

Ph.D. tézisek

A C1 orf 124/Spartan szerepe a DNS-hiba tolerancia útvonalban

Írta: Juhász Szilvia

Témavezető: Dr. Haracska Lajos

**Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet**

**Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola**

2012

1 Bevezetés és célkitűzések

A sejtek örökítőanyagát folyamatosan érik külső és belső forrásból származó károsító hatások, amelyek javítása létfontosságú a sejtek életének szempontjából. A DNS károsodások következtében megállt replikációs villa akár DNS kettősszálú törések kialakulásához, genomikus instabilitáshoz, végeredményben a sejt halálához vezethet. Ennek elkerülése érdekében alakult ki az evolúció során a Rad6-Rad18 DNS-hiba tolerancia útvonal.

A Rad6-Rad18 ubikvitin konjugáló és ligáz enzim komplex képes monoubikvitilálni a PCNA-t. Monoubikvitiláció esetén a replikatív polimeráz lecserélődik egy úgynevezett alternatív polimerázra, amelynek aktív centruma képes befogadni a beépült hibás bázist. A DNS-hibán túlhaladva ismét visszacserélődik a replikatív polimeráz, és helyreáll a sejt normál replikációja. Ez a folyamat a transzléziós szintézis (TLS Translesion synthesis). A TLS folyamata DNS hibától függően több alútvonalra tagolódik, amelyek lehetnek hibamentesek vagy hibát generálók. Az UV-károsított DNS esetében például az egyik út a polimeráz éta (Pol η) aktiválásával a hiba mentes, míg más utak, a polimeráz kappa (Pol κ), polimeráz iota (Pol ι) vagy a polimeráz zéta (Pol ζ) és Rev1 szerepjátszásával mutáció árán történő átírást biztosítanak. A Rad6-Rad18 mellett a HLTF fehérje is egy ubikvitin ligáz, amely az Ubc13-Mms2 ubikvitin konjugáló enzim komplex-szel együtt képes a már monoubikvitilált PCNA-re további ubikvitin molekulákat kapcsolni. A poliubikvitilált PCNA aktiválja a templát cserével történő javítást, többek között a replikációs villa megfordításával. A replikációs villa mentésének másik útvonala a rekombináció függő folyamat, azonban ennek túlműködése genomikus instabilitáshoz vezethet. Ezért a szigorú szabályozás elengedhetetlen a sejt genomikus stabilitásának megőrzése érdekében.

Az ubikvitilált PCNA féléletidejét képes szabályozni az USP1 fehérje (Ubiquitin-specific protease 1) együttműködve az UAF1 fehérjével (USP1-associated factor 1). Az USP1 az UAF1 fehérjével komplexet alkotva képes deubikvitilálni a PCNA molekulát, ezzel akadályozni a DNS-hiba tolerancia útvonal működését, utat engedve a rekombináció függő villamentésnek.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az ubikvitin kötő domének szabályozó szerepét az emberi DNS-hiba javító folyamatokban. Megfigyeltük, hogy a különleges C2HC típusú cinkujj-szerű struktúrával rendelkező ubikvitin kötő domén csak a

DNS-hiba javító folyamatokban szerepet játszó fehérjékben található meg. Annak érdekében, hogy meghatározzuk a C2HC domén szabályozó szerepét, szekvencia adatbázisokban olyan fehérjék után kutattunk, amelyek rendelkeznek ilyen ubikvitin kötő doménnel. Így fedeztük fel a C1orf124 gént, amely a Spartan fehérjét kódolja.

Fő célunk volt, hogy megvizsgáljuk a C1orf124/Spartan esetleges szerepét a DNS-hiba javító folyamatokban.

2 Alkalmazott módszerek

Rekombináns DNS-technikák

- Polimeráz-láncreakció (PCR), illetve PCR alapú mutagenézis
- Restriktációs emésztés
- DNS fragmentum ligálás
- Agaróz gélelektroforézis

Fehérje módszerek

- Fehérjék tisztítása élesztőből
- GST pull down kísérlet
- *In vitro* ubikvitilálás

Sejtbiológiai kísérletek

- Koimmunoprecipitálás
- *In vivo* ubikvitilálási kísérletek
- Áramlási citométer alapú sejtérzékenységi kísérletek
- siRNS interferencia és stabil sejtvonalak izolálása
- Immunfestés

Számítógépes módszerek

- Fehérje szekvenciák illesztése
- Fehérje adatbázisok szűrése

3 Eredmények és megvitatásuk

3.1 A C1orf124 azonosítása és a szerkezete

Az ismert C2HC (UBZ) domént tartalmazó DNS-hiba javító fehérjék génjei mellett az adatbázisban egy új gént találtunk, C1orf124/Spartan jelzéssel, amely szintén rendelkezik ezzel a doménnel. A szekvencia adatbázis adatai alapján feltételezett homológjai csak a gerincesekben találhatók meg. Az rendelkezésre álló információk alapján a Spartan N-terminálisán hordoz egy SprT domént, amelyben egy jellegzetes HExxH aminosav szekvencia található. Baktériumokban végzett kísérletek alapján ennek a HexxH motívumnak feltehetően metalloproteáz funkciója lehet, azonban emlős sejtekben funkciója nem ismert. A fehérje C-terminális végén helyezkedik el az UBZ domén, amelyről feltételeztük, hogy az ubikvitin kötésben van szerepe. A Spartan egy lehetséges PIP motívumot is tartalmaz. A PIP egy PCNA interakciós motívum, amely számos DNS-hiba javításban részt vevő fehérjében is megtalálható. A Tumorscape Adatbázis adatai szerint Spartan génközeli kromoszóma régió deléciója esetén a rák különböző fajtái alakulhatnak ki magas számban, amelyet 3131 különböző tumor vizsgálatával határoztak meg

3.2. A Spartan a DNS károsodás helyéhez lokalizál

A DNS-hiba javító fehérjékre jellemző, hogy a DNS károsodás helyéhez lokalizálnak. Ezért megvizsgáltuk, hogy lézersugárral (laser microirradiation) kezelt sejtekben a Spartan a károsodás helyéhez lokalizál-e. A vad típusú (WT) Spartan kolokalizációt mutatott a lézersugár helyével, amelyet γ -H2AX ellenanyaggal jelöltünk, tehát a Spartan a DNS károsodás helyéhez lokalizál. A BrdU (bróm-deoxiuridin), mint timin analóg képes beépülni a DNS-be szintézis során. A BrdU jelölt, anti-BrdU ellenanyaggal immunfestett sejtekben a replikációs villák apró sejtmagi fókuszokként láthatók. A polimerázok processzivitási faktoraként azonosított PCNA fehérje immunfestése esetében is láthatóak az aktív replikációs villák. Ezeknek a módszereknek a segítségével kimutattuk, hogy a Spartan kolokalizációt mutat a BrdU beépülés helyével, valamint a PCNA fehérjével.

3.3. A Spartan lokalizációja függ a PIP és UBZ doménjétől

Lokalizációs kísérletekben megvizsgáltuk az egyes domének szerepét a Spartan lokalizációjában. Azt figyeltük meg, hogy az SprT domén mutáns hasonló lokalizációt mutatott, mint a vad típusú Spartan, míg a PIP és az UBZ mutánsok nem képesek sejtmagi

fókuszokat alkotni. Megvizsgáltuk, hogy a Spartan kolokalizációt mutat-e a Rad18-al illetve, a Rad18 hogyan befolyásolja lokalizációját. A Spartan a Rad18 +/- sejtekben nem képes sejtmagi fókuszokat alkotni, azonban azokban a mintákban, ahol a Rad18-at komplementáltuk, azaz DsRed Rad18-at expresszáltattunk, ott helyreállt a Spartan lokalizációja és kolokalizációt mutatott a Rad18-al. A kísérleti eredmény tükrében azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan lokalizációjához szükséges a Rad18.

3.4. A Spartan kölcsönhat az ubikvitin-PCNA-vel

In vivo koimmunoprecipitációs kísérletekben kimutattuk, hogy a Spartan egy komplexben működik az ubikvitin-PCNA-vel. Megerősítésként megvizsgáltuk *in vitro* körülmények között is a Spartan és az ubikvitin-PCNA közötti kölcsönhatást. Ezzel párhuzamosan azt is teszteltük, hogy melyik domén felelős az ubikvitin-PCNA kötéséért. Ezért vad típusú (WT), UBZ, PIP, és UBZ-PIP kettős mutáns és PCNA illetve ubikvitin-PCNA tisztított fehérjékkel GST pull-down kísérleteket készítettünk. Először azt teszteltük, hogy a Spartan kölcsönhat-e a PCNA-vel. Azt figyeltük meg, hogy a vad típusú és az UBZ pontmutáns Spartan képes kötni a PCNA-t, ellentétben a PIP pontmutánsal. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan a módosítatlan PCNA-t a PIP doménjén keresztül képes kötni. Hasonló kísérleti elrendezésben megvizsgáltuk a Spartan és a monoubikvitin-PCNA közötti kölcsönhatást. A vad típusú (WT) Spartan lépett kölcsönhatásba a monoubikvitin-PCNA-vel (150 mM NaCl). Poliubikvitin-PCNA kötést megvizsgálva azt figyeltük meg, hogy a vad típusú Spartan megőrizte kölcsönható képességét, a PIP mutáns kötő képességének erőssége csökkent, míg az UBZ és UBZ-PIP nem volt képes a poliubikvitin-PCNA kötésére. Az *in vitro* kísérletek eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan PIP doménjén keresztül képes kötni a PCNA-t, UBZ doménjén keresztül az ubikvitin láncot a PCNA-n és preferenciálisan az ubikvitin-PCNA-vel hat köcsön.

3.5. A Spartan csendesített emberi sejtek érzékenységet mutatnak DNS károsító ágensekkel szemben

A Spartan lokalizációja függ a Rad18-tól, azzal fehérjekomplexet képez. A Rad18 csendesítése, illetve a PCNA ubikvitiláció hiánya a sejtek megnövekedett érzékenységét okozzák DNS károsító ágensekkel szemben. A nem specifikus géncsendesítés elkerülése érdekében három különböző target szekvenciájú siRNS-sel csendesítettük a Spartant. Ezeket az siRNS-sel transzfektált sejteket kevertük GFP-t stabilan expresszáló sejtekkel 3:1 arányban, majd kezeltük különböző DNS károsító ágensekkel, mint UV sugárzással (20J/m²)

és MMS-sel (0,02%). A kísérlet során azt figyeltük meg, hogy a Spartan csendesített sejtek nagyfokú érzékenységet mutattak, mind UV, mind MMS kezelés hatására.

3.6. A Spartan csendesítése fokozza a testvér kromatidák közötti átkereszteződések számát

A Rad18 függő DNS-hiba tolerancia útvonal és a homológ rekombináció alternatív módon képes a megállt replikációs villa mentésére. Kimutatták, hogy a Rad18 csendesítése a sejtekben megnöveli a testvér kromatidák közötti átkereszteződések számát. Kísérletünkben kimutattuk, hogy a Spartan csendesítése hasonlóan a Rad18 csendesítéséhez fokozott testvér kromatidák közötti kicserélődést okoz. Ezzel a kísérlettel is megerősítettük, hogy a Spartan a Rad18 útvonalban játszik szerepet.

3.7. A Spartan stimulálja a pol η replikációs villához történő lokalizációját

Az ubikvitin-PCNA szabályozza a megakadt replikációs villánál a polimeráz váltást, ezzel a TLS szintézis elindulását. Mivel a Spartan köti az ubikvitin-PCNA-t, feltételeztük, hogy stimulálja a TLS-t. Ennek vizsgálatára a Pol η TLS polimerázt választottuk markerként. A pol η homogén eloszlást mutat a sejtmagban. UV (20J/m²) kezelés után három óra elteltével pedig sejtmagi fókuszokat alkot. A kísérletünkben a pol η már UV kezelés nélkül is képes volt fókuszformálásra a Spartan túlexpresszáltatása mellett. Az USP1 deubikvitiláz enzim szabályozza az ubikvitin-PCNA féléletidejét. Ezért az USP1 fokozott expressziója a sejtekben az ubikvitin-PCNA deubikvitilálását eredményezi, amelynek következtében gátolja a TLS-t, esetünkben a pol η fókuszformáló képességét. Megfigyeltük, hogy a kezeletlen és kezelt sejtekben az előző kísérletekhez hasonlóan a Spartan fokozott expresszáltatása a pol η fókuszokat tartalmazó sejtek számát növelte, míg az USP1 csökkentette. Azonban abban a mintában, ahol mindkettő, vagyis az USP1-t és a Spartant is fokozottan expresszáltattuk, ott az USP1 nem volt képes csökkenteni a pol η fókuszokat tartalmazó sejtek számát. A kísérletek eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan az USP1 deubikvitiláló hatásától képes védeni az ubikvitin-PCNA-t, amelynek eredményeként stimulálja a pol η fókuszformáló képességét.

3.8. Összefoglalás

Eredményeinket összefoglalva bizonyítottuk, hogy az eddig ismeretlen C1orf124/Spartan egy új Rad6-Rad18 csoportba tartozó DNS-hiba javító fehérje. Kísérleti eredményeink alapján a Spartan funkciójára a következő modellt állítottuk fel:

A DNS károsodás következtében megállt replikációs villa helyénél a Rad6-Rad18 által szabályozott PCNA ubikvitiláció valamint az USP1 PCNA deubikvitiláció dinamikus folyamat. Mindkét folyamat szabályozza az ubikvitin-PCNA féléletidejét és a replikációs villa mentésének lehetőségét. Az ubikvitin-PCNA aktiválja a TLS-t és a templát váltás függő villamentést. Az ubikvitin-PCNA deubikvitilálásával azonban lehetőség nyílik a replikációs villa mentésre a rekombináció függő folyamat működésével, amely túlműködése azonban genomikus instabilitáshoz vezethet. A Spartan szabályozó szerepet tölt be az ubikvitin-PCNA féléletidejének szabályozásában azáltal, hogy képes kötni az ubikvitin-PCNA-t, megvédve azt az USP1 deubikvitiláló hatásától. Így a Spartan közvetett módon stimulálja a TLS-t, illetve a templátváltás függő mechanizmust.

Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a Spartan fontos szerepet játszik a DNS-hiba tolerancia útvonalban, valamint a genom stabilitásának megőrzésében.

4 Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Haracska Lajosnak, hogy lehetővé tette csoportjában a PhD munkám végzését. Balogh Dávidnak köszönöm az *in vitro* kísérletek elkészítését. Köszönöm Dr. Hajdú Ildikónak, hogy elkészítette a microirradiation kísérletet, és Dr. Burkovics Péternek, hogy Spartan pontmutánsokat készített. Köszönöm Mark A. Villamil-nak és Zhiaho Zhuang-nak, hogy rendelkezésünkre bocsátották a tisztított USP1/UAF1 komplexet. Köszönöm az SZBK Genetikai Intézetnek, hogy lehetőséget biztosított a Ph.D. munkám végzéséhez. Köszönöm Prof. Raskó Istvánnak a támogatást és a hasznos tanácsokat. Laboratóriumunk minden tagjának köszönöm a hasznos tanácsokat és ötleteket. Köszönet Illésné Kovács Katalinnak, Nótári Péternének és Fekete Ildikónak a szakaszisztenciáért.

5 Közlemények

Nemzetközi tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Gali H, Juhász S, Morocz M, Hajdu I, Fatyol K, Szukacsov V, Burkovics P, Haracska L.

SUMO modification of human PCNA prevents DNA double-strand break formation at stalled replication fork

Nucleic Acids Res. 2012 Jul;40(13):6049-59. Epub 2012 Mar 28. PMID: 22457066 **IP:8,026**

Juhász S, Balogh D, Hajdu I, Burkovics P, Villamil MA, Zhuang Z, Haracska L.

Characterization of human Spartan/C1orf124, an ubiquitin-PCNA interacting regulator of DNA damage tolerance

Nucleic Acids Res. 2012 Sep 16.) PMID: 22987070 **IP:8,026**

Szabadalom

2011. P1000315 alapszámú magyar szabadalmi bejelentés, cím: Rendszer HR és NHEJ vizsgálatára, aktaszám: 106959-3405A SG/LZS

Tudományos poszter

Juhász Szilvia, Balogh Dávid, Burkovics Péter, Haracska Lajos

ZIZI, egy új szereplő a DNS-hibák javításában

Az MBKE 2011. évi vándorgyűlése (Pécs, 2011)

Balogh Dávid, **Juhász Szilvia**, Haracska Lajos.

Egy új szereplő a humán DNS-hiba tolerancia útvonalban

„IX. Magyar Genetika Kongresszus és XVI. Sejt- és fejlődésbiológiai Napok” (Siófok, 2011.)

Barasevich Katinka, **Juhász Szilvia**, Balogh Dávid, Burkovics Péter, Haracska Lajos

A ZIZI fehérje vizsgálata humán sejtekben

„IX. Magyar Genetika Kongresszus és XVI. Sejt- és fejlődésbiológiai Napok” (Siófok, 2011.)

Szilvia Juhász, Dávid Balogh, Lajos Haracska (Dubrovnik, 2011.)

Role of ubiquitylation in replication of damaged DNA

Barabás Szakál, Ildikó Hajdú, **Szilvia Juhász**, Lajos Haracska

Interaction of TLS polymerases with the human homologue of yRAD5

(VII. Hungarian Congress in Genetics, 15-17, 2007 Balatonfüred)

Tudományos előadások:

Szilvia Juhász, Gali Himabindu, Dávid Balogh, Barasevich Katinka, Ildikó Hajdú, Barnabás Szakál, Péter Burkovics, Lajos Haracska

Players at the crossroads of DNA damage bypass, homologous recombination, and non-homologous end-joining

„IX. Magyar Genetika Kongresszus és XVI. Sejt- és fejlődésbiológiai Napok” (Siófok, 2011.)

Szilvia Juhász, Barnabás Szakál, Ildikó Hajdú

Measuring the frequency of homologous recombination and random integration in human cells

Central European Meeting on Genome Stability and Dynamics (Bratislava, 2011)

Péter Burkovics, Valéria Szukacsov, Marek Sebesta, Himabindu Gali, **Szilvia Juhász**, Mónika Mórocz, Lajos Pintér, Alexandra Sisakova, Victoria Marini, Lumir Krejci and Lajos Haracska

PCNA-SUMO: Regulation of the DNA repair pathways at the stalled replication fork

(2010 Straub napok, Szeged)

Juhász Szilvia, Szakál Barnabás, Hajdú Ildikó, Haracska Lajos

A homológ rekombináció és a nem homológ végeket összekapcsoló mechanizmusok arányának mérésére alkalmas riporter rendszer építése és alkalmazása humán sejtekben (Nyíregyháza, 2009)

„VIII Magyar Genetika Kongresszus és XVI. Sejt- és fejlődésbiológiai Napok”