szubsztráton. A kontroll kísérletben ezek a DNS-kötő fehérjék teljes mértékben gátolták a BLM helikáz villa-visszafordító

aktivitását. A HLTf viszont képes volt átalakítani ezen replikáció során jelen lévő fehérjék által kötött villa szubsztrátot.

Diszkusszió

Általánosságban a Swi2/Snf2 családba sorolt fehérjékre az jellemző, hogy a nukleoszóma elmozdulását végzik a kromatin remodelling során. Azonban néhány tagjuk olyan különleges funkcióval rendelkezik, mint például a MOT1, amely leszorítja a DNS-ről a TATA box-kötő fehérjét, a HARP, ami képes összetekercselni a letekert DNS-t, és a FancM, HLTf, és az élesztő Rad5, amelyek replikációs villa-visszafordító képességgel rendelkeznek. A HLTf újonnan felfedezett koordinált fehérje eltávolító/DNS átrendező kettős funkciója tovább bővíti ezen fehérjék enzimatikus repertoárját és felveti a kérdést, miszerint más Swi2/Snf2 fehérjék is mutatnak-e hasonló aktivitást. Továbbá valószínűsítjük, hogy a HLTf koordinált fehérje eltávolító/DNS átrendező kettős funkciója fontos lehet a genom stabilitásának megőrzésében, amit az is jelez, hogy a rák egyes formáiban a HLTf expressziója csökkent, vagy különböző Swi2/Snf2 domén deléziós mutáns HLTf fehérje van jelen.

Publikációs lista:

1. Yathish Jagadheesh Achar, David Balogh, and Lajos Haracska

Coordinated protein and DNA remodeling by human HLTF on stalled replication fork

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011 Aug;108 (34): 14073-14078
(IF₂₀₀₉: 9.432)

2. Harsha HC, Suresh S, Amanchy R, Deshpande N, Shanker K, Yatish AJ, Muthusamy B, Vrushabendra BM, Rashmi BP, Chandrika KN, Padma N, Sharma S, Badano JL, Ramya MA, Shivashankar HN, Peri S, Choudhury DR, Kavitha MP, Saravana R, Niranjana V, Gandhi TK, Ghosh N, Chandran S, Menezes M, Joy M, Mohan SS, Katsanis N, Deshpande KS, Raghobama C, Prasad CK, Pandey A.

A manually curated functional annotation of the human X chromosome.

Nature Genetics. 2005 Apr; 37(4):331-2.
(IF₂₀₀₉: 34.284)

3. Peri S, Navarro JD, Kristiansen TZ, Amanchy R, Surendranath V, Muthusamy B, Gandhi TK, Chandrika KN, Deshpande N, Suresh S, Rashmi BP, Shanker K, Padma N, Niranjana V, Harsha HC, Talreja N, Vrushabendra BM, Ramya MA, Yatish AJ, Joy M, Shivashankar HN, Kavitha MP, Menezes M, Choudhury DR, Ghosh N, Saravana R, Chandran S, Mohan S, Jonnalagadda CK, Prasad CK, Kumar-Sinha C, Deshpande KS, Pandey A.

Human protein reference database as a discovery resource for proteomics.

Nucleic Acids Research. 2004 Jan 1; 32.
(IF₂₀₀₉: 7.479)

4. *Peri S, Navarro JD, Amanchy R, Kristiansen TZ, Jonnalagadda CK, Surendranath V, Niranjana V, Muthusamy B, Gandhi TK, Gronborg M, Ibarrola N, Deshpande N, Shanker K, Shivashankar HN, Rashmi BP, Ramya MA, Zhao Z, Chandrika KN, Padma N, Harsha HC, **Yatish AJ**, Kavitha MP, Menezes M, Choudhury DR, Suresh S, Ghosh N, Saravana R, Chandran S, Krishna S, Joy M, Anand SK, Madavan V, Joseph A, Wong GW, Schiemann WP, Constantinescu SN, Huang L, Khosravi-Far R, Steen H, Tewari M, Ghaffari S, Blobel GC, Dang CV, Garcia JG, Pevsner J, Jensen ON, Roepstorff P, Deshpande KS, Chinnaiyan AM, Hamosh A, Chakravarti A, Pandey A.*

Development of human protein reference database as an initial platform for approaching systems biology in humans.

Genome Research. 2003 Oct; 13(10):2363-71.
(IF₂₀₀₉: 11.342)

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Haracska Lajos, Yathish J Achar (jelölt) Ph.D munkájának témavezetőjeként igazolom, hogy a jelölt tézisei az általa végzett tudományos kutatómunka eredményeit híven tükrözik.

Igazolom, hogy a jelöltnek döntő szerepe volt elsőszerzős publikációjának létrehozásában, amely a tézis alapjául szolgált. Ezentúl jelentős mértékben hozzájárult több tudományos eredmény megszületéséhez is, amelyek publikálása folyamatban van.

Szeged, 2011. szept. 8.

.....
Dr. Haracska Lajos
Tud. tanácsadó
MTA SZBK
Genetikai Intézet