

# A humán HLTF fehérje HIRAN doménjének strukturális és funkcionális vizsgálata

*Ph.D. értekezés*

**Balogh Dávid**

**Témavezető: Dr. Haracska Lajos**

**Magyar Tudományos Akadémia**

**Szegedi Biológiai Kutatóközpont**

**Genetikai Intézet**

**Szegedi Tudományegyetem**

**Természettudományi és Informatikai Kar**

**Biológia Doktori Iskola**

**2016**

**Szeged**

# Tartalomjegyzék

<b>1. Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Bevezetés.....</b>	<b>5</b>
2.1. A DNS-hiba azonnali kijavítása .....	6
2.2. Báziskivágó és nukleotidkivágó hibajavítás.....	7
2.3. A homológ rekombináció és a nem homológ végek összekötése.....	9
2.4. A posztreplikációs hibajavítás és a hibát toleráló DNS szintézis .....	11
2.5. Az ubikvitin szerepe a DNS-hibajavításban.....	11
2.6. A DNS-hibatolerancia útvonal szabályozása .....	13
2.6.1. Alternatív DNS polimerázok.....	14
2.6.2. A Rad5 útvonal szerepe a hibajavításban .....	16
2.6.3. A humán HLTF fehérje.....	17
<b>3. Célkitűzések.....</b>	<b>20</b>
<b>4. Anyagok és módszerek.....</b>	<b>21</b>
4.1. Antibiotikumok .....	21
4.2. Tápfolyadékok .....	21
4.3. Enzimek .....	21
4.4. Restrikciós emésztés, ligálás .....	21
4.5. PCR reakció .....	21
4.6. LR reakció .....	22
4.7. Plazmidok létrehozása.....	22
4.8. Baktérium transzformálás.....	23
4.9. Plazmidtisztítás baktériumból.....	23
4.10. Élesztő transzformálás.....	23
4.11. Fehérjék tisztítása.....	23
4.12. Poliakrilamid gél.....	25
4.13. Western blot analízis .....	26
4.14. DNS szubsztrátok.....	26
4.15. Replikációs villa-visszafordító esszé .....	27
4.16. Gél shift, és DNS kompetíciós kísérletek.....	27
4.17. PCNA ubikvitilációs kísérlet .....	28

4.18. ATPáz esszé.....	28
4.19. Humán sejt kultúrák, stabil humán sejt vonalak.....	28
4.20. Sejten belüli fehérjelokalizáció vizsgálata.....	29
4.21. A használt oligonukleotidok.....	29
4.22. BrdU comet esszé.....	30
4.23. UV érzékenységi kísérlet.....	30
<b>5. Eredmények.....</b>	<b>31</b>
5.1. A HLTF fehérje HIRAN doménjének szerkezete.....	31
5.2. A HIRAN domén mutáns HLTF fehérjék létrehozása és tisztítása.....	32
5.3. A HIRAN mutáns aktív ubikvitin ligáz.....	34
5.4. A HIRAN mutáns HLTF rendelkezik ATPáz aktivitással.....	35
5.5. A HIRAN mutáns HLTF aktív kettősszálú DNS-függő helikáz.....	36
5.6. A HIRAN mutáns HLTF nem képes visszafordítani a replikációs villát.....	37
5.7. A vad típusú HIRAN domén hozzáadása komplementálja a HIRAN deléciós HLTF villa-visszafordító aktivitását <i>in vitro</i> .....	39
5.8. A HIRAN domén megléte esszenciális a HLTF működéséhez <i>in vivo</i> .....	40
5.9. A HIRAN domén mutáns HLTF fehérjék a sejtmagba lokalizálódnak.....	43
5.10. A HLTF fehérjék posztreplikációs hibajavításban betöltött szerepe függ a HIRAN doméntól.....	44
5.11. A HIRAN domén specifikusan köti a replikációs villát.....	47
<b>6. Eredmények megvitatása.....</b>	<b>51</b>
<b>8. Magyar nyelvű összefoglaló.....</b>	<b>55</b>
<b>9. Summary of the PhD thesis.....</b>	<b>58</b>
<b>10. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>61</b>
<b>11. Saját közlemények jegyzéke.....</b>	<b>63</b>
<b>12. Referenciák.....</b>	<b>64</b>

## 1. Rövidítések jegyzéke

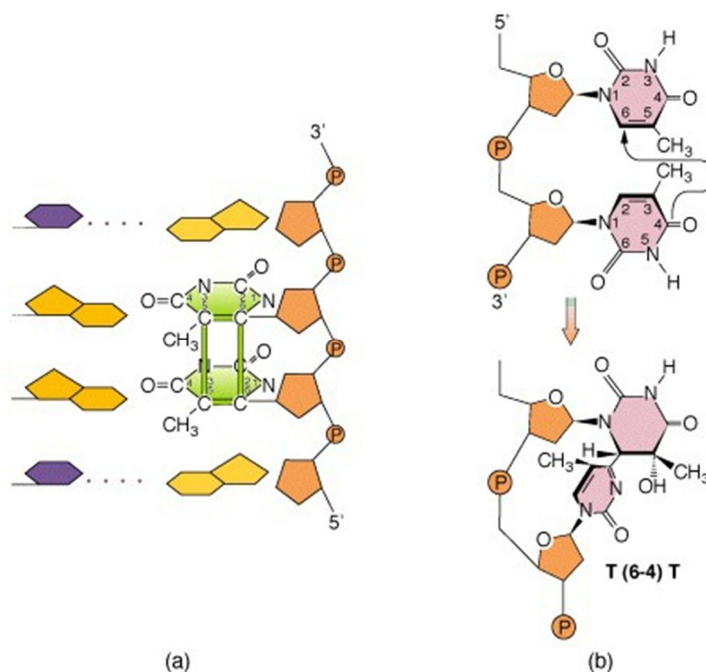
APS	Ammónium-persulfát (Ammonium persulfate)
ATP	Adenozin-5'-trifoszfát (Adenosine triphosphate)
BER	Báziskivágó hibajavítás (Base excision repair)
BSA	Marha szérumalbumin (Bovine Serum Albumin)
DAPI	Fluoreszcens DNS festék (4',6-diamidino-2-phenylindole)
dCMP	Deoxi-citozin-monofoszfát (Deoxycytidine monophosphate)
DDT	DNS-hibitolerancia (DNA damage tolerance)
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle-médium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimetil-szulfoxid (Dimethyl sulfoxide)
DNS	Dezoxiribonukleinsav (Deoxyribonucleic acid)
E1	Ubikvitin aktiváló enzim (Ubiquitin-activating enzyme)
E2	Ubikvitin konjugáló enzim (Ubiquitin-conjugating enzyme)
E3	Ubikvitin ligáz enzim (Ubiquitin-ligase enzyme)
FACS	Fluoreszcencia által aktivált sejtelválasztás (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
FCS	Magzati borjú szérum albumin (Fetal Calf Serum)
FLAG	8 aminosavas jelölő peptid (FLAG octapeptide, DYKDDDDK)
GFP	Zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein)
GST	Glutation S-transzferáz (Glutathione S-transferase)
HECT	Ubikvitin ligáz domén (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus)
HR	Homológ rekombináció (Homologous Recombination)
HRP	Torma-peroxidáz enzim (HorseRadish Peroxidase)
HU	Hidroxiurea (Hydroxyurea)
MMR	Mismatch hibajavítás (Mismatch repair)
NER	Nukleotidkivágó hibajavítás (Nucleotide excision repair)
NHEJ	Nem-homológ végek összekapcsolása (Non-Homologous End-Joining)
PCNA	Polimerázok processzivitási faktora (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
PEG	Polietilén-glikol (Polyethylene glycol)
PFA	Paraformaldehid (Paraformaldehyde)

PIP	PCNA kölcsönható régió (PCNA-Interacting Protein motif)
RFC	Replikációs faktor fehérje (Replication factor C)
RING	Ubikvitin ligáz domén (Really Interesting New Gene)
RNS	Ribonukleinsav (Ribonucleic acid)
RPA	DNS-kötő fehérje (Replication Protein A)
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát (Sodium dodecyl sulfate)
shRNS	Rövid hajtű RNS (Small hairpin RNA)
SUMO	Kis módosító fehérje (Small Ubiquitin-like Modifier)
TCR	Transzkripció-kapcsolt hibajavítás (Transcription-Coupled Repair)
TEMED	Tetrametil-etilén-diamin (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)
TLS	Transzléziós szintézis (Translesion synthesis)
UBM	Ubikvitinkötő motívum (Ubiquitin-Binding Motif)
UBZ	Ubikvitinkötő cink-finger domén (Ubiquitin-Binding Zinc finger)
UV	Ultraibolya sugárzás (Ultraviolet light)
XP-V	Xeroderma pigmentosum variáns (Xeroderma Pigmentosum Variant)

## 2. Bevezetés

A DNS molekula a sejtek életéhez szükséges nélkülözhetetlen információkat tartalmaz. Annak érdekében, hogy egy utódsejt az eredeti pontos másolata legyen, genetikai információja nem változhat meg. Az élőlények sejtjei azonban állandóan külső és belső DNS- károsító tényezőknek vannak kitéve: UV és egyéb sugárzásoknak, különböző vegyszereknek, a táplálékban előforduló káros adalékanyagoknak, reaktív oxigéngyököknek, dohányzás által a szervezetbe jutott kemikáliáknak stb., amelyek kovalensen módosíthatják a bázisokat, megváltoztathatják az örökítő anyagot, és replikációt blokkoló DNS hibákat okozhatnak.

A DNS hibák sok típusa ismert, ezek közül az egyik leggyakoribbak az oxidációs hibák, melyek bázisvesztést okozhatnak. Egy átlagos emlős sejt DNS-éből néhány ezer purin és néhány száz pirimidin bázis vész el spontán egy nap alatt. Egy purin vagy pirimidin bázis elvesztése abázikus régiók kialakulásához vezet. Egy lehetséges oxidációs hiba a bázisok kissé instabil amino-csoportjának keto-csoporttá alakulása, más néven a deamináció. Ide tartozik az adenin hypoxantinná, a guanin xantinná és az 5-metil-citozin timinné alakulása.



**1. ábra:** a. Ciklobutil gyűrű szerkezete, b. T-T pirimidin dimer kialakulása UV sugárzás hatására.

A nukleinsav bázisok által elnyelt UV sugárzás leggyakrabban ciklobután-pirimidin és pirimidin-pirimidin dimerek kialakulását okozza, ami a legtöbb esetben T-T, kisebb számban T-C, illetve C-C kovalens kapcsolatokat jelent, melyek az egyik bázis 6-os és a szomszédos bázis 4-es pozíciójában található szén atomjai között alakulnak ki<sup>1</sup> (1. ábra). A szálon belüli keresztkötések mellet kialakulhatnak szomszédos szálak közötti keresztkötések, illetve DNS és fehérjék közötti keresztkötések is.

A DNS-szekvencia megváltozásának másik fő forrását a „mismatch”-ek jelentik, amelyek a replikáció során kialakuló kisméretű inszerciók vagy deléciók. Végül meg kell említenünk az egyes-, illetve kettősszálú töréseket, amelyek a topoizomerázok, nukleázok és röntgensugárzás hatására alakulhatnak ki, és rendkívül nagy kockázatot jelentenek a sejt számára. Szükség van tehát olyan mechanizmusokra, amelyekkel a sejtek képesek megőrizni integritásukat.

A DNS hibákat felismerő és javító mechanizmusok számos fajtája alakult ki az evolúció során, amelyek mind prokarióta, mind eukarióta sejtekben képesek megszüntetni a károsodásokat. E javító utakat négy nagy csoportra lehet osztani: 1. a hiba direkt kijavítása; 2. a hibás régió kivágása, majd helyes szakaszra kicserélése; 3. a kettősszálú töréseket javító mechanizmus; 4. az úgynevezett hibatolerancia útvonal.

## **2.1. A DNS-hiba azonnali kijavítása**

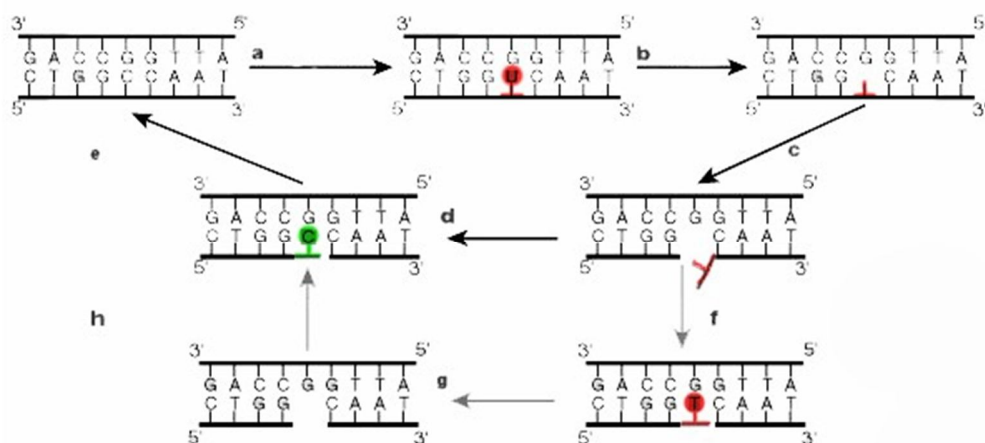
A hiba visszafordítása, azonnali javítása a legegyszerűbb út, legtöbbször mégsem működik termodinamikai vagy kinetikai okokból. A legtöbbet tanulmányozott mechanizmus a pirimidin dimerek fotoliáz általi megszüntetése<sup>2</sup>. A fénybegyűjtő rendszerek által befogott energiát a FADH veszi át, a fotoliáz a FADH-tól vett energiát használja a dimerek hasítására. A fotoliázok megtalálhatók baktériumokban, gombákban, növényekben és a gerincesekben is, kivéve a méhlepényeseket, így az embert is. Egy másik példa a hiba visszafordítására a 6-oxo-guanin alkiltranszferáz általi javítás<sup>3</sup>. Ez a fehérje minden organizmusban megtalálható. A harmadik példa az AlkB fehérje által végzett reakció, amely vas-oxo intermedieren keresztül, az alfa-ketoglutársav oxidatív dekarboxilációja során a metil csoport hidroxilációját jelenti<sup>4</sup>.

Végül meg kell említenünk a nickek DNS ligáz általi megszüntetését. Ez a reakció 5' foszfát és 3' hidroxil csoportok között játszódhat le.

## 2.2. Báziskivágó és nukleotidkivágó hibajavítás

A báziskivágó és a nukleotidkivágó javító mechanizmus a DNS molekula kettősszalú tulajdonságát használja fel. Ha a hiba csak az egyik szálon van jelen, képes javítódni kivágódással, majd a helyes szakasz beépülésével, a komplementer szálát használva templátként. Minden organizmus négy kivágó mechanizmussal rendelkezik: az úgynevezett „mismatch” repairrel (MMR), a báziskivágó repairrel (BER), a nukleotidkivágó repairrel (NER) és a transzkripció-kapcsolt repairrel (TCR).

A mismatch repair a nem megfelelően párosodó nukleotidok korrekcióját végző konzervált folyamat. Legtöbbet *Escherichia coli*-ban tanulmányozták, legfontosabb résztvevői a MutS, a MutL és a MutH fehérjék. A replikációs hiba okozta helytelen bázispárosodást a MutS ismeri fel, és kötődik az adott régióban. A komplexet a MutL stabilizálja. A MutS-MutL komplex aktiválja MutH-t, amely a szülői szál egy közeli metil csoportjához kötődik és bevágást végez a DNS molekulán. Innen az UvrD fehérje egyesszal-specifikus exonukleáz aktivitásával leemészt a hibás szálát, amit később a Polimeráz III újraszintetizál. A két szálát a DNS ligáz kapcsolja össze<sup>5</sup>.



**2. ábra:** A BER folyamata: a.) Citozin deamináció, b.) Uracil kivágás, c.) Abázikus régió kivágása, d.) Réskitöltés, e.) Ligálás, f.) Hibás résfeltöltés, g.) Visszaemésztés, h.) Helyes réskitöltés



A báziskivágó hibajavítás a kovalensen módosult vagy sérült bázisok – mint az uracil, vagy 3-metiladenin – eltávolítását végzi (2. ábra). Az útvonalnak számos variánsa létezik, de mindegyikre jellemző az a néglépéses mechanizmus, amelynek elején a DNS hibát egy specifikus DNS glikoziláz azonosítja. Ezt követően a nem megfelelő nukleotid bázisának kivágódása következik, így abázikus régió alakul ki, majd az így kialakult hely előtt a DNS egyesszálat endonukleáz hasítja (így 3'-OH vég jön létre). Végül a DNS feltöltődik DNS polimeráz segítségével. A javított szálat a DNS ligáz kapcsolja össze<sup>6</sup>.

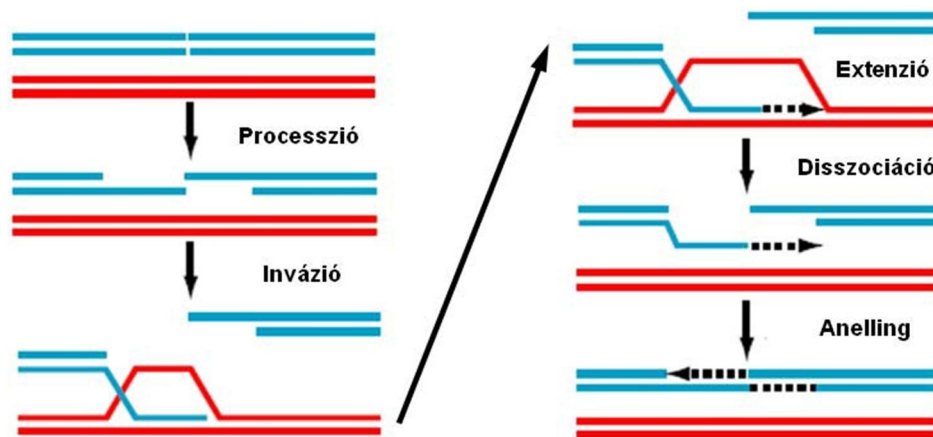
Annak ellenére, hogy a báziskivágó hibajavítás nagyon fontos, mégsem képes megküzdeni az összes hibával. Minden egyes adott hibához, amelyet a báziskivágó mechanizmus távolít el, szükséges egy DNS glikoziláz, amely felismeri a specifikus hibákat. Mivel a DNS-t károsító tényezők rendkívül széles spektrumúak, szinte lehetetlen, hogy minden specifikus hibára külön glikoziláz alakuljon ki, ezért egy másik, sokkal rugalmasabb rendszer is létrejött a problémák megoldására. Ez a nukleotidkivágó repair (NER), amely a hibás régiókat ismeri fel, azok abnormális struktúráján keresztül. A NER minden organizmusban hasonló folyamat révén játszódik le. Az első lépés a hiba felismerése, amit a hibás régióhoz kötődő multi-protein komplex kapcsolódása követ. Ezután kettős bevágás történik a hibás szálon, néhány nukleotidnyira a sérült bázistól mindkét irányban. A kivágott oligonukleotid eltávolítása után a rés feltöltődik egy DNS polimeráz által, végül a két szál összeligálódik. *E. coli*-ban az UvrA, UvrB és UvrC fehérjék vesznek részt a felismerésben és a vágásban. Két UvrA és egy UvrB komplexe kötődik a DNS kettősszálnak, majd elcsúszik a hibás régióig. Ezután az UvrA komplex leválik az UvrB-ről, amelyhez így az UvrC képes kötődni. Az így kialakult komplex vágja be két oldalt a sérült szálat. Ekkor az UvrD helikáz eltávolítja a kivágott régiót, amelyet a polimeráz I, illetve II tölt fel. A nukleotidkivágó repair eukariótákban is hasonló elv szerint működik, azzal a különbséggel, hogy sokkal több fehérje vesz részt a javításban. A hiba hatására bekövetkező DNS torzulást az XPC/HR23B komplex ismeri fel, amely még nagyobb torzulást idéz elő. Ennek következtében a kilenc alegységes TFIIH kapcsolódni képes a hibát tartalmazó szálnak és ATP felhasználásával letekeri azt 20-30 nukleotid hosszan. Ekkor az XPG nukleáz is kötődik a DNS-hez és elvágja a hibás szálat, majd a polimeráz delta feltölti a keletkezett egyesszálú régiót, a helyes szálat használva templátként<sup>7</sup>.

A nukleotidkivágó repairben részt vevő számos fehérje génjében létrejövő mutációk különböző betegségek kialakulásához vezethetnek. Az egyik leggyakoribb a Xeroderma pigmentosum, amelyet az XP fehérjék funkcióvesztése idézhet elő. Ez a betegség a megnövekedett UV érzékenység révén bőrrákot okoz<sup>8</sup>. A Cockayne-szindróma és a Trichothiodystrophia kialakulása is a nukleotidkivágó repair meghibásodásának köszönhető. Tüneteik a korai öregedés, a különböző daganatos betegségek kialakulása, valamint testi és/vagy szellemi fogyatékosság<sup>9</sup>.

### **2.3. A homológ rekombináció és a nem homológ végek összekötése**

A DNS kettősszálú törések javításának 2 fő mechanizmusa ismert. Az első előnyben részesíti a homológ rekombinációt (HR) végző fehérjéket, amelyek az információt a testvér kromatidáról veszik és a hibát helyesen javítják. A másik megengedi a nem homológ végek random összekapcsolását, ezt nem homológ végek csatlakoztatásának (NHEJ) nevezzük, amely nem megfelelő „javítást” eredményez.

A homológ rekombinációval történő kettősszálú törések javításának pontos mechanizmusa intenzíven kutatott terület. Ismert, hogy a részt vevő fehérjék pékélesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) a Rad52 episztázis csoportba tartoznak. A folyamat szempontjából kulcsfontosságú fehérje a Rad51. A Rad51 fehérje központi részének szekvenciája és funkciója is az *E. coli* RecA fehérjéjéhez hasonló. A RecA komplexet képez az egyesszálú DNS-el. A komplex a homológ kettősszálú DNS-sel kapcsolatba lép, és a RecA által kötött szál bázispárosodik a komplementer szállal<sup>10</sup>. Az eukarióta Rad51 *in vitro* hasonló folyamatot katalizál. Miután a Rad51-DNS komplex kialakul, megkeresik a komplementer szálat, amely kihurkolással szabaddá válik. Az extenziót követően az elkészült szál a Rad54 által szabaddá válik. A testvérszálak a Rad52 segítségével összeolvadnak<sup>11</sup> (3. ábra).



**3. ábra:** A homológ rekombináció folyamata: A DNS visszaemésztése után az egyesszál Rad51 segítségével bekötődik a homológ régióba, majd a szál meghosszabbodik, végül Rad54 segítségével leválik a homológ szálról. Végül a két komplementer szál Rad52 jelenlétében hibridizálódik és ligálódik.

A kettősszálú DNS-törés a komplementer szálak hibridizációjával is javítható. Miután a megfelelő fehérjék felismerik a törött régiót, az 5' végek felől visszaemésztődik, a 3' szálon így létrejövő esetleges, néhány nukleotid hosszú komplementer régiók párosodhatnak. Emlős sejtek esetén a genomban található nagyszámú, viszonylag hosszú ismétlődések miatt ez a folyamat nagy valószínűséggel lejátsszódik. A párosodás következtében kihurkolódó DNS szakaszokat endonukleázok hasítják, végül a szálak ligálódnak. A törés így megszűnik, viszont delécio keletkezik. Minden homológ rekombinációval történő javítás viszonylag bonyolult, labilis DNS struktúrák kialakulásán keresztül megy végbe, és a genomban hibákat halmozhat fel.

A harmadik folyamat, amely a legnagyobb károkat okozhatja, a nem homológ végek random összekapcsolása. Szabad DNS végek random kapcsolódását teszi lehetővé, de a legtöbb esetben a megfelelő végeket köti össze. Az, hogy a rendszer hogyan találja meg az összeillő darabokat, még nem ismert. Az NHEJ központi szerepet játszó fehérjéi minden eukarióta sejtben konzerváltak, két másik fehérje (XRCC7, ARTEMIS) csak a gerincesekre jellemző. Ez a két fehérje az immunglobulinok érésénél, V(D)J rekombinációban is fontos szerepet játszik, amely folyamat csak gerincesekben zajlik le. Ezenfelül a kettősszálú törések kijavításában is

nélkülözhetetlenek, hiszen hiányukban a sejt érzékenyebbé válik ionizáló sugárzással szemben<sup>12</sup>.

## **2.4. A posztreplikációs hibajavítás és a hibát toleráló DNS szintézis**

A korábban említett DNS reparációs mechanizmusok folyamatosan javítják a hibákat, mégis előfordul, hogy a nagyfokú károsodás következtében telítődő, esetleg meghibásodott, így nem is működő rendszerek egy hibát már nem képesek kijavítani a sejtciklus replikációs fázisáig. A replikatív polimeráz - feladatából adódóan - nagyon szűk aktív centrummal rendelkezik és csak hibátlan szálát képes magába fogadni, azzal szemben megfelelő nukleotidot beépíteni. Ha károsodott szakaszhoz érkezik, a replikáció leáll, aminek következtében kettősszálú DNS-törések, kromoszomális átrendeződések alakulhatnak ki, így a sejt egy idő után elpusztul. Ez főként egysejtű organizmusok esetén jelent nagyobb gondot, ezért az evolúció során már egysejtű eukariótákban kialakult egy mechanizmus, amely képes az elakadt replikációs villa mentésére, így a sejt életben marad és osztódni is képes. Ez a folyamat az úgynevezett DNS-hibatolerancia (DDT) útvonal, amelynek során a hiba ugyan megmarad, de a replikáció továbbhaladhat. A megmaradó hibás régiót később a BER és a NER javítja ki.

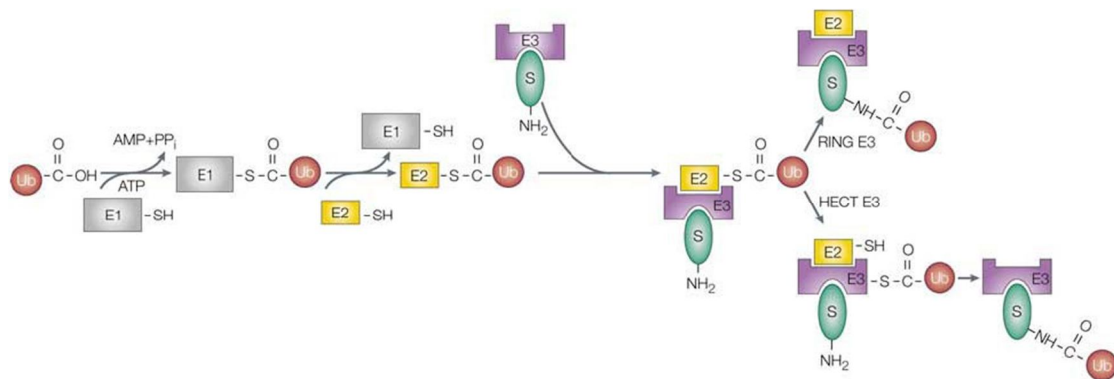
Az eukarióta hibatolerancia útvonalat leginkább pékélesztőben tanulmányozták. Az útvonalban a Rad6-Rad18 episztázis csoportba tartozó fehérjék vesznek részt. A DDT fontosságát jelzi, hogy az élesztő Rad6 homológjait megtalálták az összes eukarióta élőlényben<sup>13</sup>.

## **2.5. Az ubikvitin szerepe a DNS-hibajavításban**

A Rad6 csoportba tartozó gének klónozása és szekvencia-analízise, valamint az *in vivo* és biokémiai interakció-vizsgálatok során világossá vált, hogy az ubikvitiláció meghatározó szerepet játszik a Rad6 útvonal szabályozásában. A Rad6 a Rad18 fehérjével együttműködve képes más fehérjét ubikvitilálni. Az ubikvitin egy 76 aminosavból álló, rendkívül konzervált fehérje, amely az összes eukarióta

organizmusban megtalálható<sup>14</sup>. Az ubikvitin más fehérjékhez kötődve számos biológia folyamatot szabályoz, így a proteolízist vagy a DNS-hibatolerancia útvonalat. Az E1 aktiváló enzim ATP jelenlétében aktiválja az ubikvitint, így az ubikvitin C-terminális karboxil csoportja kovalensen kapcsolódik az E1 aktív ciszteinjéhez, tiolészter kötést létrehozva. Innen transzészterifikációval az E2 konjugáló enzim aktív centrumában található ciszteinre kerül, végül a szubsztrátra, izopeptid kötéssel, E3 ligáz jelenlétében, ahol az E3 enzim a szubsztrát felismerésben játszik szerepet<sup>15</sup>.

Az ubikvitilálási reakciókhoz a sejtekben egy-két E1 enzim van jelen, míg konjugáló enzimből több tucat, ligázból több száz áll rendelkezésre. Az E3 ligázok katalitikus doménjük alapján három csoportba sorolhatók, ezek a HECT domént tartalmazó<sup>16</sup>, a RING-finger<sup>17</sup> és az U-box E3 ligázok<sup>18</sup>. A HECT doménben található katalitikus cisztein rendszerint átveszi az ubikvitint az adott E2-ről, mielőtt a szubsztrátra kötné azt. Ezzel szemben a RING és U-box E3-ak nem létesítenek kovalens kapcsolatot az ubikvitinnel (4. ábra).

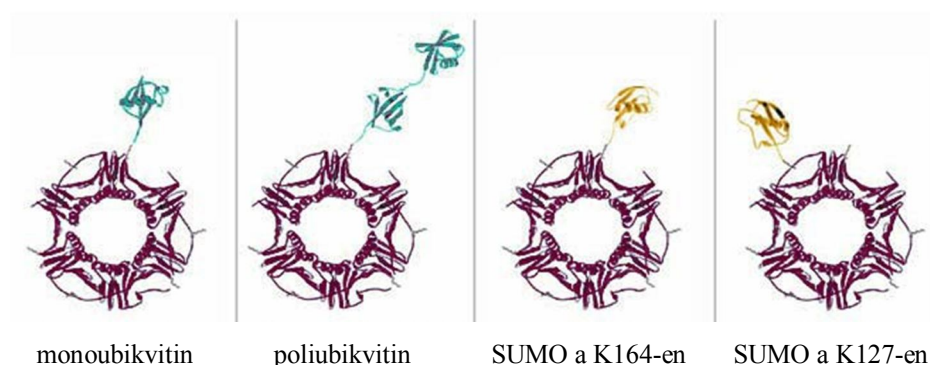


**4. ábra:** RING és HECT típusú ubikvitiláció sémája. A RING típusú ligáz nem veszi át az ubikvitint az E2 enzimtől, míg a HECT típusú ligáz először átveszi az ubikvitint az E2 enzimtől, majd ezután kapcsolja a célfehérjére.

Bizonyos körülmények között az E3 enzim ubikvitin elongációs faktorként is részt vehet a reakcióban<sup>19</sup>. Ilyenkor az ubikvitin nem monomer, hanem polimer formájában kötődik a szubsztrátra. A soron következő ubikvitin az előző ubikvitin 7 különböző lizinjéhez kötődhet, ami meghatározza a további biológiai funkciót<sup>20</sup>. A leggyakoribb az ubikvitin 48-as pozícióban található lizinjén keresztül kialakuló lánc,

amely proteoszómális lebontásra ítéli az adott szubsztrátot. Ezzel szemben a 63-as lizinen keresztüli kapcsolat nem lebontáshoz vezet, hanem négy különböző folyamatban játszhat szerepet, ezek a DNS-hibajavítás, a szignalizációs útvonalak, az intracelluláris szállítás és a riboszómális biogenezis.

A DNS-hibatolerancia útvonalban számos fehérje ubikvitilálódik, de genetikai bizonyítékok alapján a kulcslépés a PCNA molekula 164-es pozíciójában lévő lizinének ubikvitilálása, amely elindítja és – még nem teljesen tisztázott mechanizmusok révén – szabályozza a további lépéseket<sup>21</sup>. A PCNA fehérje egy rendkívül konzervált molekula, 3 alegységből felépülő homotrimer, mely szerepet játszik a replikációban. A replikáció kezdetén, a primer-templát kapcsolathoz kötődő Replikációs faktor C (RFC) ATP jelenlétében a PCNA trimert C-terminálisával a DNS 3' vége felé fordítva helyezi fel a DNS-re. A folyamat a replikatív polimerázok (Pol $\delta$ , Pol $\epsilon$ ) bekötődésével folytatódik, amelyek a PCNA C-terminálisához kapcsolódnak. Az interakció megnöveli a polimeráz-DNS közti kapcsolat stabilitását.



**5. ábra:** A PCNA fehérje poszttranszlációs módosításai: mono-, illetve poliubikvitiláció, valamint kétféle sumoiláció.

## 2.6. A DNS-hibatolerancia útvonal szabályozása

Hosszú ideig ismeretlen volt a DNS-hibán áthaladó replikáció szabályozása. Élesztőn végzett tanulmányok arra utalnak, hogy a PCNA ubikvitilációjának fontos szabályozó szerepe van a mechanizmusban<sup>22</sup>. A PCNA ubikvitilációját a Rad6 csoport egyes fehérjéi végzik, amelyek az úgynevezett posztreplikációs DNS-hibajavításban játszanak fontos szerepet. A hibajavítás itt helytelen kifejezés, hiszen a Rad6 episztázis

csoport fehérjéi csak stabil replikációt tesznek lehetővé a hiba eltávolítása nélkül. A PCNA 164-es lizinjén keresztüli ubikvitilálásához szükséges az aktiváló enzim (Uba1), a Rad6 konjugáló enzim, valamint a Rad18 ubikvitin ligáz fehérje. A PCNA ezenkívül SUMO (Small Ubiquitin-Related Modifier) módosítást is kaphat, ami a homológ rekombinációs folyamatokat gátolja<sup>23</sup> (5. ábra).

A Rad18 nemcsak a Rad6-hoz és a PCNA-hez, de a DNS-hez is képes kötődni. Ezenkívül interakcióba lép az egyesszájú DNS-kötő fehérjével (RPA), amely szintén elősegíti a PCNA DNS-hiba által indukált ubikvitilálását<sup>24</sup>. Ha a módosítás megtörtént, több különböző alútvonal indulhat el, amelyek segíthetnek a replikáció továbbhaladásában. Ezek közül kettőben transzléziós DNS polimerázok vesznek részt, amelyek lazább aktív centrumuknak köszönhetően képesek befogadni a hibás, torzult DNS szálat és a hibától, valamint az aktiválódó polimeráztól függően vagy komplementer (error-free) vagy nem komplementer (error-prone) nukleotidot építhetnek be<sup>25</sup>. Magasabbrendű eukariótákban öt speciális polimerázt azonosítottak, amelyek képesek a hibán áthaladva a DNS szintézisére<sup>26</sup>. Ezek közül négy, a Pol $\eta$ , Pol $\iota$ , Pol $\kappa$  és a REV1 a DNS polimerázok Y-családjába tartozik, amelyre jellemző az alacsony hűség és az exonukleáz aktivitás hiánya<sup>25,26</sup>. Az ötödik polimeráz a Pol $\zeta$ , katalitikus alegysége a REV3 fehérje, amely a DNS polimerázok B-családjába tartozik, és járulékos faktora a REV7 protein<sup>27</sup>.

### 2.6.1. Alternatív DNS polimerázok

A Pol $\eta$ , amely minden eukariótában megtalálható, az UV sugárzás következtében kialakuló ciklobután-pirimidin dimerekkel szemben képes nukleotidot beilleszteni, legnagyobb részt hibamentesen<sup>28</sup>. A T-T dimerekkel szemben 25-ből 1 alkalommal épít csak be guanint, a többi esetben adenin épül be<sup>29</sup>. A Pol $\eta$  mutációja emberben a *Xeroderma pigmentosum variant* (XP-V) nevű betegséget okozza, amely megnövekedett kockázattal jár a napfény indukálta bőrrákkal szemben. Az XP-V sejtek érzékenyebbek UV sugárzás okozta mutációkra<sup>30</sup>. A Pol $\eta$  volt az első polimeráz, amelyet tumorsuppresszorként azonosítottak.

A REV1, amely szintén megtalálható az összes eukariótában, egy dCMP transzferáz, amely citozint épít be minden károsodott nukleotiddal és abázikus régióval szemben, úgy *in vivo*, mint *in vitro*<sup>31,32</sup>. A REV1 a REV7 mellett kölcsönhat a másik

három Y-családbeli polimerázzal is, ezért mintegy vázként szolgálhat más TLS (Trans Lesion Synthesis) polimerázok számára a transzléziós szintézis során<sup>33,34,35,36</sup>.

A PolI csak gerincesekben megtalálható polimeráz, hatékonysága rendkívül alacsony, nem képes továbbhaladni, miután beépített egy nukleotidot a DNS sérüléssel szemben<sup>37</sup>. Hibaaránya nagyon magas, főként a timinekre nézve, amelyekkel szemben a legtöbb esetben guanint épít be adenin helyett<sup>38</sup>. Habár kölcsönhat Polη-val, UV által okozott hibák javításában betöltött szerepe nem tisztázott<sup>39,40</sup>.

A Polk jelen van a *Schizosaccharomyces pombe*-ban és minden gerincesben. A polimeráz doménjén kívül két UBZ doménnel (Ubiquitin-Binding Zinc Finger) is rendelkezik<sup>41</sup>. A Polk *in vitro* rendszerekben nem tud áthaladni az UV által okozott hibákon, de a Polk mutáns egerek mégis érzékenyek az UV sugárzásra<sup>42</sup>. A Polk az S fázisban lévő sejteknek csak kis százalékában lokalizálódik a replikációs fókuszokba, ellentétben a TLS-ben részt vevő többi Y-családba tartozó polimerázzal<sup>43</sup>.

A Polζ, amely minden eukariótában jelen van, nem rendelkezik a B-család más polimerázaira – mint a Polδ, Polε – jellemző exonukleáz aktivitással. Ezzel szemben, az Y-család tagjaira jellemzőnél magasabb átírási pontosságot mutat<sup>44,45</sup>. Jellemző rá, hogy a B család többi tagjánál könnyebben képes primer-templát mismatch-ek folytatására. Élesztőben a Polζ nem létfontosságú a sejtek számára, míg egérben deléciója embrionális letalitást eredményez, arra utalva, hogy a Polζ funkciója sokkal komplexebb a magasabbrendű organizmusokban<sup>46, 47, 48</sup>.

A Polη, ι és κ a PCNA kötő peptid (PIP) motívumán keresztül képes interakcióba lépni a PCNA-vel. Számos tanulmány kimutatta, hogy ez a domén szükséges a polimeráz TLS-ben betöltött szerepének ellátásához is. Ezenkívül minden Y-családbeli TLS polimeráz a monoubikvitilált PCNA-hez is tud kapcsolódni ubikvitin kötő motívumán keresztül. Ez a Polη és a Polk esetében UBZ, míg a Polι és a REV1 esetén az UBM motívum. Az UBZ és az UBM fontosak a TLS polimerázok funkciójának szempontjából is<sup>49,50,51,52,53</sup>. Míg egyes teóriák szerint a polimeráz – monoubikvitin-PCNA kapcsolat fontos a TLS polimerázok aktivációjához, számos tanulmány cáfolta rá erre a feltevésre. A PCNA ubikvitilációja nem zavarja Polδ és a PCNA kapcsolatát és nem hat a TLS polimeráz – PCNA kapcsolat erősségére<sup>44</sup>. A PCNA ubikvitiláció nem stimulálja a Polη *in vitro* aktivitását<sup>54,55</sup>. Így a PCNA monoubikvitilálásának igazi szerepe abban állhat, hogy befolyásolja a replikatív polimeráz és/vagy egyéb járulékos fehérjék kötődését, amivel elősegítheti a Polη és más TLS polimerázok kötődését a PIP motívumon keresztül.



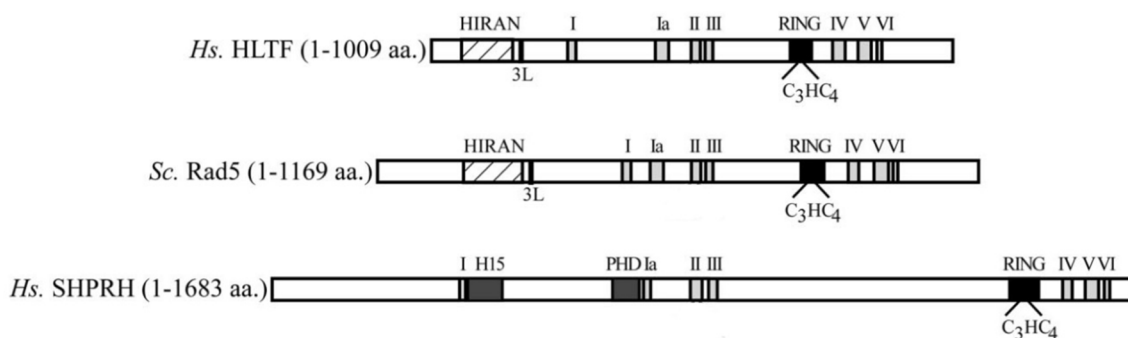
### 2.6.2. A Rad5 útvonal szerepe a hibajavításban

Élesztőben az elakadt replikációs villa a PCNA poliubikvitilációját is indukálja. A folyamat során a PCNA 164-es lizinjére kötött ubikvitinen keresztül poliubikvitin lánc alakul ki. Az egyes ubikvitin molekulák a 63-as lizinjükön keresztül kapcsolódnak a következő ubikvitinhez. A reakciót a heterodimer E2 enzim, az Ubc13-Mms2 komplex, és egy E3 ligáz, a Rad5 katalizálja<sup>56</sup>. A Rad5 rendelkezik egy HIRAN doménnel, valamint az SWI/SNF2 családra jellemző helikáz (ATPáz) doménnekkel, melyek közé ékelődve helyezkedik el egy RING-finger domén. Kimutatták, hogy a Rad5 RING doménje révén képes poliubikvitilálni a PCNA fehérjét, míg helikáz doménjei segítségével képes a kettősszalú DNS-en haladva kettősszalú DNS-függő helikázként működni, valamint visszafordítani a replikációs villát. HIRAN doménjének funkciója eddig ismeretlen. Élesztő sejtekben UV sugárzás hatására az ATPáz és a RING-finger mutáns Rad5 sejtek genomja hasonlóan töredezetté válik, ami azt sugallja, hogy mind a két aktivitás elengedhetetlen a Rad5 posztreplikációs hibajavításban (PRR) betöltött funkciójához. Ezenkívül a Rad5 ubikvitin ligáz domén mutáns élesztő sejtek érzékenyebbek az UV sugárzásra, mint a Rad5 ATPáz domén mutáns sejtek vagy az mms2, illetve ubc13 defektív élesztő sejtek<sup>57</sup>. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a Rad5-nek, mint ubikvitin ligáznak nemcsak a PCNA poliubikvitilálásában van szerepe, hanem a TLS polimerázok és egyéb fehérjék ubikvitilációjában is részt vehet.

Emlős sejtekben is megfigyelték a PCNA poliubikvitilációját UV sugárzás hatására<sup>58</sup>. Az ubikvitiláció gátlása megnöveli a TLS által okozott mutációk kialakulását, vagyis a PCNA poliubikvitilálása képes szuppresszálni a TLS útvonalát. Az SHPRH fehérjét az élesztő Rad5 humán homológjaként azonosították<sup>59,60</sup>. Hasonlóan az élesztő Rad5-höz, a humán SHPRH is az ATPázok SWI/SNF2 családjába tartozik, C3HC4 típusú RING-finger motívumot tartalmaz a SWI/SNF2 helikáz domének között<sup>61</sup>, valamint kölcsönhatásba lép a RAD6-RAD18, UBC13-MMS2 komplexekkel és indukálja a hPCNA 164-es lizinjén keresztüli poliubikvitilációt mind *in vivo*<sup>59</sup>, mind *in vitro*<sup>60</sup>.

### 2.6.3. A humán HLTF fehérje

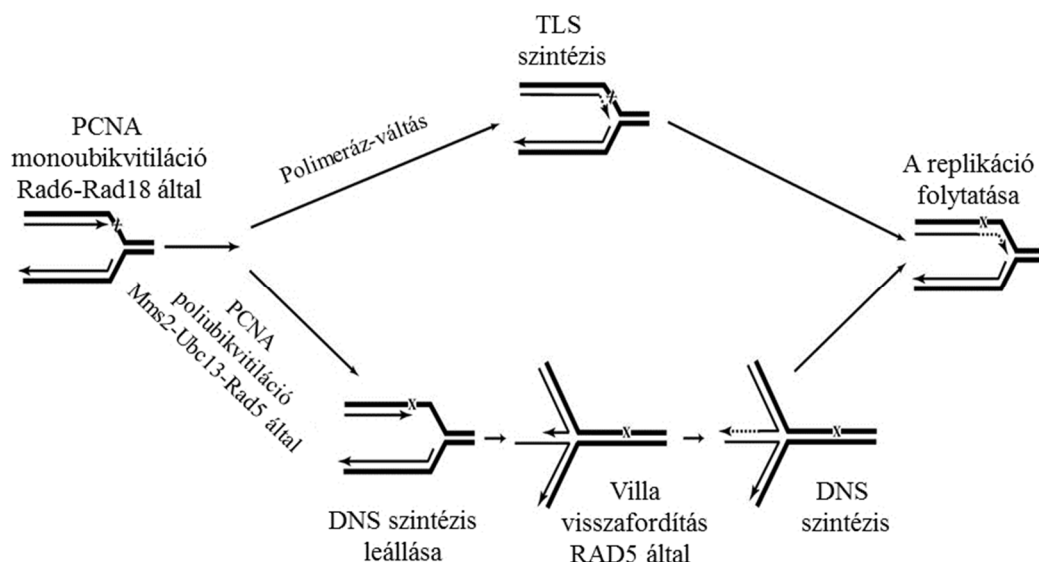
A Rad5 egy másik humán homológiát is azonosították, ez a HLTF (Helicase-like transcription factor) fehérje, amely az SHPRH-nál nagyobb homológiát mutat a Rad5-tel<sup>62,63</sup>. A HLTF fehérjét transzkripció faktoraként és tumorszupresszorként azonosították. Kimutatták, hogy a vastagbél-tumorok 30-70 %-ában a HLTF promóter hipermetilációja következtében a fehérje nem fejeződik ki, míg más tumorokban a HLTF pontmutáns, illetve csonkolt formában van jelen<sup>64</sup>. A HLTF fehérje csökkent expressziójának következtében humán és egér sejtekben a DNS-károsodások mennyisége megnő, és a genom instabillá válik. A HLTF kölcsönhat a RAD6-RAD18, valamint az UBC13-MMS2 komplexekkel<sup>63</sup>. Az SHPRH-hoz hasonlóan a HLTF is tartalmaz egy RING domént és SWI/SNF helikáz doméneket. Az MMS2-UBC13 komplex-szel együttműködve poliubikvitilálja a már monoubikvitilált PCNA fehérjét, 63-as lizineken kapcsolt láncolt létrehozva. Az SHPRH-val szemben a Rad5-höz hasonlóan egy HIRAN doménnel is rendelkezik (6. ábra), mely domén funkciója eddig ismeretlen volt. Predikciók alapján olyan DNS-kötő domén lehet, amely képes felismerni, majd később kapcsolódni a károsodott DNS-hez vagy az elakadt replikációs villához<sup>65</sup>.



**6. ábra:** A Rad5 és humán homológjai, a HLTF és az SHPRH doménszerkezete.

Laborunkban kimutattuk, hogy mind a Rad5, mind humán homológja, a HLTF fehérje, olyan kettősszálú DNS transzlokázok, amelyek képesek visszafordítani az

elakadt replikációs villa-szerű struktúrákat<sup>66,67</sup>. Azt is kimutattuk, hogy a HLTF a replikációs villa-visszafordítással egy időben képes a DNS-hez kötődött egyéb fehérjék – PCNA, RFC, RPA – eltávolítására is<sup>68</sup>. A visszatekert replikációs villára – ún. csirkeláb struktúra – elektronmikroszkópos felvételek is utalnak<sup>69,70</sup>. Hipotézisünk szerint a vezető szálon lévő hiba esetén a replikáció leállása után a vezető és a lemaradó szál szintézise szétkapcsolódik, majd a Rad5/HLTF az újonnan keletkezett szálakat letekeri, egymással hibridizáltatja. A hibával szemben lévő szál replikációja a már újonnan megszintetizált testvér kromatidáról történik. Az átírás után a Holliday junction jellegű struktúra feloldódik, az új szál a károsodott régiót áthidalja, így a hiba után folytatódhat a replikáció (7. ábra). A HLTF ezenkívül képes dimerizálódni, és elősegíti a RAD51-től független templátváltást is<sup>71</sup>.



**7. ábra:** A TLS és a Rad5 útvonal mechanizmusának vázlata.

A HLTF általi replikációs villa-visszafordítás csak akkor valósul meg, ha a hiba a vezető szálon található, mivel a károsodott követő szál áthidalható a mellette fekvő Okazaki fragment segítségével. Fontos megemlíteni, hogy míg a TLS polimerázok által végzett hibaátírás a legtöbb esetben újabb hibát generál a DNS-ben, addig a HLTF fehérje révén végbemenő folyamat eredménye hibamentes átírás.

Viszonylag sok helikáz képes a replikációs villa-visszafordításra. Ezek közé tartozik a FANCM helikáz, vagy a RecQ helikázok családjába tartozó BLM és WRN fehérjék<sup>72,73</sup>, és a SWI/SNF családba tartozó helikázok néhány tagja, a HLTF, SMARCAL1 és ZRANB3<sup>74,75</sup>. Az előbbi, kanonikus helikázok egyesszálú DNS köztiterméket hoznak létre a villa visszafordítása során, amiket később nem képesek összekapcsolni. Ezzel szemben a SWI/SNF helikázok koordinált módon végzik a folyamatot, köztitermék nélkül, egyidőben zajlik az eredeti szálak szétválasztása, és az újonnan keletkezett szálak összefűzése. Ennek köszönhetően a replikációs villa viszonylag stabil marad, mivel nem keletkeznek sebezhetőbb egyesszálú régiók. A SMARCAL1 fehérjéről kimutatták, hogy rendelkezik egy HARP doménnel, mely specifikus DNS szerkezethez képes kötődni, és ezzel elősegíti a replikációs villa koordinált visszafordítását. A HLTF fehérjében a HARP domén funkcionális homológia a HIRAN domén lehet, így sikerülhet azonosítani egy domén családot, ami választ adhat a kanonikus és SWI/SNF család helikázai közti funkcionális különbségre.

### 3. Célkitűzések

Az elakadt replikációs villa mentését végző mechanizmusok és azok szabályozása még ma sem teljes mértékben tisztázott. Az egyes fehérjék pontos működési mechanizmusai összetettségükből adódóan csak részlegesen ismertek. A DNS-hibitolerancia útvonal egyik legfontosabb komponense a HLTf fehérje, melyről tudjuk, hogy ubikvitin ligáz aktivitása révén képes poliubikvitilálni a már monoubikvitilált PCNA molekulát, valamint képes visszafordítani a replikációs villát. Az viszont még mindig kérdés, hogy hogyan találja meg a fehérje az elakadt replikációs villát és mi a visszafordítás pontos mechanizmusa.

A HLTf rendelkezik egy HIRAN doménnel, melyet DNS-kötő doménnek prediktálnak, de funkciója ezidáig ismeretlen volt. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, mi a pontos szerepe a HLTf HIRAN doménjének. Kérdésünk megválaszolására a következő kísérletek elvégzését tűztük ki célul:

1. Létrehozunk egy HIRAN domén deléciós és pontmutáns HLTf fehérjét, majd megvizsgáljuk a mutációk hatását.
2. Teszteljük a tisztított fehérjék ligáz, illetve helikáz aktivitásait, melyek valószínűleg nem köthetők a HIRAN doménhez, hogy kizárhassuk az esetleges strukturális mutációkat.
3. Megvizsgáljuk, hogy a HIRAN domén szerepet játszhat-e a DNS remodeling aktivitásban.
4. Érzékenységi kísérlettel, valamint comet esszével megvizsgáljuk a mutáns fehérjéink *in vivo* funkcióját különböző DNS-károsító ágensekkel szemben.
5. HIRAN domén fragmentet tisztítunk, hogy megvizsgáljuk a DNS-kötést, illetve a preferált DNS struktúrákat.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Antibiotikumok

Ampicillin: 100 µg / ml végkoncentráció

Kanamycin: 50 µg / ml végkoncentráció

### 4.2. Tápfolyadékok

LB: 1 % tripton, 0,5 % élesztőkivonat, 1 % NaCl. Táptalajhoz: + 1,5 % bacto-agar

YPD: 1 % élesztőkivonat, 2 % pepton, 2 % D-glükóz. Táptalajhoz: + 16,7 g bacto-agar / 1000 ml

OMISSION MEDIA (OMM): 0,72 % omission media mix (100 g élesztő nitrogén alap, 300 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,8 g adenin, 1,2 g arginin, 1,2 g hisztidin, 1,8 g izoleucin, 1,8 g leucin, 1,8 g lizin, 1,2 g metionin, 3 g fenilalanin, 1,2 g triptofán, 1,8 g tirozin, 1,2 g uracil, 9 g valin), 2 % D-glükóz. Táptalajhoz: 1,67 % bacto-agar

+12: mindegyik aminosavat tartalmazza

- LEU: OMM – leucin

- URA: OMM – uracil

Exp.- LEU: - LEU, 2 % tejsav, 3 % glicerin.

### 4.3. Enzimek

Fermentas cég által forgalmazott enzimek, a gyártó által ajánlott pufferekkel.

### 4.4. Restrikciós emésztés, ligálás

Plazmidok restrikciós emésztése (10 µl): 10 µg DNS, 1 µl 10X puffer, 2 u restrikciós endonukleáz, víz. Az emésztés 37 °C-on 2 órán keresztül tartott. Az emésztett DNS-t agaróz gélen futtattuk, majd Qiagen Gel Extraction kittel tisztítottuk a gyártó által adott protokoll szerint. A ligálás (10 µl) az alábbiakat tartalmazta: 0,5 µg vektor, 1 µg fragment, 1 µl 10X ligáz puffer, 5 u T4 DNS ligáz, víz.

### 4.5. PCR reakció

Standard PCR reakció 20 µl-re: 5 pmol primer1, 5 pmol primer2, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl puffer Taq 10X, 0,185 mM dNTP mix, 10 pmol templát DNS, 0,5 u Taq polimeráz.

PCR reakció lépései: 1: 92°C – 2 perc, (2: 92°C – 30 mp, 3: 55°C – 30 mp, 4: 72°C – 50 mp) 30X, 5: 72°C – 3 perc, 6: 4°C a kivételig.

Mutagén PCR reakció 25 µl-re: 10 pmol primer1, 10 pmol primer2, 2,5 µl puffer Pfu + MgSO<sub>4</sub> 10X, 0,1 mM dNTP mix, 50 ng templát DNS, 1,25 u Pfu polimeráz, 18,5 µl MQ víz. Kondíciók: 1: 94°C – 3 perc, (2: 94°C – 30 mp, 3: 55°C – 30 mp, 4: 68°C – 15 perc) 20X, 5: 68°C – 5 perc, 6: 4°C a kivételig.

#### **4.6. LR reakció**

Standard LR reakció: 0,6 µl (20-100 ng) „entry” vektor, 0,6 µl (20-100 ng) „destination” vektor, 0,4 µl LR klonáz puffer, 0,4 µl puffer TE pH: 8,0 (10 mM Tris HCl pH: 8,0; 1 mM EDTA), 0,2 µl LR klonáz, inkubálás 25°C-on 8 óráig.

#### **4.7. Plazmidok létrehozása**

A HIRAN domén deléziós HLTF fehérjéhez (HLTF HIRAN del) a HLTF fehérje 156 – 589 aminosavas darabját kódoló cDNS régiót PCR segítségével amplifikáltuk a pIL1867 (HLTF pENTR2B) plazmidról, a következő oligonukleotidokkal: o2515, mely EcoRI restrikciós hasítóhelyet tartalmazott és o2522 mely SalI hasítóhelyet tartalmazott. A fragmentet a pIL1867 plazmid EcoRI – SalI helyére klónoztuk, így megkaptuk a pIL2106 plazmidot. Ezután a HLTF C-terminális részét EcoRI – EcoRI hasítással klónoztuk a pIL1867 vektorból a pIL2106 EcoRI – EcoRI helyére, így megkaptuk a pIL2108 (HLTF HIRAN del pENTR2B) plazmidot. Az NN90,91AA dupla pontmutánst PCR alapú mutagenézissel hoztuk létre a pIL1867 plazmidról, a következő oligonukleotidok segítségével: o2732 és o2733, így kaptuk meg a pIL2349 (HLTF 90/91 pENTR2B) plazmidot. A HIRAN domén klónozását PCR segítségével végeztük. A vad típusú HIRAN domént pIL1867 plazmidról amplifikáltuk o2603, NcoI helyet tartalmazó és o2604, XhoI hasítóhelyet tartalmazó oligonukleotidok segítségével. A fragmentet a pIL1163 (pENTR4) plazmid NcoI – XhoI helyére klónoztuk, így megkaptuk a pIL2174 (HIRAN domain pENTR4) plazmidot. A dupla pontmutáns HIRAN domént ugyanezekkel az oligonukleotidokkal amplifikáltuk pIL2349 plazmidról és klónoztuk a pIL1163 plazmid NcoI – XhoI helyére, így megkaptuk a pIL2734 (HIRAN domén 90/91 pENTR4) plazmidot. Az élesztő expressziós plazmidokat a következő ENTRY vektorokból hoztuk létre: pIL1867, pIL2108, pIL2349, pIL2174, pIL2734 LR rekombináció segítségével, a pIL1844 (pBJ842 GST-

FLAG-Destination) vektort használva akceptorként, így kaptuk meg a pIL1520, pIL2111, pIL2736, pIL2177, pIL2735 élesztő expressziós plazmidokat.

#### **4.8. Baktérium transzformálás**

A kompetens baktériumsejteket jégen felolvasztjuk, hozzámérjük a plazmid DNS-t (20-100 ng), majd jégen inkubáljuk 20 percig. Ezután a sejteket hűsokkoljuk 1 percig 42 °C-on, majd további 2 percig jégen tartjuk. Kanamicin rezisztencia esetén a sejtekhez hozzámérünk 1 ml LB tápoldatot, és 1 órán át 37 °C-on inkubáljuk. Inkubálás után a sejteket centrifugáljuk 3 percig 4000 rpm-en. A felülúszót eltávolítjuk, majd a baktériumokat szélesztjük antibiotikummal kiegészített LB táplemezre és éjszakán át 37 °C-on növesztjük.

#### **4.9. Plazmidtisztítás baktériumból**

A baktériumból (DH5 $\alpha$ ) történő plazmidtisztításhoz a Qiagen miniprep kitjét használtuk, a gyártó által javasolt protokoll szerint.

#### **4.10. Élesztő transzformálás**

50  $\mu$ l kompetens élesztősejtet felolvasztunk, majd hozzámérjük a plazmid DNS-t (0,5-1  $\mu$ g) és 300  $\mu$ l 40% PEG lítium-acetátot. Ezután a sejteket 30 °C-on 30 percen keresztül inkubáljuk, majd hozzámérünk a sejtekhez 38,8  $\mu$ l DMSO-t, és hűsokkoljuk 15 percig 42 °C-on. Az elegyet centrifugáljuk 3 percig 4000 rpm-en, a felülúszót óvatosan eltávolítjuk, majd a pelletet felvesszük 1 ml +12 médiumban és újra centrifugáljuk 3 percig 4000 rpm-en. Ezután a felülúszót ismét eltávolítjuk, és a sejteket felvesszük 1,5 ml +12 médiumban, kémcsőbe mérjük és éjszakán át 30 °C-on inkubáljuk. Másnap a sejteket 3 percig 4000 rpm-en centrifugáljuk, szélesztjük –LEU táptalajra és 3 napig növesztjük 30 °C-on.

#### **4.11. Fehérjék tisztítása**

HLTF, HIRAN domén: GST-FLAG-HLTF-et, valamint a GST-HIRAN domént BJ5464 Del proteázhiányos élesztősejtből, galaktózzal indukálható plazmidról termeltük. –LEU táplemezeiről egy egyedi élesztőkolóniát 5 ml –LEU tápoldatba oltottunk, majd éjszakán át 30 °C-on növesztettük. Ezt oltottuk másnap 100 ml –LEU tápoldatba, majd 30 °C-on, 12 órán át növesztettük. Továbboltottuk 500 ml –LEU



táplódatba, és ismét 12 órán keresztül növesztettük a sejteket 30 °C-on. Ezután 200-200 ml-t oltottunk 2-2 liter Exp.-LEU táplódatba. 16 órán át, 30 °C-on történő rázatás után, 8 órán át 0,2% galaktózzal indukáltunk. A sejteket centrifugáltuk 15 percig 4500 rpm-en, majd felvettük a sejtek térfogatához viszonyított 1/2 mennyiségű 3X YBB pufferben: 150 mM Tris HCl pH: 7,5, 150 mM KCl, 1,8 M NaCl, 30 % szukróz, 4,5 mM EDTA, 21,5 mM béta-merkaptóetanol. A szuszpenziót folyékony nitrogénbe csepegtettük, majd a fagyott cseppeket leszűrtük és kávédarálóval 15 mp-ig daráltuk. A részleges felolvadás után a folyamatot megismételtük. Az újra felolvadt szuszpenziót 1 óráig 35000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszót Sephadex G25 gyöngyön folyattuk át, majd glutation-sepharose gyöngyre csepegtettük. A gyöngyöt mostuk 1X T puffer + 500 mM NaCl, 1X T puffer + 300 mM NaCl pufferrel. A T puffer tartalma: 40 mM Tris HCl pH:7,5, 10% glicerín, 0,01% NP40, + használat előtt: 1,5 mM EDTA, 7,15 mM béta-merkaptóetanol. 20 percig 4°C-on a következő pufferben eluáltuk a fehérjéket (E puffer): 40 mM Tris HCl, pH:7,3, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 10% glicerín, 20 mM glutation. Dializáltuk éjszakán át 4 °C-on T puffer + 100 mM NaCl, majd újabb 2 órát T puffer + 100 mM NaCl-dal.

RAD6 - RAD18: A GST-RAD18-at és a RAD6-ot túltermeltük BJ5464 Del élesztő sejtekben, a HLTF termelésével azonos körülmények között. Centrifugálás után a sejteket felvettük 1/3 mennyiségű, 500 mM NaCl-dal kiegészített 3X YBB pufferben, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. A fagyott sejteket kávédarálóval megtörtük és jégen felolvasztottuk. Ultracentrifugáltuk 1 órán át 35500 rpm-en, majd a felülúszót ammónium-szulfáttal (34,5 %) kicsaptuk, 1,5 óra alatt jégen kevertetve. Az elegyet 1 órán át 15000 rpm-en centrifugáltuk, majd a csapadékot feloldottuk a következő pufferben (A puffer): 100 mM Tris HCl pH:7,5, 100 mM NaCl, 1 mM béta-merkaptóetanol. Ezután 2 liter A pufferrel szemben éjszakán át 4°C-on dializáltuk. Másnap 30 perc 15000 rpm-nyi centrifugálás után a mintát Sephadex G25 gyöngyön engedték át, végül glutation-sepharose géltre vittük fel. Kötődés után 2X mostuk 1X YBB pufferrel, és E pufferrel eluáltuk a fehérjéket.

UBA1: A hUBA1-et állandó kifejeződést biztosító alkohol dehidrogenáz promóteres vektorról, BJ5464Del élesztősejtekből tisztítottuk. A 100 ml startert –URA tápban növesztettük, ezt tovább oltottuk 500 ml YPD-be, 16 óra rázatás után, továbboltottuk 3X 2 l YPD-be és éjszakán át ráztuk 30 °C-on. A sejteket centrifugálás után azonos mennyiségű 40 mM Tris HCl pH: 7,5-ben vettük fel és a HLTF tisztításnál leírt módon tártuk fel. Majd ultracentrifugáltuk 1 órán át 35500 rpm-

en, és a felülúszót 2 órán keresztül 4 °C-on T puffer + 50 mM KCl-al szemben dializáltuk. Az oldatot DEAE oszlopra vittük, az elúció T puffer + 500 mM KCl-dal történt, 10 ml-es frakciókat szedve. A fehérjét tartalmazó frakciókat ammónium-szulfáttal kicsaptuk (65 g ammónium szulfátot használtunk 100 ml oldathoz), folyamatos keverés mellett, jégen 1,5 óra alatt. 15 perc 15000 rpm-en történő centrifugálás után a csapadékot visszaoldottuk a következő pufferben (B puffer): 50 mM Tris HCl pH: 7,5, 5% glicerín, 0,2 mM DTT, 1 mM EDTA, éjszakán át ugyan ebben a pufferben dializáltuk 4 °C-on. A dializált fehérjeoldatban az ATP koncentrációját 2 mM-ra, a MgCl<sub>2</sub>-ét 5 mM-ra növeltük. B puffer + 2 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>-vel mosott ubikvitin oszlopra vittük fel az oldatot, 25 °C-on. Az oszlopot mostuk T puffer + 1 M KCl-al, T puffer + 50 mM KCl + 20 mM DTT-vel eluáltunk, 1 ml-es frakciókat szedve. A hUBA1 fehérjét tartalmazó frakciókat Q-Sepharose oszlopra vittük, az elúció NaCl grádienssel történt: T puffer + 50 mM-tól 600 mM NaCl-ig. Az UBA1-et tartalmazó frakciókat összekevertük és 50 µg/ml BSA-val folyékony nitrogénben fagyasztottuk le.

hPCNA: A hPCNA termelése és tisztítása a HLTF-nél leírtakhoz hasonlóan történt, de a glutation gyöngyöt T puffer + 500 mM NaCl mosás után T puffer + 150 mM NaCl-dal mostuk. Az elúció T puffer + 150 mM NaCl-ban, Prescission proteázzal, éjszakán át 4 °C-on történt.

#### **4.12. Poliakrilamid gél**

A denaturáló poliakrilamid gélhez először egy elválasztó gélt öntünk: 12%-os gélhez: 6 ml 30% akrilamid / 0,8% biszakrilamid keverék, 3,75 ml 1,5 M Tris pH: 8,8, 150 µl 10% nátrium-dodecil szulfát (SDS), 5,25 ml steril desztillált víz, 50 µl 10% ammonium-perszulfát (APS), 20 µl tetrametil-etilén-diamin (TEMED). A gél tetejére vízzel telített butanolt mérünk. Ha megszilárdult, gyűjtő gélt öntünk rá, amibe a mintákat fogjuk mérni: 0,65 ml 30% akrilamid / 0,8% biszakrilamid keverék, 1,25 ml 1,5 M Tris pH: 8,8, 50 µl 10% SDS, 3,05 ml steril desztillált víz, 25 µl 10% APS, 10 µl TEMED. A natív poliakrilamid gélhez: 10%-os gélhez: 5 ml 30% akrilamid / 0,8% biszakrilamid keverék, 375 µl 10X TBE puffer, 187,5 µl glicerín, steril desztillált víz 7,5 ml-ig, 50 µl 10% APS, 20 µl TEMED.

#### 4.13. Western blot analízis

A denaturáló poliakrilamid gél nedves blottolóban éjszakán át 300 mA-en nitrocellulóz filterre blottoltuk. Transzfer puffer: 0,242 % Tris, 1,117 % glicin, 20 % metanol. A filtert szobahőmérsékleten (18-28 °C) telítettük 5% tejpor, 1% BSA-t tartalmazó TBS Tween pufferben 1 órán át. (TBS Tween puffer: 150 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH: 7,5, 0,05 % Tween20) Elsődleges ellenanyaggal 1 órát inkubáltuk, mostuk 5X5 percig TBS Tween pufferrel, a másodlagos ellenanyaggal 30 percig inkubáltuk. Ezt követően mostuk: 5X5 percig TBS Tween-el, végül 1X5 percig TBS pufferrel. A HRP-vel konjugált ellenanyagot Millipore kemilumineszcens HRP szubsztráttal tettük láthatóvá, 5 perc inkubálással. A jelet Kodak Imager 4000MM készülékkel detektáltuk. Az ellenanyagokat 5 % tejport, 1 % BSA-t tartalmazó TBS Tweenben oldottuk fel.

Használt ellenanyag: V068: anti-hPCNA Ig (egér) HRP konjugált, /Santa cruz, cat. numb.: sc-56, PC-10/ 5000x hígításban.

#### 4.14. DNS szubsztrátok

A DNS szubsztrátokat oligonukleotidokból hibridizáltuk össze, 1X TE pufferben, 95 °C-ról lassan 4 °C-ra hűtve. Az összehibridizált szubsztrátot futtattuk 10% natív poliakrilamid gélen, majd a megfelelő méretű fragmentet kivágtuk és MQ:TE, 1:1 arányú keverékben oldottuk vissza. A radioaktív szubsztrátok esetében a hibridizálást jelölés előzte meg T4 polinukleotid kináz puffer segítségével, gamma-ATP-vel. A szubsztrátokhoz használt oligonukleotidok a következők voltak: o1358 (ssDNS 42 nt.), o1058/o1118 (dsDNS 75 nt.), o1054/o1118 (részleges duplex), o1054/o1056/o1058/o1118 (villa), az 5' <sup>32</sup>P-jelölt oligonukleotidok aláhúzva, és o3063 (ssDNS 75 nt.), o3063/o1054 (dsDNS 75 nt.), o1054/o1056/o1058/o3063 (villa), ahol o3063 5' fluoreszcein-jelölt oligonukleotid, az o1118-cal megegyező szekvenciával.

A plazmid alapú szubsztrátot a következőképpen hoztuk létre: restrikciónal emésztettük a pG46 plazmidot Nt.BbvCI, valamint a pG68 plazmidot Nb.BbvCI-vel, így kaptuk meg a pG46B és pG48A emésztett plazmidokat. Ezután a pG46B plazmidot kezeltük Shrimp Alkaline Phosphatase enzimmel, majd radioaktívan jelöltük gamma-ATP-vel, T4 polinukleotid kináz segítségével, így kaptuk meg a pG46B' plazmidot. A pG48A plazmidot XhoI emésztéssel linearizáltuk, így kaptuk meg a pG48A Xh plazmidot. Végül a komplementer egyesszálú régiókat tartalmazó két plazmidot

összehibridizáltuk 53 °C-ról lehűtve a következő pufferben: 50 mM Tris HCl pH.: 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT.

#### **4.15. Replikációs villa-visszafordító esszé**

A replikációs villa-visszafordító esszét oligonukleotid alapú szubsztráton a következő pufferben végeztük: 20 mM Tris-HCl (pH 7,0), 0,1 mg/ml BSA, 1 mM DTT és 10% glicerín, kiegészítve 5 mM MgCl<sub>2</sub>-dal és 5 mM ATP-vel. 15 perc 37 °C-on történő inkubálás után azonos mennyiségű helikáz STOP puffert adtunk hozzá: 20 mM EDTA, 2 mg/ml Proteináz K, 1% SDS, 10% glicerín, és 0,02% brómfenolkék, majd 5 perc inkubálás után a mintákat 10% natív poliakrilamid gélen futtattuk elektroforézis segítségével EDTA mentes, 1X Tris-borát pufferben. A plazmid alapú szubsztrát esetében a kísérleti elrendezés azonos volt az oligonukleotid alapú szubsztráton végzett kísérlettel, azonban itt az inkubáció után a mintákat AflIII, EcoRI, illetve BamHI restrikciós enzimekkel hasítottuk 1 órán keresztül 37 °C-on. A termékeket 6% natív poliakrilamid gélen történő elektroforézissel, 1X Tris-borát pufferben futtattuk.

#### **4.16. Gél shift, és DNS kompetíciós kísérletek**

A gél shift kísérleteket a következő pufferben végeztük: 20 mM Tris HCl pH.: 7,0, 0,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/ml BSA, 1 mM DTT, 10% glicerín. A reakciókat jégen mértük össze, majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután futtattuk 6%-os natív poliakrilamid gélen, mely akrilamid és N,N biszakrilamid 30:0,8 arányú keverékét, 0,5X Tris-borát puffert és 2,5% glicerint tartalmazott. Az elektroforézist 4 °C-on, EDTA-mentes, 0,5X Tris-borát pufferben végeztük. DNS kompetíciós kísérletben elsőként GST-FLAG-HIRAN domént kötöttünk Cy5 fluoreszcens festékkel jelölt oligonukleotid alapú replikációs villa-szerű szubsztráthoz szobahőmérsékleten, 15 percig úgy, hogy a szubsztrát 95%-a meg legyen kötve HIRAN doménnel. A következő pufferben dolgoztunk: 20 mM HEPES 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 µg/ml BSA, 0,2% NP40 és 10% glicerín. Ezután a fehérjével kötött DNS szubsztrátot azonnal használtuk a kompetíciós kísérlethez, amibe növekvő koncentrációban adtuk a kompetítor, fluoreszcenccel jelölt DNS-t (0-1 µM), majd az elegyet inkubáltuk 15 percig szobahőmérsékleten. A mintákat 0,5X Tris-borát pufferrel, és 2.5% glicerinnel kevertük össze, és így mértük a 6% natív poliakrilamid gélre, ami a következőket tartalmazta: akrilamid és N,N biszakrilamid, 30:0.8 arányban, majd

futtattuk 4 °C-on, 0,5X Tris-borát pufferben, EDTA nélkül. A mintákat Typhoon Trio Image segítségével tettük láthatóvá.

#### **4.17. PCNA ubikvitilációs kísérlet**

Az *in vitro* ubikvitilációs reakció (10 µl) PCNA ubikvitilációs pufferben (40 mM Tris HCl, pH 7,5, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mg/ml BSA, 10% glicerin, 500 µM ATP), a következő fehérjék jelenlétében történt: 100 nM Uba1, 50 µM ubikvitin, 10 nM RFC és 0,5 nM kettősszálú pUC19 plazmid DNS, BstNBI enzimmal (New England BioLabs) 30 °C-on, 60 percig hasítva. A reakcióba mértünk továbbá: PCNA-t (50 nM), Rad6–Rad18-at (100 nM), Mms2–Ubc13-at (100 nM) és HLTF-et (20 nM) és inkubáltuk 37 °C-on, 60 percig. Az ubikvitilált PCNA-t tartalmazó mintákat 12%-os denaturáló poliakrilamid gélen futtattuk és Western blot után anti-PCNA ellenanyagot (Santa Cruz Biotechnology) használva tettük láthatóvá.

#### **4.18. ATPáz esszé**

Az ATPáz esszé (10 µl) ATPáz reakciópufferben (20 mM Tris-HCl pH 7,0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 60 µg/ml BSA, 1 mM DTT és 10% glicerin), a következő komponensek jelenlétében történt: 5-20 nM HLTF fehérje, 1 mM [γ-32P]ATP és 1 µM dsDNS, a következő oligonukleotidokból hibridizálva: o1249 és o1250. 37°C, 30 perc inkubálás után minden mintából 2 µl-t cseppentettünk PEI cellulóz F vékonyréteg kromatográfiás lemezre (Merck), amelyet a következő oldószerbe helyeztünk futtatáshoz: 1 M hangyasav és 0,25 M LiCl. A termékeket Typhoon Trio imager segítségével detektáltuk.

#### **4.19. Humán sejt kultúrák, stabil humán sejt vonalak**

A humán HCT116 sejteket DMEM-ben (Sigma) növesztettük 10 % FCS-el (Sigma) kiegészítve, 3 °C-on. A sejtek transzfekcióját Lipofektamin 2000 transzfekciós reagens (Invitrogen) segítségével végeztük, a gyártó által ajánlott protokoll szerint. A HLTF-specifikus shRNS-t expresszáló stabil sejt vonalat a következőképpen hoztuk létre. HLTF-specifikus oligonukleotidokat: o2611 és o2612 összehibridizáltuk és az shRNS-Neo plazmid HindIII helyére klónoztuk, létrehozva így a pIL2394 plazmidot. A következő lépésben ezt a plazmidot transzfektáltuk HCT116 sejtekbe, majd a stabilan

expresszáló vonalakat G-418 SULPHATE (Gibco, Cat. No.: 11811064) segítségével szelektáltuk.

#### 4.20. Sejten belüli fehérjelokalizáció vizsgálata

A vad típusú és HIRAN domén deléciós mutáns HLTf fehérjék lokalizációjának vizsgálatát immunfestéssel végeztük, anti-FLAG ellenanyaggal (Sigma), 1:300 hígításban, valamint Cy3 fluoreszcens molekulával konjugált anti-egér ellenanyaggal (Sigma, cat. numb.: C2181), 1:1000 hígításban. A sejtek ezután lettek felvéve 25% glicerint tartalmazó PBS pufferben: (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4; 140 mM NaCl), majd 1 mg/ml DAPI festés után történt meg a mikroszkópos elemzés, Olympus FV1000 konfokális lézer szkennelő mikroszkóp és Leica LSM konfokális mikroszkóp segítségével.

#### 4.21. A használt oligonukleotidok

o1054	AGCTACCATGCCTGCCTCAAGAATTCGTAA
o1056	TTACGAATTCTTGAGGCAGGCATGGTAGCT
o1058	AGCTACCATGCCTGCCTCAAGAATTCGTAATATGCCTACACTGGAGTACC GGAGCATCGTCGTGACTGGGAAAAC
o1118	GTTTTCCCAGTCACGACGATGCTCCGGTACTCCAGTGTAGGCATATTACG AATTCTTGAGGCAGGCATGGTAGCT
o1249	AC
o1250	GT
o1358	GA
o2515	AAGAATTCTGGATTGGAGTAC
o2522	ACGCGTCGACGCAATAGAAAAGCGGTTTCAGATCAG
o2603	TTTCCATGGATTCCGTTTTATTTGGAAGTTTGAG
o2604	TTTCTCGAGTCCATGTTTCTTCAACTGATCTG
o2611	GATCCCCGGTGCTTTGGCCTATATCATTCAAGAGATGATATAGGCCAAAG CACCTTTTTGAAA
o2612	AGCTTTTCCAAAAGGTGCTTTGGCCTATATCATCTCTTGAATGATATAG GCCAAAGCACCGGG
o2732	CAACGAGATCCTGCTGCCCCCTTATGATAAG
o2733	CTTATCATAAGGGGCAGCAGGATCTCGTTG
o3730	GTACCGGAGCATCGTCGTGACTGGGAAAAC
o3752	AGCTACCATGCCTGCCTCAAGAATTCGTAATATGCCTACACTGGACCGTA CTTCGCCTAGTAGACTGCCTTCCCG
o3753	CGGGAAGGCAGTCTACTAGGCGAAGTACGG

#### **4.22. BrdU comet esszé**

A HLTF shRNS-t stabilan expresszáló HCT116 sejteket transzformáltuk shRNS-rezisztens HLTF fehérjét expresszáló plazmidokkal, Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 reagens segítségével a gyártó által előírt protokoll szerint. A szinkronizálatlan sejteket 24 óra múlva kezeltük 25  $\mu$ M BrdU-val 20 percen keresztül. A sejtek egy részét ezután UV-val kezeltük, majd 6 órán keresztül dNTP-vel kiegészített tápfolyadékban növesztettük. Ezután a sejteket összegyűjtöttük, PBS-sel mostuk, majd mikroszkóp tárgylemez felületére agaróz gélbe ágyasztuk. A fehérjét lizáltuk a következő pufferben: 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH:10, 1% Triton X-100 és 0,5% nátrium-lauril-szulfát. A mintát a következő jéghideg pufferben futtattuk: 0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH 13, 25 mA-en 25 percig. A lemezeket neutralizáltuk 0,4 M Tris-HCl, pH 7,4-el, majd 30 percig blokkoltuk 0,1% BSA-t és 0,1% Tween 20-at tartalmazó PBS pufferben. Majd immunfestést végeztünk 30  $\mu$ l anti-BrdU ellenanyaggal (1:750, Ab-Direct Serotech) 90 percig, és Alexa Fluor 488-el jelölt anti-patkány ellenanyaggal (1:750, Molecular Probes, Inc.) 2 órán keresztül. A mintát Zeiss Axioscope fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, és Komet 5.0 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK) programmal elemeztük.

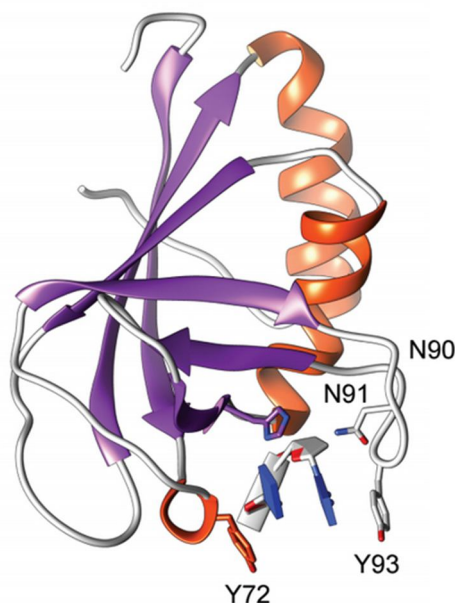
#### **4.23. UV érzékenységi kísérlet**

HLTF-csendesített HCT116 sejteket transzfektáltunk shRNS-rezisztens HLTF fehérjét termelő plazmidokkal, 6 lyukú lemezben. 24 óra múlva a sejteket összekevertük GFP-t stabilan expresszáló HeLa sejtekkel 1:1 arányban. Ezt a sejtkeveréket 16 óra elteltével kezeltük UV fénnel. Ezután 7 napig növesztettük a sejteket. Végül FACS analízis segítségével (Guava Easy site System) határoztuk meg a GFP-t expresszáló és nem expresszáló sejtek arányát.





PDBID deposition 5BNH). A szerkezet alapján a HIRAN domén egy hatszálú béta-hordóból és az azt körülvevő két alfa-hélixből épül fel (9. ábra).



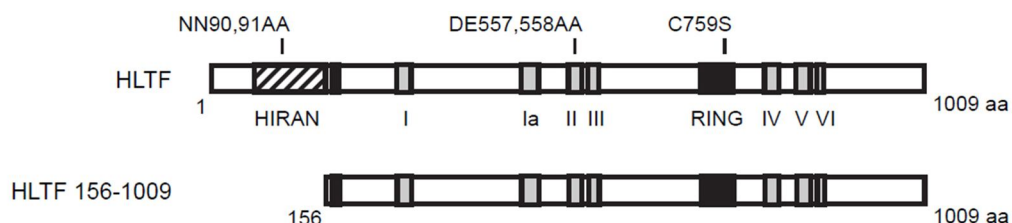
**9. ábra:** A HIRAN domén háromdimenziós szerkezete, a DNS-kötésben, illetve a funkció betöltésében fontos aminosavak megjelölésével.

A HIRAN domén DNS-kötő régiója két hurok és egy béta lemez által alkotott árokban helyezkedik el. Ez az árok, melyet az Y72-es és az Y93-as aminosavak határolnak, egy dinukleotid befogadására képes. A két aminosav erős kölcsönhatást létesít a fehérjével együtt tisztuló dinukleotiddal, amely a mérések alapján egy timin és egy guanin. Az említett két aminosavon kívül a 90-es és 91-es pozícióban lévő aszparagin aminosavak is fontos szerepet játszhatnak a DNS megkötésében (9. ábra).

## 5.2. A HIRAN domén mutáns HLTF fehérjék létrehozása és tisztítása

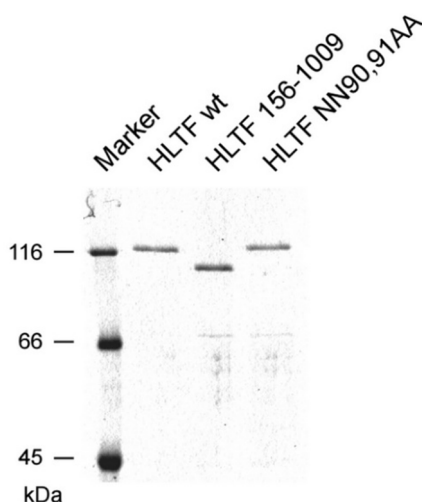
Célunk az volt, hogy meghatározzuk, vajon a HLTF fehérje eddig ismert aktivitásai sérülnek-e a HIRAN domén hiányában. Hogy ezt vizsgálni tudjuk, különböző mutáns fehérjéket hoztunk létre. Előzetes kísérleteink, valamint a kristálystruktúra és a számítógépes modell alapján PCR alapú mutagenézis segítségével egy dupla pontmutációt hoztunk létre a HLTF HIRAN doménjében, ahol is a 90-es és a

91-es pozíciójú aszparagint alaninra cseréltük (8. ábra), létrehozva a HLTF NN90,91AA fehérjét. Ezenkívül egy HIRAN deléciós HLTF fehérjét is létrehoztunk, amelyben a HIRAN doménnel együtt a HLTF fehérje N-terminálisának 155 aminosavát deletáltuk, létrehozva a HLTF 156-1009 fehérjét (10. ábra).



**10. ábra:** A vad típusú (HLTF) és a HIRAN domén deléciós (HLTF 156-1009) fehérjék doménszerkezete.

A fehérjéink génjét tartalmazó túltermelő plazmidokat élesztőbe transzformáltuk, ott a fehérjéket túltermeltettük, majd affinitás kromatográfiás módszerrel tisztítottuk. A vad típusú és mutáns fehérjéink egyaránt GST (Glutation S-transzferáz), illetve FLAG taget tartalmaztak a fehérje N-terminálisához fűzionálva.

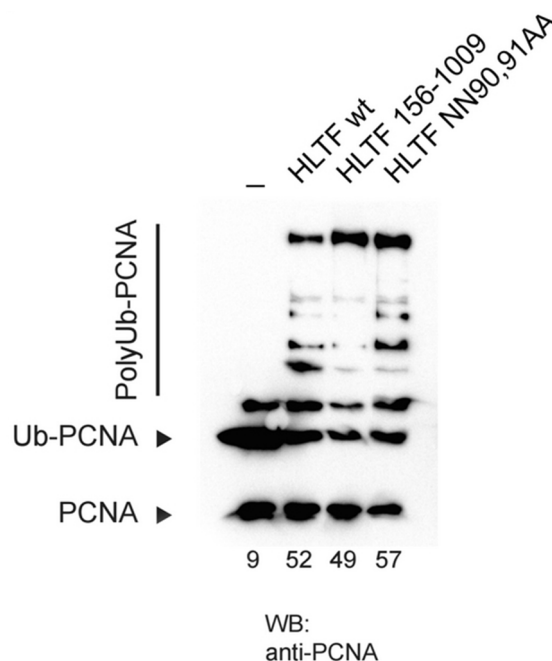


**11. ábra:** A tisztított vad típusú (HLTF wt), a HIRAN domén deléciós (HLTF 156-1009) és a HIRAN domén pontmutáns (HLTF NN90,91AA) HLTF fehérjék poliakrilamid gélképe Coomassie brillantkékkel festve.

A fehérjét tartalmazó élesztő extraktumot glutationnal kapcsolt gyöngyökön engedték keresztül, majd a gyöngyre nem kötődő komponenseket több lépésben lemostuk az oszlopról, végül egy proteáz segítségével a GST és a FLAG tag között elhasítottuk a fúziós fehérjéinket, így eredményként közel 100%-os tisztaságú, FLAG taggel jelölt HLTF fehérjét kaptunk. Ezeket a preparátumokat használtuk további kísérleteinkben. Első lépésben azonos koncentrációjúra hígítottuk a fehérjeoldatainkat, amit Coomassie brillantkék festéssel ellenőriztünk (11. ábra).

### 5.3. A HIRAN mutáns aktív ubikvitin ligáz

A tisztított fehérjékkel megvizsgáltuk, hogy a HIRAN doménben létrehozott deléció milyen hatással van a HLTF fehérje különböző funkcióira *in vitro*. Ehhez megvizsgáltuk a poliubikvitin ligáz és a helikáz aktivitást különböző kísérleti elrendezésben.

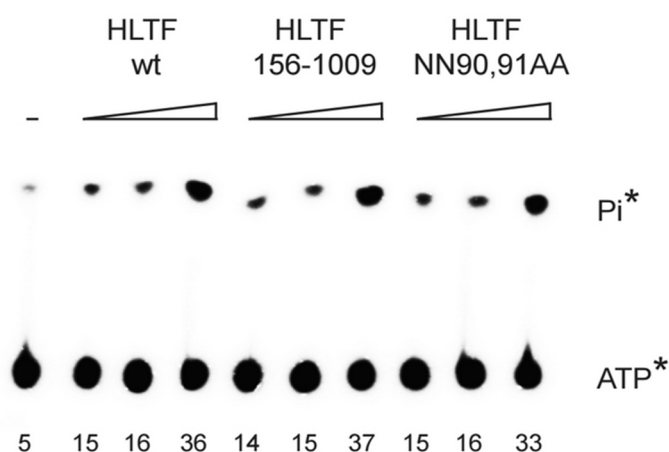


**12. ábra:** A HIRAN domén mutáns HLTF fehérjék rendelkeznek ubikvitin ligáz funkcióval. Western blot ábra a vad típusú (HLTF wt), a HIRAN domén deléciós (HLTF 156-1009) és a HIRAN domén pontmutáns (HLTF NN90,91AA) HLTF fehérjék általi PCNA poliubikvitilálásról. A számok a poliubikvitilált PCNA mennyiségét jelölik a kiindulási PCNA és az ubikvitilált PCNA százalékában.

A ligáz aktivitás méréséhez először monoubikvitiláltuk a PCNA-t a RAD6/RAD18 komplex segítségével, majd a reakcióhoz mértük az MMS2/UBC13 komplexet, illetve a vad típusú és a HIRAN domén mutáns HLTF fehérjét. A reakció után a poliubikvitilált PCNA jelenlétét Western blot segítségével tettük láthatóvá. Kimutattuk, hogy a deléciós mutáns HLTF a vad típushoz hasonló mértékű ubikvitin ligáz aktivitással rendelkezik (12. ábra). Az eredményből arra következtettünk, hogy a HIRAN doménben létrehozott mutáció az ubikvitin ligáz funkcióra nem volt hatással.

#### 5.4. A HIRAN mutáns HLTF rendelkezik ATPáz aktivitással

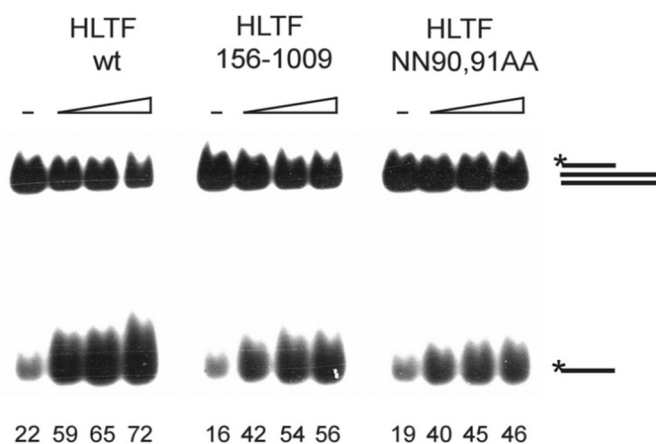
Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a tisztított fehérjéink az ATPáz, illetve helikáz aktivitásukat sem veszítették el, megvizsgáltuk a fehérjék ATP hidrolizáló képességét és kettősszálú DNS-függő helikáz aktivitását. Az ATPáz aktivitás méréséhez radioaktívan jelölt gamma foszfáttal rendelkező ATP molekulát használtunk. A HLTF-et kettősszálú DNS-sel stimuláltuk, majd a mintákat vékonyrétegen futtattuk meg. Száradás után a hidrolizált gamma foszfátot detektáltuk. Kimutattuk, hogy a HIRAN deléciós HLTF fehérje a vad típusal megegyező mértékű ATPáz aktivitással rendelkezik (13. ábra).



**13. ábra:** A HIRAN domén mutáns HLTF fehérjék rendelkeznek ATPáz aktivitással. Vékonyréteg kromatográfiás kép a vad típusú (HLTF wt), a HIRAN domén deléciós (HLTF 156-1009) és a HIRAN domén pontmutáns (HLTF NN90,91AA) fehérjék által hidrolizált radioaktív ATP-ről. A számok a hidrolizált ATP mennyiségét jelölik a kiindulási ATP mennyiség százalékában.

## 5.5. A HIRAN mutáns HLTF aktív kettősszálú DNS-függő helikáz

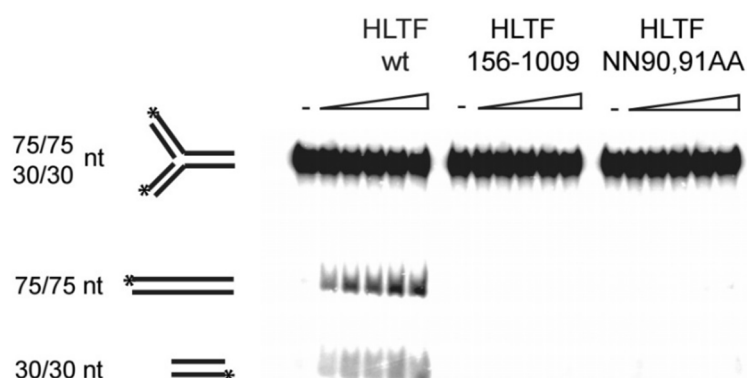
Miután láttuk, hogy a mutáns fehérjénk rendelkezik ATPáz aktivitással, valószínűsítettük, hogy a kettősszálú DNS-függő helikáz aktivitása is sértetlen maradt. Az ellenőrző kísérletet egy hármasszálú DNS szubsztráton végeztük el. A szubsztrátban a Watson – Crick párosodás mellett a harmadik szál Hoogsteen bázispárosodással kapcsolódik. Ezt a harmadik szálát jelöltük radioaktívan, így nyomon tudtuk követni a reakció során. Ha a HLTF megköti a kettősszálú DNS-t, és ép a kettősszálú DNS-függő helikáz funkciója, képes eltávolítani a harmadik szálát a szubsztrátról. A reakciót natív poliakrilamid gélen futtatva pozitív reakció esetén megjelenik a gyorsabban futó egyszálú DNS. Kísérletünkben a vad típusú, illetve a HIRAN mutáns HLTF molekulákat használtuk azonos szubsztrát mennyiséggel, növekvő fehérjemennyiséget használva, azonos ideig. Azt tapasztaltuk, hogy a mutáns fehérjék is képesek voltak a harmadik szál eltávolítására a vad típusú fehérjéhez hasonló mértékben (14. ábra). Így a kísérleteinkkel is bizonyítottuk, hogy nemcsak a kettős pontmutáció, de a teljes HIRAN deléción sem befolyásolja a HLTF fehérje megfelelő térszerkezetének kialakulását, így ubikvitin ligáz és ATP hidrolízis-függő dsDNS helikáz aktivitását.



**14. ábra:** A HIRAN domén mutáns HLTF fehérjék rendelkeznek kettősszálú DNS-függő helikáz aktivitással. Vad típusú (HLTF wt), HIRAN domén deléciós (HLTF 156-1009) és HIRAN domén pontmutáns (HLTF NN90,91AA) fehérjékkel végzett, natív poliakrilamid gélen futtatott reakciók, a radioaktív jel segítségével történő detekció a harmadik szál eltávolításáról. A számok a rövid egyes szál leválasztásának mértékét jelölik a kiindulási, hármasszálú szubsztrát mennyiségének százalékában.

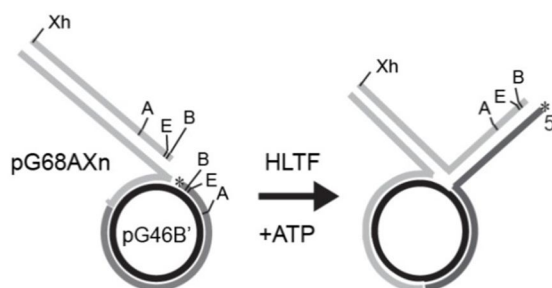
## 5.6. A HIRAN mutáns HLTF nem képes visszafordítani a replikációs villát

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a mutáns fehérjék HIRAN domén nélkül, illetve mutáns HIRAN doménnel is rendelkeznek-e replikációs villa-visszafordító aktivitással. Kétféle kísérleti rendszert alkalmaztunk. Az első esetben oligonukleotidokból összehibridizált modell homológ replikációs villa szubsztrátot használtunk. Ebben az esetben a szülői szálak jelentő kettősszálú DNS szakasz 40 nukleotid hosszúságú, míg a villa két szárát alkotó, szintén kettősszálú szakaszok 35 nukleotid hosszúságúak voltak. A HLTF fehérje helikáz aktivitása révén képes a homológ replikációs villát visszafordítani. A modell szubsztrát esetén egy 35, illetve egy 75 nukleotid hosszúságú kettősszálú DNS fragmentet kapunk termékként. A reakció végén a reakcióelegyet natív poliakrilamid gélen megfuttatva, ezek a DNS darabok nyomonkövethetők. Esetünkben a szubsztrát egyik rövid és egyik hosszú karja volt radioaktívan jelölve, így a terméket radioaktivitás útján tudtuk detektálni. A reakció során azt tapasztaltuk, hogy míg a vad típusú HLTF fehérje rendelkezett helikáz aktivitással és képes volt a modell replikációs villa visszafordítására, addig sem a HIRAN deléciós mutáns, sem a HIRAN pontmutáns fehérje nem mutatott aktivitást (15. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy a HLTF fehérje általi replikációs villa-visszafordításhoz nem elég a kettősszálú DNS-függő helikáz aktivitás, a HIRAN domén jelenléte is elengedhetetlen.

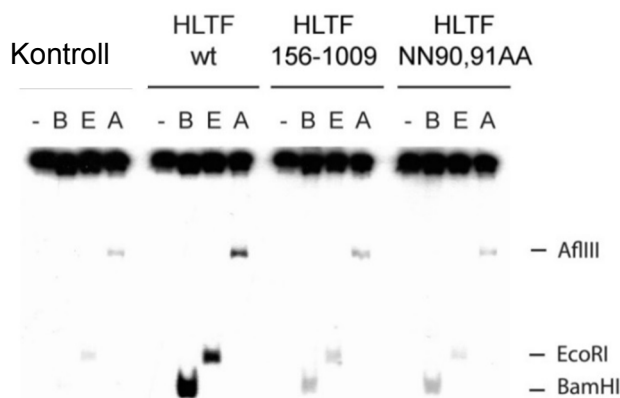


**15. ábra:** Vad típusú (HLTF wt), HIRAN domén deléciós (HLTF 156-1009) és HIRAN domén pontmutáns (HLTF NN90,91AA) fehérjékkel, natív poliakrilamid gélen futtatott minták, radioaktív oligonukleotidok segítségével történő kimutatása a replikációs villa-visszafordító aktivitásnak. A vad típusú HLTF esetén megjelennek a 30/30 és 75/75 nukleotid hosszú kettősszálú termékek, míg a mutáns fehérjék esetén nem.

Hogy megerősítsük az előző kísérletben kapott eredményt, a második esetben a replikációs villa-visszafordítást az *in vivo* körülményeket jobban imitáló, plazmid alapú szubsztráton is megvizsgáltuk. Az ebben a kísérleti elrendezésben használt plazmid DNS tartalmazott egy behasítást, amelytől 5' irányban egy túlnyúló, a nick-től 3' irányban található DNS szakasszal komplementer kettősszalú DNS található. A 3' irányban lévő plazmid szakasz 5' vége radioaktívan volt jelölve. A hasítástól 5' irányban található túlnyúló szakasz restrikciós enzim hasítóhelyeket tartalmaz, mely szakaszokon a HLTF a replikációs villa-visszafordító aktivitása révén elmozgatott radioaktív szállal történő hibridizálódás után, restrikciós endonukleázokkal hasítva különböző hosszúságú radioaktív kettősszalú termékeket kapunk (16. ábra).



**16. ábra:** A kiindulási és a replikációs villa-visszafordító aktivitás révén létrejövő struktúra szerkezeti képe a plazmid alapú replikációs villa szubsztrát esetében. A nagybetűkkel jelölt restrikciós endonukleáz hasítóhelyek a következők: Xh–XhoI, A–AflIII, E–EcoRI, B–BamHI.

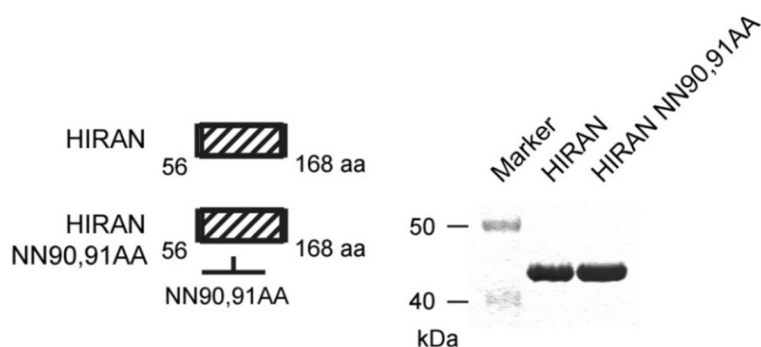


**17. ábra:** A HIRAN domén mutáns HLTF fehérjék nem képesek a replikációs villa-szerű plazmid alapú DNS szubsztrátot visszafordítani. Vad típusú (HLTF wt), HIRAN domén deléció (HLTF 156-1009) és HIRAN domén pontmutáns (HLTF NN90,91AA) HLTF fehérjékkel végzett, natív poliakrilamid gélen futtatott replikációs villa-visszafordító reakciók, radioaktív oligonukleotidok segítségével detektálva. A vad típusú HLTF esetén megjelennek a gélben gyorsabban haladó, kisméretű hasítási termékek.

A reakció során létrejött DNS struktúrát hasítva létrejövő termékeket natív poliakrilamid gélen a radioaktivitásuk révén tettük láthatóvá. A hasított termékek az eredeti szubsztrátnál gyorsabban haladnak a gélben. Azt tapasztaltuk, hogy a modell replikációs villához hasonlóan, ebben az esetben is a vad típusú HLTF mutatott aktivitást, míg a HIRAN domén deléciós, illetve pontmutáns HLTF fehérjék nem voltak képesek a struktúra feloldására (17. ábra).

### 5.7. A vad típusú HIRAN domén hozzáadása komplementálja a HIRAN deléciós HLTF villa-visszafordító aktivitását *in vitro*

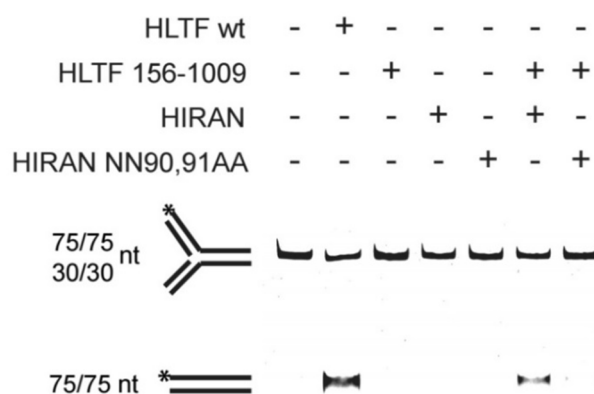
Hogy megerősítsük a feltételezéseinket, miszerint a replikációs villa-visszafordító aktivitás elvesztése valóban a funkcióképtelen HIRAN doménnek köszönhető, egy új kísérleti elrendezést alkalmaztunk. Az elképzelés szerint, ha a tisztított HIRAN deléciós HLTF fehérjét összekeverjük tisztított HIRAN doménnel, a két fehérje összeállhat, a vad típusú fehérjéhez hasonló struktúrát vehet fel és helyreállhat a villa-visszafordító aktivitása. Ehhez HIRAN domént kellett tisztítanunk. PCR segítségével amplifikáltunk a HLTF fehérjéről vad típusú és kettős pontmutáns HIRAN doméneket, melyek a fehérje 56-168 aminosavig terjedő szakaszát tartalmzták. Ezeket a doméneket élesztő expressziós plazmidokba klónoztuk, amelyek GST és FLAG taget tartalmztak. Az így létrehozott plazmidokat élesztőbe transzformáltuk, a fehérjéket túltermeltettük, majd a HLTF-hez hasonló módon tisztítottuk (18. ábra).



**18. ábra:** A HIRAN domén konstrukciók szerkezeti ábrája. Vad típusú (HIRAN) és pontmutáns (HIRAN NN90,91AA) domének. A GST-FLAG tag fúziós, tisztított HIRAN domének képe, poliakrilamid gélen futtatva, Coomassie késsel festve.



A tisztítás végén azonos koncentrációban kaptuk a GST-FLAG fúziós vad típusú (HIRAN) és dupla pontmutáns (HIRAN NN90,91AA) HIRAN doméneket. A tisztított doménekkel és a HIRAN deléciós mutáns HLTF-fel elvégeztük a replikációs villa-visszafordító esszét oligonukleotid alapú, egyik szálán fluoreszcenccel jelölt, modell replikációs villa szubsztráton. Míg a HIRAN deléciós HLTF fehérje önmagában, illetve mutáns HIRAN doménnel összekeverve továbbra sem volt aktív a modell szubsztráton, addig a deléciós HLTF-et vad típusú HIRAN doménnel összekeverve kismértékű aktivitást tapasztaltunk (19. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy a két fehérjedarab a reakcióelegyben összeállt, létrehozva egy, a vad típusú HLTF-hez hasonló struktúrát, amely már rendelkezett replikációs villa-visszafordító aktivitással. Ezzel bebizonyítottuk, hogy a HIRAN domén megléte a HLTF fehérjében nélkülözhetetlen a replikációs villa visszafordításához.

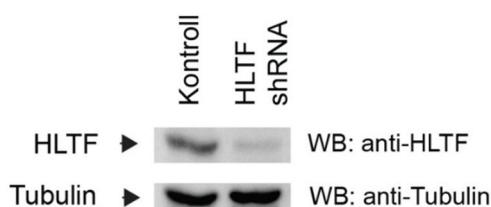


**19. ábra:** Egy szálon fluoreszcensen jelölt, oligonukleotid alapú, modell replikációs villa szubsztrát esetében, villa-visszafordító aktivitás révén 75/75 nukleotid hosszú, kettősszálú, fluoreszcens terméket kapunk, melyet natív poliakrilamid gélen való futtatás után, fluoreszcencia révén tettünk láthatóvá. Vad típusú HLTF (HLTF wt), HIRAN domén deléciós HLTF (HLTF 156-1009), vad típusú HIRAN domén (HIRAN) és pontmutáns HIRAN domén (HIRAN NN90,91AA).

## 5.8. A HIRAN domén megléte esszenciális a HLTF működéséhez *in vivo*

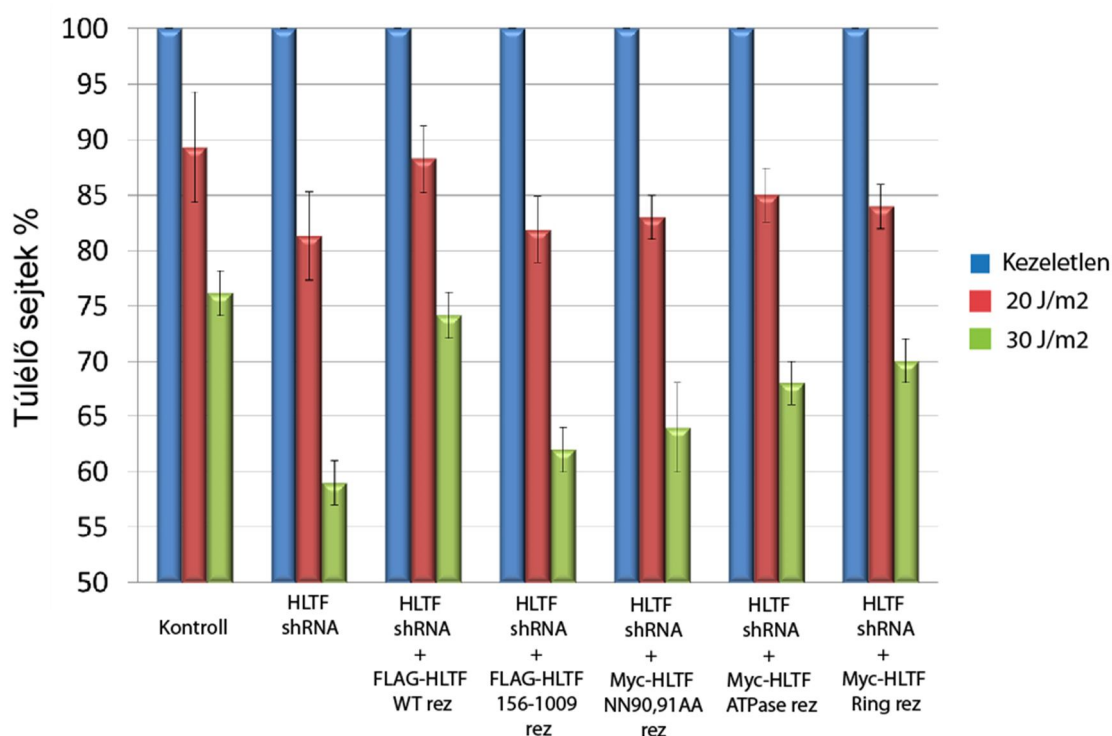
Az *in vitro* kísérletek után megvizsgáltuk, vajon a HIRAN domén hiánya milyen hatással van a HLTF *in vivo* aktivitására. Ehhez létrehoztunk egy olyan humán sejtvonalat (HCT116), melyben shRNS segítségével stabilan csendesítettük a HLTF fehérjét (20. ábra). Ezután plazmidon létrehoztunk olyan vad típusú, valamint HIRAN

domén mutáns HLTF konstruktokat, melyek shRNS-rezisztensek, így képesek termelődni a csendesített sejtekben. Azt vizsgáltuk, képesek-e a mutáns fehérjéink visszaállítani a vad típusú állapotot, vagy sem. Az első kísérletben a vad típusú, illetve a HIRAN deléciós fehérjékkel komplementált sejtvonalakat UV sugárzással kezeltük, és kompetíciós kísérletben vizsgáltuk az érzékenységet.



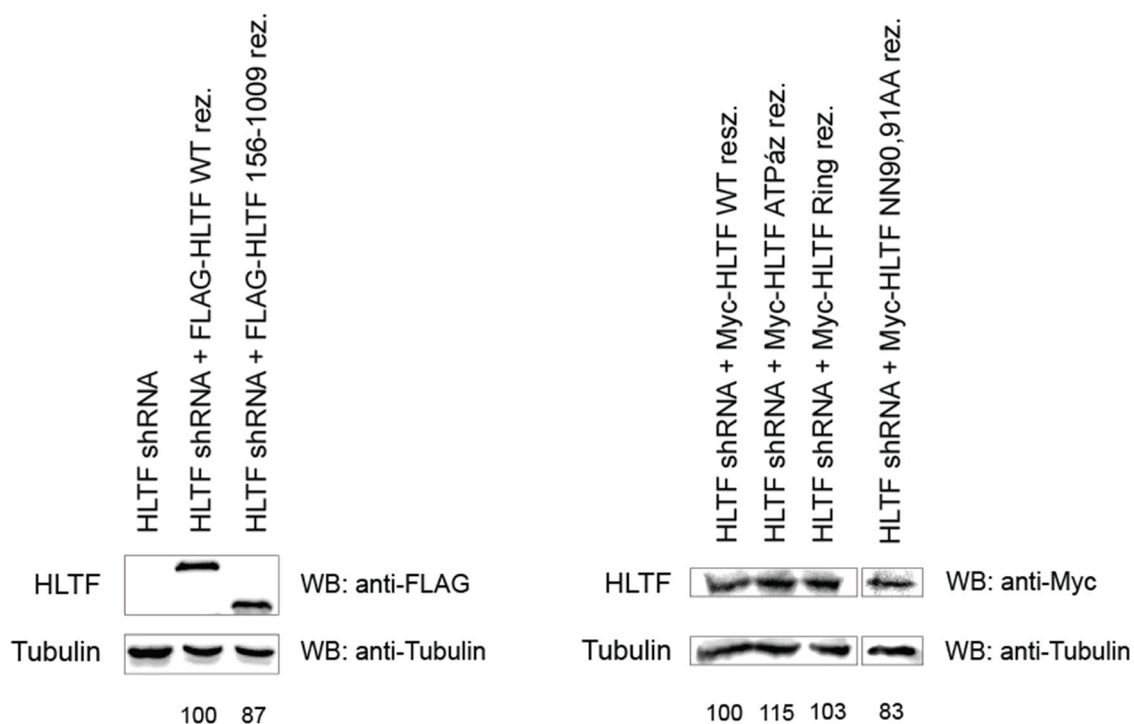
**20. ábra:** A HLTF csendesítésének vizsgálata. Az shRNS segítségével nagymértékű endogén HLTF mennyiségcsökkenést sikerült elérnünk. A kísérletben kontrollként tubulint használtunk.

A kompetíciós kísérlet során, a HLTF-csendesített sejtvonalban egyesével túltermeltük az shRNS-rezistens fehérje konstruktokat, majd ezeknek a sejteknek az UV sugárzásra adott érzékenységét hasonlítottuk össze vad típusú és HLTF-csendesített sejtek érzékenységével. A HIRAN mutánsok mellett a már ismert doménekben (ATPáz, RING) mutáns HLTF konstruktokat is bevontunk a kísérletbe, melyekről tudjuk, hogy érzékenyebbek a vad típusnál. A kísérlet során a HLTF-csendesített sejtek nagymértékű érzékenységet mutattak UV sugárzás általi DNS-károsító hatásra. Azt tapasztaltuk, hogy míg a vad típusú fehérje képes volt közel teljes mértékben visszaállítani a sejtek érzékenységét a vad típusú sejtek érzékenységének szintjére, addig a HIRAN mutáns fehérjéket expresszáló sejtek érzékenysége a HLTF-et stabilan csendesített sejtekéhez hasonló mértékű volt. Az ATPáz és RING mutáns fehérjéket termelő sejtek köztes érzékenységet mutattak. Az eredményekből arra következtettünk, hogy a HIRAN domén jelenléte, annak megfelelő működése, esszenciális a HLTF fehérje funkciójának betöltéséhez *in vivo* (21. ábra).



**21. ábra:** A HLTf csendesítésének, illetve a sejtekben túltermelt shRNS-rezisztens (rez) HLTf fehérjék hatásának vizsgálata UV hatására létrejött DNS-károsodások esetén. A HIRAN domén deléciós (FLAG-HLTf 156-1009 rez) és pontmutáns (Myc-HLTf NN90,91AA rez) HLTf fehérjéket expresszáló sejt vonal a HLTf-csendesített (HLTF shRNA) sejt vonalhoz hasonló mértékű érzékenységet mutatott.

Western blot segítségével követtük nyomon az egyes shRNS-rezisztens fehérjék sejtben belüli expressziós szintjét. Mivel FLAG-, illetve Myc-jelölt fehérjéket is használtunk, ezekhez FLAG-, illetve Myc-jelölt vad típusú fehérjéket használtunk kontrollként; ezek expressziós szintje, illetve komplementációjuk mértéke megegyezett, illetve összemérhető volt a mutáns fehérjék expressziós szintjével (22. ábra).

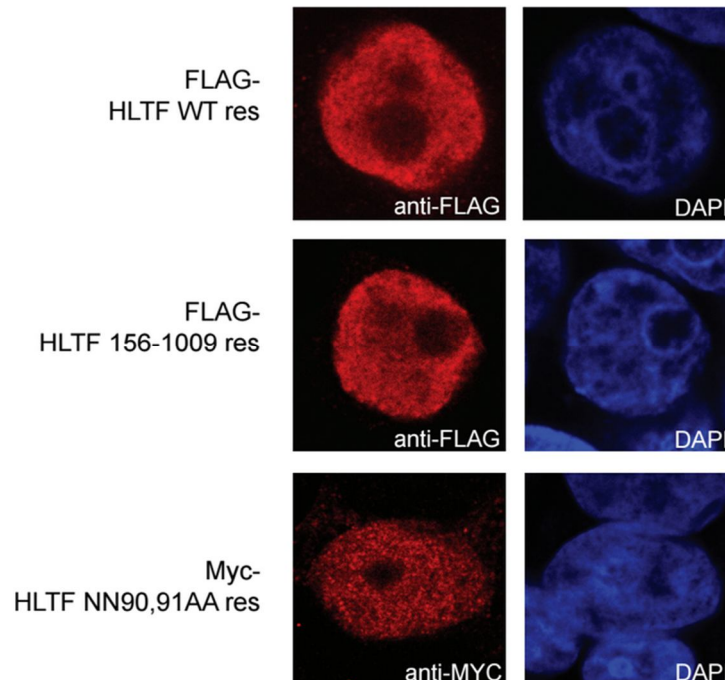


**22. ábra:** A túltermelt shRNS-rezisztens vad típusú, illetve mutáns HLTf fehérjék expressziós szintje Western blot kísérlet segítségével. ShRNS rezisztens fehérjék: vad típus (FLAG/Myc-HLTf WT rez.), HIRAN deléciós mutáns (FLAG-HLTf 156-1009 rez.), ÁTPáz mutáns (Myc-HLTf ÁTPáz rez.), RING mutáns (Myc-HLTf Ring rez.), és HIRAN domén pontmutáns (Myc-HLTf NN90,91AA rez.). Kontrollként tubulint használtunk.

## 5.9. A HIRAN domén mutáns HLTf fehérjék a sejtmagba lokalizálódnak

Mivel úgy tűnt, hogy a HIRAN domén funkciójának elvesztésével a fehérje elveszti teljes sejten belüli funkcióját *in vivo*, fennállt az a lehetőség, hogy a HIRAN deléciós, illetve pontmutáns HLTf azért funkcióképtelen, mert nem képes arra a konkrét helyre eljutni, ahol szükség lenne rá, vagyis nem képes bejutni a sejtmagba. Elképzelhető, hogy a delécióval és a pontmutációval elronthattuk vagy levághattuk a nukleáris lokalizációs szignált a fehérjéről, amelyre szükség van a sejtmagba való bejutáshoz. Hogy ezt a lehetőséget kizárjuk, immunfestéssel megvizsgáltuk, hogy a HIRAN mutáns HLTf hol található a sejteken belül. A FLAG taggel, illetve Myc taggel fuzionált fehérjéinket kifejeztettük a sejtben, majd a lokalizációjukat anti-FLAG, illetve anti-Myc ellenanyaggal történő immunfestéssel detektáltuk. A kísérletben kontrollként a sejtmagot DAPI-val jelöltük. Azt tapasztaltuk, hogy a HIRAN mutáns HLTf fehérjék,

haszonlóan a vad típusú fehérjéhez, a sejtmagban találhatóak (23. ábra). Így kizártuk annak a lehetőségét, hogy a mutáns fehérjék azért nem képesek a funkciójukat ellátni, mert nem jutnak be a sejtmagba.

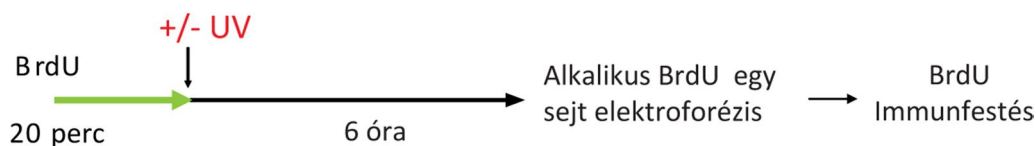


**23. ábra:** A HIRAN mutáns HLTf fehérjék bejutnak a sejtmagba. Vad típusú (HLTf wt), HIRAN domén deléció (HLTf 156-1009) és HIRAN domén pontmutáns (HLTf NN90,91AA) HLTf fehérjék sejtmagi lokalizációja. A lokalizációt FLAG és Myc elleni ellenanyaggal mutattuk ki immunofluoreszcencia segítségével, a sejtmagot DAPI festéssel jelöltük meg.

### 5.10. A HLTf fehérjék posztreplicációs hibajavításban betöltött szerepe függ a HIRAN doméntól

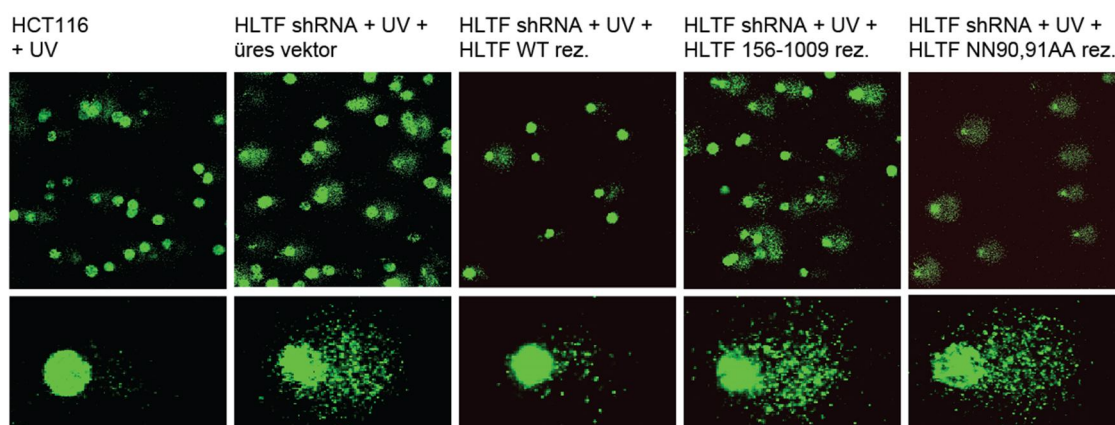
A HLTf-csendesített sejtek UV érzékenységet egy másik kísérleti rendszer segítségével, egy módosított comet esszével is megvizsgáltuk, ahol bromodeoxiuridin (BrdU) jelölést alkalmazunk. A kísérlet során az osztódó sejteket a BrdU bázisanalóggal jelöljük, majd a felesleges BrdU-t kimossuk a tápoldatból. Ezután a sejteket UV sugárzással kezeljük. A besugárzás után 6 órával a sejteket agaróz gélben fixáljuk, majd elektroforézis segítségével futtatjuk meg a bennük lévő DNS-t, melyet ezután immunfestéssel teszünk láthatóvá. A kísérlet végén csak azokat a sejteket látjuk,

amelyek éppen a replikáció fázisában voltak és képesek voltak beépíteni a BrdU-t (24. ábra).



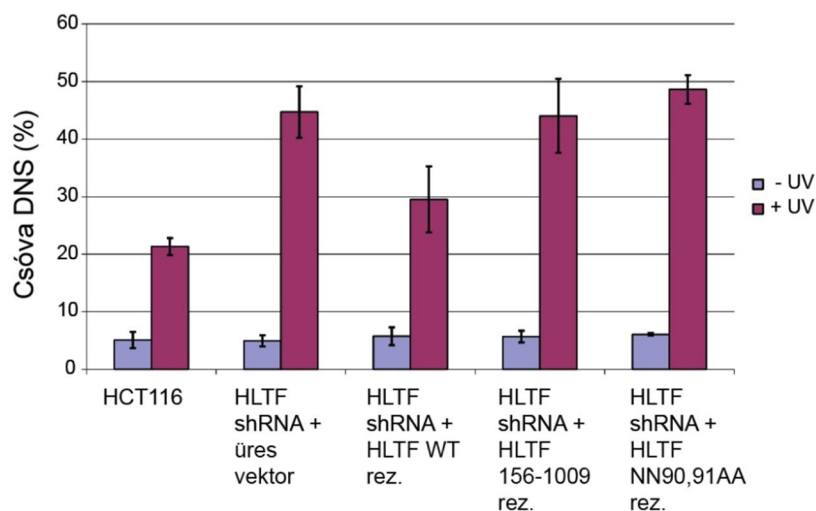
**24. ábra:** A comet esszé (egysejt elektroforézis) folyamatának sematikus ábrája.

Ha a sejt DNS-e teljesen megkettőződött, az elektroforézis során a nagy kromoszómák nem tudnak kifutni a sejtmagból, így egy csoportban maradnak. Ha a sejt replikációja az UV sugárzás hatására lelassul és 6 óra alatt nem fejeződik be, úgy az elektroforézis során a befejezetlen replikációból származó DNS darabok kifutnak a sejtmagból, így egy üstököszerű képet kapunk. Az üstökös magja/feje a replikálódott DNS-ből áll, míg a csóvája a befejezetlen replikációból származik. Minél nagyobb a csóva mérete a fejhez viszonyítva, a sejt annál érzékenyebb az adott károsító ágenssel szemben. A kísérlet során kontrollként vad típusú HCT116 sejteket használtunk. Ezenkívül HLTF-csendesített vonalakat is vizsgáltunk, amelyekben túltermeltük az shRNS-rezisztens vad típusú, illetve HIRAN domén mutáns HLTF fehérjét. Azt tapasztaltuk, hogy UV kezelés után 6 órával a vad típusú sejtek replikációja szinte teljes volt, csóva DNS alig volt megfigyelhető. Ezzel szemben a HLTF-csendesített vonalban a replikáció lelassult UV sugárzás hatására, és megnövekedett csóva DNS-t mutattunk ki, ami arra utal, hogy az UV által okozott DNS hibák javításában szerepet játszik a HLTF fehérje. A vad típusú shRNS-rezisztens HLTF-et túltermelve a csendesített vonalban, a csóva DNS mennyisége lecsökkent, a vad típusú HCT116 sejtekben mért érték közelébe. Ezzel szemben, a HIRAN domén mutáns HLTF fehérjék egyike sem volt képes visszaállítani vad típusra jellemző fenotípust (25. ábra). Ez az eredmény arra utal, hogy a HLTF HIRAN doménje elengedhetetlenül szükséges az UV sugárzás hatására leállt replikációs villák újraindításához.



**25. ábra:** Comet kísérlet HLTF-csendesített sejtvonalon. shRNS-rezisztens (rez) vad típusú (HLTF wt), HIRAN domén deléciós (HLTF 156-1009) és HIRAN domén pontmutáns (HLTF NN90,91AA) HLTF fehérjékkel végzett kísérlet. A vad típusú shRNS-rezisztens HLTF képes volt visszaállítani a vad típusú HCT116 sejtekre jellemző fenotípust, míg a HIRAN domén mutáns fehérjék nem.

A kísérlet eredményét grafikonon is ábrázoltuk, összehasonlítva a kezeletlen és az UV-val kezelt sejtek érzékenységét is (26. ábra).

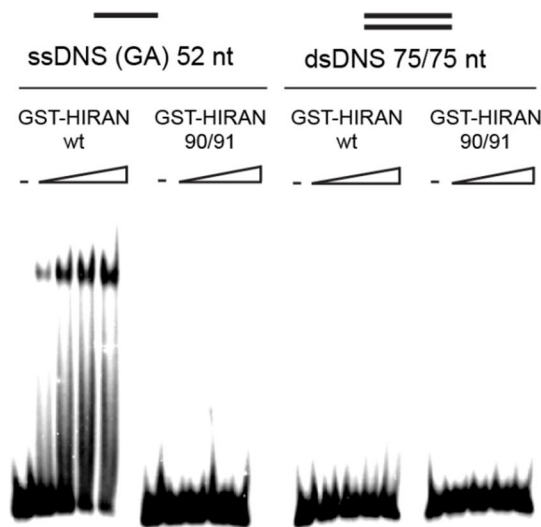


**26. ábra:** A comet kísérlet HLTF-csendesített sejtvonalon, grafikonon ábrázolva.

### 5.11. A HIRAN domén specifikusan köti a replikációs villát

A kristálystruktúra alapján a HIRAN domén nagy valószínűséggel egy DNS-kötő domén. Ezt erősítik a kísérleti eredményeink is, melyek szerint a HIRAN domén hiánya a HLTF fehérjének csak a replikációs villa-visszafordító aktivitására volt hatása *in vitro*. Ehhez az aktivitáshoz a HLTF-nek DNS-t kell kötnie. Ezért megvizsgáltuk, vajon a HIRAN domén valóban képes-e DNS-t kötni, és ha igen, milyen DNS struktúrához kapcsolódik. Ehhez gél shift kísérletet alkalmaztunk. A felhasznált szubsztrát DNS-ek a következők voltak:

- 52 nukleotid hosszú, GA ismétlődéseket tartalmazó egyesszálú DNS (ssDNS)
- 75 nukleotid hosszú kettősszálú DNS (dsDNS)
- részleges duplex, melynek kettősszálú szakasza 30 nukleotid, egyesszálú túlnyúló vége 45 nukleotid hosszúságú
- homológ replikációs villát imitáló DNS szubsztrát, melynek a szülői szálát formáló szakasza 45, az elágazás utáni szakasz 30 nukleotid hosszúságú volt.



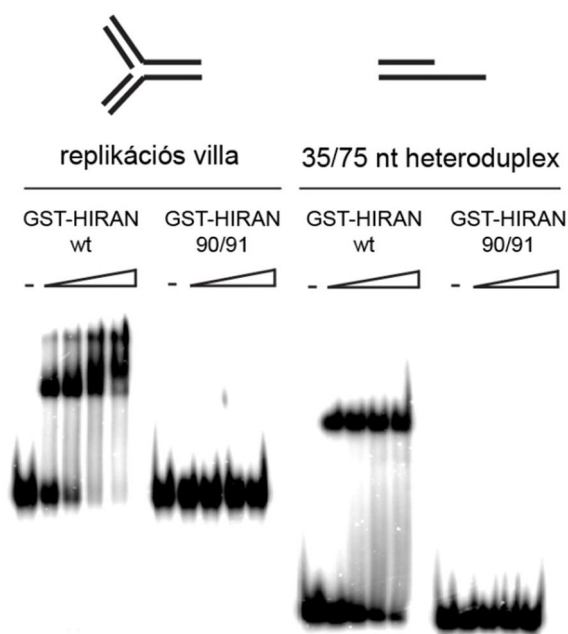
**27. ábra:** A HIRAN domén köti az egyesszálú DNS-t, de nem kapcsolódik duplaszálú DNS-hez. Vad típusú (HIRAN) és pontmutáns (HIRAN NN90,91AA) doménekkal végzett gél shift kísérlet. A vad típusú domén koncentrációját növelve, a megkötött DNS mennyisége is nő.

A reakció során a HIRAN fragmentekhez adtuk a szubsztrát molekulát, majd szobahőmérsékleten (18 - 24 °C) inkubáltuk az elegyet, hogy kialakulhasson a



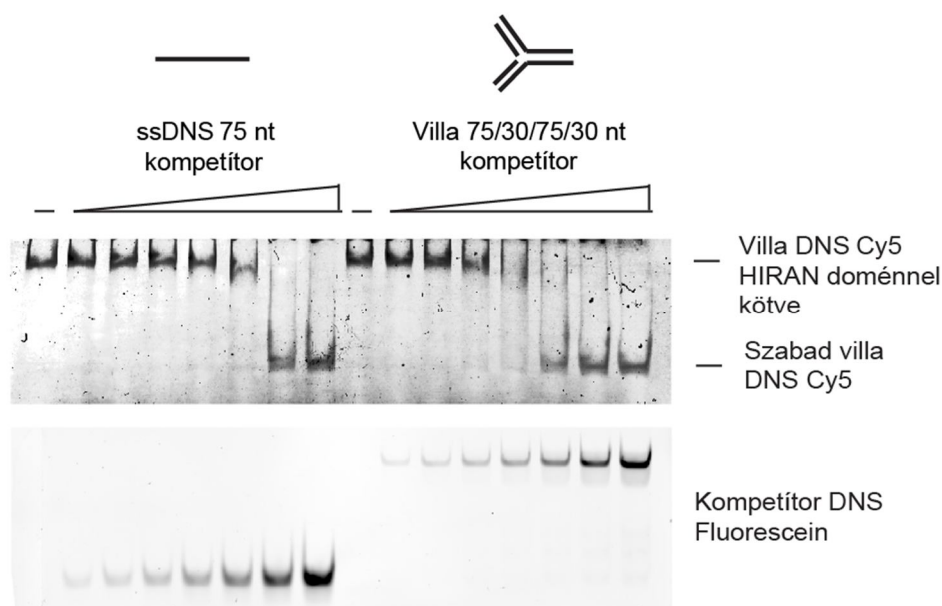
kölcsönhatás. A reakciókat ezután natív poliakrilamid gélen futtattuk, hogy a komplexek ne essenek szét. Ha volt kölcsönhatás a fehérje és a DNS között, a jel magasabb molsúlytartományba tolódott el. A termékeket a radioaktívan jelölt szubsztrátok segítségével detektáltuk. Kimutattuk, hogy a HIRAN domén képes DNS-t kötni (27. ábra).

A vad típusú HLTF az egyesszalú DNS-hez kapcsolódott, ezzel szemben a kettősszalú DNS-t nem kötötte. A pontmutáns fehérje egyik esetben sem kapcsolódott a DNS-hez. A továbbiakban megvizsgáltuk, vajon bonyolultabb DNS szerkezetekhez kapcsolódik-e a HIRAN domén. Mivel tudjuk, hogy a HLTF fehérje az elakadt replikációs villánál működik, illetve annak visszafordításában vesz részt, valamint a HIRAN domén mutáns HLTF nem képes a replikációs villát visszafordítani, ezért replikációs villa-szerű szubsztrátot, valamint részleges duplex DNS-t is használtunk. A részleges duplex DNS-sel ki tudtunk mutatni kölcsönhatást. Ez nem meglepő, hiszen tudjuk, hogy a HIRAN köti az egyesszalú DNS, amit tartalmaz a részleges duplex. Ezzel szemben, érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy bár a HIRAN domén nem köt kettősszalú DNS-t, mégis képes volt kölcsönhatni a replikációs villát imitáló DNS szubsztráttal is, amely viszont tisztán kettősszalú DNS szakaszokból épül fel (28. ábra).



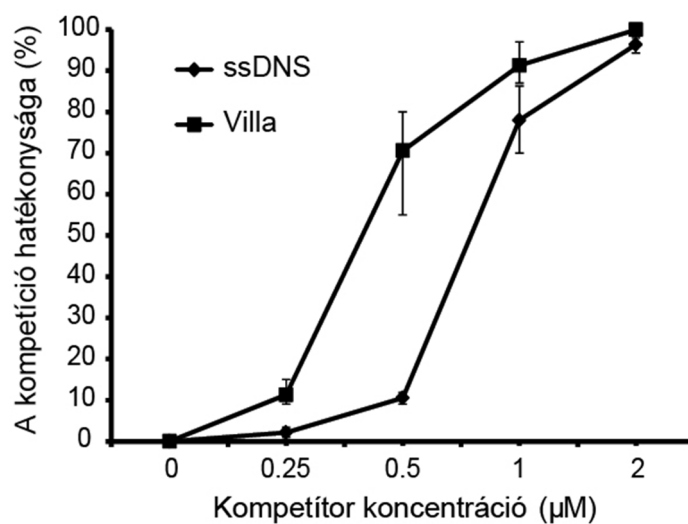
**28. ábra:** A HIRAN domén köti a részleges duplexet és a replikációs villát. Gél shift kísérlet a vad típusú (HIRAN) és pontmutáns (HIRAN NN90,91AA) doménekkal. A vad típusú HIRAN domén koncentrációját növelve, a megkötött DNS mennyisége is nő.

Mivel már tudtuk, hogy a HLTf HIRAN doménje egyesszálú DNS-t és replikációs villát köt, kíváncsiak voltunk, vajon ezek közül melyik szubsztráthoz képes erősebben kapcsolódni. Ezt a kérdést egy kompetíciós kísérlettel próbáltuk megválaszolni. A kísérlet során Cy5 fluoreszcens festékkel jelölt replikációs villa szubsztráthoz kötöttük első körben a HIRAN domént, majd ezután a reakcióelegyekbe mértük a fluoreszcenccel jelölt kompetitor replikációs villa DNS-t, valamint a 75 nukleotid hosszú egyesszálú DNS-t, növekvő koncentrációban. A kétféle jelöléssel az eredeti szubsztrát replikációs villát, valamint a kompetitorokat is egy időben tudtuk nyomon követni. Arra számítottunk, hogy az erősebb kompetitor már kisebb koncentrációban is képes a HIRAN domént leszorítani az eredeti szubsztrátról, míg az a DNS, amelyikhez kisebb az affinitása, így gyengébb kompetitor, csak magasabb koncentrációban képes a HIRAN domént leszorítani. Azt tapasztaltuk, hogy a replikációs villa bizonyult erősebb kompetitornak, mivel alacsonyabb koncentrációban is képes volt a HIRAN domént leszorítani, mint az egyesszálú DNS (29. ábra).



**29. ábra:** A HIRAN domén specifikusan köti a replikációs villát. Kompetíciós kísérlet fluoreszcensen jelölt szubsztrátokkal. A felső sorban a Cy5-jelölt, HIRAN doménnel kötött replikációs villa látható. Ahogy növekvő koncentrációban adjuk a kompetitor szubsztrátot (alsó sor), a HIRAN domén elengedi az eredeti szubsztrátot és átköt a kompetitorra. Így megjelenik a kötetlen Cy5-jelölt replikációs villa, amely kisebb méretű, így a natív gélen gyorsabban fut. A villa kompetitor esetén a HIRAN domén hamarabb engedi el az eredeti szubsztrátot.

Kísérletünkben azt a következtetést vontuk le, hogy bár a HIRAN domén az egyesszálú DNS-t is jól köti, mégis a fő szubsztrátja valószínűleg a replikációs villa. A kísérleti eredményünket számszerűsítettük is, és grafikonon ábrázoltuk a HIRAN domén kötési erősségét az egyes szubsztrátokhoz viszonyítva (30. ábra).



**30. ábra:** A kompetíciós kísérlet grafikus ábrázolása, a kompetítorok koncentrációjának és a kompetíció hatékonyságának ábrázolásával.

## 6. Eredmények megvitatása

Munkánk eredményeként meghatároztuk a humán HLTF fehérje HIRAN doménjének funkcióját. Kísérleteinkkel karakterizáltuk a HIRAN domén DNS-hibatolerancia útvonalban, illetve a HLTF általi replikációs villa-visszafordításban betöltött szerepét.

Csoportunk fő kutatási területe a humán DNS-hibatolerancia útvonal szabályozásának vizsgálata. Munkánk során célunk a folyamat szabályozási mechanizmusának, illetve az útvonalban részt vevő egyes kulcsfehérjék aktivitásának pontos meghatározása. Ennek érdekében, az egyes fehérjékben található domének funkciójának részletes analízisét végezzük. A humán HLTF fehérje kulcsszerepet játszik az elakadt replikációs villa mentésében. Fő funkciója a PCNA molekula poliubikvitilálása, valamint a templát váltáshoz szükséges replikációs villa-visszafordítás, illetve RAD51-től független templátváltás. Ezekhez a funkciókhoz tartozó domének jól jellemzettek, így a RING domén, amely a ligáz funkcióért felelős és hét helikáz/ATPáz domén, melyek kettősszálú DNS helikáz funkciót adnak a fehérjének. A HLTF fehérjében található emellett egy HIRAN domén is, amelynek a funkciója eddig ismeretlen volt.

A HIRAN domén egy nagyon specifikus feladatot láthat el, amire abból lehet következtetni, hogy emberi fehérjék közül egyedül a HLTF-ben fordul elő. Éppen ez okból választotta ki Sirano Dhe-Paganon csoportja, hogy kölcsönható kismolekulákat teszteljenek a HIRAN doménnel a HLTF specifikus gátlásához. A csoporttal együttműködve meghatároztuk a HIRAN domén NMR struktúráját, valamint Dante Neculai csoportjával együttműködve a kristályszerkezetét is. Sikerült kimutatnunk, hogy a HIRAN domén képes DNS-t kötni, és meghatároztuk az ehhez szükséges aminosavakat. Kutatásainkkal párhuzamosan, rajtunk kívül több kutatócsoport is foglalkozott a HIRAN domén funkciójának vizsgálatával. Mindhárom csoport meghatározta a HIRAN domén kristályszerkezetét. Az eredmények szinte teljes mértékben egybevágoak, saját eredményeinket is igazolják<sup>76,77,78</sup>. Annak érdekében, hogy a HIRAN domén funkcióját tudjuk vizsgálni a HLTF fehérjén belül, létrehoztunk egy HIRAN deléciós mutánst, melyről levágtuk a HLTF fehérje N-terminális végét a teljes HIRAN doménnel együtt, valamint a kristályszerkezet alapján egy dupla pontmutáns HLTF fehérjét. Az aktív, vad típusú fehérje az MMS2-UBC13 ubikvitin

konjugáló komplex-szel együttműködve képes a már monoubikvitilált PCNA fehérjét poliubikvitilálni. Ezenkívül képes ATP-t kötni és hidrolizálni, valamint kettősszalú DNS-függő helikázként is működik és képes a replikációs villa visszafordítására. A HIRAN domén deléciós és pontmutáns HLTF a várákosainknak megfelelően képes volt a PCNA-t poliubikvitilálni, valamint ATP-t hidrolizálni. Emellett megmaradt a kettősszalú DNS-függő helikáz aktivitása és le tudta választani a Hoogsteen bázispárosodott harmadik DNS szálát a hármasszalú DNS szubsztrátról. Ezek az eredmények mind arra utalnak, hogy a deléciós mutáns fehérjénk térszerkezete rendben van, és a már korábban jellemzett, egyéb doménjei megfelelően működnek. A replikációs villa-visszafordító aktivitást kétféle szubsztráton is megvizsgáltuk, és a HIRAN domén mutáns HLTF fehérjét használva egyik esetben sem kaptunk terméket, a mutánsok nem voltak képesek a replikációs villa-visszafordításra. Ez a megfigyelés azért meglepő, mivel a deléciós fehérje képes helikázként működni, és aktív a hármasszalú DNS-en, viszont egybevág Andrew C. és munkatársai eredményével. E kísérleti eredmények alapján azt feltételeztük, hogy a HIRAN domén fontos szerepet játszik a HLTF replikációs villa-visszafordító aktivitásában. Ezt erősítette az a megfigyelés is, miszerint a vad típusú HIRAN doménnel összekevert mutáns HLTF fehérje visszanyerte az eredeti aktivitását. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a két fehérje rész képes volt összeállni egy funkcionális egésszé. Ez indirekt bizonyíték lehet arra, hogy a HIRAN domén lehet felelős a replikációs villa-visszafordító aktivitásért.

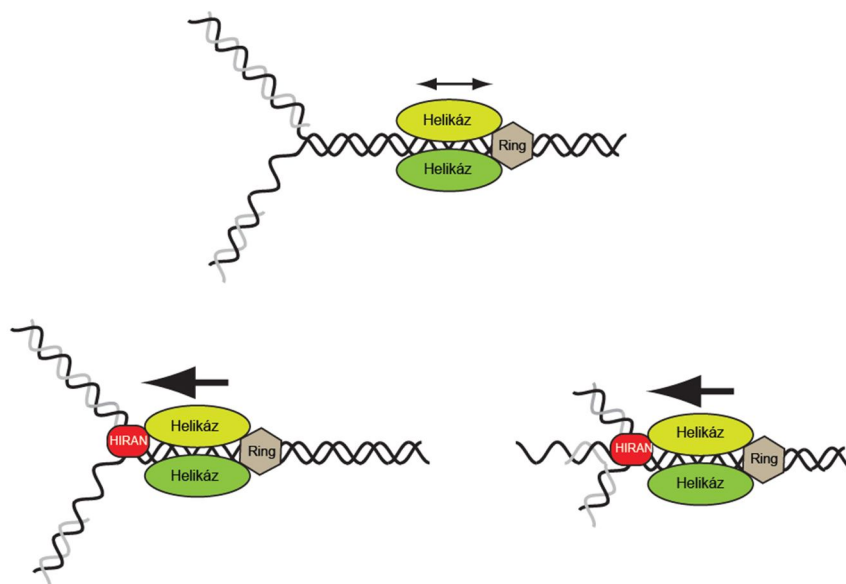
A DNS-hibatolerancia útvonalban részt vevő fehérjék deléciója, illetve egyes doménjeik mutációja érzékennyé teszi a humán sejteket UV sugárzásra. A helikáz domén mutáns és RING domén mutáns HLTF fehérjét tartalmazó humán sejtek is érzékenyek UV sugárzásra. Megvizsgáltuk, hogy a HIRAN deléciós mutáns HLTF fehérjét expresszáló humán sejtek érzékenyek-e UV sugárzásra. Létrehoztunk egy olyan HCT116 humán sejt vonalat, amely stabilan expresszál egy, a HLTF-re specifikus shRNS-t, így ebben a sejt vonalban a HLTF fehérje stabilan csendesítve van. Ebben a sejt vonalban expresszáltuk az shRNS-rezisztens vad típusú és HIRAN mutáns HLTF konstruktokat, és vizsgáltuk érzékenységüket UV sugárzás hatására. A vad típusú fehérje képes volt visszaállítani az érzékenységet a vad típusú HCT116 sejtekhez hasonló mértékre, míg a HIRAN domén mutáns fehérjét expresszáló sejt vonalak hasonlóan érzékenyek voltak, mint a HLTF-csendesített HCT116 sejtek. Mivel *in vitro* eredményekből tudjuk, hogy a deléciós HLTF ligáz és helikáz aktivitással is

rendelkezik, meglepő volt a teljes érzékenység. Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a fehérje valóban bejut a sejtmagba és nem azért defektív, mert a citoplazmában marad, immunfestést végeztünk vad típusú és HIRAN deléciós HLTF fehérjét tartalmazó sejtekben. Azt tapasztaltuk, hogy a HIRAN domén mutáns fehérjék a sejtmagba lokalizálódnak a vad típushoz hasonlóan. Az *in vivo* eredményünket egy másik kísérleti rendszer segítségével is meg akartuk erősíteni. Ennek érdekében BrdU comet esszét végeztünk. A kísérlet során az előzőekben említett sejtvonalakat UV sugárzással kezeltük, majd az S fázisos sejteket nyomon követve megmértük, milyen gyorsan fejeződik be a replikáció. Azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú HLTF expressziója teljes mértékben képes volt komplementálni a HLTF hiányát, míg a HIRAN domén mutáns fehérjékben végbemenő replikáció a HLTF-csendesített sejtekéhez hasonlóan lassabban fejeződött be.

A továbbiakban a HIRAN domén konkrét funkcióját, aktivitását vizsgáltuk meg. Ehhez klónoztuk, élesztőben túltermeltük, majd kitisztítottuk a HLTF HIRAN doménjét. Negatív kontrollként a kettős pontmutáns HIRAN domént használtuk. Ezután megvizsgáltuk, hogy a tisztított fragmentek milyen típusú DNS szubsztráthoz tudnak kötődni, *in vitro* gél shift esszében. Kísérleteinkben a negatív kontrollként használt pontmutáns HIRAN domén nem volt képes DNS-t kötni. Ez az eredmény szintén megegyezik más csoportok eredményeivel. A vad típusú domén képes volt egyesszálú DNS-hez, illetve ss-dsDNS heteroduplexhez kapcsolódni, de kettősszálú DNS-hez nem. Mivel a HLTF az elakadt replikációs villánál dolgozik, képes visszafordítani azt, megvizsgáltuk a HIRAN domén kötését replikációs villa-szerű szubsztráthoz. A vad típusú domén meg tudta kötni az oligonukleotid alapú replikációs villa-szerű struktúrát annak ellenére, hogy dsDNS-t nem köt. Ebből arra következtettünk, hogy a domén a replikációs villa centrumában található részt képes megkötni, valószínűleg így lokalizálva a HLTF fehérjét az elakadt replikációs villához. Ez a kötődés specifikus, méréseink alapján erősebb, mint az ssDNS-sel létrehozott kapcsolat.

Kísérleteink arra utalnak, hogy a HLTF fehérje HIRAN doménje képes megkötni az egyesszálú DNS-t, valamint a replikációs villát, nagy valószínűséggel tehát ez a domén felelős a HLTF fehérje replikációs villához történő kapcsolódásáért. A HIRAN deléciós fehérjével végzett kísérletek alapján a HIRAN domén nemcsak a fehérje lokalizációjában, hanem replikációs villa-visszafordító aktivitásában is elengedhetetlen. Az *in vivo* kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a HIRAN domén megléte elengedhetetlen a HLTF fehérje bármely aktivitása szempontjából, mivel tudjuk, hogy

bár a deléciós fehérje aktív ubikvitin ligáz és aktív helikáz, mégis *in vivo* teljes funkcióvesztést mutat. Ebből arra következtetünk, hogy a HIRAN domén azért lehet felelős, hogy a HLTF fehérjét odaviszi és odahorgonyozza az elakadt replikációs villához, ahol így már képes lesz a PCNA-vel kölcsönhatni és poliubikvitilálni azt, valamint el tudja végezni a villa visszafordítását, illetve a szálcserét. Modellünk alapján a HLTF fehérje HIRAN domén nélkül egyrészt nem képes bekötni a replikációs villa közepébe, csak kettősszalú DNS-t köt helikáz doménjeivel. Másrészt, bár dsDNS-függő helikázként működik, ez az aktivitás mégsem elég ahhoz, hogy a replikációs villát visszafordítsa. A HIRAN domén tehát nemcsak a lokalizációt adja meg, hanem az irányultságot is a fehérjének, amit a már visszaforduló villában az ssDNS kötése stabilizál (31. ábra). Az eredményeink alapján létrehozott modellt erősítik a SMARCAL1, SNF2 helikáz családba tartozó fehérjén végzett kutatások eredményei, melyek a HIRAN doménhez hasonló funkciót feltételeznek a SMARCAL1 fehérje HARP2 doménjének. Ez a fehérje szintén a SWI/SNF helikázok családjába tartozik, HARP doménje két alegységből áll, melyek DNS-t kötnek, és nélkülük a SMARCAL1 nem képes visszafordítani a replikációs villát<sup>74</sup>. Bár a HARP domén az egyes- és kettősszalú DNS találkozásánál kötődik, a HIRAN domén pedig a túlnyúló 3' véghez kapcsolódik, úgy tűnik sikerült azonosítani egy domén családot, mely a replikációs villa koordinált visszafordításáért lehet felelős.



**31. ábra:** A HIRAN domén funkciójának modellje. HIRAN domén nélkül a HLTF fehérje képes DNS-hez kötődni és azon mozogni, de a replikációs villa visszafordítására nem képes. A HIRAN domén az elakadt replikációs villához lokalizálja a HLTF fehérjét, megerősíti a kapcsolatot a DNS-sel, valamint irányultságot és specificitást ad a villa-visszafordításhoz.

## 8. Magyar nyelvű összefoglaló

A sejtjeinkben található örökítőanyagot folyamatosan különböző károsító hatások érik. Ide tartozik az UV sugárzás, a dohányfüst, az alkohol, a kemikáliák és az anyagcsere-folyamatok során keletkezett reaktív oxigén gyökök, amelyek megváltoztatják a DNS szerkezetét. Ennek kivédése érdekében számos DNS-hibajavító útvonal alakult ki. Ezek a mechanizmusok folyamatosan helyreállítják a DNS lánc eredeti struktúráját, mégis akadnak olyan hibák, amelyek nem kerülnek kijavításra a sejtciklus S fázisáig. Ekkor a replikációs villa leállítását, ennek következtében kettősszalú DNS-töréseket, kromoszomális átrendeződéseket, végső esetben a sejt halálát okozhatják. Ennek elkerülésére alakult ki a DNS-hibatolerancia útvonal, amely különböző mechanizmusok révén képes a replikációs villa mentésére.

Az útvonal első lépése a polimerázok processzivitási faktoraként azonosított PCNA molekula 164-es lizinjének monoubikvitilálása a Rad6/Rad18 komplex által. Ennek következtében a replikatív polimeráz lecserélődhet egy, a hiba átírására képes alternatív polimerázra. Egy másik, hibamentes átírást biztosító mechanizmus során a monoubikvitilált PCNA molekulát az Mms2/Ubc13/HLTF komplex az ubikvitin 63-as lizinjén keresztül poliubikvitilálja, aminek következtében a HLTF fehérje a replikációs villát képes visszafordítani. Az így létrejött DNS szerkezeten a hibával szemben lévő szál a már újonnan szintetizált utód szárról íródhat át. Harmadik lehetőségként a hiba alternatív templatváltás révén is áthidalásra kerülhet.

Kutatásaink során a DNS-hibatolerancia útvonal funkciójának és szabályozásának pontos megértésére törekszünk. Ezen belül is a HLTF fehérje aktivitásainak, szabályozó mechanizmusának minél pontosabb feltárása a célunk. A HLTF fehérjét transzkripció faktoraként és tumorszupresszorként azonosították. Vastagbél-tumorerő jelentős százalékában promótere hipermetilált, vagy a fehérje csonkolt formája expresszáldik. A HLTF fehérje jelenleg ismert aktivitásainak döntő többségét kutatócsoportunk tárta fel. A fehérje rendkívül fontos szerepet játszik a genom stabilitásának megőrzésében. Csökkent expressziója DNS mutációk felhalmozódásához és genomi instabilitáshoz vezet. Doménszerkezete jól ismert, rendelkezik egy RING típusú ubikvitin ligáz doménnel, valamint a kettősszalú DNS-transzlokáz funkcióért felelős helikáz doménnel. HIRAN doménjének szerepe azonban máig nem tisztázott.



Célul tűztük ki, hogy meghatározzuk a HIRAN domén funkcióját. Ehhez:

- HIRAN domén deléciós és pontmutáns HLTF fehérjét tisztítunk, majd megvizsgáljuk a mutációk hatását.
- Teszteljük a tisztított fehérjék ligáz, illetve helikáz aktivitásait, melyek valószínűleg nem köthetők a HIRAN doménhez, hogy kizárhassuk az esetleges strukturális mutációkat.
- Megvizsgáljuk, hogy a HIRAN domén szerepet játszhat-e a HLTF replikációs villa-visszafordító aktivitásában.
- Érzékenységi kísérlettel, valamint comet esszével megvizsgáljuk a mutáns fehérjénk *in vivo* funkcióját különböző DNS-károsító ágensekkel szemben.
- HIRAN domént tisztítunk, hogy megvizsgáljuk a DNS kötést, illetve a preferált DNS struktúrákat.

Munkánk során a következő eredményeket értük el:

- Létrehoztunk egy HIRAN deléciós és egy pontmutáns HLTF fehérjét, élesztőben expresszáltuk és a vad típusú fehérjével párhuzamosan homogenitásig tisztítottuk affinitás-kromatográfia révén.
- A HIRAN mutáns fehérjéről bebizonyítottuk, hogy aktív ubikvitin ligázok, képesek a PCNA-t poliubikvitilálni, emellett aktív ATPázok és dsDNS-függő helikázok.
- Kimutattuk, hogy a HIRAN mutáns HLTF nem képes visszafordítani a replikációs villát, oligonukleotid és plazmid alapú replikációs villa-szerű szubsztrátok esetén sem.
- *In vivo* kísérletekből megállapítottuk, hogy UV sugárzás hatására a HIRAN mutáns HLTF fehérje expressziója nem képes komplementálni a HLTF stabilan csendesített sejtek érzékenységét, a HIRAN mutáns HLTF fehérjét kifejező, HLTF-csendesített sejtek érzékenysége megegyezik a HLTF-csendesített sejtekével.
- Comet esszé segítségével kimutattuk, hogy UV sugárzás hatására a HLTF-csendesített sejtekben a replikáció hosszabb idő alatt megy végbe, amit a mutáns HLTF fehérje expressziója nem képes komplementálni. *In vivo* kísérleteinkben a HIRAN mutáns fehérjék null mutánsnak bizonyultak.
- Létrehoztunk egy vad típusú és egy kettős pontmutáns HIRAN domén fragmentet expresszáló plazmidot, a fehérjéket élesztőben túltermeltük, majd affinitás-kromatográfiás módszerrel tisztítottuk.

- Gél shift kísérletekkel kimutattuk, hogy a pontmutáns HIRAN domén nem képes DNS-t kötni.
- A vad típusú HIRAN doménról megállapítottuk, hogy köti az ssDNS-t, valamint a replikációs villa-szerű szubsztrátot.
- Kompetíciós kísérletben a replikációs villa erősebb szubsztrátnak bizonyult.

## 9. Summary of the PhD thesis

DNA in our cells is continuously under assault from different damaging agents such as UV irradiation, reactive oxygen species, metabolites, and chemicals. These agents change the structure of the DNA molecule. To avoid these mutations, many DNA repair mechanisms have evolved. These mechanisms are able to restore the original structure of the DNA double helix. Some damages reach the S-phase of the cell cycle where they can cause stalling of the replication fork leading to double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and cell death. To avoid these consequences, a DNA damage bypass pathway has evolved which protects the stalled replication fork in different ways.

The main step of the pathway is the monoubiquitylation of the PCNA protein, the processivity factor of polymerases, by the Rad6/Rad18 complex at the lysine 164 position. Following this modification, the replicative polymerase can be switched to an alternative polymerase, which is able to synthesize through the lesion. In another error free mechanism, the monoubiquitylated PCNA becomes polyubiquitylated by the Mms2/Ubc13/HLTF complex through the lysine 63 residue, therefore, HLTF can reverse the replication fork. On this newly emerged so-called chicken foot structure, the stalled strand can be completed using the newly synthesized sister strand as a template. The third possibility is an alternative template switching mechanism.

Our study focuses on the better understanding of the function and regulation of the DNA damage bypass pathway. Our goal is to shed light on the activities and regulatory role of the HLTF protein. HLTF was identified as a transcription factor and tumour suppressor. In a high percentage of colon cancers, the promoter of HLTF is hypermethylated, or a truncated form of the protein is expressed. The known main activities of the HLTF protein were discovered in our research group. The protein plays a highly significant role in the maintenance of genome stability. Reduced expression of the protein leads to the accumulation of DNA mutations and genome instability. The domain structure of HLTF is well known. It has a RING-type ubiquitin ligase domain and helicase domains responsible for dsDNA-dependent translocase activity. However, the function of the HIRAN domain is unknown.

Our goal was to identify the function of the HIRAN domain. To achieve this, we proposed:

- To generate HIRAN domain deletion and point mutant HLTF proteins, and to examine the effect of the mutations.
- To test the ligase and helicase activities of the purified proteins, which are probably not affected by the HIRAN mutation, to exclude the possibility of structural mutations.
- To investigate whether the HIRAN domain has any effect on replication fork reversal activity.
- To investigate the *in vivo* function of the mutant HLTF proteins via sensitivity assay and comet assay using DNA-damaging agents.
- To purify the HIRAN domain to examine its DNA-binding ability and to specify the preferred DNA structures.

In the course of our work, we gained the following results:

- We generated a HIRAN domain deletion and a double point mutant HLTF protein, overexpressed in yeast, and purified parallelly with the wild-type protein to homogeneity by affinity chromatography.
- We showed that the HIRAN mutant proteins retain their ubiquitin ligase, ATPase and dsDNA-dependent helicase activities.
- We demonstrated that the HIRAN mutant HLTF proteins are not able to reverse the replication fork, either on an oligonucleotide or on a plasmid-based replication fork-like substrate.
- Using *in vivo* experiments, we revealed that under UV treatment the expression of HIRAN domain mutant HLTF protein cannot complement the sensitivity of the stable silenced cell line.
- Using comet assay, we showed that under UV treatment HLTF-silent cells need longer time to fully replicate. The expression of HIRAN mutant HLTF proteins did not complement this effect. In *in vivo* experiments, HLTF mutants seemed to be null mutants.
- We generated wild-type and double point mutant HIRAN domain-expressing plasmids. We overexpressed the proteins in yeast, and purified them using affinity chromatography.
- We showed in gel-shift experiments that the point mutant HIRAN domain is not able to bind DNA.

- We demonstrated that the wild-type HIRAN domain is able to bind ssDNA and the replication fork-like structure.
- In a competition assay, the replication fork-like structure proved to be a better substrate than ssDNA.

## 10. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Haracska Lajosnak**, hogy 2006-ban csatlakozhattam a csoportjához. Köszönöm a lehetőséget, a sok rám fordított energiát, türelmet, és a rengeteg segítséget.

Köszönettel tartozom **Pintér Lajosnak**, aki bevezetett a kutatás sokszor nehéz, de csodás világába. Köszönöm a rengeteg átadott szellemi és technikai tudást, a sok jó tanácsot, a szakmai és baráti beszélgetéseket, és hogy megmutatta azt a szemléletet, amivel igazán jó kutatóvá válhat az ember.

Köszönöm továbbá **Fekete Ildikónak**, **Kovács Katalinnak**, és **Nótári Péterné Icunak** a technikai segítséget, amivel könnyebbé tették a labormunkát.

Köszönöm **Yathish Jagadheesh Acharnak** a szakmai segítségét és hasznos tanácsait!

Szeretném megköszönni **Juhász Szilviának**, **Mórocz Mónikának**, **Tick Gabriellának** és **Burkovics Péternek** a kísérletekben és a cikkek megírásában nyújtott segítséget!

Köszönettel tartozom továbbá **laborunk egykori és jelenlegi tagjainak**, hogy mindenben segítettek, amiben tudtak.

Különösen köszönöm **Döme Lilinek**, **Frittmann Orsolyának** és **Tóth Róbertnek**, hogy mindig számíthattam rájuk, mind szakmai, mind egyéb tekintetben, és amiért mindig örömtelivé tették a néha nehéz pillanataimat.

Köszönöm külföldi partnereinknek, **Česlovas Venclovasnak**, **Dante Neculainak**, **Sirano Dhe-Paganonnak** és **Shunichi Takedának** a segítséget.

Szeretnék köszönetet mondani **egykori tanárainknak**, akik erősítették bennem a természettudományos pálya iránti szeretetemet. Kiemelném gimnáziumi tanárait, **Lampert Zoltán** biológia, **Smiger András** kémia és fizika tanáromat, valamint **Dr.**

**Boros Imre Miklós, Dr. Maróy Péter és Dr. Török Tibor** egyetemi tanárait, akiknek köszönhetően ragadott meg véglegesen e tudományterület szépsége.

Köszönöm **Dr. Honti Viktornak** és **Dr. Pankotai Tibornak**, amiért rövid határidővel elvállalták dolgozatom bírálatát!

Köszönöm továbbá az **SZBK Genetikai Intézet vezetőinek, és minden tagjának**, akik valamilyen módon hozzájárultak dolgozatom megírásához, valamint szakmai segítséget nyújtottak.

Végezetül szeretném megköszönni **családomnak, rokonaimnak, és barátaimnak**, hogy mindig mellettem álltak, és mindenben számíthattam rájuk. Köszönöm!

## 11. Saját közlemények jegyzéke

### A dolgozat alapját képező közlemények:

*Achar Yathish<sup>#</sup>, Balogh David<sup>#</sup>, Neculai Dante<sup>#</sup>, Juhasz Szilvia, Morocz Monika, Gali Himabindu, Dhe-Paganon Sirano, Venclovas Ceslovas, Haracska Lajos.* Human HLTf mediates postreplication repair by its HIRAN domain-dependent replication fork remodelling. NUCLEIC ACIDS RESEARCH &: pp. in-press. (2015). **IF: 9.11** MTMT: 2933791

*Burkovics P, Sebesta M, Balogh D, Haracska L, Krejci L.* Strand invasion by HLTf as a mechanism for template switch in fork rescue. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 42:(3) pp. 1711-1720. (2014) **IF: 9.11** MTMT: 2549960

### További közlemények:

*Achar YJ, Balogh D, Haracska L.* Coordinated protein and DNA remodeling by human HLTf on stalled replication fork. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 108:(34) pp. 14073-14078. (2011) **IF: 9.67** MTMT: 1921828

*Juhasz 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 RESEARCH 40: pp. 10795-10808. (2012) **IF: 9.11** MTMT: 2106876



## 12. Referenciák

1. Moriwaki, S. & Takahashi, Y. Photoaging and DNA repair. *J. Dermatol. Sci.* **50**, 169–76 (2008).
2. Jorns, M., Baldwin, E., Sancar, G. & Sancar, A. Action mechanism of *Escherichia coli* DNA photolyase. II. Role of the chromophores in catalysis. *J. Biol. Chem.* **262**, 486–491 (1987).
3. Gerson, S. L. Regeneration of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human lymphocytes after nitrosourea exposure. *Cancer Res.* **48**, 5368–73 (1988).
4. Falnes, P. Ø. & Rognes, T. DNA repair by bacterial AlkB proteins. *Res. Microbiol.* **154**, 531–538 (2003).
5. Li, G.-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* **18**, 85–98 (2008).
6. Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T. & Leiros, I. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 981–93 (2009).
7. de Laat, W. L., Jaspers, N. G. & Hoeijmakers, J. H. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* **13**, 768–85 (1999).
8. Gratchev, A., Strein, P., Utikal, J. & Goerdts, S. Molecular genetics of Xeroderma pigmentosum variant. *Exp. Dermatol.* **12**, 529–536 (2003).
9. Kraemer, K. H. *et al.* Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: A complex genotype–phenotype relationship. *Neuroscience* **145**, 1388–1396 (2007).
10. Mazin, A. V & Kowalczykowski, S. C. The function of the secondary DNA-binding site of RecA protein during DNA strand exchange. *EMBO J.* **17**, 1161–8 (1998).
11. Aylon, Y. New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **566**, 231–248 (2004).
12. Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U. & Schwarz, K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 712–20 (2003).
13. Koken, M. H. *et al.* Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene RAD6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 8865–9 (1991).
14. Schlesinger, D. H., Goldstein, G. & Niall, H. D. The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* **14**, 2214–8 (1975).

15. Fang, S. & Weissman, A. M. A field guide to ubiquitylation. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 1546–61 (2004).
16. Bernassola, F., Karin, M., Ciechanover, A. & Melino, G. The HECT Family of E3 Ubiquitin Ligases: Multiple Players in Cancer Development. *Cancer Cell* **14**, 10–21 (2008).
17. Jackson, P. K. *et al.* The lore of the RINGS: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* **10**, 429–39 (2000).
18. Hatakeyama, S. & Nakayama, K. I. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 635–45 (2003).
19. Koegl, M. *et al.* A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**, 635–44 (1999).
20. Li, W. & Ye, Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2397–406 (2008).
21. Andersen, P. L., Xu, F. & Xiao, W. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res.* **18**, 162–73 (2008).
22. Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135–141 (2002).
23. Barbour, L. & Xiao, W. Regulation of alternative replication bypass pathways at stalled replication forks and its effects on genome stability: a yeast model. *Mutat. Res.* **532**, 137–55 (2003).
24. Davies, A. A., Huttner, D., Daigaku, Y., Chen, S. & Ulrich, H. D. Activation of Ubiquitin-Dependent DNA Damage Bypass Is Mediated by Replication Protein A. *Mol. Cell* **29**, 625–636 (2008).
25. LEHMANN, A. *et al.* Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair (Amst).* **6**, 891–899 (2007).
26. Prakash, S., Johnson, R. E. & Prakash, L. EUKARYOTIC TRANSLESION SYNTHESIS DNA POLYMERASES: Specificity of Structure and Function. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 317–353 (2005).
27. Nelson, J. R., Lawrence, C. W. & Hinkle, D. C. Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science* **272**, 1646–9 (1996).
28. Masutani, C., Kusumoto, R., Iwai, S. & Hanaoka, F. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase  $\epsilon$ . *EMBO J.* **19**, 3100–9 (2000).
29. Washington, M. T., Johnson, R. E., Prakash, L. & Prakash, S. Accuracy of lesion bypass by yeast and human DNA polymerase  $\epsilon$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 8355–60 (2001).

30. Cordonnier, A. M. & Fuchs, R. P. Replication of damaged DNA: molecular defect in xeroderma pigmentosum variant cells. *Mutat. Res.* **435**, 111–9 (1999).
31. Jansen, J. G. *et al.* Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice. *J. Exp. Med.* **203**, 319–23 (2006).
32. Lawrence, C. W. *DNA Repair and Replication. Advances in protein chemistry* **69**, (Elsevier, 2004).
33. Guo, C. *et al.* Mouse Rev1 protein interacts with multiple DNA polymerases involved in translesion DNA synthesis. *EMBO J.* **22**, 6621–30 (2003).
34. Murakumo, Y. *et al.* Interactions in the error-prone postreplication repair proteins hREV1, hREV3, and hREV7. *J. Biol. Chem.* **276**, 35644–51 (2001).
35. Ohmori, H., Ohashi, E. & Ogi, T. Mammalian Pol kappa: regulation of its expression and lesion substrates. *Adv. Protein Chem.* **69**, 265–78 (2004).
36. Tissier, A. *et al.* Co-localization in replication foci and interaction of human Y-family members, DNA polymerase pol eta and REV1 protein. *DNA Repair (Amst)*. **3**, 1503–14 (2004).
37. Johnson, R. E., Washington, M. T., Prakash, S. & Prakash, L. Fidelity of human DNA polymerase eta. *J. Biol. Chem.* **275**, 7447–50 (2000).
38. Tissier, A. *et al.* Misinsertion and bypass of thymine-thymine dimers by human DNA polymerase iota. *EMBO J.* **19**, 5259–66 (2000).
39. Choi, J.-Y. *et al.* Translesion Synthesis across O6-Alkylguanine DNA Adducts by Recombinant Human DNA Polymerases. *J. Biol. Chem.* **281**, 38244–38256 (2006).
40. Dumstorf, C. A. *et al.* Participation of mouse DNA polymerase iota in strand-biased mutagenic bypass of UV photoproducts and suppression of skin cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18083–8 (2006).
41. Ogi, T., Ohashi, E. & Ohmori, H. [Mutagenesis by Escherichia coli DinB and its mammalian homolog Pol kappa]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* **46**, 1155–61 (2001).
42. Ogi, T. & Lehmann, A. R. The Y-family DNA polymerase  $\kappa$  (pol  $\kappa$ ) functions in mammalian nucleotide-excision repair. *Nat. Cell Biol.* **8**, 640–642 (2006).
43. Ogi, T., Kannouche, P. & Lehmann, A. R. Localisation of human Y-family DNA polymerase kappa: relationship to PCNA foci. *J. Cell Sci.* **118**, 129–36 (2005).
44. Haracska, L., Prakash, S. & Prakash, L. Yeast DNA polymerase zeta is an efficient extender of primer ends opposite from 7,8-dihydro-8-Oxoguanine and O6-methylguanine. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1453–9 (2003).
45. Johnson, R. E., Washington, M. T., Haracska, L., Prakash, S. & Prakash, L. Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature* **406**, 1015–9 (2000).

46. Bemark, M., Khamlichi, A. A., Davies, S. L. & Neuberger, M. S. Disruption of mouse polymerase zeta (Rev3) leads to embryonic lethality and impairs blastocyst development in vitro. *Curr. Biol.* **10**, 1213–6 (2000).
47. Esposito, G. *et al.* Disruption of the Rev3l-encoded catalytic subunit of polymerase zeta in mice results in early embryonic lethality. *Curr. Biol.* **10**, 1221–4 (2000).
48. Wittschieben, J. *et al.* Disruption of the developmentally regulated Rev3l gene causes embryonic lethality. *Curr. Biol.* **10**, 1217–20 (2000).
49. Bienko, M. *et al.* Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science* **310**, 1821–4 (2005).
50. Guo, C. *et al.* Ubiquitin-Binding Motifs in REV1 Protein Are Required for Its Role in the Tolerance of DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8892–8900 (2006).
51. Parker, J. L., Bielen, A. B., Dikic, I. & Ulrich, H. D. Contributions of ubiquitin- and PCNA-binding domains to the activity of Polymerase eta in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **35**, 881–9 (2007).
52. Plosky, B. S. *et al.* Controlling the subcellular localization of DNA polymerases iota and eta via interactions with ubiquitin. *EMBO J.* **25**, 2847–55 (2006).
53. Wood, A., Garg, P. & Burgers, P. M. J. A ubiquitin-binding motif in the translesion DNA polymerase Rev1 mediates its essential functional interaction with ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **282**, 20256–63 (2007).
54. Acharya, N., Brahma, A., Haracska, L., Prakash, L. & Prakash, S. Mutations in the ubiquitin binding UBZ motif of DNA polymerase eta do not impair its function in translesion synthesis during replication. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7266–72 (2007).
55. Nikolaishvili-Feinberg, N. *et al.* Ubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen and recruitment of human DNA polymerase eta. *Biochemistry* **47**, 4141–50 (2008).
56. Frampton, J. Postreplication Repair and PCNA Modification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2976–2985 (2006).
57. Gangavarapu, V. *et al.* Mms2-Ubc13-dependent and -independent roles of Rad5 ubiquitin ligase in postreplication repair and translesion DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7783–90 (2006).
58. Chiu, R. K. *et al.* Lysine63 Polyubiquitination Guards Against Translesion Synthesis Induced Mutations. *PLoS Genet.* **preprint**, e116 (2005).
59. Motegi, A. *et al.* Human SHPRH suppresses genomic instability through proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *J. Cell Biol.* **175**, 703–8 (2006).

60. Unk, I. *et al.* Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18107–12 (2006).
61. Sood, R. *et al.* Cloning and characterization of a novel gene, SHPRH, encoding a conserved putative protein with SNF2/helicase and PHD-finger domains from the 6q24 region. *Genomics* **82**, 153–61 (2003).
62. Motegi, A. *et al.* Polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTF and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 12411–6 (2008).
63. Unk, I. *et al.* Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 3768–3773 (2008).
64. Moinova, H. R. *et al.* HLTF gene silencing in human colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 4562–4567 (2002).
65. Iyer, L. M., Babu, M. M. & Aravind, L. The HIRAN domain and recruitment of chromatin remodeling and repair activities to damaged DNA. *Cell Cycle* **5**, 775–82 (2006).
66. Blastyák, A. *et al.* Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Mol. Cell* **28**, 167–75 (2007).
67. Blastyák, A., Hajdú, I., Unk, I. & Haracska, L. Role of double-stranded DNA translocase activity of human HLTF in replication of damaged DNA. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 684–93 (2010).
68. Achar, Y. J., Balogh, D. & Haracska, L. Coordinated protein and DNA remodeling by human HLTF on stalled replication fork. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14073–8 (2011).
69. Subramanian, D. & Griffith, J. D. p53 Monitors Replication Fork Regression by Binding to ‘Chickenfoot’ Intermediates. *J. Biol. Chem.* **280**, 42568–42572 (2005).
70. Fouché, N., Ozgür, S., Roy, D. & Griffith, J. D. Replication fork regression in repetitive DNAs. *Nucleic Acids Res.* **34**, 6044–50 (2006).
71. Burkovics, P., Sebesta, M., Balogh, D., Haracska, L. & Krejci, L. Strand invasion by HLTF as a mechanism for template switch in fork rescue. *Nucleic Acids Res.* **42**, 1711–20 (2014).
72. Neelsen, K. J. & Lopes, M. Replication fork reversal in eukaryotes: from dead end to dynamic response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 207–20 (2015).
73. Hu, L. *et al.* Two replication fork maintenance pathways fuse inverted repeats to rearrange chromosomes. *Nature* **501**, 569–72 (2013).

74. Bétous, R. *et al.* SMARCAL1 catalyzes fork regression and Holliday junction migration to maintain genome stability during DNA replication. *Genes Dev.* **26**, 151–62 (2012).
75. Ciccia, A. *et al.* Polyubiquitinated PCNA recruits the ZRANB3 translocase to maintain genomic integrity after replication stress. *Mol. Cell* **47**, 396–409 (2012).
76. Kile, A. C. *et al.* HLTF's Ancient HIRAN Domain Binds 3' DNA Ends to Drive Replication Fork Reversal. *Mol. Cell* **58**, 1090–100 (2015).
77. Ikegaya, Y., Hara, K., Hishiki, A., Yokoyama, H. & Hashimoto, H. Crystallographic study of a novel DNA-binding domain of human HLTF involved in the template-switching pathway to avoid the replication arrest caused by DNA damage. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **71**, 668–670 (2015).
78. Hishiki, A. *et al.* Structure of a Novel DNA-binding Domain of Helicase-like Transcription Factor (HLTF) and Its Functional Implication in DNA Damage Tolerance. *J. Biol. Chem.* **290**, 13215–23 (2015).