

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

Ph.D. értekezés

Halmai Miklós

Témavezető: Dr. Unk Ildikó

Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

SZTE Természettudományi és Informatikai Kar

Szeged 2017

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
ÁBRÁK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	7
1.1 DNS reparáció és DNS hiba tolerancia	7
1.2 DNS reparációs és DNS hiba tolerancia útvonalak	10
1.2.1 Reparációs episztázis csoportok	10
1.2.2 A bázis excíziós reparáció (BER)	10
1.2.3 A nukleotid excíziós reparáció (NER)	12
1.2.4 DNS hiba tolerancia (Rad6/Rad18 útvonal)	15
1.2.4.1 PCNA ubiquitiláció és PCNA sumoiláció	16
1.2.4.2 Transzléziós DNS szintézis (TLS)	18
1.4.2.3 DNS hiba tolerancia templát váltással (Rad5 útvonal)	22
1.2.5 Kettős szálú DNS töréseket javító mechanizmusok	24
1.2.6 Tévesen párosodott bázisok javítása (Mismatch reparáció, MMR)	28
1.3 A PCNA fehérje szerkezete és funkciói	30
1.3.1 A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PCNA fehérje kémiai-szerkezeti jellemzői	30
1.3.2 A PCNA fehérje funkciói	31
1.3.3 Fehérjekötő régiók a PCNA molekulán	37
1.3.4 Új fehérjekötő felszín a PCNA alegységek kapcsolódási felszínén	39
1.4 Célkitűzések	42
2. ANYAGOK ÉS KÍSÉRLETI ELJÁRÁSOK.....	43
2.1 Élesztő (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) és <i>Escherichia coli</i> törzsek	43
2.2 Plazmidok, DNS konstruktok	43
2.3 Táploldatok, táplemezek	44
2.4 Homológ rekombináción alapuló génkiütés élesztő sejtekben	45
2.5 POL30 (PCNA) pontmutások létrehozása PCR alapú helyspecifikus mutagenézissel	46
2.6 POL30 pontmutáns gének genomba integrálása	48
2.7 DNS károsító hatásra mutatott érzékenység kvalitatív kimutatása (spot assay)	49
2.8 DNS károsító hatásra mutatott érzékenység kvantitatív mérése	49
2.9 UV által indukált mutációs frekvencia mérése	50
2.10 Spontán mutációs ráta mérése	50
2.11 GST-fúziós fehérjék tisztítása, fehérje kölcsönhatások in vitro vizsgálata (GST-pulldown)	51

2.12 Natív (nem denaturáló körülmények között végzett) grádiens akrilamid gélelektroforézis	52
2.13 Az UV károsítás génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata LacZ riporter használatával...	53
2.14 Statisztikai kiértékelés.....	54
3. EREDMÉNYEK	55
3.1 Mutációkat hordozó POL30 gének és PCNA fehérjék	55
3.2 A POL30 mutáns élesztő törzsek fenotípus vizsgálata	58
3.3 A POL30 mutáns élesztő törzsek genetikai, funkcionális és biokémiai jellemzése	64
3.3.1 A <i>pol30-L154A</i> élesztő törzs.....	65
3.3.2 A <i>pol30-II99,100AA</i> PCNA allél	72
3.3.3 A <i>pol30-D109A</i> élesztő törzs.....	77
3.3.4 A <i>pol30-III181,182AA</i> élesztő törzs.....	82
3.3.5 A <i>pol30-FE103,104AA</i> allél	88
4. MEGVITATÁS ÉS ÖSSZEGZÉS	91
5. IRODALOMJEGYÉK	95
6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	101
7. ÖSSZEFOGLALÁS	102
8. SUMMARY	105

Rövidítések jegyzéke

AP	Abasic site (abázikus hely)
BER	Base excision repair (bázis excíziós reparáció)
CDK	Cyclin dependent kinase (ciklin függő kináz)
CPD	Ciklobutane pyrimidine dimer
CSA	Cockayne syndrome A gene (Cockayne szindróma A gén)
CSB	Cockayne syndrome B gene (Cockayne szindróma A gén)
DDT	DNA damage tolerance (DNS hiba tolerancia)
DSB	Double strand break (kettős szálú DNS törés)
DSBR	Double strand break repair (kettős szálú DNS törés-reparáció)
GC	Gene conversion (génkonverzió)
GGR	Global genome repair (teljes genom reparáció)
GST	Glutathione sepharose transferase
HR	Homologous recombination (homológ rekombináció)
HU	Hydroxi urea
ICL	Interdomain connecting loop (interdomén hurok)
MMR	Mismatch repair (tévesen párosodott bázisok javítása)
MMS	Metil-methane sulphonate
NER	Nucleotide excision repair (nukleotid excíziós reparáció)
NHEJ	Non homologous end joining (nem homológ DNS végek összekapcsolása)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
RE	Reciprocal exchange (reciprok kicserélődés)
RFC	Replication factor C
RPA	Replication protein A
SC	Synthetic complete media (Szintetikus komplett táptalaj/oldat)
SDS	Sodium dodecil sulphate
SDSA	Synthesis dependent strand annealing
SUMO	Small ubiquitin like modifier (ubiquitinszerű módosító peptid)
TCR	Transcription coupled repair (transzkripció-kapcsolt reparáció)
TLS	Tranlesion DNS synhtesis (transzléziós DNS szintézis)
XP	Xeroderma pigmentosum
XPV	Xeroderma pigmentosum variant form

Ábrák jegyzéke

1. **ábra:** A DNS károsodások eredete és a rájuk adott sejtválaszok sokszínűsége
2. **ábra:** Az abázikus helyek eredete és következményei élesztő sejtekben
3. **ábra:** Nukleotid excíziós reparáció emlős sejtekben
4. **ábra:** DNS hiba tolerancia útvonalak (DDT)
5. **ábra:** A PCNA poszttranszlációs módosításai, és az általuk irányított folyamatok
6. **ábra:** A DNS polimerázok doménszerkezete
7. **ábra:** Az ubiquitilált PCNA és a DNS polimerázok kapcsolódása
8. **ábra:** A Rad5 fehérje és humán homológjainak doménszerkezete
9. **ábra:** A Rad5 fehérje *in vitro* aktivitása oligonukleotid szubsztrátokon
10. **ábra:** A homológ rekombináció
11. **ábra:** A homológ rekombináció Holliday-hurkának feloldására alkotott modellek
12. **ábra:** A PCNA kristályszerkezete
13. **ábra:** A PCNA poszttranszlációs módosításai
14. **ábra:** A PCNA irányító szerepe a DNS hiba tolerancia útvonalak felett
15. **ábra:** Több kölcsönható partner osztozik a PCNA három fehérjekötő régióján
16. **ábra:** Fehérjekötésben fontos aminosavak a PCNA monomerek kapcsolódási felszínén
17. **ábra:** A helyspecifikus PCR alapú mutagenézis működési elve
18. **ábra:** Az előállított aminosav cserék helye a PCNA fehérje trimer gyűrűjének kristályszerkezeti modelljén.
19. **ábra:** A pontmutációkat hordozó *POL30* gének előállításához használt oligonukleotid párok szekvenciája
20. **ábra:** *POL30* mutáns élesztő törzsek növekedési sebessége
21. **ábra:** Az előállított *POL30* mutáns törzsek UV érzékenysége
22. **ábra:** Az előállított *POL30* mutáns törzsek MMS érzékenysége
23. **ábra:** A mutáns PCNA fehérjéket termelő törzsek UV és MMS érzékenysége
24. **ábra:** Episztázis analízis az L154A mutáns PCNA-t termelő törzsszel
25. **ábra:** A DDT (Rad6/Rad18) útvonal inaktív az L15A PCNA változatot termelő törzsben
26. **ábra:** Pontmutációk képződése a *pol30-L154A* élesztő törzsben
27. **ábra:** Episztázis analízis vizsgálat az II99,100AA PCNA-t termelő törzsszel

- 28. ábra:** A *pol30-II99,100AA* gén és a Rad6/Rad18 útvonal génjeinek viszonya
- 29. ábra:** UV-indukált és spontán mutációs ráta a *pol30-II99,100AA* élesztő törzsben
- 30. ábra:** A vad típusú PCNA, és az II99,100AA PCNA fehérjék kölcsönhatása GST gyöngyön immobilizált REV1 fehérjével
- 31. ábra:** A D109A aminosavcsere a NER működését érinti
- 32. ábra:** Mutációs ráták a D109A PCNA változatot termelő élesztő törzsben
- 33. ábra:** A *pol30-D109A* és a NER gének genetikai kapcsolatának vizsgálata
- 34. ábra:** A *pol30-III181,182AA* allél a rekombinációs útvonal működését befolyásolja
- 35. ábra:** Az UV indukált mutációs ráta, és a spontán mutagenesis mértéke a *pol30-III181,182AA* törzsben
- 36. ábra:** A vad típusú PCNA, és az II181,182AA PCNA fehérjék kölcsönhatása a Rad54 fehérjével
- 37. ábra:** A mutáns PCNA változatok trimer stabilitása
- 38. ábra:** Episztázis vizsgálatok a *pol30-FE103,104AA* génnel

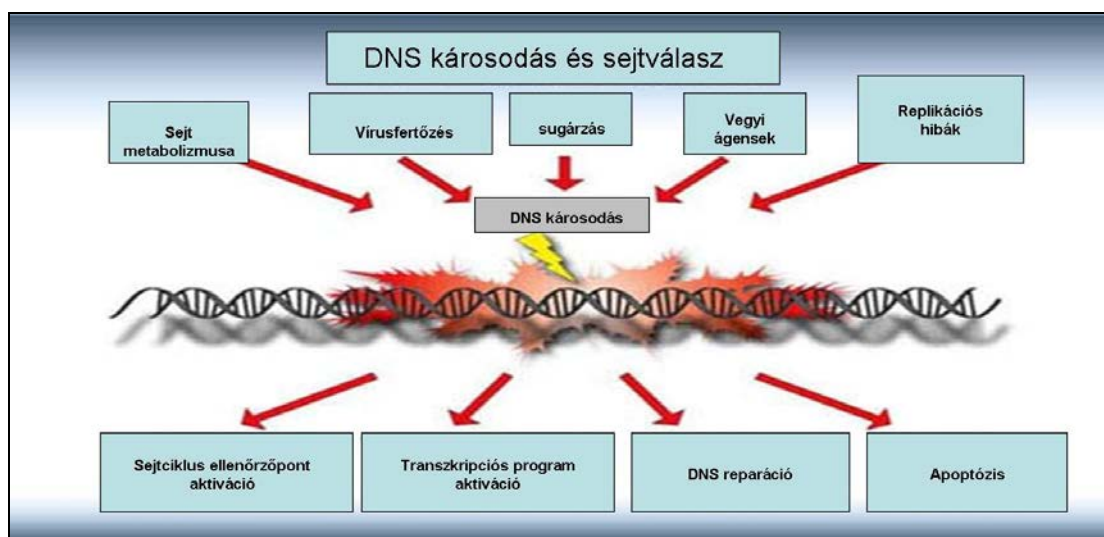
1. Bevezetés

1.1 DNS reparáció és DNS hiba tolerancia

A sejtek örökítő anyagát folyamatos jelleggel számos külső és belső hatás károsítja. Tegyük említést az UV sugárzásról, a cigarettafüsttről, kipufogógázokban található nitrogén és kén-oxidokról, bizonyos munkahelyi kockázatokról-mérgekről, radioaktív sugárzásról, vagy a metabolikus folyamatok során keletkező reaktív oxigén gyökök által képződött károsodásokról.

Ha a DNS károsodások eredetét mégis kategorizálni szeretnénk (1. ábra), megállapíthatjuk, hogy azok keletkezhetnek a DNS bázisainak spontán hidrolízise, a környezeti hatások (például az UV sugárzás, ionizáló sugárzás, valamint DNS károsító vegyületek), és belső metabolikus DNS károsító ágensek jelenlétének (reaktív oxigén gyökök) eredményeképp. Egyes becslések szerint egy sejt DNS-ét naponta 10^4 - 10^6 károsodás éri. (Friedberg 1991, Lindahl and Wood 1999).

A DNS károsodások a replikáció, és a transzkripció folyamatát egyaránt gátolhatják. Az elakadt replikáció pedig programozott sejthalálhoz vezethet. (Lindahl and Wood 1999).



1.ábra: A DNS károsodások eredete és a rájuk adott sejtválaszok sokszínűsége

(forrás: www.ncu.edu.tw)

A sejtszintű túlélés biztosítása érdekében változatos **DNS reparációs útvonalak** alakultak ki, melyek a DNS károsodást eltávolítják, és rendelkezésre álló ép templát esetén

visszaállítják a DNS eredeti információtartalmát. A DNS hiba észlelésekor checkpoint fehérjék aktiválódnak és megállítják a sejt ciklust, amíg a DNS reparáció végbemegy. (Hoeijmakers 2001) Ezen DNS reparációs útvonalak bemutatására később (vö.1.2 fejezet) bővebben is kitérek.

A reparációs mechanizmusok működése ellenére elképzelhető- és egyben bizonyított, hogy maradnak olyan károsodások is, amelyek javítása nem történik meg a DNS replikáció kezdetéig. A szerkezeti módosulások a DNS replikáció folyamatosságát gátolhatják, ami a replikációs villa elakadását majd szétesését, kettős szálú DNS törések keletkezését, és végső soron apoptózis létrejöttét eredményezheti (Prakash and Prakash 2002). Azon folyamatokat, melyek a replikáció folyamatosságát hivatottak biztosítani, és nem a DNS károsodás eltávolítását végzik, **DNS hiba tolerancia folyamatoknak** nevezzük. A DNS hiba tolerancia működésének mechanisztikus részletei a máig napig csak részben ismertek, noha a tudományterületen intenzív munka folyik.

A DNS hiba tolerancia útvonalak jellemzője a túlélés bármely áron elvének megvalósítása. Tekinthesz rájuk „vészreakcióként” is, amelyek nem nyújtanak módot a DNS károsodásának helyreállítására, viszont a túlélés biztosításával lehetőséget adhatnak a DNS reparációs folyamatoknak a károsodás kijavítására egy újabb osztódási ciklusban.

A DNS hiba tolerancia útvonal (DNA damage tolerance, avagy DDT) tehát képes biztosítani a DNS szintézist DNS károsodáson keresztül is. Az elmúlt két évtizedben több új fehérjét, DNS polimeráz enzimet azonosítottak, amelyek speciális tulajdonságaiknak köszönhetően képesek a sérült bázisokkal szemben bázisokat beilleszteni, vagy éppen egy DNS hibával szemben beillesztett bázistól folytatni a DNS szintézist (vö.1.2.3 fejezet).

A DDT útvonal egyes DNS polimerázai a károsodott bázisokkal szemben nem a megfelelő komplementer bázist helyezik be, más enzimek pedig a hibás bázispártól kiindulva folytatják a szintézist (vö.1.2.3 fejezet). A DNS károsodásokon keresztüli replikáció tehát pontmutáció képzéshez vezethet. (Prakash and Prakash 2002)

Felmerülhet a kérdés, hogy miért jó a többsejtű élőlényeknek (ahol egy károsodott sejt pusztulása nem túl nagy költség) egy ilyen mutagén útvonal fenntartása? A feltételezések szerint az evolúcióban, a DNS szintézis során a DNS károsodások átírása közben keletkező mutációk a természetes szelekció választékát alkothatták. A gyors, és effektív DNS hiba tolerancia lehetővé teszi a replikációs villa újraindulását, ami pedig más, sokkal károsabb folyamatokat előzhet meg, mint például a kettős szálú DNS töréseket a károsodások környékén, és az ezzel járó kromoszóma instabilitást. Mivel a genom nagy részét nem kódoló szekvenciák alkotják, a képződő pontmutációk nagy része amúgy is csendes lesz.

A DDT útvonalon belül a mutagenezist végző tolerancia mechanizmusok mellett a károsodott DNS mutációmentes átírását biztosító mechanizmus is működik (vö.1.2.3 fejezet). Ezen mechanizmus nem használ alternatív, alacsony templáthűségű DNS polimerázokat, hanem a replikációs villa átrendezésével biztosítja a DNS károsodás hibamentes replikációját (vö.1.2.3 fejezet). Ha a replikációs villában elhelyezkedő PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) fehérje 164-es lizinje monoubiquitinált, a mutagén útvonal működik, ha ez a lizin poliubiquitinált, akkor a mutációmentes hiba átírás. Mint látjuk, ez esetben az ubiquitin általi poszttranszlációs módosítás nem degradációs szignálként, hanem funkciót szabályozó jelként működik. (Hoegge, Pfander et al. 2002)

A fent definiált DNS károsodás indukálta pontmutáció képzés, az úgynevezett mutagenezis kutatása, de a többi DNS tolerancia és reparációs útvonal vizsgálata is egyaránt nagy lendülettel folyik. Ha sikerülne befolyásolni a szabályozását, annak terápiás jelentősége lehetne. Az útvonal ágainak specifikus gátlása a ma meglévő rákgyógyszerek hatékonyságát növelheti.

A PCNA fehérje, amelynek vizsgálata jelen értekezés tárgyát képezi, sok tekintetben útválasztó. Láthattuk, hogy a DNS károsodásokon keresztül történő DNS szintézis mutagén illetve mutációmentes voltát poszttranszlációs módosulása szabályozza. Azonban a PCNA szerepe ennél jóval általánosabb. Ez egy esszenciális fehérje, amely a hozzá kapcsolódó replikatív DNS polimerázok (Pol δ , Pol ϵ) processzivitását biztosítja. A DNS-t körülvevő, három alegységből felépülő, gyűrűs szerzetű fehérje egyben a DNS hiba tolerancia specifikus DNS polimerázainak, és több más reparációs fehérjének is dokkolóhelye (Paunesku, Mittal et al. 2001). Elképzelhető tehát, hogy a PCNA minden olyan reparációs folyamatban szerepet játszik, amelyhez DNS szintézis szükséges (vö.1.3.2 fejezet). Miután, mint látni fogjuk (vö.1.2 fejezet), a legtöbb reparációs és DNS hiba tolerancia folyamat ilyen, kézenfekvőnek tűnt, hogy irányított pontmutációk sorozatát hozzuk létre az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) PCNA molekulán, olyan helyeket, felszíneket keresve, amelyek a PCNA fehérje reparációban, vagy DNS hiba toleranciában betöltött funkciójához elengedhetetlenek. Munkánkat a DNS reparációs és DNS hiba tolerancia folyamatok eukarióta alapmodelljén, *Saccharomyces cerevisiae* sejteken végeztük.

1.2 DNS reparációs és DNS hiba tolerancia útvonalak

Az értekezésem tárgyát képező PCNA fehérje számos reparációs útvonalban részt vesz (vö.1.3 fejezet). Az értekezés megértéséhez szükségeltetik tehát a kérdéses DNS reparációs és DNS hiba tolerancia útvonalak bővebb ismertetése. Az alábbi útvonalakban működő, bemutatásra kerülő fehérjék közül egyesek mutánsait genetikai munkámban felhasználtam, mások ismertetése az útvonalakról alkotott átfogóbb kép kialakítása miatt szükséges.

A bemutatott DNS reparációs és hiba tolerancia útvonalak a következők:

- Bázis excíziós reparáció (BER)
- Nukleotid excíziós reparáció (NER)
- DNS hiba tolerancia (DDT, Rad6/Rad18 útvonal)
- Kettős szálú DNS töréseket (DSB) javító mechanizmusok
- Mismatch reparáció (MMR, hibásan párosodott bázisok eltávolítása)

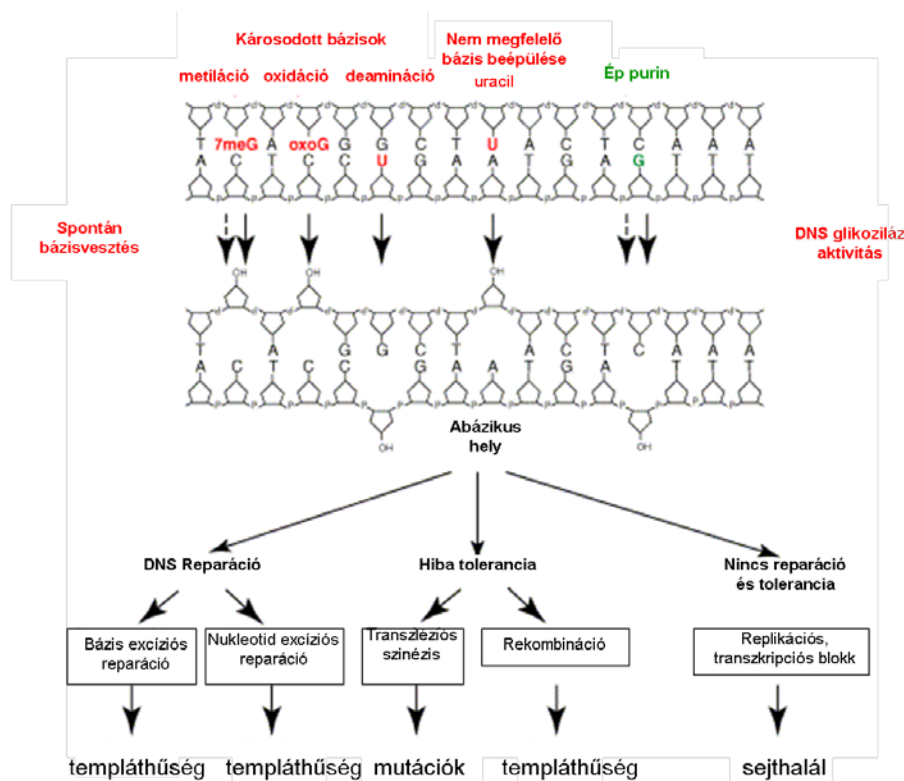
1.2.1 Reparációs episztázis csoportok

Az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) DNS reparációs génjeit az eukarióta szervezetek hasonló funkciót ellátó génjei közül elsőként azonosították. A sejteket UV-sugárzásnak kitéve elkülönítettek a sugárzásra szenzitív törzseket, amelyeket RAD névvel, és sorszámmal láttak el. A RAD radiáció érzékenységet jelent. Később az érzékenységet felelős gének térképezése és azonosítása után a géneket egymáshoz való viszonyuk alapján osztályozták, és az együttműködő, azonos reparációs útvonalban szereplő géneket csoportokba sorolták. Ezek az episztázis csoportok. Ma több ilyen nagy episztatikus csoportot különítünk el, melyek a fő reparációs útvonalaknak feleltethetők meg.

1.2.2 A bázis excíziós reparáció (BER)

A genomban a rendelkezésre álló adatok szerint naponta 10 000 körüli az elvesztett bázisok száma (Lindahl and Nyberg 1972). Ezeket az abázikus helyeket (AP) meg kell szüntetni, hiszen a transzkripciót, és a replikációs polimerázokat is gátolják. Az abázikus helyek közvetlenül az N-glikozidos kötés hidrolitikus hasadásával keletkezhetnek, de közvetetten maga a bázis excíziós reparáció is létrehozhatja a sérült (metilált, deaminált,

vagy oxidált) bázisok kivágásával. Az abázikus helyek megszüntetése a BER egyik specialitása, hiszen amint azt az alábbiakban láthatjuk, a BER működése első lépésében maga is egy abázikus helyet hoz létre, majd azt később eltávolítja.



2. ábra: Az abázikus helyek eredete és következményei élesztősejtekben. A lehetséges következmények: NER és BER általi javítás, rekombináció általi javítás, transzleziós szintézis, vagy mindezek hiányában a sejt halála. (módosítva: Boiteux and Guillet 2004)

Az abázikus helyeken kívül a bázis excíziós reparáció nagy hatékonysággal javítja a kisméretű, egy bázist érintő, a DNS hélix térszerkezetét nagymértékben nem befolyásoló báziskárosodásokat. Ilyenek például a 8-oxoguanin, 3-metiladenin, 7-metilguanin, az adenin deaminációjával keletkező hipoxantin és a guanin deaminációjával keletkező xantin (Memisoglu and Samson 2000, Boiteux and Guillet 2004). A BER-ben az első lépés a sérült bázis kivágása, melyet N-glükozidáz enzimek végeznek (a legismertebb ilyen enzimek az Ntg1, Ntg2, Ogg1, és Mag1). A keletkezett abázikus hely mellett ezután 5' oldalról egy specifikus endonukleáz hasít (Apn1, ritkábban az Apn2), majd az így keletkező egyes szálú DNS törés végéről a Rad27 (elágazáshoz közeli 5' vég környékére specifikus endonukleáz és 5'-3' exonukleáz aktivitású fehérje) emészt le 1-10 nukleotidos szakaszt. A Rad27 humán homológja a Fen 1 fehérje. Az exonukleáz aktivitás után

keletkező néhány nukleotidnyi hiányt a szabadon maradt 3'OH csoporttól kiindulva a DNS polimeráz ϵ tölti fel, majd a folytonosság ligálás által áll helyre (Wang, Wu et al. 1993, Boiteux and Guillet 2004).

A BER-t a kivágott nukleotidok száma alapján ún. short patch, és long patch folyamatokra oszthatjuk. A short patch BER-nél csupán egy nukleotid lecserélése történik, míg a long patch BER folyamán 2-10 új nukleotid szintetizálódik.

1.2.3 A nukleotid excíziós reparáció (NER)

A nukleotid excíziós reparáció többféle DNS károsodás felismerésében és eltávolításában nélkülözhetetlen. Legfontosabb feladata a DNS kettős hélix térszerkezetét megváltoztató nagyobb léziók (pl. az UV károsodás okozta pirimidin dimerek), és a DNS kettős szálon belüli keresztkötések eltávolítása. Kimutatták azonban, hogy a BER tárgyalásakor említett egyetlen bázist érintő módosulásokat (pl. abázikus helyeket), valamint oxidatív károsodásokat, és alkilált bázisokat is képes felismerni és javítani (Torres-Ramos, Johnson et al. 2000). A folyamat kivágja a sérülést és a körülötte elhelyezkedő 25-30 bázispárnyi DNS szakaszt a kettős hélixből. Az útvonalnak az UV károsodások javításában betöltött jelentőségét mutatja, hogy génjeinek hibája a Xeroderma pigmentosum nevű humán recesszíven öröklődő megbetegedést okozza, ami az UV sugárzás által kiváltott bőrrák kialakulásának kockázatát 2000-szer növeli. Az útvonal génjeinek emlős homológjait ezért XP-nek nevezik (Prakash and Prakash 2000). Élesztőben ezen útvonal génjeinek delécioja erős UV érzékenységet okoz.

A NER aktiválódása két különböző módon következhet be. A két útvonal a hibát érzékelő szenzorban különbözik, és emiatt külön nevet viselnek. A két útvonal neve **TCR** (transcription coupled repair), illetve **GGR** (global genome repair, 3.ábra).

A **TCR** aktiválódása aktívan átíródozó gének károsodásakor történik meg. A folyamat során a DNS hibánál elakadt RNS polimeráz II, és a hozzá lazán kapcsolódó **Rad26** (emlős homológja a CSB) fehérje észleli a DNS hibát. A Rad26 fehérje egy ATP-áz és helikáz aktivitással rendelkező fehérje, amely kromatin átrendezést is végez. A polimeráz felszínéhez elakadás esetén szorosabban kötődik a Rad26, és egyes vizsgálatok szerint kissé elmozdítja, mintegy hátratólja az RNS polimerázt. Ezután a Rad26 fehérjén keresztül megtörténik a reparációhoz szükséges komplex felépülése, amely végleg elmozdítja, hátrébb tolja az RNS polimerázt a transzkripciós buborékból. Amennyiben az RNS

polimeráz II a Def1 fehérje jelenlétében ubiquitilálódik, le is válhat a DNS-ről, és proteasomális lebontásra kerül (Prakash and Prakash 2000, Woudstra, Gilbert et al. 2002, Hanawalt and Spivak 2008). A TCR aktiválódásának újabban egy második, szintén az elakadó transzkripció apparátushoz kapcsolódó Rad26 független mechanizmusát is említik. Ebben az RNS polimeráz II Rpb9 nevű alegysége nélkülözhetetlen, a hiba felismerésének pontos mechanizmusa pedig még nem teljesen tisztázott.

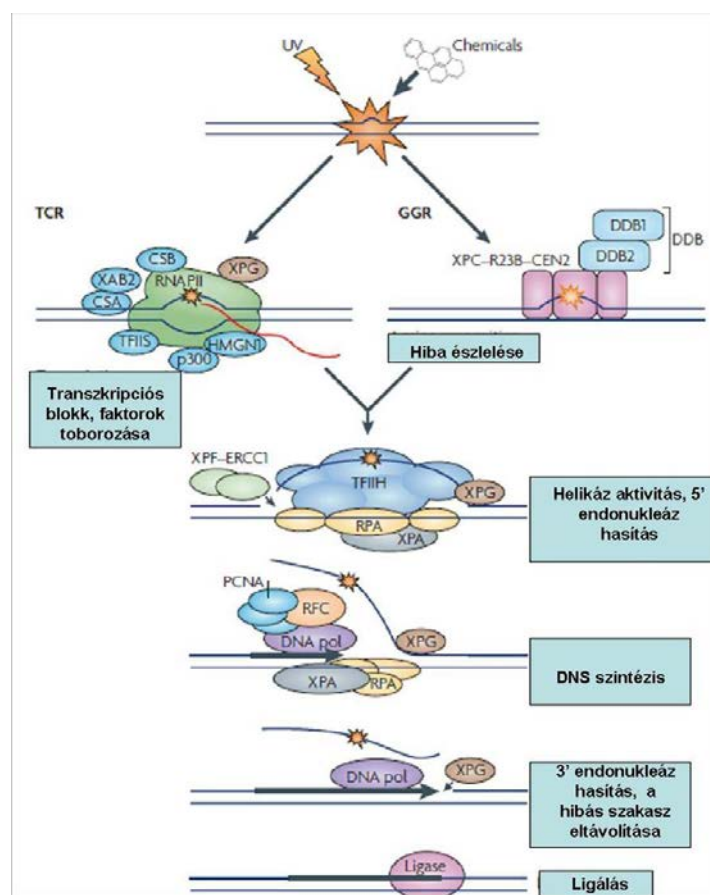
A TCR folyamatának további lépései innentől kezdve megegyeznek a NER másik ágának, a GGR-nek mechanizmusával.

A **GGR** mechanizmus aktiválódására olyan esetekben kerül sor, amikor a károsodás helyén nem zajlik transzkripció. Az érzékelő fehérjekomplex itt a **Rad7-Rad16** komplex (emlősökben a DDB-1, DDB2 fehérjék, azaz az XPE komplementációs csoport). Ez a komplex toborozza a helyszínre a Rad4 (emlősökben XPC) fehérjét, amely további alegységeket (RPA, Rad23) kötve létrehozza a DNS károsodás helyén a reparációs komplex felépüléséhez szükséges buborékot (Hanawalt and Spivak 2008).

A kezdeti különbségektől eltekintve a TCR és a GGR folyamatai a további lépésekben nem különböznek egymástól. A létrejött buborékot a **Rad14** (emlős homológja az XPA) fehérje és az RPA (replication protein A) stabilizálja. A Rad14 fehérje DNS kötő ún. Cink újj motívumot tartalmaz, mely a károsodás helyét nagyobb affinitással köti, mint az ép szerkezetű DNS-t. Az előbbieken leírt ún. preincíziós komplexhez kötődik egy sok alegységes TFIIH nevezetű transzkripció faktor, amelynek részese a Rad3 (humán homológja az XPB) és a Rad25 (humán homológja az XPD) fehérje. Utóbbi két faktor DNS helikáz, amelyek egymással szembe haladva több 10 bázispárnyi szakaszon szétcsavarják a DNS két szálát a károsodás két oldalán. A nyitott DNS struktúra keletkezése után először a károsodástól 5' irányban történik endonukleáz bemetszés a Rad1-Rad10 komplex (emlős homológja az XPF-ERCC) által, majd a hasítás helyén megindul a DNS szintézis. A replikáció PCNA jelenlétében Pol δ vagy Pol ϵ replikatív DNS polimerázok segítségével történik. A károsodás 3' végénél csak később történik a bemetszés, amelyet a Rad 2 (XPG) endonukleáz katalizál. A DNS folytonosságát ligáz reakció állítja helyre, és ezzel eltávolításra került a hibát tartalmazó DNS szakasz (3. ábra), és helyét egy újonnan szintetizált ép DNS szakasz foglalta el (Prakash and Prakash 2000, Svestrup 2007, Hanawalt and Spivak 2008).

Említésre méltó, hogy a NER későbbi folyamatait katalizáló génekben mutáns törzsek (amelyek magát a bemetszést, a helikáz aktivitást, a „nyitott konformáció” létrehozását katalizálják, pl. *rad14*, *rad1*, *rad10*, *rad25*) sokkal érzékenyebbek UV hatásra mint a hiba

érzékelését végző gének mutánsai (*rad23*, *rad7*, *rad16*, *rad26*). Az előbbieket ugyanis a teljes NER-t működésképtelenné teszik, míg a hiba felismerésében némileg sérült, de effektoraiiban hibátlan utóbbi törzsekben a nukleotid excízió bizonyos szinten működhet (Prakash and Prakash 2000).



3. ábra: Nukleotid excíziós reparáció emlős sejtekben. Bal oldalon a TCR ág, jobb oldalon a GGR ág látható, amelyek a NER közös útvonalába torkollnak. Bővebb leírás a szövegtörzsben (Hanawalt and Spivak 2008)

Emberi szervezetben a TCR génjeinek mutációi (CSB, illetve CSA) a Cockayne szindrómát okozzák, melynek tünetei a korai öregedés, idegrendszeri fejlődési zavarok, mikrocephalia, alacsony termet, osteoporosis és izomrángások, viszont a Cockayne nem okoz UV érzékenységet és nem hajlamosít tumorképződésre. Ennek oka egyfelől az, hogy a GGR folyamata aktív, a másik pedig, hogy amennyiben az elakadt RNS polimeráznál nem történik reparáció, apoptózis indukálódik. A fejlődési rendellenességek is ennek tudhatók be, hiszen az egyedfejlődés korai szakaszában intenzív anyagcsere és oxidatív folyamatok zajlanak az osztódó idegrendszerben. A keletkező oxidatív károsodásoknál

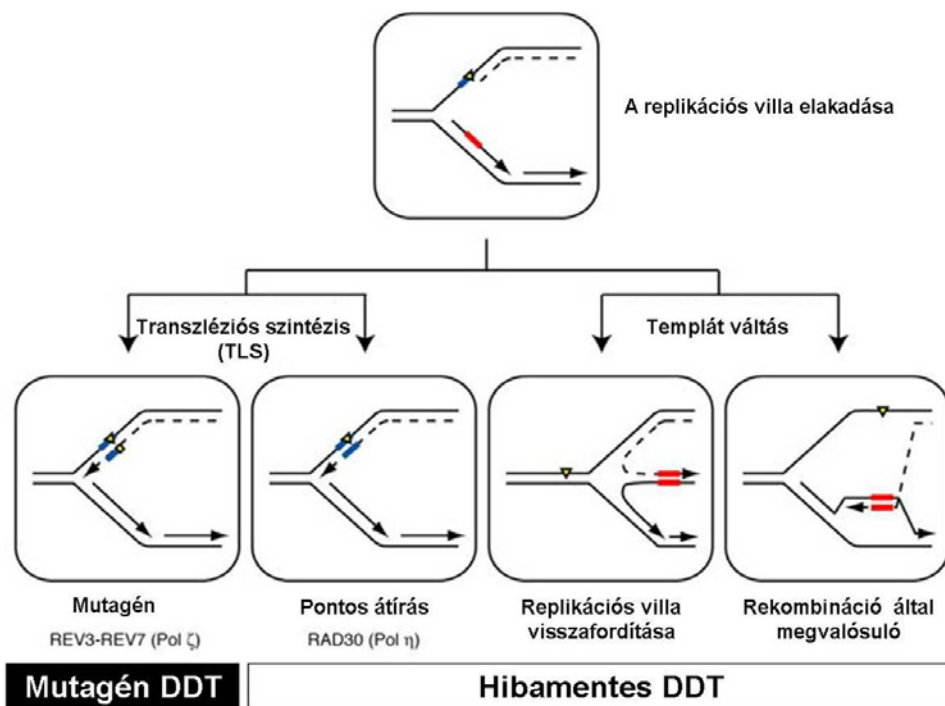
megakadt transzkripció a TCR javító folyamatok hiányában viszont fokozott szövetelhalást, apoptózist hoz létre (Hanawalt and Spivak 2008).

A GGR és a NER génjeinek mutációi (XPA-XPG) a Xeroderma pigmentosum betegséget váltják ki. A betegek rendkívül érzékenyek az UV fényre. Az állapot a test felszínén, a bőrön és egyes nyálkahártyákon fokozott tumorképződési hajlammal jár, és néhány belső, például a központi idegrendszerben keletkező tumor gyakoriságát is növeli (Hanawalt and Spivak 2008).

1.2.4 DNS hiba tolerancia (Rad6/Rad18 útvonal)

A reparációs útvonalak működése ellenére sok DNS sérülés javítatlan marad. Annak érdekében, hogy a sejtciklus zavartalanul haladjon, mindezen károsodásokat túl kell lépnie a replikációs apparátusnak. A jelen fejezetben tárgyalt tolerancia folyamatok nem távolítják el a károsodást, csupán lehetővé teszik annak replikációs „átírását”. A zavartalan replikáció előnye, hogy a sejtciklus továbbhaladása a későbbiekben lehetőséget nyújt más reparációs rendszereknek a javítás elvégzésére. A megakadó replikációs apparátus viszont azonnali apoptózist válthat ki. Az alábbiakban tárgyalt folyamatok működése sok esetben pontmutációt képez, mert ún. „nem klasszikus” DNS polimerázokat használ, amelyek magasabb hibarárával működnek a replikatív polimerázoknál.

A DNS károsodás tolerancia útvonal nem teljesen homogén. Legalább négy különböző ágát ismerjük (4. ábra, (Chang and Cimprich 2009)). A DNS károsodás tolerancia közös jellemzője, hogy aktiválódásában kulcsszerepet játszik a PCNA fehérje DNS károsodás függő ubiquitin általi poszttranszlációs módosulása. Az útvonalak közül kettő ún. transzléziós DNS szintézis, azaz a károsodáson keresztül történő replikáció, amely „nem klasszikus” DNS polimerázok által valósul meg. A másik két útvonal templát váltásos folyamat, amelyben az újonnan szintetizálódó DNS szál a replikációs villa átrendeződésének köszönhetően elkerüli a károsodott templátot, és új ép templátot keres magának (4. ábra). Az ép templát kézenfekvő módon a testvér kromatida újonnan szintetizálódott DNS szála, melynek információtartalma megegyezik a károsodott DNS száléval (Chang and Cimprich 2009).



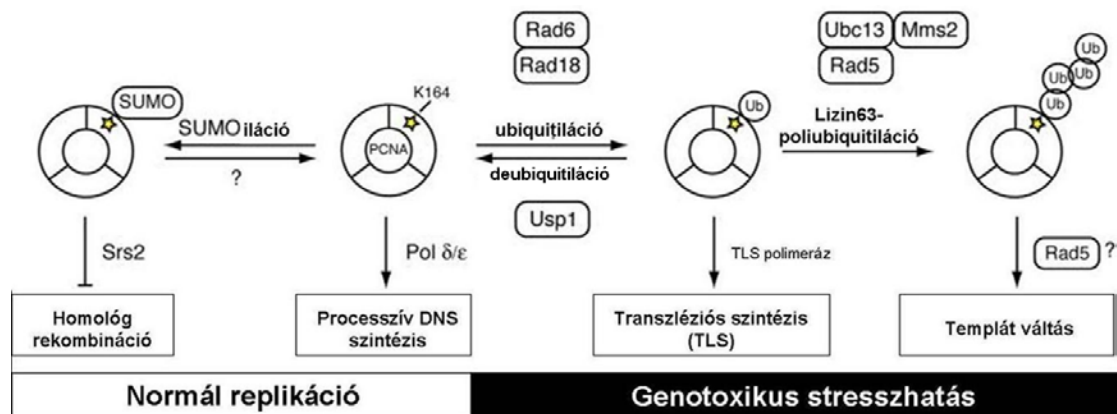
4. ábra: DNS hiba tolerancia útvonalak (DDT). A sárga háromszög a DNS károsodást jelképezi. A transzléziós szintézis sajátos transzléziós DNS polimerázokon keresztül valósul meg, enzimtől és károsodástól függően mutációt képző, illetve hibamentes végkimenetelű lehet. A templát váltás valójában a DNS károsodásnak a replikatív polimeráz általi elkerülése (módosítva: Chang and Cimprich 2009).

1.2.4.1 PCNA ubiquitiláció és PCNA sumoiláció

Mint értekezésem fő tárgyának, a PCNA molekulának egy teljes fejezetet szentelek a tézis későbbi részében. A legismertebb funkciója a DNS replikáció processzivitásának biztosítása, de a DNS polimerázokon kívül a PCNA fehérjéhez replikációs, és különböző DNS reparációs fehérjék kapcsolódnak (vö. 1.3 fejezet). A PCNA molekula egyben a DNS károsodás tolerancia folyamatok fő szabályozója (vö. 1.3.2 fejezet). A PCNA által ellenőrzött folyamatok sokfélesége miatt szükség lehet olyan jelre, amely egy adott útvonal aktiválása és végrehajtása mellett kötelezi el a sejtet. A DNS hiba tolerancia útvonal különböző ágainak aktiválódását a PCNA sajátos poszttranszlációs módosulásai határozzák meg (Chang and Cimprich 2009). A módosulások formája a sumoiláció, ubiquitiláció és poliubiquitiláció (Hoege, Pfander et al. 2002). A poszttranszlációs módosítások helye az összes eukarióta sejtben konzervált.

A PCNA monoubiquitilációja mindig csak DNS károsodást követően mutatható ki. A monoubiquitilációt a Rad6/Rad18 komplex végzi. A komplexben a Rad6 az ubiquitin

konjugáló (E2) enzim, a Rad18 pedig a ligáz (E3), azaz a szubsztrát specificitást kijelölő fehérje. Az ubiquitiláció a 164-es lizin aminosavon történik. A monoubiquitilált PCNA-t nagyobb affinitással kötik a „nem klasszikus” ún. transzléziós DNS polimerázok, mint a nem módosított PCNA molekulát (Garg, Stith et al. 2005). A monoubiquitiláció DNS polimeráz cseréhez vezet, melynek során a replikatív DNS polimeráz (Pol δ , Pol α és Pol ϵ) „nem klasszikus” transzléziós DNS polimerázokra cserélődik le (Prakash and Prakash 2002, Moldovan, Pfander et al. 2007). A transzléziós DNS polimerázok az alábbiakban tárgyalt tulajdonságaik miatt képesek átírni bizonyos DNS károsodásokat, megvalósítván a transzléziós DNS szintézist (4. és 5. ábra).



5.ábra: A PCNA poszttranszlációs módosulásai, és az általuk irányított folyamatok. A PCNA monoubiquitiláció a transzléziós szintézist (1.2.4.2. fejezet) , a poliubiquitiláció a templát váltást (1.2.4.3. fejezet) eredményezi. Az S fázisban jelen lévő sumoiláció a homológ rekombinációt gátolja(módosítva: Chang and Cimprich 2009) .

A poliubiquitilációt az Mms2/Ubc13 és a Rad5 fehérje komplexe végzi (Hoegge, Pfander et al. 2002). Az Mms2/Ubc13 az ubiquitin konjugáló enzim (E2), a Rad5 pedig az ubiquitin ligáz (E3) (Hofmann and Pickart 1999). A szabályozó poliubiquitin lánc felépülése a 63-as lizin aminosavon keresztül történik. Az ilyen kapcsolódás eltér a hagyományos, proteolitikus szignálként szolgáló 48-as lizin aminosavon keresztül felépülő poliubiquitin lánc szerkezetétől. A PCNA poliubiquitilációja a hibamentes és bizonyos lépéseiben még nem teljesen tisztázott templát váltás útvonalat aktiválja (vö.1.2.4.3 fejezet) (5. ábra).

A harmadik módosulási forma a PCNA sumoiláció. A PCNA sumoiláció szerepével és mechanizmusával bővebben a PCNA fehérje funkcióit tárgyaló 1.3.2-es fejezetben foglalkozok. A sumoiláció szintén a 164-es lizin aminosavon történik, de egy alternatív sumoilációs hely is előfordul a 127-es lizinen (Hoegge, Pfander et al. 2002). Élesztő sejtekben a sumoiláció az S fázisban kifejezetten észlelhető. A sumoilált PCNA nagy affinitással köti az Srs2 fehérjét, amely egy DNS helikáz. Az Srs2 lebontja az egyes szálú

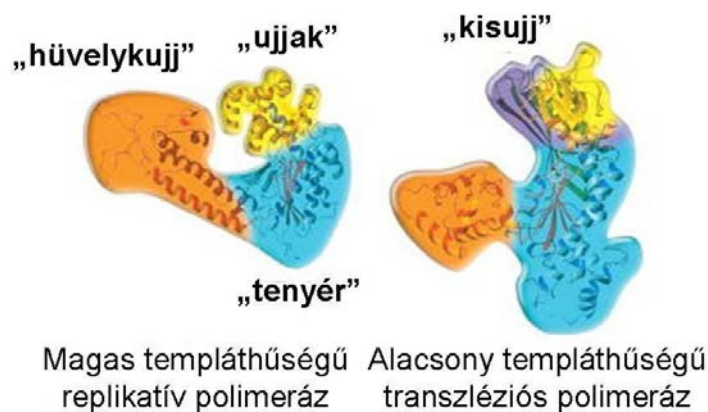
rekombinációs intermediereken felépülő Rad51 alkotta nukleoprotein filamentumot, ezáltal gátolva a homológ rekombináció bekövetkeztét (Papouli, Chen et al. 2005, Pfander, Moldovan et al. 2005, Watts 2006) (5. ábra). Ennek gyakorlati jelentősége különösen az S fázisban nagy, hiszen a replikációs villákban gyakoriak az egyes szálú DNS intermedierek, és az éppen szintézis alatt álló szálvégek, amelyek a rekombináció szubsztrátjává válhatnak.

1.2.4.2 Transzléziós DNS szintézis (TLS)

A kilencvenes években jelentősen bővült az ismert DNS polimerázok száma. Felfedeztek közöttük olyanokat is, amelyek fidelitásukban, azaz az információtartalom másolásának hűségében elmaradtak az addig ismert replikatív DNS polimerázoktól. Míg a replikatív DNS polimerázok hibaráta 10^{-5} körül mozog addig a „hibára hajlamos” „nem klasszikus” DNS polimerázok akár minden századik nukleotid behelyezésénél hibázhatnak (Prakash and Prakash 2002). Transzléziós DNS szintézis alatt a DNS károsodások „nem klasszikus” DNS polimerázok általi átírását értjük. Élesztősejtekben a transzléziós szintézis felelős a DNS károsodás indukálta pontmutációképzés nagy részéért.

A replikatív DNS polimerázok (Pol δ , Pol α , Pol ϵ) a polimerázok „B” családjába tartoznak. Magas fidelitásukat az 5'-3' exonukleáz (proofreading) aktivitásuknak köszönhetik. Kristályszerkezetüket egy emberi ököl háromdinemziós felépítéséhez hasonlítják (6. ábra). Az aktív központ kialakításában három domén, a „tenyér”, a „hüvelykujj”, és az „ujjak” vesznek részt. Ezek zárt, és meglehetősen rigid aktív központot képeznek, amelyikbe csupán egyetlen nukleotidnyi DNS templát fér be (Chang and Cimprich 2009).

A transzléziós DNS polimerázok (élesztőben a Pol η , Rev1, emlős sejtekben az előbbieket mellett a Pol κ , Pol ι) az „Y” polimeráz családot alkotják. Közös jellemzőjük egyike, hogy nem bírnak 5'-3' exonukleáz aktivitással, ezért magasabb a hibaráta. Osztoznak a „B” családhoz tartozó társaikkal az ököl formájú doménszerkezeten, azzal a különbséggel, hogy egy járulékos, kisujjnak nevezett domént is tartalmaznak (6. ábra). A kisujj domén növeli aktív centrumuk flexibilitását, így hibásan párosodott, vagy dimert képző templátok is beleférhetnek (Chang and Cimprich 2009).



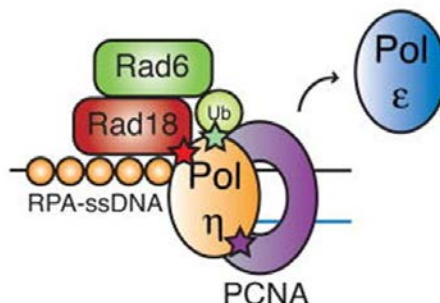
6.ábra: A DNS polimerázok doménszerkezete. A B családba tartozó DNS polimerázok (replikatív DNS polimerázok) aktív centruma zárt és rigid, míg a transzléziós polimerázok legtöbbjét magába foglaló Y családba tartozó DNS polimerázoké a „kisujj” doménnek köszönhetően (az ábrán lila színben) nyitottabb, flexibilisebb (Chang and Cimprich 2009).

A transzléziós szintézis aktiválója a PCNA molekula DNS károsodás függő monoubiquitilációja (vö.1.2.3.1 fejezet). A monoubiquitiláció hatása legalább két különböző módon segíti a „B” családba tartozó replikatív polimeráz „Y” családba tartozó transzléziós polimerázra való cseréjét.

Először is a Def1 fehérje ubiquitilált PCNA jelenlétében elősegíti a replikatív DNS polimeráz (Pol δ) katalitikus alegységének (Pol3) lebontását, ami helyet szabadít fel a PCNA felületén más polimerázok kapcsolódására. Csoportunk korábbi munkájában kimutattuk, hogy a Pol δ járulékos alegységei *in vitro* éppúgy képesek a Rev1 transzléziós polimeráz, mint saját katalitikus alegységük kötésére (Daraba, Gali et al. 2014). Másodsorban, a transzléziós polimerázok sajátossága, hogy erősebben kötődnek az ubiquitilált PCNA-hez mint a nem módosulthoz. A DNS polimerázokra általánosan jellemző PCNA kötő motívum mellett (vö.1.3.3 fejezet) rendelkeznek ugyanis ubiquitin kötő (UBZ) motívummal is, így az ubiquitinnel módosított PCNA molekulához egy helyett két helyen képesek rögzülni (Bienko, Green et al. 2005)(7.ábra). Az UBZ egy C2H2 típusú ubiquitin kötő Cink-ujj motívum, mely nélkülözhetetlen a transzléziós aktivitáshoz. Ennek megfelelően több transzléziós DNS polimeráz fizikai kapcsolatát kimutatták az ubiquitilált PCNA-vel.

A transzléziós szintézis effektorai nemcsak a PCNA-hez, hanem egymáshoz is kapcsolódhatnak (7.ábra). A Rad18 ubiquitin ligáz például kapcsolódik a Pol η transzléziós

polimerázhoz (Watanabe, Tateishi et al. 2004), a Rev1 transzléziós polimeráz pedig képes kötni a Pol η és a Pol ζ transzléziós DNS polimerázokat egyaránt (Garg, Stith et al. 2005, Plosky, Vidal et al. 2006, Guo, Tang et al. 2008). A polimerázok működésének egymás közötti finomhangolása ma még ismeretlen.



7.ábra: Az ubiquitilált PCNA és a transzléziós polimerázok kapcsolódása. Az ubiquitin jelenléte növeli a PCNA affinitását transzléziós DNS polimerázok kötésére. A transzléziós polimerázokon (pl. Pol η) a replikatív polimerázokkal (pl. Pol ϵ) szemben nem csak PCNA kötő (lila csillaggal jelölve), hanem ubiquitin kötő (UBZ) domén is található (zöld csillaggal jelölve) (Chang and Cimprich 2009).

Az alábbiakban néhány mondat erejéig jellemzem a három élesztőben működő transzléziós DNS polimerázt.

A **Pol η** (éta) DNS polimeráz az „Y” családba tartozik. Élesztőben a *RAD30* gén terméke. Képes a leggyakoribb UV fény által okozott károsodás, a pirimidin dimer (CPD) mindkét nukleotidjával szemben a megfelelő Watson/Crick párt beilleszteni (Johnson, Washington et al. 2000, Washington, Johnson et al. 2000). Más UV- károsodás esetén a Pol η sem képes a teljes átírára (pl. kovalensen keresztkötött 6-4 fotoproduktum), csupán a sérülés 3', azaz a polimeráz által először észlelt bázisával szemben képes nukleotid behelyezésére. Ez a behelyezett bázis a 6-4 fotoproduktum esetében a 3' pirimidin kvalitásától függetlenül mindig G bázis. Ebben az esetben a Pol η is mutagénnek tekinthető (Prakash and Prakash 2002). A Pol η -t általában hibamentes DNS polimerázként kezelik (4. ábra), mivel a leggyakrabban előforduló UV károsodás a pirimidin dimer, és ennek átírása során nem vét hibát. A *RAD30* gén inaktivációja emlősökben a bőrrák képződésére hajlamosító XPV betegséget okozza, mely a Xeroderma pigmentosum (vö. 1.2.3 fejezet) egy speciális formája. A betegség kialakulása annak tudható be, hogy funkcionális Pol η hiányában a pirimidin dimerek hibamentes replikációja nem lehetséges, az alábbiakban tárgyalt, mutagénnek tekintett DNS polimerázok végzik a replikációs villa menekítését (Masutani, Kusumoto et al. 1999).

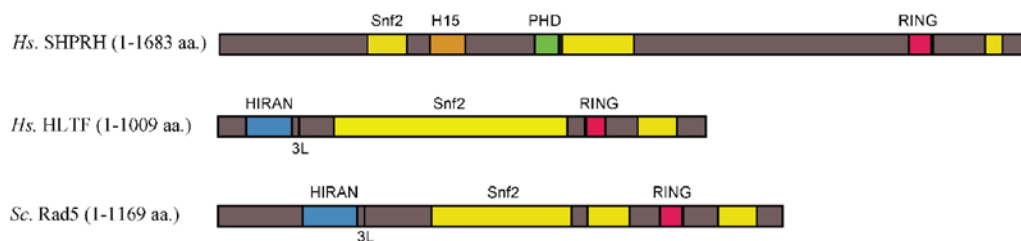
A mutagenézisért közvetlenül felelős enzim a **Pol ζ** (zéta). A Pol ζ két alegységét a *REV3* és a *REV7* gének kódolják. A Pol ζ a többi transzléziós polimeráztól eltérően a „B” családba tartozik (Chang and Cimprich 2009). Magas templáthűségű enzim. Nem képes a pirimidin dimerek 3' timinjével, vagy citozinjával szemben bázist beilleszteni, de amennyiben oda egy másik enzim (pl. a megakadó replikatív DNS polimeráz) már behelyezett egy bázist, akkor folytatja a szintézist, akkor is, ha a beillesztett bázis nem a templát komplementere. Ebben az aktivitásában hasonlít rá az emlős Pol κ . A rosszul párosodott végekről, vagy az abázikus helyekkel szembeni bázisokról más DNS polimeráz enzimek nem képesek DNS szintézist kezdeni (Prakash and Prakash 2002). A timin dimerek mellett a Pol ζ képes a 6-4 fotoproduktum 3' timinjével szemben behelyezett bázisról is szintézist kezdeni. A replikáció folyamán hibásan beépített bázisok esetében a Pol ζ kompetícióban áll a replikatív polimerázok 3'-5' exonukleáz aktivitásával, amely azonnal visszaemésztene a helytelen bázispárosodást. Ehelyett a Pol ζ tovább folytatja a szintézist a hibás bázispártól, ezáltal rögzítve a kialakult mutációt (Prakash and Prakash 2002). Az abázikus helyek átírásakor a bázishiányos hellyel szembe találomra behelyezett bázistól (mely leggyakrabban a Pol δ által behelyezett adenin) a Pol ζ szintén folytatja a polimerizációt (Prakash and Prakash 2002). A fentieknek megfelelően a Pol ζ katalitikus alegységét kódoló *REV3* génnek deléciója a spontán bázis szubsztitúciók gyakoriságát 20%- al (Roche, Gietz et al. 1994), az UV károsodás indukálta pontmutációk képződésének gyakoriságát pedig 90%-al csökkenti (saját mért adat).

A **Rev1** polimeráz egy deoxicitidil transzferáz aktivitású fehérje, amelynek polimeráz aktivitása mellett mai ismereteink szerint főként szervező tevékenysége lehet a transzléziós szintézisben. Ismert ugyanis, hogy a Rev1 deoxicitidil-nukleotid beillesztését végzi abázikus helyekkel szemben. Ismert továbbá az is, hogy jelenléte élesztőben elősegíti a Pol ζ katalitikus alegységének DNS szintézis aktivitását (Acharya, Johnson et al. 2006). Azt is megfigyelték, hogy a Rev1 *in vivo* szükséges a 6-4 fotoproduktum átírásához, de ő maga nem képes citozin beillesztésére ezen károsodással szemben (Lawrence and Maher 2001, Gibbs, McDonald et al. 2005). A Rev1 transzléziós szintézisben betöltött szervező funkcióját támasztja alá az a tény, hogy N-terminálisán lévő BRCT doménjével a PCNA-hez, míg C-terminálisával a Pol η -hoz, a Pol ζ Rev7 alegységéhez, és az emlős Pol ι -hoz képes kapcsolódni (Ohashi, Murakumo et al. 2004, Jansen, Tsaalbi-Shtylik et al. 2005, Guo, Tang et al. 2006). Az említett kapcsolatok révén a Rev1 újabb hidat képezhet a transzléziós szintézis effektorai és az őket irányító PCNA molekula között.

A fent elmondottakból látható, hogy a transzléziós szintézis bonyolult folyamat, amelyben az UV által kovalensen keresztkötött dimerek javításához sokszor két enzim egymás utáni összehangolt aktivitása szükséges. A DNS károsodás típusától és az alkalmazott DNS polimerázoktól függ, hogy az eredmény pontos másolás, avagy pontmutációképzés lesz-e. Az effektorok (DNS polimerázok) viszonylag jól ismertek, és a szabályozási folyamat bizonyos lépései- ideértve a PCNA monoubiquitiláció bizonyos hatásait- is tisztázottak, viszont a polimerázok közötti választás, a teljes folyamat „finomhangolása” a jövőbeni kutatások témája marad.

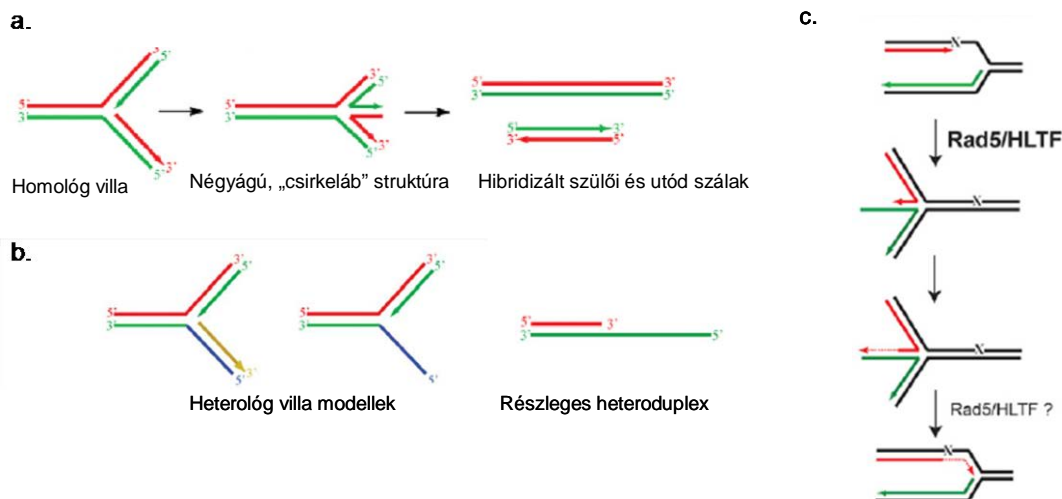
1.4.2.3 DNS hiba tolerancia templát váltással (Rad5 útvonal)

A Rad6/Rad18 DNS hiba tolerancia útvonal szabályozása alá tartozik egy további független episztázis csoport. A Rad5/Mms2/Ubc13 episztázis csoport kettős mutánsok genetikai analízisével jól elkülöníthető a transzléziós szintézis útvonalaitól (4. ábra). Az említett három gén deléciójáról azt is megfigyelték, hogy a megnövekedett UV érzékenység mellett megemeli a pontmutációképzést is, azaz hiányuk a transzléziós szintézis felé tolja el a DNS hiba tolerancia folyamatát (Unk, Hajdu et al. 2010). A kérdéses gének hiánya ezenfelül (akárcsak az ubiquitin 63-as lizinének mutációja) megszünteti a monoubiquitilált PCNA poliubiquitilációját. Ez azt bizonyítja, hogy a kérdéses gének kódolják a poliubiquitilációt végző fehérjéket (Hoegge, Pfander et al. 2002). Az Ubc 13 és az Mms2 fehérjék ismert ubiquitin konjugáló komplexet alkotnak, így a kérdéses három fehérje közül a legérdekesebb kétségtelenül a Rad5. Doménszerkezetét tekintve (8. ábra) egy az ubiquitin ligázokra (E3) jellemző RING domént, és több az SWI/SNF kromatin átrendező fehérjékre jellemző helikáz domént tartalmaz. Humán homológjait is azonosították (HLTF és SHPRH), és leírták, hogy csendesítésük a *RAD5* gén deléciójának fenotípusához hasonló hatást okoz. (Unk, Hajdu et al. 2006, Unk, Hajdu et al. 2008, Blastyak, Hajdu et al. 2010). A Rad5 konzervált domének pontmutánsainak vizsgálatával kimutatták, hogy mind a helikáz doménekre jellemző ATP-áz aktivitására, mind az ubiquitin ligáz aktivitására szükség van az UV károsodások okozta sejtelhalás mértékének csökkentéséhez (Gangavarapu, Haracska et al. 2006).



8. ábra: A Rad 5 fehérje és humán homológjainak (SHPRH és HLTF) doménszerkezete. A RING domén meglelte az ubiquitin ligáz aktivitású fehérjék sajátossága, a sárgával jelölt helikáz domének a SWI/SNF kromatin átrendező komplexekre emlékeztetnek (Unk, Hajdu et al. 2010).

Az ubiquitin ligáz aktivitásra a már említett PCNA poliubiquitiláció miatt van szükség, az ATP-áz aktivitás feladatát sokáig homály fedte. A Rad5 ugyanis nem rendelkezik klasszikus DNS helikáz aktivitással, a részleges heteroduplexeket, és a heterológ replikációs villa szerű struktúrákat (9. ábra) nem képes szétcsavarni. Oligonukleotid alapú mesterséges replikációs villa modelleken azonban kimutatták, hogy ATP függő módon a homológ replikációs villákat képes szétválasztani kettős szálú DNS darabokká, melyeknek egyikét a párosodott hosszabb „templát” DNS szálak, a másikat a rövidebb újonnan szintetizálódott DNS szálak alkotják (9. ábra). Ez arra utal, hogy a Rad5 valójában képes visszafordítani a replikációs villát, és lehetővé tenni az elakadt DNS szálnak, hogy templátként a károsodott DNS szál helyett a testvérkromatida ép, újonnan szintetizálódott DNS szálát használja (9. ábra, (Blastyak, Pinter et al. 2007).



9. ábra: A Rad5 fehérje *in vitro* aktivitása mesterséges oligonukleotid szubsztrátokon (a, b), és feltételezett *in vivo* (c) funkciója. A) A Rad5 képes a homológ replikációs villákat idéző oligonukleotid struktúrák szétcsavarására. B) Az ábrázolt, nem homológ replikációs villákat idéző struktúrákat a Rad5 nem képes processzálni. C) A Rad5 *in vivo* funkciója az elakadt replikációs villa (a DNS károsodás X-el jelölve) visszafordítása és ezáltal a templátváltás megvalósítása (Unk, Hajdu et al. 2010)

Mái napig nem ismert, hogy a PCNA poliubiquitiláció miért szükséges, milyen módon stimulálja ezt a folyamatot. Feltételezik, hogy gátolja a transzléziós szintézist, térbeli akadályát képezve a DNS polimerázok megkötésének.

Az, hogy a poliubiquitiláció a monoubiquitiláció után, azonos kiemelt helyen kapcsolódva jön létre, azt sugallja, hogy a monoubiquitilációt igénylő TLS az előnyben részesített útvonal, a templátváltás pedig csak egy második kisegítő lehetőség (Chang and Cimprich 2009).

A DNS hiba tolerancia templátcsereével megvalósuló hibamentes ágának mechanizmusára a fent ismertetett modell a leginkább elfogadott, viszont pusztán abból a megfontolásból kiindulva, hogy a replikációs villában elakadt DNS szál 3' vége egy a rekombinációhoz szükséges köztestermék lehet, megszületett egy másik modell is (4. ábra) (Chang and Cimprich 2009). Ez az újonnan szintetizálódott DNS szálak átkereszteződését vallja, és hamarosan kísérletes bizonyítékokra is talált (Zhang and Lawrence 2005). A templát váltás ezen módja Holliday hurok képződéséhez vezet, és megvalósulásához a rekombinációban résztvevő fehérjékre (Rad52, Rad54, Rad51) van szükség. A mechanizmust jelenleg nagyrészt homály fedi.

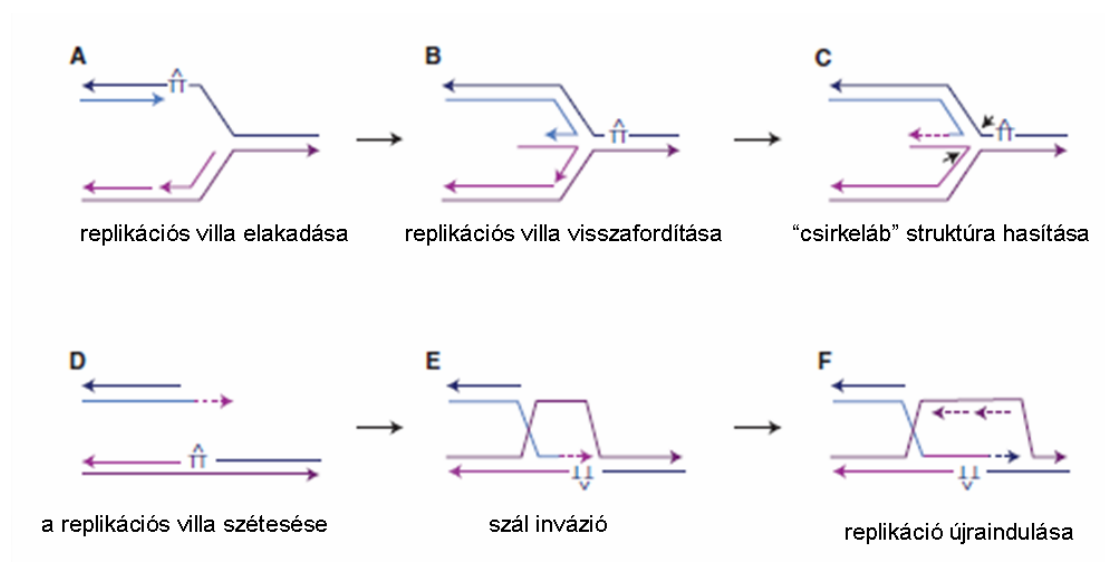
1.2.5 Kettős szálú DNS töréseket javító mechanizmusok

A kettős szálú DNS törések (DSB) a sejtre nézve rendkívül veszélyes DNS károsodási formák. A DNS mindkét szálát érintik, ezért közvetlenül a törés után nem áll rendelkezésre ép templát szál, amely alapján a reparáció az eddig ismertetett útvonalakon végbemehetne. Keletkezésük okai közül ki kell emelni az ionizáló sugárzás szerepét (Thompson 2012). Az ionizáló sugárzás által képzett „radiolítikus gyökök”, reaktív oxigén termékek először egyes szálú törést okoznak a DNS cukor-foszfát gerincén, majd amennyiben két egyes szálú törés túl közel (pl. egy helikális fordulaton belül) van egymáshoz kettős szálú DNS törés alakul ki. A DSB-k létrehozásában a DNS károsító drogok jelentősége a gyógyászati felhasználásuk miatt is régóta ismert (Wyrobek, Schmid et al. 2005). Ilyenek pl. a DNS szálakat keresztkötő és ezáltal a replikációs villát tartósan blokkoló ciszplatin és mitomicin C, vagy a DNS alkiláló szerek közül az MMS (metil metán szulfonát). Léteznek ún. „radiomimetikus”, azaz ionizáló sugárzás hatását utánzó szerek is, amelyek közül legismertebb a bleomicin. A radiomimetikus szerek az ionizáló sugárzáshoz hasonlóan reaktív oxigén gyök intermediereket hoznak létre (Chen and Stubbe 2005). Végül a DSB-k

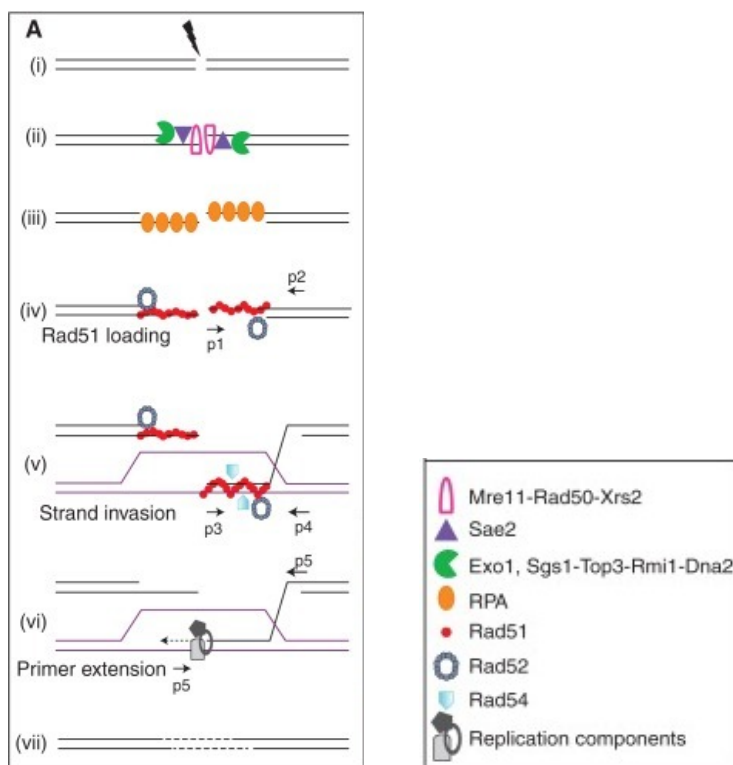
keletkezésének egy spontán rátája is létezik, amely mai elképzelések szerint a belső metabolikus oxigén stressz, és az általa keletkező egyes szálú DNS törések következménye. Mérések szerint egy átlagos humán sejtben 50 „spontán” kettős szálú törés keletkezik egy osztódási ciklus alatt (Vilenchik and Knudson 2003).

A kettős szálú DNS törések keletkezése szempontjából a replikáció kiemelten kockázatos folyamat. A replikációs villák bizonyos részei egyes szálú DNS szakaszokat tartalmaznak. Ha az egyes szálú templáton már jelen van egy cukor-foszfát törés, az a replikáció végkimenetelét tekintve egy mindkét szálát tekintve törött és egy másik, teljesen ép kromatidát eredményez (Mehta and Haber 2014). Hasonló következményekkel járhat, ha a replikációs villa egyik ága DNS károsodás (pl. timin dimer, vagy metilált bázis) következtében elakad. Ekkor bekövetkezhet a replikációs villa Rad5 helikáz általi visszafordítása, ami, amint azt az előző fejezetben láttuk, egy átmeneti csirkeláb struktúrát alakít ki. Ha a kérdéses „csirkeláb” struktúra feloldásában endonukleázok (pl. Mus1-Mms4 vagy Yen1) és nem helikázok vesznek részt, akkor a replikációs villa eltörik, és egy törött eleve 3' túlnyúló véggel rendelkező kromatida, valamint egy ép testvér kromatida keletkezik (10/A ábra, (Mehta and Haber 2014).

A.



B.



10. ábra: A homolog rekombináció A) homolog rekombináció a replikációs villa DNS hibával való találkozásakor történő aktiválódása. Ha a villa visszafordítás során keletkező négyágú elágazást endonukleázok hasítják, egy mindkét szálán törött kromatida keletkezik, amely a rekombináció szubsztrátjává válik .B) A homolog rekombináció iniciációjának lépései és effektor fehérjéi (bővebb magyarázat a szövegtörzsben, módosítva: Mehta and Haber 2014).

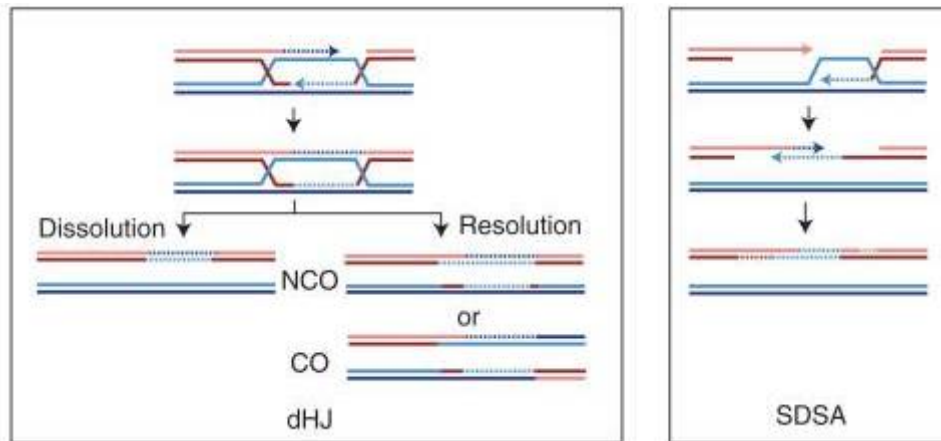
Egy ép kromatida és egy törött, homolog szekvenciát hordozó testvérkromatida megléte pedig a homolog rekombináció szubsztrátja (10/A ábra).

A kettős szálú DNS törések javításának (annak alapján, hogy a reparációhoz szükség van-e homolog DNS templát jelenlétére) **két fő mechanizmusa** van (Jackson 2002).

Az **NHEJ (non homologous end joining)** nem homolog végek összekapcsolását, ligálását képes megvalósítani. Ezen útvonal működése során kisebb deléciók gyakran előfordulnak, ugyanis a törött szálvégek gyakran ún. „piszkos” végek, ami azt jelenti, hogy sérültek, nem tartalmazzák a ligáláshoz szükséges 3'OH illetve 5' foszfát csoportokkal. A Ku70/Ku80 fehérjéből álló komplex kapcsolódik a törött szálvégekhez, majd exonukleáz aktivitású fehérjék (Mre11-Rad50-Xrs2 komplex) visszaemésztnek néhány bázispárt a törött végekről, ami információvesztéshez vezet (Jackson 2002, Mehta and Haber 2014). A DNS folytonossága a DNS ligáz IV általi ligálással áll helyre. Bár az NHEJ aktivitása a teljes sejtciklus alatt jelen lehet, emlős sejtekben a G1 fázisban különösen kifejezett, ilyenkor

ugyanis gátolt a homológ rekombinációhoz szükséges 5'-3' exonukleáz aktivitás. Haploid élesztősejtekben G1 fázisban pedig kizárólag az NHEJ működhet, hiszen a replikáció előtt nem áll rendelkezésre homológ DNS kópia (Mehta and Haber 2014).

A **homológ rekombináció (HR)** az NHEJ-vel ellentétben hibamentes kettős szálú törés reparáció. Feltételezi egy ép, homológ templát DNS meglétét. Mechanizmusára több részletes modellt is kidolgoztak, jelen tézisben az összes modellben közös kezdeti lépések részletesebb ismertetésére koncentrálok (10/B. ábra). A HR effektorai az ún. Rad52 episztázis csoportot alkotják. A HR első lépése egy hosszú, néhány száz bázispáros 3' túlnyúló vég létrehozása a törött DNS molekulán. Az első néhány nukleotidot az Mre11-Rad50-Xrs2 komplex távolítja el, majd további 5'-3' exonukleáz aktivitású fehérjék (Exo1, Sgs1-Top3-Dna2-Rmi1) folytatják a túlnyúló vég létrehozását (10/B. ábra, (Niu, Chung et al. 2010). A szabaddá vált 3' túlnyúló véghez teljes hosszában RPA fehérje egységek kötnek, amelyek stabilizálják azt. Az RPA fehérje helyét később a Rad51 fehérjék foglalják el (10/B. ábra). A Rad51 egyes szálú és kettős szálú DNS-t egyaránt képes megkötni, és a szekvencia homológia keresésének, felismerésének fehérjéje. Az egyes szálú DNS szakaszból és Rad51 egységekből felépülő nukleoprotein filamentum létrejöttét a Rad52 és Rad54 helikáz aktivitású mediátor fehérjék segítik (10/B. ábra, (Mehta and Haber 2014). A Rad52 abszolút nélkülözhetetlen az RPA Rad51-re történő cseréjéhez. A létrejött nukleoprotein filamentum a szál-invázióknak nevezett folyamat során beköt az ép templát kromatida homológ szakaszába. A szál-invázió eredménye egy rekombinációs „buborék” (Holliday hurok) létrejötte, amelyben a bekötő 3' véget a Pol δ és Pol ϵ DNS polimerázok meghosszabbítják (10/B. ábra, (Mehta and Haber 2014). A hurok felszámolási lépésének magyarázatára két különböző modell született (11. ábra). A DNS szintézis termékeinek összeligálása a DNS ligáz I által kettős Holliday hurkot és heteroduplex DNS-t hoz létre. A heteroduplex DNS feloldása csak endonukleáz hasítás által lehetséges, és a hasítás helyétől függően a rekombinációs folyamat rekombináns, vagy szülői kromatidákat ad. Ezt a modellt ma kettős Holliday-hurok modellnek nevezik (11. ábra, (Szostak, Orr-Weaver et al. 1983). Ha viszont a bekötő szál 3' végén kezdődött DNS szintézis egy idő után megszakad, helikázok számolják fel a Holliday hurkot (11. ábra). A meghosszabbított bekötő szálát visszacsatolják saját kromatidájában található törött komplementeréhez, és a DNS szintézis itt fejeződik be. Ennek a modellnek lefutása, melynek neve szintézisfüggő szál összekapcsolás (synthesis dependent strand annealing-SDSA) nem vezet rekombináns kromatidák keletkezéséhez (11. ábra, (Ira, Satory et al. 2006, Mehta and Haber 2014).



11.ábra: A homológ rekombináció Holliday-hurkának feloldására alkotott modellek. A kettős holliday hurok modellben (bal oldali kép) az inváziót végző 3' vég nem helyeződik ki a hurokból, hanem ligáz aktivitás által kettős hurok képződik. A kettős hurkot endonukleáz aktivitás számolja fel. Az SDSA modellben (jobb oldali kép) az inváziót végző 3' szál bizonyos hosszúságú DNS szintézis után helikázok által visszahelyeződik a saját kromatidájának komplementer szálához így a hurok megszűnik, és a DNS szintézis magán a törött szálon fejeződik be.

1.2.6 Tévesen párosodott bázisok javítása (Mismatch reparáció, MMR)

A mismatch reparáció a tévesen párosodott bázisok, esetleg kisebb inszerciós avagy deléciós hurkok eltávolítását végzi. Az említett replikációs „tévedések” a DNS polimeráz hibáinak eredményei, az inszerciós/deléciós szakaszok keletkezése pedig a templát elcsúszásának következménye.

A mismatch reparációról tézisem eredményeinek tárgyalásakor nem esik szó, de mivel a mismatch reparáció fehérjéi kapcsolódnak a replikációs apparátushoz, ezen belül a PCNA fehérjéhez, (vö. 1.3.2c fejezet) egy rövid beszámoló erejéig kitérek rá.

Az MMR mechanizmusában a lépések sorozata hasonló a többi ismertett replikációs útvonalhoz. Az első lépés itt is a hiba észlelése, és a hibás szakasz megkötése. Az észlelést a MutS α komplex (Msh2-Msh6) végzi, majd az MutL α komplex tagjai (Pms2-Mlh1) bemetszést végeznek a sérülés két oldalán. A bemetszésre szoruló, azaz hibát tartalmazó szál azonosításához szükség van annak azonosítására, hogy melyik volt az eredeti templát. Baktériumokban a templát szál a „Dam metiláz” által a GATC szekvenciák közelében metilált, míg az újonnan képződött nem módosított (Iyer, Pluciennik et al. 2006). Eukarióta sejtekben feltételezhetően a Mut S komplex fehérjéinek a replikációs apparátussal (különösen a PCNA fehérjével, vö. 1.3.2c fejezet) való kapcsolata irányítja az újonnan

szintetizálódott DNS szál felé a reparációs mechanizmust (Buermeyer, Deschenes et al. 1999, Clark, Valle et al. 2000, Maga and Hubscher 2003). A sérülések két oldalán létrejött bemetszéseket követően a kivágott szakaszt DNS polimeráz tölti fel, a DNS szál folytonossága pedig ligálással áll helyre.

A mismatch reparáció génjeinek (pl. *pms2*, *msh6*) hibája akár több százszorosára is emelheti a spontán pontmutációk keletkezésének rátáját, ún. spontán mutátor fenotípust okoz. Több mismatch reparációs gén mutációját azonosították ezenkívül a colorectális carcinóma örökletes formájában szenvedő betegek mintáiból (Aaltonen, Peltomaki et al. 1993).

1.3 A PCNA fehérje szerkezete és funkciói

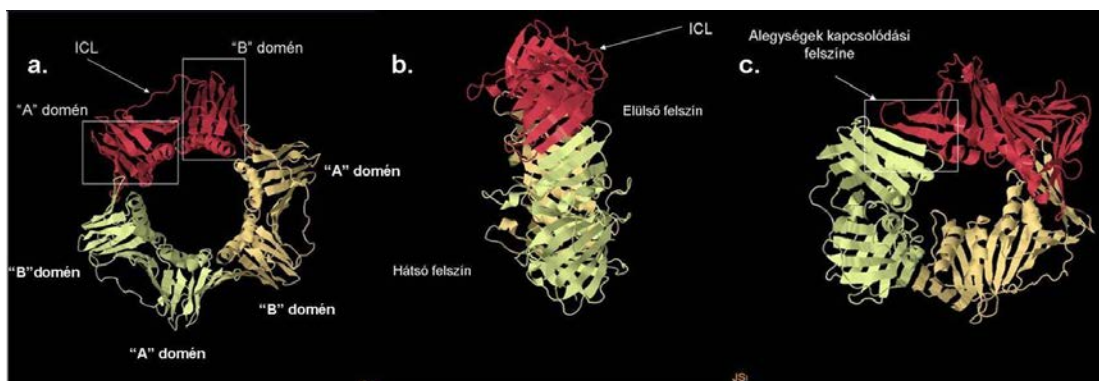
Ebben az áttekintő fejezetben, sorra vesszük vizsgálataim tárgyáról, a PCNA molekuláról rendelkezésre álló legfontosabb ismereteket.

1.3.1 A *Saccharomyces cerevisiae* PCNA fehérje kémiai-szerkezeti jellemzői

A PCNA (proliferating cell nuclear antigen) funkcionális formája egy gyűrűs struktúrát alkotó trimer. Az *S. cerevisiae* PCNA trimert alkotó monomerek hossza 258 aminosav, molekulásúlyuk 28,916 kDa, 12 β -redőt és 6 α -hélixet tartalmaznak. Minden monomer két doménből áll (egy N terminális és egy C terminális doménből) melyeket egy interdomén hurok (interdomain connecting loop- ICL) kapcsol össze (4.ábra). Az N-terminális domén-t „A” doménnek, a C-terminális domén-t pedig „B” doménnek is nevezik. A monomerek közötti kapcsolódás az egyik alegység A doménje és a szomszédos alegység B doménje között történik. Ily módon a felváltva ismétlődő A és B domének hexagonális szerkezetet adnak a trimer gyűrűnek (12.ábra). A monomerek közvetlen kapcsolódási felszínét egy-egy β -lemez alkotja (12.c ábra), melyek 8 H-kötést képeznek karbonil és imino csoportjaik között (Krishna, Kong et al. 1994). A közvetlen kapcsolódási felszínt mindkét oldalon egy-egy kiterjedt β -lemez régió veszi körül.

A három alegység gyűrűje által körülvelt belső üreg átmérője 34Å, ami összemérhető a DNS hélix 21 Å-s átmérőjével. A gyűrű külső felszínén jellemzően a β -redők, a belső üreg felé pedig az α -hélixek helyezkednek el. Az α -hélixek merőlegesek a gyűrű belsejében elhelyezkedő DNS molekulára. Az α -hélixek központi üregbe benyúló aminosav oldalláncainak köszönhetően a PCNA, és az üregben elhelyezkedő DNS molekula kapcsolatban lehet egymással (Krishna, Kong et al. 1994).

A gyűrű oldalnézetből polarizált (12.b ábra). Egy elülső, és egy hátulsó felszínnel rendelkezik. Az elülső felszín felé „néz” az interdomén hurok, amely a PCNA kötő fehérjék nagy részének kötéseért felelős (Hishiki, Hashimoto et al. 2009, Zhuang and Ai 2010), az elülső felszín felől kapcsolódik az interakciós partnerek nagy része (vö. 1.3.3 fejezet).



12. ábra: A PCNA kristályszerkezete. A) A PCNA három azonos alegységből felépülő gyűrűt alkot. Az alegységek különböző színben vannak feltüntetve. Az „A” és „B” domének felváltva követik egymást. Közöttük látható az interdomén hurok (ICL). B) A PCNA oldalnézeti képe. Az interdomén hurok az elülső felszín felé néz. C) A monomerek kapcsolódásáért β -lemezek felelősek, amelyek egymáshoz H-kötésekkel kötődnek. (Forrás: RCSB Protein Database, Krishna, Kong et al. 1994, módosítva)

1.3.2 A PCNA fehérje funkciói

A PCNA molekula deléciója letális. Számos kölcsönható partnere van. Az alábbiakban sorra vesszük különböző funkcióit, amelyek közül egyesek jól tisztázottak, némelyekbe viszont csupán csekély mechanisztikus betekintésünk van. A replikációs apparátus (repliszóma) felépülésében, a sejtciklus szabályozásában, a DNS reparációs és a DNS hiba tolerancia folyamatok irányításában, a kromatidák kohéziójában egyaránt nélkülözhetetlen szerepe van (Naryzhny 2008).

a.) DNS replikációs funkció

A PCNA legismertebb funkciója a replikációhoz köthető, ugyanis miután a primáz enzim és a Pol α DNS polimeráz megkezdte a szintézist a replikációs origónál, a PCNA-t egy Replikációs faktor C nevű fehérje ATP felhasználásával feltölti a DNS-re. Ezután a PCNA molekulához kötődik a két fő replikációs polimeráz a Pol ϵ , és a Pol δ . Ezen polimeráz enzimek esszenciális processzivitási faktora a PCNA fehérje. A PCNA fehérjén célzottan előállított pontmutációk segítségével azonosították a Pol δ kötésében szerepet játszó aminosavakat is (Eissenberg, Ayyagari et al. 1997). A kérdéses aminosavak (I126 és az L128) az ICL régióban találhatóak (vö. 1.3.3 fejezet).

b.) A sejtciklus szabályozásában betöltött funkció

A PCNA több sejtciklus szabályozó faktorról kapcsolatba hozható. A sejtciklus előrehaladását kiváltó CDK-ciklin komplexekkel, és a CDK működést gátló p21

inhibítorral egyaránt kölcsönhat. Az S fázis specifikus CDK2-ciklinA komplex a PCNA monomer C-terminális régiójához kapcsolódik. Úgy tűnik, hogy a PCNA fehérje a CDK2-ciklinA komplexet azon szubsztrátok közelébe pozicionálja, amelyek a PCNA gyűrűhöz kapcsolódnak, ezáltal elősegítve a foszforilációjukat (Koundrioukoff, Jonsson et al. 2000). Emlősökben például a replikáció iniciációjához nélkülözhetetlen Pol α -primáz komplex csak akkor kolokalizál a replikációs apparátussal, ha a Pol α p68 alegysége a CDK2-ciklinA komplex által foszforilálódott (Maga and Hubscher 2003).

A sejtciklus előrehaladását gátló fehérjék közül a PCNA a p21-el kapcsolódik. A p21-hez kapcsolódott PCNA molekula kevésbé képes stimulálni a Pol δ és a Pol α általi *in vitro* DNS szintézist, azaz a replikáció processzivitását (Podust, Podust et al. 1995). Terminálisan differenciálódott sejtekben kimutatták azt is, hogy a bennük észlelt magas p21 szint a PCNA szintjének csökkenését (véltetően lebomlását) váltja ki, ezáltal gátolva a sejtciklus előrehaladását (Engel, Hauck et al. 2003). A p21-el való kapcsolat létrejötte gátolhatja más replikációs fehérjék, (pl. polimerázok, RFC, lig1) kötődését. A p21 tehát a PCNA molekulán keresztül is kifejti sejtosztódást gátló hatását.

c.) DNS reparációs útvonalakban betöltött funkció

A PCNA központi szereplő több DNS reparációs útvonalban is. Kölcsönhat a mismatch reparáció (vö. 1.2.6 fejezet) Mut S komplexével, pontosabban az Msh2, Msh3 és az Msh6 fehérjékkel. A Mut S komplex egy szenzor, amely a hibásan párosodott bázispárokat felismeri, a DNS „szkennelését” végzi. (Bowers, Tran et al. 2001) *In vitro* MMR kísérletekben mutáns Msh3, vagy Msh6 fehérjék adagolása meggátolta az MMR folyamat DNS szintézis lépését. Ez arra utal, hogy az inaktív Msh3 és Msh6 leszorította az aktív Msh3 illetve Msh6 fehérjéket a PCNA-ról, és közvetve arra is, hogy a fent említett kölcsönhatásnak szerepe van az MMR működésében (Clark, Valle et al. 2000, Paunesku, Mittal et al. 2001). A Mut S mismatch felismerő komplex és a PCNA közötti kölcsönhatás *in vivo* a replikáció után jön létre, és stabilan fennál. A Mut S komplex a hibásan párosodott bázispárok közelében ATP felhasználásával a kerül át a PCNA molekuláról a DNS-re. A bakteriális mismatch reparáció a bemetszésre szoruló hibás szálat a templát szál metilált állapota miatt képes azonosítani. Feltételezik, hogy az eukarióta mismatch reparációs folyamatban a PCNA az, amely polaritásának köszönhetően az újonnan képződött szál azonosítását lehetővé teszi (vö.1.2.6 fejezet). A PCNA-nak tehát szerepe lehet a mismatch reparáció fehérjéinek helyszínre toborozásában és koordinálásában egyaránt. (Maga and Hubscher 2003).

A BER folyamatok fehérjéi közül a PCNA a Fen1 (Flap Endonuclease 1) fehérjével, és a DNS Ligáz I-el hat kölcsön. A Fen1 fehérje a DNS károsodás egyik oldalán keletkező bemetszés után aktiválódik az ún. long patch BER folyamán. Endonukleáz aktivitásával eltávolítja a keletkezett néhány nukleotidnyi, a károsodást tartalmazó egyes szálú DNS szakaszt. A DNS ligáz I a BER DNS szintézis lépése végén szükséges ligálási lépést katalizálja. Ha az említett fehérjék PCNA kötő motívumait elrontják, a BER hatásfoka jelentősen romlik (Matsumoto, Kim et al. 1999). Feltételezik, hogy a PCNA a long patch BER DNS polimerizációs folyamatában processzivitási faktorként is szerepet játszik (Paunesku, Mittal et al. 2001).

A NER az eukarióta sejtek UV károsodásait javító leghatékonyabb DNS reparációs folyamat (vö.1.2.3 fejezet). Hörcsög sejteken végzett kísérletek igazolták, hogy a sejtek UV besugárzását követően a PCNA oldhatatlan komplexet formál sejtmagi struktúrákkal. A GGR (inaktív XPD vagy XPB génnel rendelkező) vagy TCR (inaktív CSB génnel rendelkező) folyamatokban inaktív hörcsög sejtekben nem volt megfigyelhető ezen sajátos komplex kialakulása (Balajee, May et al. 1998). Csakugyan bizonyítást nyert, hogy *in vitro* kísérletekben az UV dimerek javításának minimális feltétele a jellegzetes NER fehérjék (XPA, XPG, XPC, XPF, TFIIH, Pol δ , Pol ϵ , és DNS ligáz I) mellett a PCNA fehérje jelenléte is (Araujo, Tirode et al. 2000, Paunesku, Mittal et al. 2001, Maga and Hubscher 2003). A PCNA kölcsönhat az XPG endonukleáz fehérjével, amely a NER DNS szintézis lépése előtt aktív, és feladata a sérüléshez viszonyított 3' helyzetű DNS hasítás létrehozása. A PCNA feltöltődése a DNS-re az XPG hasítási helyénél történik (Gary, Ludwig et al. 1997). Immunfluoreszcencia kísérletekben megfigyelték, hogy az XPA fehérje jelenlétében a PCNA fókuszokat képez a DNS károsodás helyén, míg XPA mutáns törzsekben ezen fókuszok nem jönnek létre (Aboussekhra and Wood 1995). Az XPA fehérje a NER folyamatainak DNS károsodást felismerő szenzora. Az utóbbi publikációból például arra következtethetünk, hogy a PCNA a NER folyamán nem csak a DNS szintézis járulékos faktora, hanem a folyamat kezdeti lépéseiben is részt vehet. Lehetséges például, hogy az XPA és XPG fehérjék helyszínre toborozásához is szükséges. (Maga and Hubscher 2003)

Több jel utal arra is, hogy a PCNA, az ionizáló sugárzás hatására létrejövő károsodások javításában is fontos szerepet játszik. Mint más útvonalak esetében, a pontos funkció meghatározását itt is nehezíti, hogy a PCNA esszenciális fehérje, delécioja nem életképes. Az ionizáló sugárzás okozta DNS törések javítását az NHEJ és a HR, a sugárzás nyomán keletkező oxidált bázisok eltávolítását pedig a BER végzi (Maga and Hubscher 2003). A

PCNA BER-ben betöltött szerepét jelen fejezetben már tárgyaltuk. A PCNA rekombinációban betöltött szerepére vonatkozó hipotézisek az alábbi megfigyeléseken alapulnak. A PCNA csökkent expressziója figyelhető meg a „csupasz” egerekben, amelyek fokozottan érzékenyek az ionizáló sugárzásra (Woloschak, Chang-Liu et al. 1996, Woloschak, Paunesku et al. 1996). A PCNA túltermelése humán sejtvonalakban növeli a sejtek túlélőképességét alacsony dózisú ionizáló sugárzással szemben (Boothman, Meyers et al. 1996). Végül kimutatták, hogy tumoros sejtekben gyakori a PCNA túltermelődése, különösen akkor, ha azok ellenállóbb fenotípust mutatnak az ionizáló sugárzásra. (Paunesku, Mittal et al. 2001) A felsorolt megfigyelések nem meglepőek, hiszen a rekombináció folyamatában a szálinvázió után DNS szintézis is történik, amihez a PCNA mint processzivitási faktor nélkülözhetetlen (vö. 1.2.5 fejezet illetve 10B. ábra).

d.) DNS hiba toleranciában betöltött funkció

A PCNA fehérje DNS hiba tolerancia folyamatokban betöltött fontos szabályozó szerepére 2002-ben derült fény. Ekkor fedezték fel a PCNA egy kitüntetett helyén történő poszttranszlációs módosulásokat. DNS károsító kezelést (pl. UV besugárzás, MMS behatás) követően PCNA 164-es lizinje a Rad6/Rad18 ubiquitin konjugáló és ligáz komplex által monoubiquitilálódik. A monoubiquitilált PCNA a Rad5 ubiquitin ligáz, és az Mms2/Ubc13 ubiquitin konjugáló komplex által a monoubiquitiláció helyén poliubiquitilálódhat. Az ubiquitin alegységek ez esetben a 63-as lizinen keresztül kapcsolódnak egymáshoz. Egy másik lehetséges módosulás az Ubc9 SUMO konjugáló enzim által végzett sumoiláció, melynek helyszíne szintúgy a 164-es lizin, vagy a 127-es lizin aminosavak. A SUMO módosítás nem DNS károsítás függő, hanem az S fázis során állandóan kimutatható (Hoege, Pfander et al. 2002).



13. ábra: A PCNA poszttranszlációs módosításai. Az Ubiquitin vagy a SUMO módosítás a 164-es lizin aminosavon következik be (Krishna, Kong et al. 1994).

A PCNA különböző módosulásai a DNS hiba tolerancia útvonalak különböző ágait aktiválják (14. ábra). A teljesség kedvéért az alábbiakban röviden összefoglalom a PCNA

módosulások szerepét az 1.2.4 fejezetben bővebben ismertetett DNS hiba tolerancia útvonalban.

A PCNA monoubiquitilációja a mutagén transzléziós DNS szintézist segíti elő. Ennek folyamán a DNS károsodásnál elakadt replikatív DNS polimeráz a PCNA felszínén egy alacsony fidelitású ún. transzléziós polimerázra cserélődik le (Hoegge, Pfander et al. 2002).

A monoubiquitilált PCNA felszínén lejátszódó DNS polimeráz csere pontos folyamata csak részben tisztázott. Csoportunk kimutatta, hogy a PCNA monoubiquitilációja után a Def1 fehérje a Pol δ katalitikus alegységének proteasomális lebontását indukálja. A Pol3 nevezetű katalitikus alegység lebontását nem követi a járulékos alegységek lebomlása. Feltételezik, hogy a transzléziós polimerázok a katalitikus alegység helyére kapcsolódva aktívak (Daraba, Gali et al. 2014).

A transzléziós DNS polimerázok képesek bizonyos károsodott DNS bázissal szemben nukleotid beillesztésre (6. ábra). Aktív centrumuk nyitottabb (vö. 1.2.4.2 fejezet), így képes a pirimidin dimereket is befogadni. A Pol ζ DNS polimeráz az UV sugárzás hatására keletkezett pirimidin dimerek 3' nukleotidjával szemben más enzimek által hibásan beépített bázishoz képes egy újabb nukleotidot hozzáadni, ezáltal mutációt rögzítve a genomba (Prakash and Prakash 2002). A Pol η DNS polimeráz, képes az UV sugárzás hatására keletkező timin dimereket hibamentesen átírni. A Pol ζ és a Pol η DNS polimeráz minden eukarióta sejtben megtalálható (Prakash and Prakash 2002). Emlős sejtekben két további DNS polimeráz, a Pol ι és Pol κ is részt vesz a léziókon keresztüli DNS szintézisben (vö. 1.2.4.2 fejezet) (Hubscher, Maga et al. 2002).

A PCNA fehérje 164-es lizinjének poliubiquitilációja eddig nem teljesen tisztázott módon a replikációs villa Rad5 (kettős szálú DNS transzlokáz) fehérje általi megfordításához vezet (10C és 14.B ábra). Ebben a folyamatban az újonnan szintetizálódott ép komplementer DNS szál szolgál majd templátként az elakadt DNS szintézis számára (Blastyak, Pinter et al. 2007). Mivel az útvonal a replikációhoz nem alacsony fidelitású DNS polimerázokat, hanem a replikatív DNS polimerázokat, a Pol δ -t és a Pol ϵ -t használja, természetéből adódóan nem mutagén (14. ábra).

e.) A PCNA SUMO módosulásának rekombinációt gátló szerepe

A PCNA sumoilálódásának szerepét sokáig homály fedte (vö. 1.2.4.1 fejezet). Mivel a SUMO módosulás az ubiquitilációhoz hasonlóan a 164-es lizin aminosavon történik, kezdetben azt feltételezték, hogy az ubiquitilációval antagonistá hatása lehet. Ezt a feltevést cáfolja, hogy az ubiquitiláció csökkenése (pl. az ubiquitin ligáz Rad 18 génjének

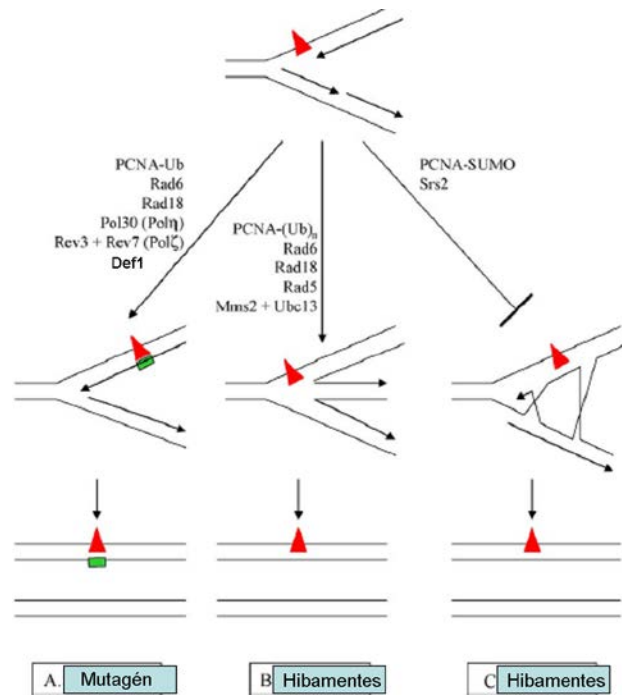
deléciója) nem okozza a sumoiláció erősödését. A módosulásoknak a sejtciklus során történő időbeli megjelenése is különbözik. Amíg az ubiquitiláció csupán DNS károsítás után jelentkezik, a sumoiláció az S fázisban lévő élesztősejtekben állandóan kimutatható, valamint a DNS szintézist gátló HU (hidroxi-urea) adagolásával váltható ki. Az eltérő szabályozás és az elkülönülő időbeli megjelenés nyomán arra következtettek, hogy a két módosulás különböző folyamatok szabályozásában vesz részt (Watts 2006).

Jogosan merült fel tehát a kérdés, hogy mi a PCNA sumoiláció szerepe. A választ az a megfigyelés adta meg, hogy a PCNA sumoilációjára nem képes K164R PCNA mutáns egy bizonyos Srs2 fehérje delécióhoz hasonlóan viselkedett, amikor a Rad6/Rad18 útvonal génjeinek delécióival kombinálták őket. Az Srs 2 (supressor of Rad6) fehérje egy helikáz, amelynek hiánya a Rad6 és a Rad18 deléciók okozta megnövekedett UV érzékenységet részlegesen elnyomja. Ezt a szupressziót a Rad6/Rad18 útvonal egyéb fehérjeinek deléciója esetén is (pl. Rad5, Ubc13, Mms2) kiváltja az Srs2 deficiens törzs. Kimutatták, hogy az Srs2 helikáz gátolja a rekombinációt, mivel a Rad51 fehérjét eltávolítja a rekombinációt kezdeményező nukleoprotein filamentumból. A K164R PCNA mutáció az Srs2 delécióhoz hasonlóan részlegesen elnyomta a Rad6/Rad18 útvonal fehérjeinek hiánya okozta megnövekedett UV érzékenységet. A K164R PCNA mutáció okozta megnövekedett UV érzékenységet az Srs 2 deléció viszont nem volt képes elnyomni. Az Srs2 deléció és K164R PCNA mutáns törzsekben leírt UV érzékenység csökkenés előfeltétele mindig az aktív rekombinációs útvonal megléte volt (Watts 2006).

Ezen genetikai bizonyítékok birtokában állították fel a modellt, miszerint az Srs2 fehérje a nemkívánatos (pl. S fázisban előforduló) rekombinációt gátolja, és ezen aktivitását a PCNA sumoilációja szabályozza. Amennyiben a sumoilált PCNA vagy az Srs2 fehérje hiányzik, a rekombinációs apparátus felszabadul a gátlás alól. A túlműködő rekombináció csökkenti az észlelhető UV érzékenységet (Pfander, Moldovan et al. 2005)

A modellt biokémiai kísérletekkel is alátámasztották. Kimutatták az Srs2 fehérje és a PCNA közötti kölcsönhatást, valamint a sumoilált PCNA jelentősen megnövekedett affinitását az Srs2-vel való kölcsönhatásra *in vitro* kísérletekben és a replikációs villánál (Chip kísérletekben) egyaránt (Papouli, Chen et al. 2005).

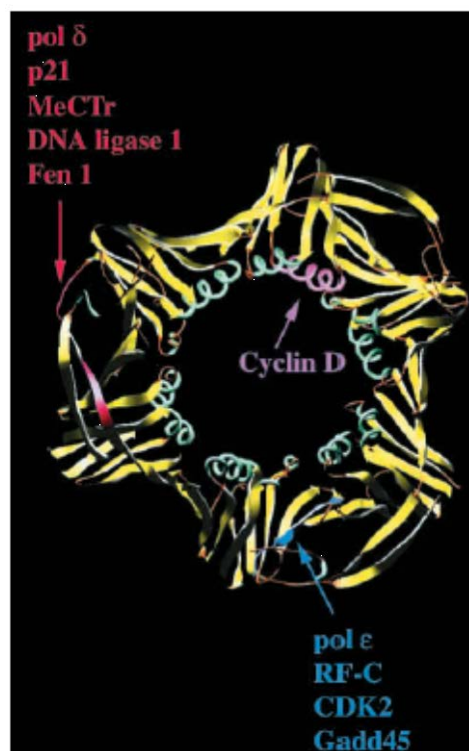
A PCNA sumoiláció tehát a replikációs villához toborozza az Srs2 fehérjét (vö.1.2.4.1 fejezet), amely meggátolja a Rad51 fehérjék asszociációját és ezáltal a homológ rekombinációs folyamat beindulását a károsodott replikációs villákban (14. ábra).



14.ábra: A PCNA irányító szerepe a DNS hiba tolerancia útvonalak felett. A nyilak melletti feliratban megfigyelhető az adott mechanizmus működéséhez szükséges PCNA módosulás. (A) A mutagén útvonal TLS polimerázok által (Polζ, Polη) téves bázis (■) beépülését eredményezheti a károsodással (▲) szemben. (B) A PCNA poliubiquitilációja egy olyan hibamentes tolerancia útvonalat aktivál, amely templátváltást eredményez a Rad51 fehérje rekombinogén aktivitása nélkül. (C) A PCNA sumoilációja az Srs2 helikáz által gátolja a rekombinációfüggő hiba tolerancia útvonalat, amelyben a Rad51 fehérje segítségével az elakadt szál átkereszteződik a már megszintetizálódott komplementer szállal és ezt használja fel templátként. (Forrás: Watts 2006, módosítva)

1.3.3 Fehérjekötő régiók a PCNA molekulán

A PCNA fehérjén három fő fehérjekötő régió ismert. A legtöbb fehérjét az interdomén hurok (ICL) régiója képes kötni (Maga and Hubscher 2003). Ez a hurok jellemzően a monomerek doménjei között az elülső felszín felé kitolódva helyezkedik el, és így könnyen hozzáférhető az interakciós partnerek számára (15. ábra). A hurkot az alegységek L121 és E132 aminosavai közötti régiója alkotja. A régióban túlnyomórészt hidrofób aminosavak vannak. Az ide kapcsolódó fehérjék között találjuk a Polδ replikatív polimerázt (vö. 1.3.2/a. fejezet), a BER folyamatai során aktív Fen1 endonukleázt (vö. 1.3.2/c. fejezet), a BER és a NER DNS szintézis lépésének végén a DNS ligálási lépést katalizáló DNS ligáz I-et (vö. 1.3.2 c. fejezet) és a p21 ciklin dependens kináz inhibitor (vö. 1.3.2 b. fejezet, 15. ábra).



15. ábra: Több kölcsönható partner osztozik a PCNA három ismert fehérjekötő régióján. Az interdomén összekötő hurok és a hozzá kapcsolódó fehérjék nevei pirossal, a belső felszínen elhelyezkedő N-terminális vég és interakciós partnerei ibolya, az alegységek C-terminális farka és a hozzá köthető fehérjék kékkel van jelölve. Az átláthatóság kedvéért monomerenként csak egy-egy régió van kiemelve. (Forrás: Maga and Hubscher 2003)

A monomerek N-terminális részén elhelyezkedő, a gyűrű belső felszíne felé néző α -hélix régiók is fehérje kötőhelyet formálnak. Ide a ciklin D képes kötődni (15. ábra).

A harmadik fehérjekötő felszínt a C-terminális farkok képezik. Ide többek között a PCNA fehérjét a DNS-re feltöltő RFC fehérje (vö. 1.3.2 a. fejezet), a CDK2-ciklinA komplex (vö. 1.3.2 b. fejezet) és a Pol ϵ replikatív DNS polimeráz kapcsolódik (Maga and Hubscher 2003).

A PCNA kötő fehérjék egy jellegzetes szekvenciával az ún. PIP-box (PCNA interacting peptide) motívummal rendelkeznek. Ezt a motívumot megtalálhatjuk az Y családba tartozó DNS polimerázoknál is (pl. a Pol η transzléziós DNS polimeráznál, vö. 1.2.3.2 fejezet). A PIP-box konszenzus szekvenciája a Q(S)-x-x-h-x-x-a-a, ahol az „x” bármely aminosav lehet, a „h” egy mérsékelten hidrofób oldalláncot jelent (pl. M, I, L), az „a” pedig kifejezetten hidrofób, aromatikusan (pl. F, Y) oldalláncot. A PIP-box hidrofób jellegének köszönhetően beleillik a PCNA interdomain hurok hidrofób aminosavai által alkotott kötőhelybe. A PIP motívummal rendelkező PCNA kötő fehérjéket PIP fehérjéknek (PCNA interacting protein) is nevezik (Warbrick 2000). A PIP motívum gyakran a fehérjék C-

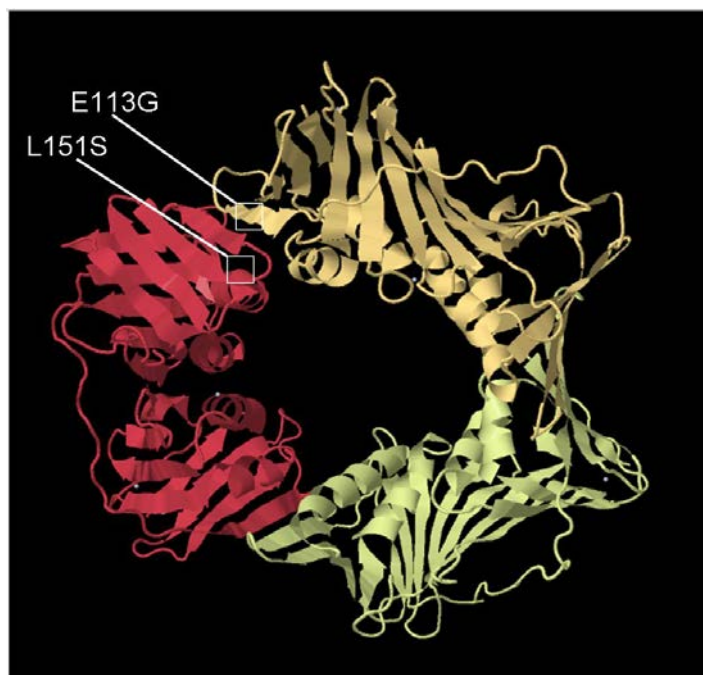
terminálisának közelében helyezkedik el, ami lehetővé teszi a fehérje stabil kapcsolatát a PCNA-val, de egyúttal egyfajta mozgékonytságot is lehetővé tesz számára feladata ellátásához (Castrec, Rouillon et al. 2009).

A számba vett fehérjekötési régiók, és példaként felhozott kapcsolódó partnerek ellenére számos fehérje pontos kapcsolódási helye a PCNA gyűrűn ismeretlen. A PCNA fehérje által szabályozott összes folyamat, és az összes kapcsolódó fehérjepartner ismertetése meghaladja ezen értekezés terjedelmi és formai kereteit.

Az a tény, hogy több interakciós partner kötődik azonos régióhoz, egyértelműen alátámasztja a PCNA különböző sejtleletani folyamatok felett gyakorolt kapcsoló jellegű szerepét. Mivel azonos felszínért versengenek, az interakciós partnerek nem helyezkedhetnek el egyszerre a PCNA felszínén, az pedig, hogy közülük éppen melyik foglalja el az aktivitásához szükséges pozíciót, javarészt ismeretlen szabályozási folyamatok összességének eredménye.

1.3.4 Új fehérjekötő felszín a PCNA alegységek kapcsolódási felszínén

A közelmúltban két tanulmány az alegységek közötti kapcsolódási felszín közelében is azonosított egy lehetséges fehérjekötő helyet (Northam, Garg et al. 2006, Sharma, Kochenova et al. 2011). A szerzők egy mutáns PCNA fehérjét termelő, UV sugárzásra érzékeny élesztő törzset vizsgáltak. Az E113G és L151S kettős aminosavcserét hordozó PCNA fehérjéről (16. ábra) megállapították, hogy -szemben a vad típusú fehérjével- nem képes kölcsönhatni az UV indukált mutagenézis egyik effektorával, a Rev1 fehérjével (Sharma, Kochenova et al. 2011). A kölcsönhatás vizsgálatához GST pulldown kísérleteket, és gélfiltrációs kromatográfiát végeztek.



16.ábra: Fehérjekötésben fontos aminosavak a PCNA monomerek kapcsolódási felszínén. A három alegység külön-külön színben van feltüntetve (Forrás: RCSB Protein Database, Krishna, Kong et al. 1994, módosítva).

A kérdéses PCNA fehérje továbbá nem képes funkcionális kapcsolatba lépni a Pol ζ mutagén DNS polimerázzal sem. Ez valójában azt jelenti, hogy a mutáns PCNA *in vitro* kísérletekben nem képes serkenteni a Pol ζ DNS polimeráz aktivitását (Northam, Garg et al. 2006). A kérdéses mutáns viszont a replikatív polimeráz (Pol δ) általi DNS szintézist továbbra is hatékonyan serkentette. A felsorolt biokémiai megfigyelésekkel összhangban az UV indukálta pontmutációképzés csaknem teljes hiányát tapasztalták pontmutációk kimutatására használt rendszerekben (Northam, Garg et al. 2006). A *pol30-E113G,L151S* pontmutációk hatása, az élesztőgenetikában genetikai kapcsolatok valószínűsítésére széleskörűen használt episztázis analízis vizsgálatok alapján is a DNS hiba tolerancia útvonalba térképezhető (Sharma, Kochenova et al. 2011).

Az alegységek kapcsolódási felszínének közelében elhelyezkedő új fehérjekötő hely tehát a Rev1 és Pol ζ DNS polimerázok által megvalósuló pontmutációkat generáló transzléziós DNS szintézis működéséhez nélkülözhetetlen.

Az 1.3.3 fejezetben ismertetett PIP-box PCNA kötő motívumot tartalmazó fehérjék képesek kötődni a szerzők által vizsgált pontmutáns PCNA fehérjéhez. A PIP-box jelen ismereteink szerint a PCNA interdomén hurkához, és C-terminálisához való kapcsolódáshoz szükséges (vö. 1.3.3 fejezet). A Pol ζ és a Rev1 nem hordozza a PIP-box motívumot, helyette viszont egy másik PCNA kötő motívum fordul elő bennük. A szerzők

feltételezik, hogy ez az alternatív PCNA kötő motívum az újonnan felfedezett, és DNS hiba toleranciához szükséges PCNA felszín kötésére szolgál (Sharma, Kochenova et al. 2011).

Az előbbieknél egy sokkal régebbi közlemény is foglalkozik a PCNA alegységek kapcsolódási felszínének környékével (Amin and Holm 1996). Ez a munka random mutagenézissel generált pontmutációkat többek között ezen a felszínen, és megfigyelte, hogy az ide lokalizálódó mutánsok többsége hőmérséklet érzékeny növekedési fenotípust, illetve MMS metiláló ágensre megnövekedett érzékenységet mutatott. Behatóbb genetikai analízisnek, az akkor előállított mutánsokat nem vetették alá.

A jelen értekezés alapját képező közlemény közlési folyamatával egyidőben megjelent egy közlemény, amely a PCNA alegységek kapcsolódási felszínének közelében több aminosavcserét vizsgál, és azt írja le, hogy bennük kivétel nélkül csökkent az UV károsodás által indukált pontmutációk mennyisége. A közlemény azonban megfigyelésének tisztázására semmilyen genetikai analízist nem végez, továbbá biokémiai magyarázatot sem ad (Kondratyck, Boehm et al. 2016).

A fenti eredmények tükrében a PCNA többi fehérjekötő régiójához hasonlóan elképzelhető, hogy az alegységek kapcsolódási felszíne körül elhelyezkedő régió nemcsak a transzlációs szintézist (Northam, Garg et al. 2006), hanem további folyamatokat is szabályozhat, más interakciós partnerei is lehetnek.

1.4 Célkitűzések

Az előbbieken bemutattam a PCNA fehérje sokféle szerepét, és egyes, a különböző funkcióihoz nélkülözhetetlen kapcsolódó partnereit. Azt is láthattuk, hogy bár az interakciókhoz szükséges PCNA felszínek egy része ismert, nemrégiben egy újabb, fehérjekapcsolódásban jelentős helyet írtak le.

Mivel a jól jellemzett biológiai funkcióval rendelkező régiók a PCNA felületének csak kis részét fedik le, kísérleteink tervezésénél azt tűztük ki célul, hogy az eddig ismeretlen szerepű PCNA felszíneknek a DNS reparációs és DNS hiba tolerancia folyamatokban való részvételét vizsgáljuk, mélyebb betekintést nyerve ezáltal az említett folyamatok szabályozásába.

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

1. Előállítani általunk tetszőlegesen megválasztott PCNA régiókban aminosavcseréket okozó pontmutációkat hordozó élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) *POL30* géneket.
2. Létrehozni olyan élesztő törzseket, amelyek egyedüli PCNA forrásként a kérdéses aminosavcseréket hordozó PCNA fehérjéket termelik.
3. Az előállított PCNA mutáns élesztő törzsek közül DNS károsító hatásra mutatott érzékenység alapján kiszűrni azokat, amelyekben a pontmutáció a PCNA fehérje DNS reparációs vagy DNS hiba tolerancia funkcióinak valamelyikét károsítja.
4. Genetikai analízissel a kérdéses pontmutáció hatását valamely ismert episztázis csoportba (vö. 1.2 fejezet) sorolni, azaz meghatározni, hogy melyik DNS reparációs útvonal működése sérült.
5. Funkcionális esszék segítségével bemutatni, hogy a vizsgált PCNA aminosavcserék az adott DNS reparációs útvonalon belül bizonyos biológiai folyamatot (DNS károsodás indukálta pontmutációképzés, spontán pontmutációképzés, NER etc.) befolyásolnak.
6. Biokémiai vizsgálatokkal magyarázni a PCNA mutációknak a kérdéses DNS reparációs útvonalakra gyakorolt mechanisztikus hatását.

2. Anyagok és kísérleti eljárások

2.1 Élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) és *Escherichia coli* törzsek

A PCNA pontmutáns élesztő törzseket **EMY 74.7** genetikai háttérben (*MATa*, *his3-D1*, *leu2-3*, *leu2-112*, *trp1D*, *ura3-52*) állítottam elő. A DNS károsító hatásra adott érzékenységek vizsgálata, a genetikai episztázis analízisek, a DNS károsodás indukálta mutációs ráta mérése, valamint a rekombinációs ráta mérése plazmid alapú riporterekkel ezen a genetikai háttéren zajlott. Egyes pontmutáns PCNA gének (*pol30-L154A*, *pol30-II99,100AA*) esetében a pontmutációt hordozó plazmidot az EMY 74.7 törzsben észlelt fenotípusok ellenőrzésére **BY 4741** genetikai háttérbe (*MATa*, *his3-D1*, *leu2*, *met15*, *ura3*) is bejuttattuk. Mindkét esetben az EMY74.7 háttéren tapasztalt eredményekkel megegyező fenotípust kaptunk, így ezeket a képeket a dolgozatban nem mutatom be.

Fehérjék túltermeltetésére és tisztítására a **BJ 5464** genetikai háttérű törzset (*Mat α* , *ura3-52*, *trp1*, *leu2-D1*, *his3-D200*, *pep4::HIS3*, *prb1-D1.6R*, *can1*, *GAL*) használtunk (Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, USA). A kérdéses törzs proteáz deficiens, a PEP1 és PRB6 vakuoláris proteázok génjeinek delécióját hordozza (Jones 1991). A deletált gének által termelt enzimek felelősek a feltárt élesztő sejtek felülúszójában, extraktumában észlelhető proteolitikus aktivitásért.

Klónozáshoz, konstruktok előállításához *E.coli* **DH5 α** kompetens baktérium törzset használtunk.

2.2 Plazmidok, DNS konstruktok

A homológ rekombináción alapuló génkiütéshez használt ún. gene blaster konstruktok (vö. 2.4 fejezet) **pUC 19** vektorban lettek elkészítve. Kis mérete miatt ugyancsak ezt a klónozó vektort használtam pontmutációk létrehozására a PCR alapú helyspecifikus mutagenézisben.

YCplac111 *E.coli*/*S.cerevisiae* ingázó (shuttle) vektor *LEU2* marker génnel. Ezt az élesztő centromert tartalmazó vektort PCNA pontmutáns gének élesztő törzsekbe történő bevitelére és a PCNA róluk való termeltetésére használtam. A centromer jelenléte és a

PCNA saját promótere a genomi PCNA expresszióhoz hasonló mennyiségű fehérje termelődését eredményezi.

YCp50, illetve pRS314 *E.coli/S.cerevisiae* ingázó (shuttle) vektorok *URA3*, valamint *TRP1* marker génnel. Élesztő centromeres vektorok, amely a *yCplac111*-től a szelekciós marker kvalitásában különböznek. Egyikük sem rendelkezik konstitutív expressziót biztosító promóterrel. Azonos célra, a pontmutáns PCNA gének élesztő sejtekben történő kifejeztetésére használtam, a *yCplac111* konstrukttal kapott eredmények ellenőrzésére.

A vad típusú, illetve megfelelő pontmutációt hordozó PCNA fehérjét glutation-S-transzferáz peptiddel N-terminális fúzióban termeltettük túl fehérje tisztításhoz **pBJ842** konstruktokról (Johnson, Prakash et al. 2006).

pRS426 alapú konstruktot használtunk a transzkripció hatásfokának riportereként. A plazmidba *GALI* promóter által meghajtott *LacZ* gént helyeztünk (pID835). A konstruktot a 2.13 fejezetben bővebben ismertetett módon használtuk.

2.3 Tápoldatok, táplemezek

YPD tápoldat: 2% D-glükóz (Molar Chemicals Kft.), 2% bakto-pepton (MERCK), és 1% élesztő kivonat (MERCK) desztillált vízben feloldva, 110°C-on 20 percig autoklávozva.

YPD lemezek öntéséhez 1.7% agart adagoltam (bakteriológiai agar, Molar Chemicals Kft.) autoklávozás előtt. A YPD a prototróf élesztőtörzsek növesztésének alap tápoldata.

Szintetikus teljes tápoldat (SC): 2% D-glükóz, 0.17% élesztő nitrogén bázis (aminosav nélküli, ammónium szulfátot tartalmazó, Difco) és aminosav keverék porban (Sigma Aldrich). Az aminosavakat por formájában adagoltam egyenként bemérve autoklávozás előtt. Az egyes aminosavak mennyisége: adenin 40 mg/liter, L-arginin 30 mg/liter, L-hisztidin 20 mg/liter, L-izoleucin 20 mg/liter, L-leucin 30 mg/liter, L-lizin-HCl 30 mg/liter, L-metionin 20 mg/liter, L-fenilalanin 50 mg/liter, L-triptofán 30 mg/liter, L-tirozin 30 mg/liter, uracil 20 mg/liter, L-valin 100 mg/liter.

Szintetikus tápanyaghiányos tápoldat: Bizonyos tápanyagforrást nélkülöző szintetikus tápoldat. Pl. a "triptofán hiányos" tápoldatból hiányzik a triptofán, más eltérést a szintetikus teljes tápoldathoz (lásd fent) képest nem mutat. Szintetikus tápanyaghiányos táplemezek öntéséhez autoklávozás előtt 1.7% agart adagoltam (Molar Chemicals Kft.).

SC-szacharóz tápoldat: szintetikus teljes tápoldat amelynek cukorforrása 1.7% glükóz helyett 3% szacharóz. Gének galaktóz általi indukciója esetén használatos.

MMS tartalmú táplemez: Készítése a YPD táplemez készítéséhez hasonló, annyi különbséggel, hogy autoklávozás után a még cseppfolyós de már kézmeleg, agart tartalmazó tápoldatba a megfelelő koncentrációkban (jellemzően 0.0005-0.05%) tömény MMS oldatot (Sigma) adagolok.

L-canavanin tartalmú táplemez: Szintetikus arginin hiányos táplemez, 40 mg/l L-canavanin (Sigma) tartalommal.

5-FOA tartalmú táplemez: Szintetikus teljes táplemezek (SC), amelyek 1g/l koncentrációban tartalmazzák az 5-FOA (5-fluoro orotát) port. A por autoklávozás után kerül adagolásra a kézmeleg, még cseppfolyós tápoldatba.

2.4 Homológ rekombináción alapuló génkiütés élesztő sejtekben

Az élesztőgenetika egyik legjelentősebb fegyvere a célzott génkiütés jó hatásfoka. A homológ rekombináción alapuló génkiütés valójában a gén kódoló szakaszának (ORF) egy szelekciós markerre való lecserélése (Rothstein 1991). Ehhez minden kiütni kívánt gén esetében speciális konstruktot kell készíteni. pUC19 alapú vektorba be kell klónozni az eltávolítani kívánt gén 5' és 3' végeihez közel (a start kodontól proximálisan illetve a stop kodontól disztálisan) található, PCR-el felamplifikált 200-1000 bp hosszúságú szakaszát. A felamplifikált génszakaszok közé klónozható a választott szelekciós marker (*URA3*, *HIS2*, *TRP1* etc.). Génkiütéshez az elkészült konstruktot endonukleáz hasítással linearizáljuk, a kapott két lineáris fragmens egyike a „génkiütő” kazetta, amely sorrendben a gén kódoló szekvenciáját megelőző génspecifikus 5' szalaszt, majd a szelekciós markert, végül a stop kodon után következő 3' génspecifikus szakaszt tartalmazza. A linearizált génkiütő konstruktot (1-4 µg mennyiségben) betranszformáljuk élesztő sejtekbe, a szelekciós marker genomba integrálódását a megfelelő szelekciós lemezekben ellenőrizzük. A szelekciós lemezekben kinövő telepekben a beépülés helyspecifikusságát, azaz a deléción létrejöttét génre specifikus PCR reakcióval ellenőrizzük.

URA3 szelekciós marker alkalmazása esetén a marker gén spontán deléciójára szelektálhatunk 5-fluoroorotát (5-FOA) tartalmú lemezekben (Alani, Cao et al. 1987). Az *URA3* uracil bioszintézis marker gén terméke dekarboxilációs reakcióban mérgező 5-fluorouracilt hoz létre az 5-FOA-ból. 5-FOA tartalmú lemezen így csak azok a telepek képesek kinőni, amelyek spontán módon elvesztették az *URA3* markert. A spontán deléciót az *URA3* marker mindkét végéhez ligált direkt ismétlődések, az ún. HIS szekvenciák teszik

lehetővé. Ezen negatív szelekció használata lehetővé teszi több egymás utáni célzott génkiütés végrehajtását az *URA3* marker felhasználásával, ami a rendelkezésre álló korlátozott mennyiségű szelekciós marker, és az élesztőgenetikában nélkülözhetetlen többszörös deléciót tartalmazó élesztő törzsek előállítása miatt rendkívül előnyös.

2.5 *POL30* (PCNA) pontmutánsok létrehozása PCR alapú helyspecifikus mutagenézissel

A helyspecifikus *POL30* pontmutációk PCR reakcióval történő létrehozásához a Stratagene vállalat „Quick Change Site-Directed Mutagenesis” protokollját követtem.

Az élesztő *POL30* (PCNA) gén 2040 bp hosszúságú genomi Mlu I fragmentjét pUC 19 vektorba klónoztam. A kérdéses régió 200 bázispár hosszúságú promótert, és a stop kodon után további 1020 bázispár hosszúságú szakaszt tartalmaz.

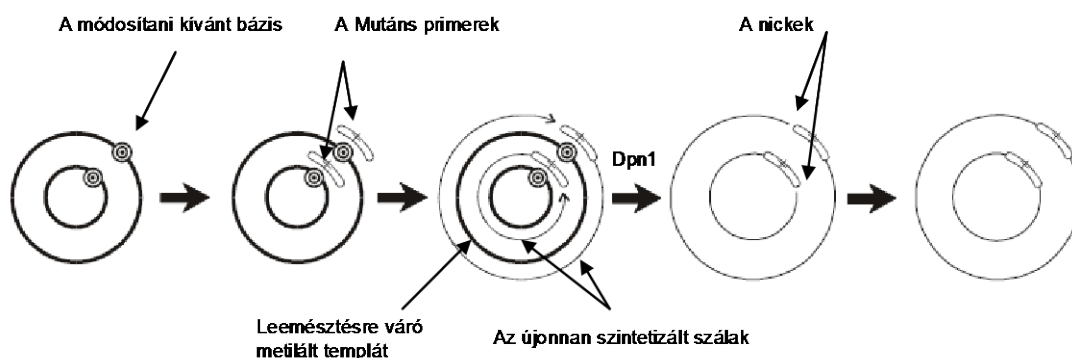
A megváltoztatni kívánt bázisok helyéhez hibridizáló, kívánt mutációkat hordozó komplementer oligonukleotidokat terveztünk. Az oligonukleotidok tervezésénél figyelembe kellett venni, hogy mindkét primernek tartalmaznia kell az előállítani kívánt mutációt, és ugyanarra a helyre kell hibridizálnia a templát két ellentétes DNS szálán. Az eredményes mutagenézishez a primerek hosszának 25 és 45 bázispár között kell lennie, a mutációknak körülbelül középen kell elhelyezkedniük. Az oligonukleotidok GC tartalma legalább 40% kell legyen.

A primerek olvadási pontjának (T_m) ajánlatos 10 fokkal a PCR DNS szintézis hőmérséklete felett lennie. A primerek olvadási hőmérsékletének számítása a következő képlet alapján történik: $T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N$ (ahol N a megváltoztatott bázisok %-a);

A PCR alapú mutagenézishez magas fidelitása miatt Pfu polimerázt használtunk. 18 ciklusos PCR reakciót végeztünk, melyeken belül a denaturáció hőmérséklete 95°, időtartama 0.5 perc, a renaturáció hőmérséklete 55°, időtartama 1 perc, végül pedig a DNS szintézis hőmérséklete 68°, időtartama pedig 8 perc (kb. 2kb/perc) volt.

A PCR termékei a mutációkat hordozó, nickeket tartalmazó újonnan szintetizált szálból, illetve a templát DNS szálból álló hibrid plazmidok (17. ábra). A PCR termékek hemimetiláltak, az eredeti templát szál metilált, míg az újonnan szintetizált szál a sejtmentes rendszerben nem metilált. Metilációt felismerő specifikus endonukleázzal (DpnI, felismerési helye az 5'- Gm6ATC- 3') a reakciótermékekről leemésztettük a

templátot, majd emésztés után *E. coli* DH5 α kompetens sejtekbe transzformáltuk, ahol a gazdasejt a nickelt szálak javítását elvégezte.



17. ábra: a PCR alapú helyspecifikus mutagenézis működési elve. (bővebb magyarázat a szövegtörzsben)

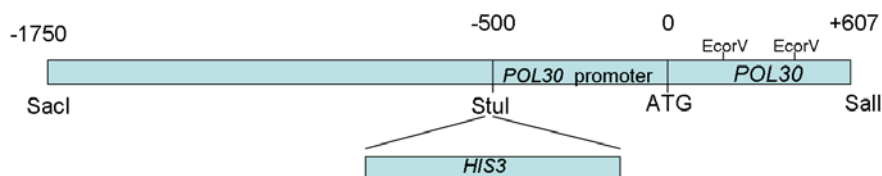
A transzformálás eredményeként kapott egyedi baktériumtelepek pUC19 *POL30* plazmidjaiban szekvenálással ellenőriztük a *POL30* gént a mutáció jelenlétének kimutatása érdekében. A mutációkat hordozó telepekből glicerines törzsoldatot készítettünk.

Bár a pUC19 plazmid kis méretének köszönhetően ideális helyspecifikus mutagenézis, bakteriális klónozás végzéséhez, élesztősejtekben nem tartható fenn. Élesztősejtekben történő termeltetéshez ezért a pontmutációkat tartalmazó 2040 bázispár hosszúságú, saját genomi promóterrel rendelkező *POL30* fragmenteket HindIII-BamHI hasítás után élesztő centromeres vektorok (YCplac 111) megfelelő helyeire klónoztam át. A vad típusú 2040 bázispár hosszúságú MluI *POL30* genomi fragmenst is beklónoztam a pUC19-be, majd innen HindIII-BamHI hasítás után YCplac 111 vektorba. Ez a vad típusú *POL30* konstruktszolgált a genetikai vizsgálatoknál a mutáns PCNA fehérjét expresszáló konstruktok vad típusú kontrolljaként. Élesztő centromerrel rendelkező vektorok alkalmazása azért fontos, mert így az alacsony kópiaszámnak (1-5/sejt) és a hordozott saját genomi promóternek köszönhetően a termelt PCNA fehérje mennyisége összemérhető lesz a vad típusú törzsben tapasztalható PCNA mennyiségével, nem kell a mutáns fehérje túltermelésétől tartani. A későbbiekben egyes pontmutáns *POL30* géneket- a genetikai analízishoz előállított dupla deléciós törzsek markerezettségének megfelelően- szintén a fent leírt klónozási stratégiát használva- más marker génnel ellátott élesztő centromeres vektorokba (pRS314, YCp50) is áthelyeztem.

A fenti lépésekkel párhuzamosan EMY 74.7 élesztőben elkészítettem a genomi *POL30* (PCNA gén) delécióját. Mivel az élesztősejtek PCNA hiányában nem életképesek, a génkiütés előtt a törzsbe bejuttattam egy pRS314 alapú vad típusú PCNA fejhérjét termelő konstruktot, amely a *POL30* gén promóterét és kódoló szekvenciáját a genomi MluI-XbaI fragmenten (1128bp) hordozza. Az ily módon elkészített akceptor törzsbe juttattam be egyenként a különböző pontmutációkat hordozó PCNA konstruktokat. A komplementáló, vad típusú (*TRP2* markeres) *POL30* plazmidot ezután replika lemezeléssel a pontmutációkat hordozó, vagy éppen a vad típusú kontroll (YCplac111, *LEU2* markeres) *POL30* plazmidokra cseréltem. Ezzel az előállított pontmutáns *POL30* gének maradtak egyedüli PCNA forrásként a sejtekben. A *POL30* gént hordozó plazmidra ezután már szelektálni sem kell, hiszen esszenciális génről lévén szó azt a törzs stabilan hordozza, elveszíteni nem tudja.

2.6 *POL30* pontmutáns gének genomba integrálása

A fent ismertetett módon előállított *POL30* pontmutáns gének közül kettőt (*pol30-L154A* és *pol30-II99,100AA*) a genomi lókuszhelyére is beintegráltuk. Ezáltal a plazmidról kifejezett pontmutáns fehérjék által okozott fenotípust szeretnénk volna ellenőrizni. A genomi lókuszhelyére integrált *POL30* génváltozatokat hordozó élesztő törzsek az élesztő centromeres vektorokban lévő azonos *POL30* génváltozatokat hordozó törzsekkel megegyező fenotípust mutattak. A dolgozatban bemutatott kísérletekben kizárólag az episzómális *POL30* géneket hordozó törzseket használtuk (vö. 2.5 fejezet). A gének integrációja is a homológ génszakaszok hatékony rekombináción alapul. Esetemben egy olyan pUC 19 alapú konstruktot készítettünk, amely a PCNA-t kódoló *POL30* gén promóterét és szabályozó régióját a start kodontól 5' irányban 1750 bázispár hosszan, valamint magának a génnek az N-terminális felét tartalmazza (a 777bp-os kódoló szakasz első 608 bázispárját). A vad típusú *POL30* lókuszhelyét PCR-el szaporítottuk fel és a pUC19 SacI-SalI helyeire klónoztuk. A mutáns gének integrálásához a fenti konstruktban a vad típusú *POL30* gén EcoRV fragmentjét a mutációkat tartalmazó EcoRV *POL30* fragmenttel cseréltük le (lásd az alábbi sematikus rajzt).



A start kodon előtti 500. bázisnál elhelyezkedő StuI hasítóhelyre *HIS2* szelekciós markert klónoztunk. Az integráció az integrációs pUC19 alapú plazmid SacI-SalI általi linearizálásával kezdődik. A linearizált, integrációra kerülő szakasz sorrendben tartalmazza a szelekciós marker előtti 1250 bázispáros genomi régiót, magát a *HIS2* szelekciós markert, a marker mögött a *POL30* promótert, valamint a *POL30* gén start kodon felőli 608 bázispárnyi szakaszát, benne az integrálni kívánt mutációval (lásd a fenti sematikus rajzot). A hasított plazmid transzformálása után kinövő *HIS⁺* élesztő telepeket a marker helyspecifikus jelenlétére PCR-el, a teljes PCNA gén épségére DNS szekvenálással ellenőriztük.

2.7 DNS károsító hatásra mutatott érzékenység kvalitatív kimutatása (spot assay)

A módszer célja különböző élesztő törzsek DNS károsító anyagokra és hatásokra mutatott érzékenységének egymással való összehasonlítása. Megfelelő tápoldatban éjszakán át növesztett és 10^7 sejt/ml-es koncentrációra beállított élesztő kultúrákból steril vízben négy lépcsős 10-szeres hígítási sorozatokat készítettem. A táplemezek felületére törzsenként külön-külön sorban minden hígítási lépésből 5-5 μ l-t cseppentek. UV kezelés esetén a beszáradt cseppeket megfelelő dózisú 260 nm hullámhosszúságú UV kezelem. MMS illetve bleomycin kezelés esetén a hígítási sorokat a feltüntetett koncentrációjú MMS-t illetve bleomycint tartalmazó táplemezre csepegtetem. A lemezek 2-3 napos 30°C-os növekedést igényelnek. UV kezelés után a növesztés (a fotoliáz DNS károsodást javító aktivitását megelőzendő) sötétben történik. Jelen munkámban egy-egy a megfigyelt fenotípust jól szemléltető reprezentatív képet mutatok be, amelyet több megismételt kísérlet közül válogattam ki.

2.8 DNS károsító hatásra mutatott érzékenység kvantitatív mérése

A módszer célja az élesztő törzsek DNS károsító anyagokra és hatásokra mutatott érzékenységének számszerűsítése. YPD lemezekre meghatározott számú élesztősejtet

lemezelünk. Különböző dózisú károsító hatás alkalmazásánál a túlélő telepek számából túlélési százalékot számolunk. A különböző dózisoknál tapasztalt túlélési százalékok adataiból túlélőgörbe szerkeszthető. Munkámban kvantitatív DNS károsítás érzékenység mérést 254 nm-es UV forrás alkalmazása esetén használtam. A kísérleteket legalább háromszor ismételtam, az eredményeket átlagoltam, és a szórást a megfelelő ábrákon feltüntettem.

2.9 UV által indukált mutációs frekvencia mérése

Egy éjszakán át YPD tápoldatban növesztett élesztő kultúrákat megfelelő koncentrációban szintetikus teljes (SC) táplemezekre és L-canavanin tartalmú lemezekre szélesztettem (SC táplemezekre 10^2 - 10^3 sejtet, L-canavanin lemezekre 10^7 sejtet). A lemezeket különböző időtartamig 254 nm-es UV sugárzásnak tettem ki, az alkalmazni kívánt UV dózis eléréséig. A lemezeket 4 napig fénytől védve 30°C-on tároltam, majd a telepeket megszámláltam.

A szintetikus táptalajon különböző UV dózisok után számolható telepekből az adott törzsre jellemző túlélés mértéke túlélőgörbe formájában megadható. A canavanin tartalmú lemezeken csak akkor nőhetnek telepek, ha a *CANI* lókuszban egy inaktiváló forward mutáció keletkezett, a *CANI* gén ugyanis arginin permeáz enzimet kódol, amely a mérgező arginin analóg L-canavanint is bejuttatja a sejtbe. A canavanin lemezeken kinövő *canI^R* mutáns telepek számát az adott UV dózisonál az SC lemezekben tapasztalt pusztulás mértékével korrigáljuk. Így megadható az egy adott élesztő törzsre, adott UV dózison jellemző, 10^7 lemezelt sejtire számított indukálódott mutációk száma. A gyakorlatban a különböző genetikai háttérű élesztő törzsek indukált mutációs rátáinak egymáshoz hasonlítása nem más, mint a mutagén DNS hiba tolerancia funkcionális vizsgálata. A mutációk minősége szükség esetén genomi DNS izolálása, és a *CANI* lókuszra specifikus PCR reakció után szekvenálással ellenőrizhető. A kísérleteket legalább háromszor ismételtam, az eredményeket átlagoltam, és a szórást a megfelelő ábrákon feltüntettem.

2.10 Spontán mutációs ráta mérése

Éjszakán át YPD tápoldatban növesztett élesztő törzseket 10^3 sejt/ml koncentrációra hígítottam, majd ezekből törzsenként 10 párhuzamos kultúra növekedését indítottam el 0.5

ml lyukterfogatu titer lemezben. Minden egyes lyukba 450µl friss tápoldatba 50µl-nyi (azaz kb. 50 sejtnyi) kultúrát oltottam le. A lemezt 3 napig 30°C-on rázatva inkubáltam, majd a párhuzamos kultúrák koncentrációját egyenként megszámloltam, a 0,5 ml térfogatnyi kultúrákból párhuzamos mintánként 450µl-t L-canavanin lemezre szélesztettem, a fennmaradó mennyiségekből pedig párhuzamos mintánként 10µl-t hígítási sor készítésére használtam fel. A hígítási sorokból párhuzamos mintánként lemezelési kontrollként 200-200 sejtet szintetikus teljes (SC) táplemezre szélesztettem. Az L-canavanin lemezeken kinőtt telepek számából, a lemezelési kontroll által mutatott túlélési százalékkal korrigálva párhuzamos mintánként megadható az adott törzsre jellemző, 10^7 lemezelést túlélő sejtre jutó spontán *can1* revertánsok száma. A párhuzamos minták revertánsainak száma átlagolható. Az átlagos revertáns számból, a Lea-Coulson fluktuációs modell alapján készült táblázatból (Lea and Coulson 1949) megadható a törzsre jellemző, 10^7 lemezelést túlélő sejtre jutó spontán mutációk száma. A kísérleteket legalább háromszor ismételtam, az eredményeket átlagoltam, és a szórást a megfelelő ábrákon feltüntettem.

2.11 GST-fúziós fehérjék tisztítása, fehérje kölcsönhatások in vitro vizsgálata (GST-pulldown)

A megfelelő fehérjék génjei (PCNA pontmutánsok, Rev1, Rad54) egyenként N-terminális GST címke fúziót tartalmazó pBJ842 vektorba lettek klónozva, a leolvasási keret megtartásával. Az itt leírt protokoll kis változásokkal a szakirodalom hasonló eljárásait követi (Johnson, Prakash et al. 2006). A fehérjék túltermelése 2% galaktóz indukcióval indítható, az alkalmazott élesztő kultúra térfogat 1-2 liter között mozog. A letermelt sejtek, -70 fokon tárolhatóak. A fehérjetisztítás során a feltárás száraz jégben történő mechanikus zúzás, majd a feltárt sejtek 5-10 ml 1XBS pufferben lesznek feloldva (50mM TrisHCl pH 7, 1mM EDTA pH8, 3MKCl, szacharóz, 150 mM NaCl, 5-10mM β-merkaptotanol, 1 Roche proteáz inhibitor tabletta/50 ml puffer). 20 perces 4°-on történő 16000 rpm-es centrifugálás, majd 90 perces 4°-on történő 35 000 rpm-es ultracentrifugálást követően a tiszta felülúszót 50-100µl térfogatú GST (glutátion-szefaróz) gyöngy töltetet tartalmazó oszlopba töltjük. A lizátumot az oszlopon legalább kétszer átfolyatjuk, majd 5ml magas sótartalmú oldattal (HSB: 50mM TrisHCl pH 7.5, 1M NaCl, 10% glicerín; 0,01%NP40) és 5ml alacsony sótartalmú oldattal (LSB: 50mM TrisHCl pH 7.5, 150mM NaCl, 10%

glicerín, 0,01%NP40) mossuk az oszlopot. Végül 2ml Prescission proteáz pufferrel (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glicerín, 0,01% Nonidet P-40) történő mosás következik.

A fehérjét tartalmazó GST gyöngyöket összegyűjtjük 100µl Prescission proteáz pufferben, 0,1µg Prescission proteázt adunk hozzá és egy éjszakán át 4°C-on inkubáljuk. A Prescission proteáz a GST-címke és a fehérje között hasít, a reakció felülúszójában így módon tiszta tag nélküli fehérjét eredményezve.

Fehérjék közötti interakció kimutatásához (GST pulldown) az egyik fehérjét nem emésztjük le a GST-gyöngyről, hanem a kérdéses fehérjét tartalmazó Prescission proteáz pufferben lévő gyöngyhez (0,5 µg fehérje, ami kb. 5-10µl gyöngy) hozzáadjuk a fent leírt módon tisztított feltételezett interakciós partner fehérjét (0,5µg mennyiségben). A komplex képződéséhez a fehérjéket egy éjszakán keresztül 4°C-on együtt inkubáljuk, majd másnap a gyöngyök négyszeri, pufferben történő átmosása után 20mM-os redukált glutátió oldattal leszorítjuk a komplexet a gyöngyökről. Az elúciós lépés redukált glutátió használata helyett elvégezhető Prescission-proteáz emésztéssel is. Az interakció ellenőrzése akrilamid gélen történik, az analizált frakciók között megtalálható az interakciót vizsgáló reakcióból az elején vett bemeneti (load) frakció, a reakcióidő letelte után vett átfolyó (felülúszó) frakció, a mosás frakció, és végül maga az elúciós frakció. Az interakciós partnernek a GST gyöngyhez vagy a címkéhez történő aspecifikus kicspódását kiszűrendő egy párhuzamos negatív interakciós kontroll is összemérésre kerül, melyben önmagában, fúziós fehérje nélkül túltermeltetett GST címke kerül gyöngyre kötésre, és ehhez adjuk hozzá a feltételezett interakciós partnert.

2.12 Natív (nem denaturáló körülmények között végzett) grádiens akrilamid gélelektroforézis

Natív, azaz SDS mentes akrilamid géleket a tisztított PCNA fehérjék trimer konformációjának ellenőrzésére használtunk. Az SDS mentes gélben a fehérjék nem méretüknek megfelelően, hanem háromdimenziós szerkezetüknek megfelelően futnak, és az alegységek közötti kapcsolatok is fennmaradnak. A gélekben akrilamid sűrűség grádienszt hoztunk létre 6% és 15%-os akrilamid gélekből, a „Pharmacia LKB” grádiens keverő készülék segítségével. A natív akrilamid gél összetétele: gél-sűrűségnek megfelelő mennyiségű 30% akrilamid/0.8% bisz akrilamid keverék, 375mM végkoncentrációjú TrisCl

(SDS mentes) négyszeres hígításban, és a megfelelő térfogat eléréséhez szükséges steril víz.

A natív akrilamid gélhez használt mintapuffer összetétele: 310mM végkoncentrációban 6.8-as PH-val rendelkező TrisCl (SDS nélkül), 50% glicerol, 0,05% brómfenolkék, és a térfogat eléréséhez szükséges steril víz. A natív akrilamid gélhez használt elektroforézis puffer összetétele: 1,44 m/m% glicin, 0,3m/m% Tris-amino metán, steril víz. A fehérjemintákat a mintapufferben történő feloldás után nem forraltuk meg.

2.13 Az UV károsítás génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata LacZ riporter használatával

A kísérletek elvégzéséhez használt élesztő törzseket a pRS426 alapú pID835 plazmiddal transzformáltuk, amely a *LacZ* gént a GAL1 promóter által vezérelve termeli. Három nappal a kísérlet előtt egyedi élesztő telepeket oltottunk le szintetikus komplett tápoldatba, amely nem tartalmazott glükózt és uracilt, és 2% tejsavval és 3% glicerollal egészítettük ki. Ezen starter kultúrákat a kísérlet napján egyenként átoltottuk 10 ml azonos tápoldatba A600 OD. 0,1 optikai denzitásra, majd OD 0,7-ig növesztettük őket. Ekkor a kultúrákat két 5 ml-es egységre osztottuk, majd az egyik egységet 130J/m² UV dózissal besugároztuk, a másikat nem kezeltük. Mind az UV kezelt mind a kezeletlen sejteket a fenti összetételű friss tápoldatban felfuszpendáltuk, és kiegészítettük 2% galaktózzal. A *LacZ* gén galaktóz általi indukciója után a kultúrákat sötétben növesztettük, és 1-1 ml mintát vettünk belőlük közvetlenül a kezelés után, és a kezelés után 3, illetve 5 órával. A termelődött *LacZ* termék β -galaktozidáz mennyisége volt a transzkripció mértékének indikátora. A begyűjtött sejteket Z-pufferben átmostuk (60 mM Na₂HPO₄, 39,8 mM NaH₂PO₄·H₂O, 10 mM KCl, 0,9 mM MgSO₄, pH 7.0) majd 50mM β -merkaptóetanollal kiegészített Z pufferben feltártuk a sejteket 3 gyors egymásutáni fagyasztási- olvasztási ciklussal. Standard ONPG folyékony esszét alkalmaztunk a β -galaktozidáz aktivitás meghatározására a CLONTECH Yeast Protocols Handbook kézikönyv (PT2024-1, VI. fejezet) leírása szerint. A transzkripció helyreállításának százalékos arányát az UV kezelt mintában mérhető β -galaktozidáz enzim aktivitás, és a neki megfelelő nem kezelt mintában mérhető enzim aktivitás arányából fejeztük ki. A bemutatott eredményeket a vad típusú törzs transzkripciójának helyreállításához normalizáltuk, annak értékét véve 1-nek. Négy kísérlet eredményét átlagoltuk, és a szórást feltüntettük.

2.14 Statisztikai kiértékelés

Ahol szükségesnek tartottuk elvégeztük az eredmények statisztikai kiértékelését a Student's t-próba függvény használatával (Microsoft Excell szoftver segítségével). 0,05-nél kisebb P értékeket szignifikáns különbségnek vettünk. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3. Eredmények

3.1 Mutációkat hordozó *POL30* gének és PCNA fehérjék

Helyspecifikus, PCR alapú mutagenezissel a 2.5 fejezetben leírt módon 10 módosított *POL30* gént állítottunk elő, amelyek mindegyike egy-egy általunk megválasztott helyen aminosavcserét eredményező pontmutációt hordoz. A kiválasztott aminosavakat kódoló tripleteket- a gyakori szakmai megközelítésnek megfelelően- minden esetben alanint kódoló kodonra módosítottuk. Az alanint ugyanis apoláros jellege és kis mérete biológiai funkcióját tekintve kevésbé hangsúlyossá teszi. Mivel az élesztő PCNA fehérje génjének neve *POL30*, egy PCNA mutáns törzs genotípusát pl. az L154A aminosav cserét hordozóét helyesen *pol30-L154A* -nak kell írni. Dolgozatom további részében a genotípusokat igyekszem eszerint feltüntetni, a fenti genotípusnak megfelelő aminosavcserét hordozó fehérjére pedig L154A PCNA változatként hivatkozok.

A mutációk helyének megválasztásakor több szempontot is figyelembe vettünk. Elsősorban a PCNA trimer alegységeinek kapcsolódási felszínét vettük célba, ugyanis jól leírt fehérjekötő felszín ebben a régióban még nem ismeretes (vö. 1.3.3 fejezet), viszont két nemrégiben megjelent közlemény behatóan foglalkozik egy kettős aminosavcserét hordozó élesztő PCNA változattal, amely pont ezt a régiót érinti (vö. 1.3.4 fejezet). A leírt törzsben nem működik a transzléziós DNS szintézis, ugyanis a kérdéses *POL30* gén Pol ζ DNS polimerázzal való funkcionális kapcsolata, illetve a Rev1 DNS polimerázzal való fizikai kölcsönhatása sérült (Northam, Garg et al. 2006, Sharma, Kochenova et al. 2011). Feltételeztük, hogy hasonlóan a PCNA egyéb ismert fehérjekötő régióihoz, (vö. 1.3.3 fejezet) ezen régióban is egy kiterjedtebb, több funkciót szabályozó felszín található. Az alegységek kapcsolódási felszíne kiterjedt, egymáshoz illeszkedő β -redőkből áll. (18/a ábra) Az általunk létrehozott tíz aminosavcseréből hét ezeken helyezkedik el (18/a ábra). A mutációk elhelyezkedésüket tekintve megoszlanak a kapcsolódási felszín két oldalán, az egyik alegység A, illetve a másik alegység B doménje között.

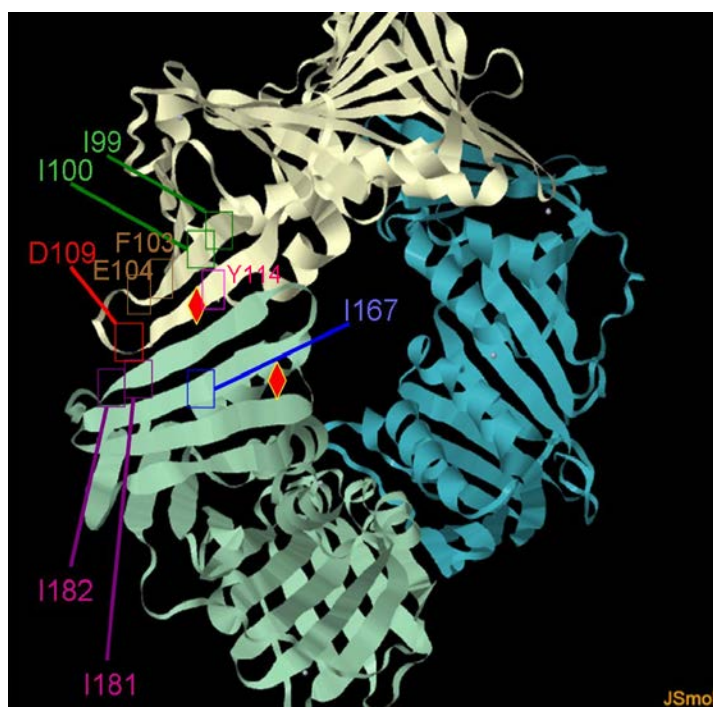
További két előállított aminosavcsere az alegységek C-terminálisán idéz elő aminosav változást (18/b ábra, F245A és DE256,257AA). Ezen helyek közelében egy már jól ismert és jellemzett fehérjekötési régió helyezkedik el (vö. 1.3.3 fejezet).

A fennmaradó egy mutációt úgy terveztünk meg, hogy az a PCNA gyűrű belső felszínén elhelyezkedő α -hélixek egyikén okoz aminosav cserét. (18/c ábra, L154A). Ez a mutáció

már elő lett állítva és leírva egy korábbi közleményben, de ott csupán a DNS károsításokra adott érzékenysége (UV és MMS érzékenység) lett összefoglalva, behatóbb vizsgálatnak nem vetették alá (Lau, Flores-Rozas et al. 2002).

A mutációk létrehozásához felhasznált PCR primerek szekvenciáját a genomi szekvenciához viszonyított eltérések kiemelésével a 19. ábrán tüntettem fel.

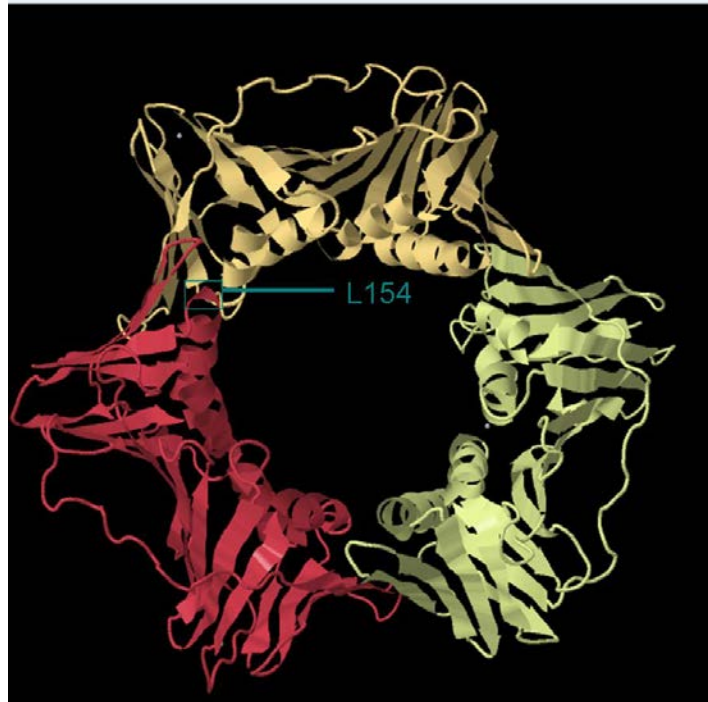
A.



B.



C.



18. ábra: Az előállított aminosav cserék helye az élesztő PCNA fehérje trimer gyűrűjének kristályszerkezeti modelljén. A fehérje alegységei különböző színűek. A) Az alegységek kapcsolódási felszínén elhelyezkedő mutációk. Piros rombuszal jelölve a szakirodalomból ismeretes E113-as és L151-es aminosav, amelyek együttes mutációjáról kimutatták, hogy inaktíválja a transzléziós DNS szintézist. Piros körrel jelölve a K164-es aminosav, amely a PCNA ubiquitiláció helye. B) A PCNA monomer C-terminálisán elhelyezkedő mutációk. Az F245 a fehérje C-terminálisából kinyúló kis kacs előtt elhelyezkedő utolsó β -lemezen, míg a DE257,257AA magán a kinyúló kacson helyezkedik el. C) A trimer belső felszínén elhelyezkedő mutáció. Az L154A mutáció az alegységek kapcsolódási felszíneitől nem messze, de a gyűrű belső felszíne felé forduló α -hélixben helyezkedik el. (RCSB protein database, Krishna, Kong et al. 1994, módosítva)

genotípus	A PCR alapú helyspecifikus mutagenézishez használt oligonukleotidok
<i>pol30-Y114A</i>	gACCgTATAgCCgAAg CCT CTCTgAAATTgATgg CCATCAATTTCAgAgAgg C TTcggCTATACggTC
<i>pol30-FE103,104AA</i>	CCATCATCTTA GCT gCggATACCAAgAAAgACCg CggTCTTTCTTgTATCC gCA G CT AATAAgATgATgg
<i>pol30-L154A</i>	gTTCgTgACTTgTCCCAAg Cg AgTgATTCTATTAATATCATg CATgATATTAATAgAATCACTC gCT gggACAAGTCACgAAC
<i>pol30-DE256,257AA</i>	CTTggCTCCTAAATTTAATg CCgCA gAATAAATgTAAATTATC gATAATTTACATTTATTCTg Cgg CATTAAATTTAggAgCCAAG
<i>pol30-II158,160AA</i>	gTCCCAATTgAgTgATTCTg CTA Ag CC ATgATCACCAAgAAAC gTTTCTTTggTgATCATg gC ATTAg CA gAATCACTCAATTgggAC
<i>pol30-II181,182AA</i>	CggATCAggtTCAGTC gCAg CAAAACCATTCgTggATATgg CCATATCCACgAATggTTTT gCTgC gACTgAACCTgATCCg
<i>pol30-II99,100AA</i>	gACAACACACCggATTCC gCgC CTTATTATTgAggATACC ggTATCCTCAAATAATAAg gCggC ggAATCCggTgTgTTgTC
<i>pol30-D109A</i>	gATACCAAgAAAg CCC gTATAgCCgAATAC gTATTCggCTATACgg gCT TTCTTggTATC
<i>pol30-F245A</i>	gATTgAAgAgTggg gCC TACAgTTTTCTTggC gCCAAGAAAACTgTAgg gCCCC ACTCTTCAAATC
<i>pol30-I167A,D109A</i>	gATCACCAAAgAAACAg CAAA gTTTgTAgCTgACggTg CACCGTCAgCTACAAACTTT gCTg TTTCTTTggTgATC

19. ábra: A pontmutációkat hordozó *POL30* génnek előállításához használt oligonukleotid párok szekvenciája. A felső sorokban az ún. szensz, míg az alsó sorokban az antiszensz oligonukleotid látható 5'-3' irányban. A genomi szekvenciához viszonyított eltérések félkövéren vannak kiemelve.

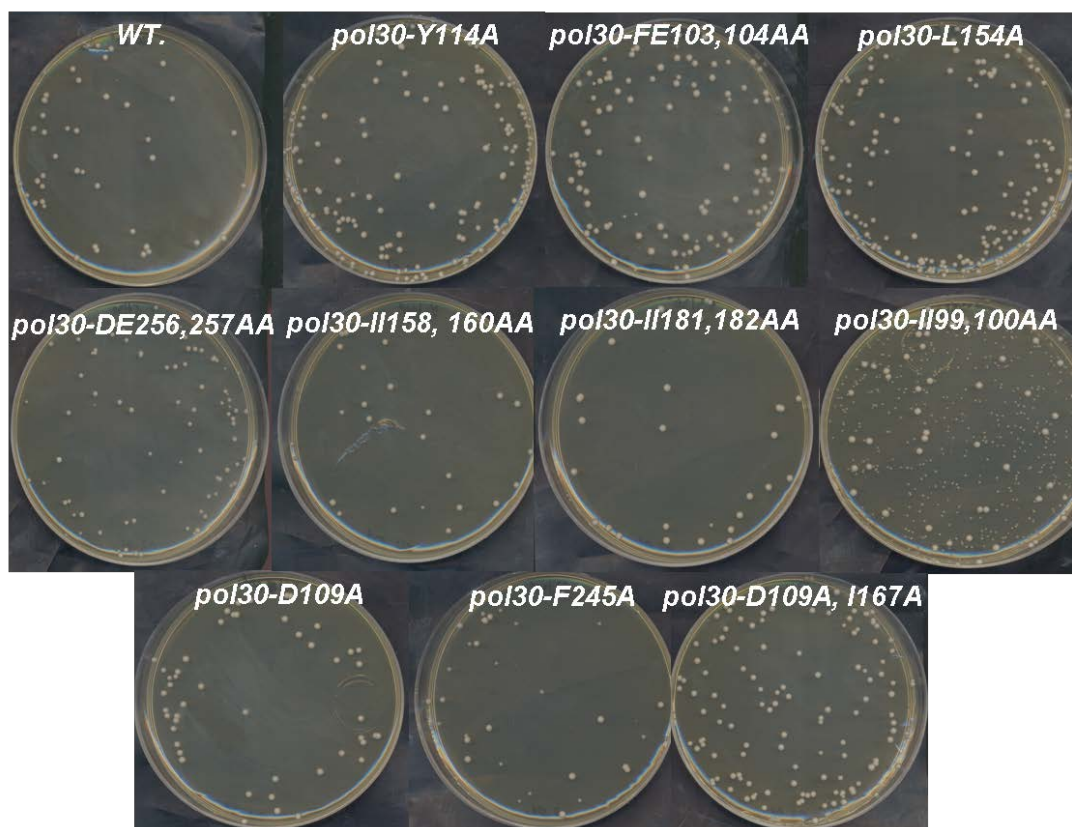
A létrehozott *POL30* pontmutáns géneket (vö. 2.5 fejezet) hordozó centromeres konstruktokat általunk módosított, genomi *POL30* kópiát nélkülöző élesztő törzsekbe juttattam, ahol egyedüli PCNA forrásként fejeztettem ki őket, (vö. 2.5 fejezet) biztosítva ezáltal, hogy a vizsgált élesztő törzsekben csupán a módosított PCNA fehérje legyen jelen.

3.2 A *POL30* mutáns élesztő törzsek fenotípus vizsgálata

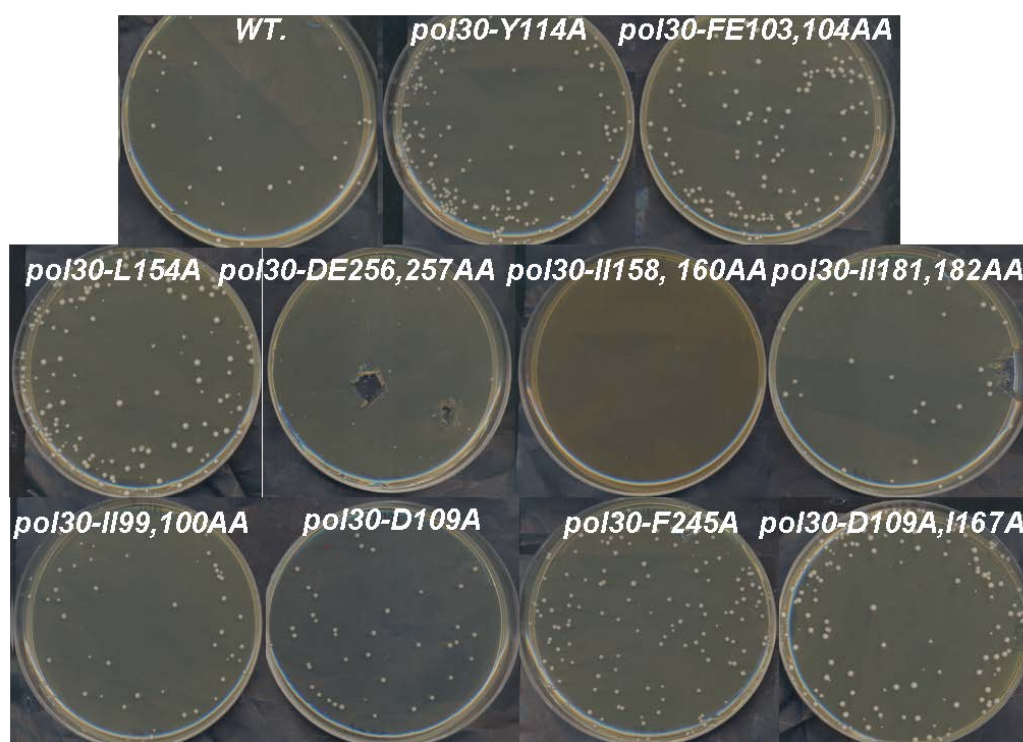
A különböző PCNA változatokat termelő törzsekben elsőként a növekedési sebességet, azaz az osztódás sebességét ellenőriztük. A lassú növekedésű törzsek replikációs defektussal bírnak, ezek további vizsgálataink számára tárgytalanok, hiszen mi DNS reparációs vagy DNS hiba tolerancia folyamatok működésében károsodott, normál sebességgel osztódó törzseket kerestünk. A növekedési hibák egyik fajtája a hőmérséklet érzékeny növekedés. Egyes törzsek enyhe növekedési defektusa optimális növekedési hőmérsékleten (élesztőben 30°C) nem mutatható ki, csupán az optimálistól eltérő növesztési körülmények esetén látható. Minden törzsből számolható mennyiségű sejtet lemeztünk ki teljes táptalajt (YPD) tartalmazó táplemezre, majd a lemezeket 30°-on

illetve 25°C-on inkubáltuk. A telepek átmérőjét vizuálisan összehasonlítva kiszűrhattuk azokat a törzseket, amelyek észlelhető eltérést mutattak azonos növekedési körülmények között a telepek átmérőjében. A kísérlet eredményeképpen azt láttuk, hogy optimális hőmérsékleten inkubálva egyetlen mutáns PCNA fehérjét termelő törzs sem növekszik lassabban a vad típusú fehérjét termelő kontroll törzsnél, 25°-on viszont két törzs is jelentős növekedési defektust mutat (20. ábra). A C-terminálison elhelyezkedő módosítást hordozó DE256,257AA PCNA-t termelő törzs csak rendkívül lassan, míg az alegységek kapcsolódási felszínén elhelyezkedő egyik módosítást hordozó törzs, az II158,160AA PCNA-t kifejező szinte egyáltalán nem képes kinőni ezen a restriktív hőmérsékleten (20. ábra).

A.



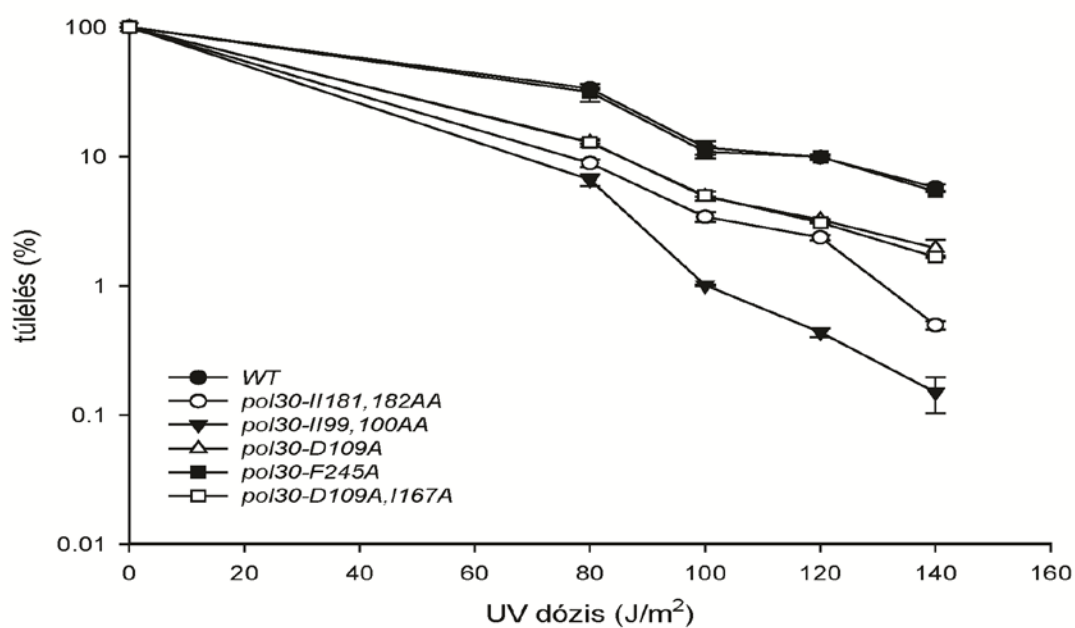
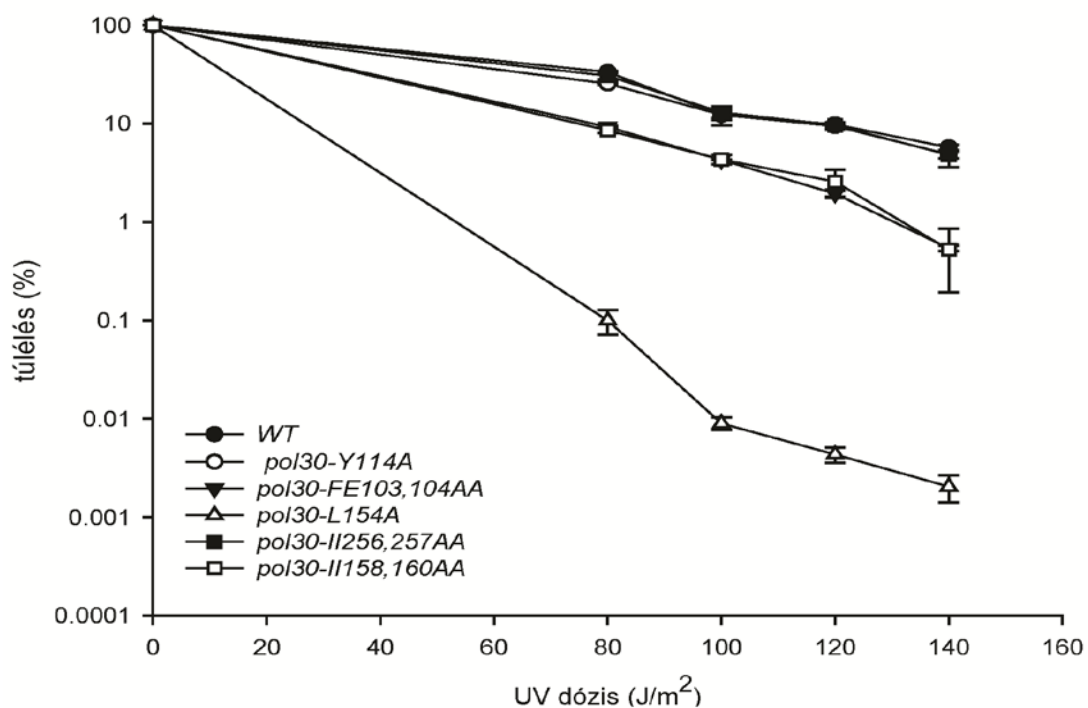
B.



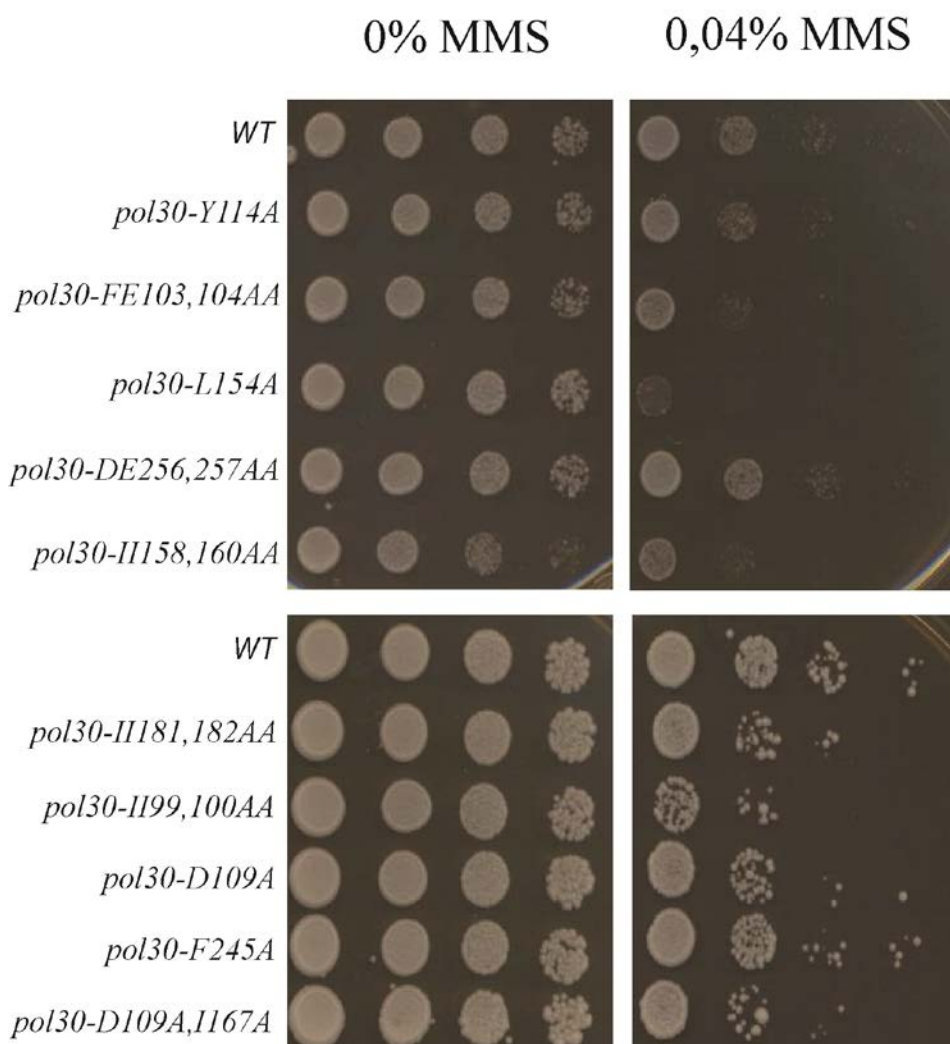
20.ábra: *POL30* mutáns élesztő törzsek növekedési sebessége. A) 3 nap növesztés után 30 fokon. B) 3 nap növesztés után 25 fokon.

A növekedési sebesség szűrése után a törzseket DNS károsító hatásnak vetettük alá. UV és MMS károsítást alkalmaztunk. A PCNA mutáció jelenléte miatt a vad típusnál érzékenyebbé váló törzsek igazán érdekesek számunkra, hiszen ezek DNS károsodásra mutatott megnövekedett érzékenységüket annak köszönhetik, hogy károsodott bennük a DNS reparáció vagy DNS hiba tolerancia valamely útvonalának működése.

A pontmutáns PCNA fehérjét kifejező különböző törzsek különböző fenotípust mutattak DNS károsító hatásokra, de egyazon törzs hasonlóképp reagált UV és MMS kezelésre egyaránt. A tíz előállított törzsből 3 (*pol30-F245A*; *pol30-Y114A* PCNA; *pol30-DE256,257AA*) egyáltalán nem mutatott a vad típusú törzshöz képest megnövekedett érzékenységet sem MMS, sem UV károsításra (21., 22. és 23. ábra). A *pol30-Y114A* törzs ilyen viselkedése főként annak tudatában meglepő, hogy csupán egy aminosavnyi távolságra van a szakirodalomban UV érzékenyként leírt (1.3.4 fejezet) *pol30-E113G* pontmutációtól. Ez ugyanis arra utal, hogy az alegységek kapcsolódási felszínén egymáshoz térben legközelebb eső régiók máris teljesen más szerepet képesek betölteni. A többi hét módosított PCNA fehérjét kifejező törzsből öt (*FE103,104AA*; *II158,160AA*; *II181,182AA*; *D109A* és *D109A,II167A* PCNA változat) enyhén, de egyértelműen megnövekedett érzékenységet okoz UV és MMS károsításra (21., 22. és 23. ábra), további egy (*II99,100AA* PCNA változat) az előző ötnél is kissé nagyobb érzékenységet idéz elő (21., 22. és 23. ábra). A *pol30-L154A* törzs DNS károsító hatásokra messze a legérzékenyebb az előállított mutáns fehérjét hordozó törzsek közül (21., 22. és 23. ábra).



21. ábra: Az előállított *POL30* mutáns törzsek UV érzékenysége: A *pol30-Y114A*, *pol30-DE256,257AA* és a *pol30-F245A* PCNA törzsek nem érzékenyebbek a vad típusú törzsnél, az *pol30-FE103,104AA*, *pol30-II158,160AA*, *pol30-II181,182AA*, *pol30-D109A* és *pol30-D109A,1167A* és *pol30-II99,100AA* törzsek megnövekedett érzékenységűek, míg az *pol30-L154A* a legérzékenyebb mind közül.



22. ábra: Az előállított *POL30* mutáns törzsek MMS érzékenysége: Az *pol30-Y114A*, *pol30-DE256,257AA* és a *pol30-F245A* törzsek nem érzékenyebbek a vad típusú törzsnél, a *pol30-FE103,104AA*, *pol30-III158,160AA*, *pol30-III181,182AA*, *pol30-D109A*, *pol30-D109A,I167A* és *pol30-II99,100AA* törzsek megnövekedett érzékenységűek, míg a *pol30-L154A* a legérzékenyebb mind közül.

A mutáns PCNA fehérjét termelő élesztő törzsek UV és MMS érzékenységét, valamint növekedési sebességét sematikusán a 23. ábrában foglaltam össze. További vizsgálataink számára azon mutánsok érdekesek, amelyek megnövekedett UV vagy MMS érzékenységgű fenotípust mutatnak, és nem lassult bennük jelentős mértékben a replikáció folyamata. Megfigyelhető, hogy az említett kritériumoknak megfelelő törzsekben (a *pol30-L154A* törzs kivételével) a PCNA fehérjében mindig az alegységek kapcsolódási felszínén történt aminosavcsere.

A megnövekedett UV és MMS érzékenységgű törzsek közül további vizsgálatainkból lassú növekedés miatt csupán a *pol30-III158,160AA* törzset kellett kizárnunk.

genotípus	Növekedési defektus	UV érzékenység	MMS érzékenység
WT.	0	0	0
<i>pol30-Y114A</i>	0	0	0
<i>pol30-FE103,104AA</i>	0	++	++
<i>pol30-L154A</i>	0	++++	++++
<i>pol30-DE256,257AA</i>	+	0	0
<i>pol30-II158,160AA</i>	++	++	++
<i>pol30-II181,182AA</i>	0	++	++
<i>pol30-II99,100AA</i>	0	+++	+++
<i>pol30-D109A</i>	0	+	++
<i>pol30-F245A</i>	0	0	0
<i>pol30-I167A,D109A</i>	0	+	++

23.ábra: A mutáns PCNA fehérjéket termelő törzsek UV és MMS érzékenysége (0-a vad típushoz hasonló, + érzékenyebb), valamint növekedési defektusa (0-a vad típushoz hasonló, + sérült növekedési sebességű). A zöld betűkkel jelölt törzsek nem mutattak megnövekedett érzékenységet DNS károsító hatásokra, a pirossal jelölt törzs ugyan érzékenyebb a vad típusú törzsnél, de növekedési képességében is korlátozott.

3.3 A POL30 mutáns élesztő törzsek genetikai, funkcionális és biokémiai jellemzése

Látva a DNS reparációs és DNS hiba tolerancia folyamatok (vö. 2. fejezet) sokszínűségét, a nagyszámú jellemzett DNS reparációs és DNS hiba tolerancia útvonalat (vö. 2. fejezet), felmerül a kérdés, hogyan tudnánk újonnan vizsgált géneket, esetünkben az előállított fehérjemódosítások hatását egy ismert genetikai útvonalba sorolni. Élesztőgenetikában a DNS reparációt kutató genetikai vizsgálatok fő eszköze az episztázis analízis. Kettős deléciós törzsek előállításán alapul, azaz egy ismert útvonalba tartozó, és DNS károsító hatásokra ismert érzékenységet mutató gén deléciója mellé a vizsgált, de a DNS reparációban még nem jellemzett gén delécióját állítjuk elő. Amennyiben az előállított kettős deléciót hordozó élesztő törzs DNS károsító hatásra mutatott érzékenysége nem növekszik meg az érzékenyebbik kiindulási törzs érzékenységehez viszonyítva, a két gén viszonyát episztatikusnak nevezzük. Az ilyen viszony arra utal, hogy a vizsgált gének termékei az alkalmazott DNS károsítás által kiváltott károsodás

javításában egy útvonalon belül működnek. Episztázis vizsgálatokkal egy csoportba sorolt gének az élesztőgenetikai terminológiában egy episztázis csoportot alkotnak.

Az episztázis analízisnek kétségtelen haszna, és megkerülhetetlen volta mellett korlátai is vannak. Attól még, hogy a kettős deléciót hordozó törzs DNS károsító hatásra megnövekedett érzékenységet mutat, nem zárható ki annak a lehetősége, hogy az újonnan vizsgált gén terméke az adott DNS károsodást javító többféle útvonalban is szerepet játszik, a vizsgált útvonalat beleértve. Sokféle útvonalban szerepet játszó, pleiotróp gének esetén tehát nagyon nehéz „tisztá” episztázist kapni.

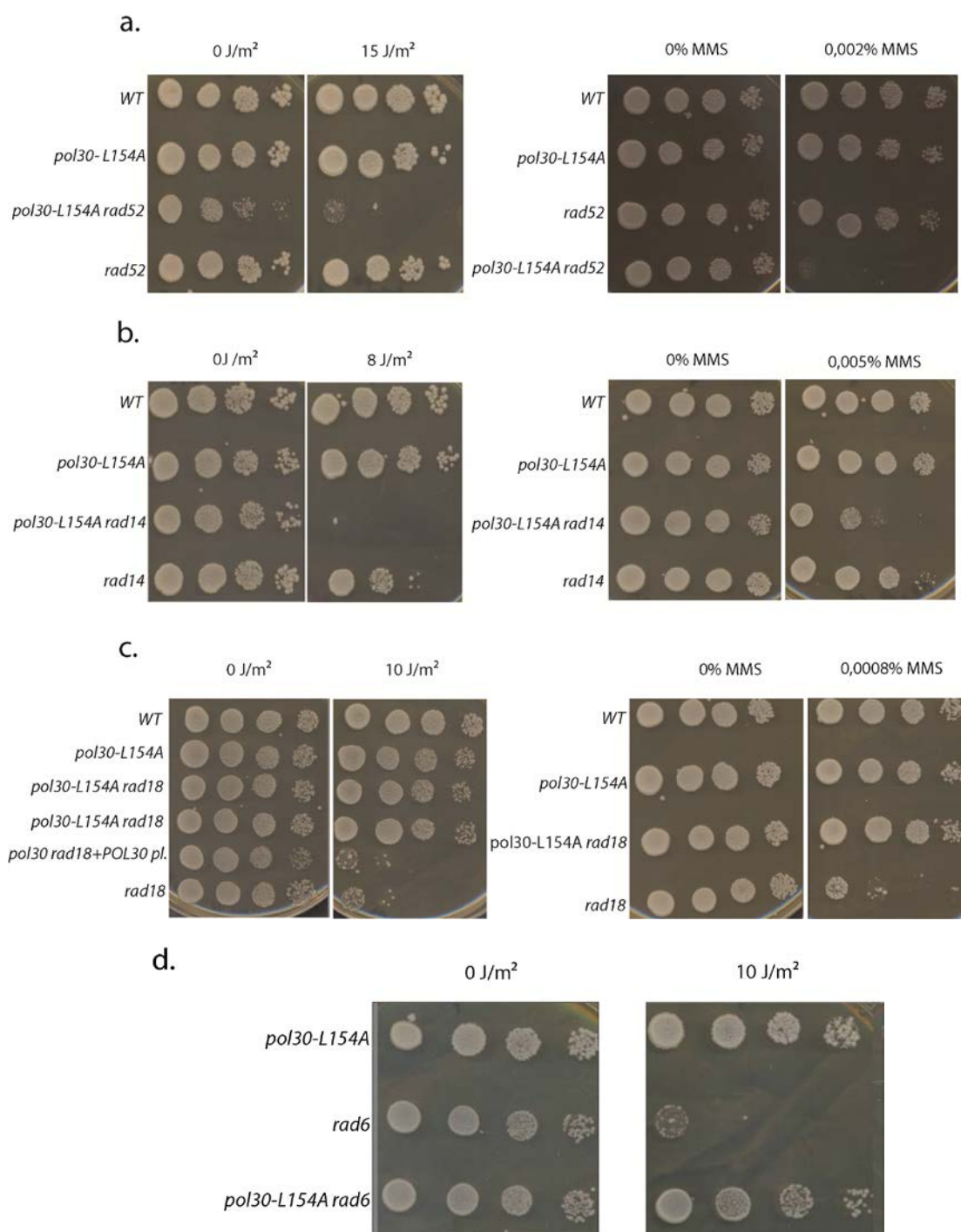
Munkámban episztázis analízis vizsgálatokkal igyekeztem meghatározott DNS reparációs vagy DNS hiba tolerancia útvonalakba sorolni a PCNA módosítások hatását. Az episztázis vizsgálatok eredményeit a kérdéses útvonalak funkcióját vizsgáló esszék segítségével (spontán és indukált mutációs ráta mérése) erősítettem meg. Végül biokémiai vizsgálatokkal is próbáltam magyarázni egyes PCNA pontmutáns törzsek fenotípusát.

Az alábbiakban sorban ismertetem a PCNA fehérje módosításának köszönhetően DNS károsító hatásra érzékennyé vált, de replikációs defektust nem mutató törzsek vizsgálatait.

3.3.1 A *pol30-L154A* élesztő törzs

A kérdéses PCNA mutáció a PCNA gyűrű belső felszínén lévő egyik α -hélixben helyezkedik el (18/c ábra), és a változatot termelő törzs a legerősebb érzékenységet mutatja DNS károsításra az előállított élesztő törzsek közül (vö.3.2 fejezet és 21, 22, 23 ábra).

Előállítottuk a mutációt hordozó törzsben a főbb DNS reparációs és DNS hiba tolerancia útvonalak kulcsfontosságú gégeinek delécióit (24. ábra). Az episztázis vizsgálatok alapján leszögezhetjük, hogy az *pol30-L154A* pontmutáns gén nem episztatikus a NER (vö.1.2.3 fejezet) kulcsszerepet játszó *RAD14* génjével (24/b ábra), sem a homológ rekombináció útvonalaiban szerepet játszó *RAD52* (vö.1.2.5 fejezet) génnel (24/a ábra). Viszont rendkívül érdekes módon szupresszálja a *RAD18* gén deléciójának DNS károsító hatásokra mutatott nagyon erős érzékenységét (24.c ábra).



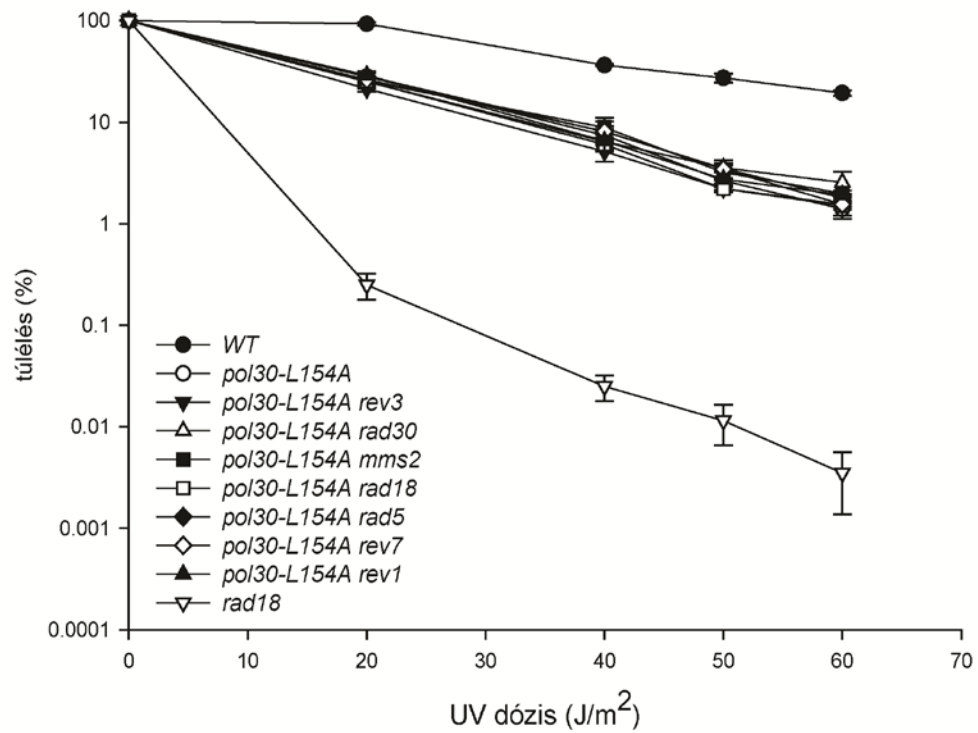
24. ábra: episztázis analízis az L154A mutáns PCNA-t termelő törzzsel. A) A *pol30-L154A* gén nem episztatikus a *RAD52* génnel. B) A *pol30-L154A* gén nem episztatikus a *RAD14* génnel. C) Az *pol30-L154A* gén szupresszálja a *RAD18* deléciójának UV és MMS érzékenységét. A *pol30-L154A rad18* kettős deléciós törzsből két egymás után előállított azonos változat áll rendelkezésünkre biológiai replikátumként, az UV kezelt kísérletben mindkettő, az MMS kísérletben csupán egyik szerepel. D) A *pol30-L154A* allél szupresszálja a *RAD6* deléciójának UV érzékenységét.

Arról, hogy az érzékenység szupressziójáért valóban a mutáns PCNA gén és nem egy genomai háttérmutáció felelős, úgy győződünk meg, hogy a pontmutáns PCNA-t hordozó

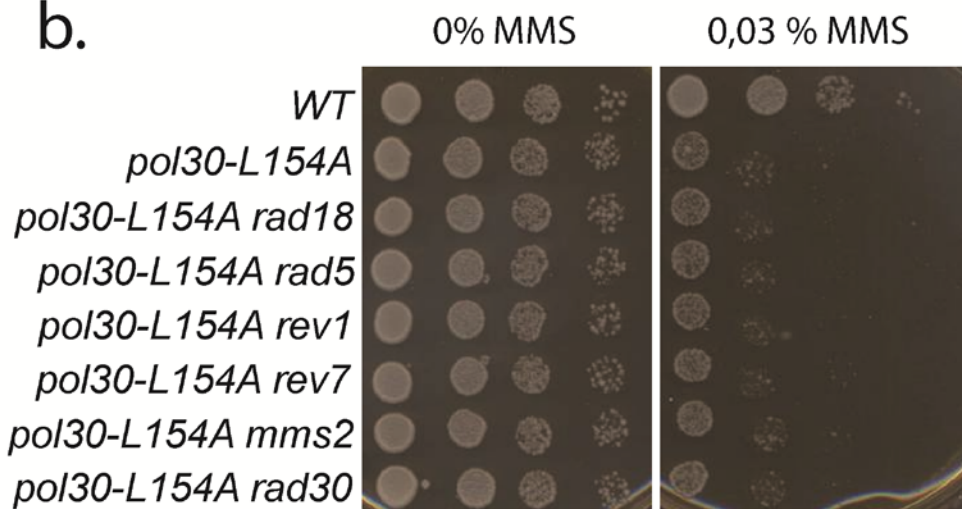
plazmidot egy vad típusú plazmidra cseréltük vissza (24.c ábra). Ennek következtében a várt érzékenység helyreállt. Hasonló fenotípust kaptunk a *RAD6*-tal végzett episztázis vizsgálatok esetében (24.d ábra). A pontmutáció képes volt szupresszálni a *RAD6* gén deléciójának érzékenységét is. Noha a *RAD6* és *RAD18* génekkel (1.2.4 fejezet) itt nem kifejezett episztázisról, hanem szupresszióról beszélünk, a fenotípus arra utal, hogy a *pol30-L154A* jelenléte befolyásolja a Rad6/Rad18 útvonalat. Elképzelhető volt, hogy a pontmutáns valamilyen módon PCNA fehérje jelenléte a Rad6/Rad18 felsőbb ellenőrzése nélkül aktiválhatja a Rad6/Rad18 útvonal egyes ágait (vö.1.2.4 fejezet), ezáltal okozva a *rad18* deléciós törzs DNS károsító szerekre mutatott érzékenységének szupresszióját. Hogy átfogóbb képet kapjunk erről az érdekes fenotípusról, ellenőrizzük a Rad6/Rad18 útvonal különböző génjeinek működését az L154A PCNA-t termelő pontmutáns törzsben. Az episztázis vizsgálatba bevont nagyszámú, a Rad6/Rad18 útvonal különböző ágain belül működő gén közül egy sem tudta befolyásolni a *pol30-L154A* törzs UV és MMS érzékenységét (25. ábra). Ez arra utal, hogy a Rad6/Rad18 útvonal ezen mutánsban, teljes egészében inaktív (25.ábra).

Ha nem a Rad6/Rad18 útvonal egyes ágainak működése, akkor mi okozhatja a *rad18* deléció érzékenységének szupresszióját? A szakirodalomban ismeretes egy PCNA pontmutáció, amely az L15A mutáns PCNA-hoz rendkívül hasonló fenotípust okoz. Ez a K164-es aminosav argininre való mutációja (Hoegge, Pfander et al. 2002). Mivel a K164 aminosav a PCNA ubiquitiláció és egyben sumoiláció helye, így ez a PCNA mutáns nem képes sem ubiquitilálódni, sem sumoilálódni. A K164-es mutánsban a *rad6* és *rad18* deléció érzékenységének szupressziójáért a sumoiláció hiánya a felelős. Ugyanis a sumoilált PCNA köti az Srs2 helikázt, amely gátolja a homológ rekombináció működését (vö. 1.3.2/e fejezet). Ha nincs sumoiláció, a homológ rekombináció túlműködik, és ez okozza az *rad6* és *rad18* deléciós törzsek UV és MMS érzékenységének csökkenését.

a.



b.



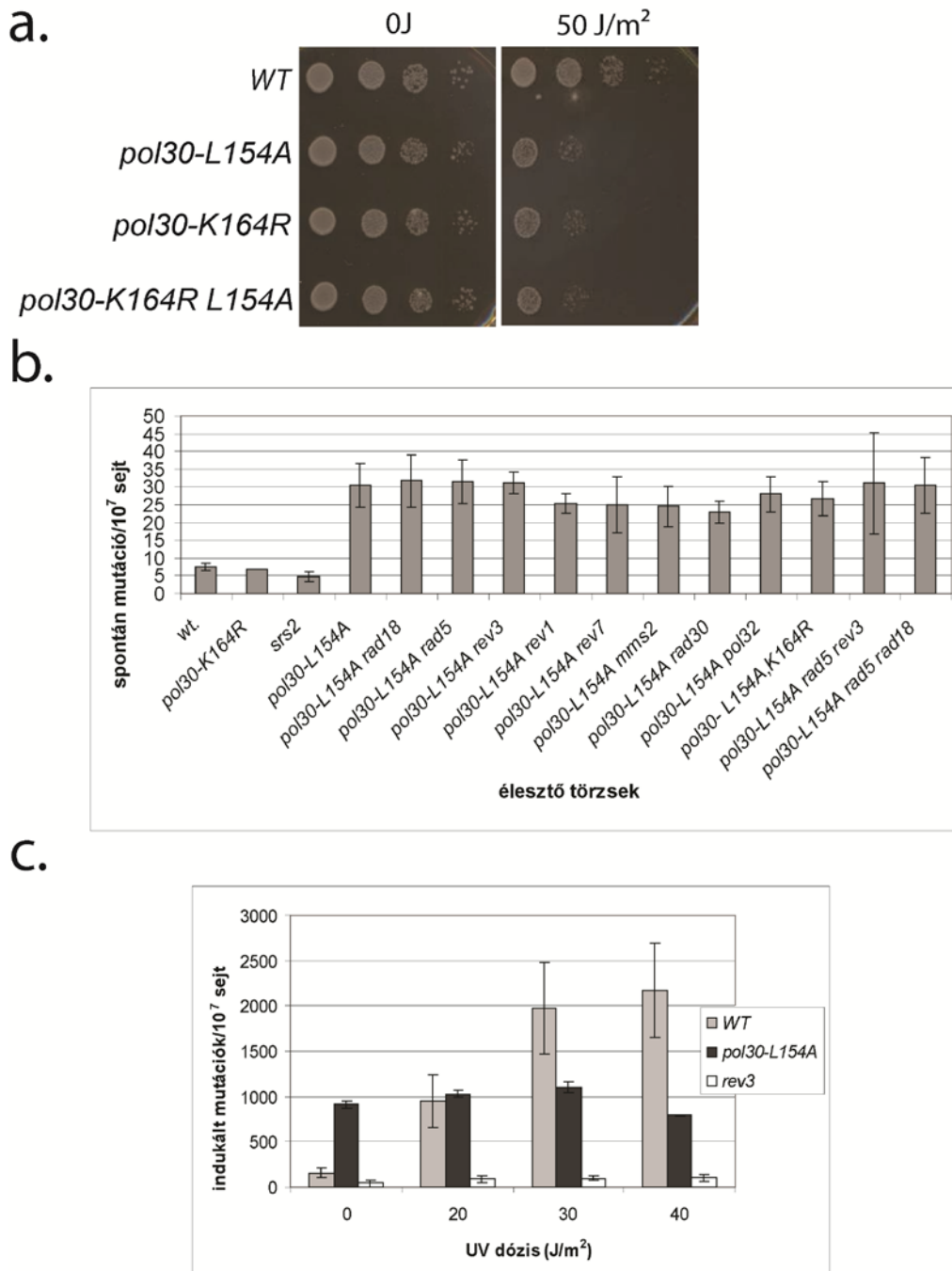
25.ábra: A DDT (Rad6/Rad18) útvonal inaktív az L154A PCNA változatot termelő törzsben. A) a Rad6/Rad18 útvonal génjeinek delécioja nincs hatással a *pol30-L154A* allélt hordozó törzs UV érzékenységére. B) a Rad6/Rad18 útvonal génjeinek delécioja nincs hatással a *pol30-L154A* allélt hordozó törzsek MMS érzékenységére.

Ha esetünkben is hasonló mechanizmus okozza a tapasztalt szupressziót, akkor az L154A-K164R kettős aminosavcserét hordozó PCNA fehérjének nem szabad erősebb UV érzékenység szupressziót okoznia az L154A aminosavcserét hordozó PCNA fehérjénél,

hiszen ekkor a homológ rekombináció már a *pol30-L154A* törzsben is felszabadult a gátlás alól, és túlműködik. Kísérleteink azt mutatták, hogy mind az L154A, mind a K164R mind pedig a K164R-L154A kettős aminosavcserét hordozó PCNA változat azonos UV érzékenységet okoz (26/a. ábra). Ezek az eredmények (a Rad6/Rad18 útvonal teljes inaktivitásának tudatában, amely fenotípus a K164R mutáns PCNA változatra is jellemző az ubiquitiláció hiánya miatt) azt sugallják, hogy az L154A mutáns PCNA fehérje a K164R-hez hasonlóan nem képes sem ubiquitilálódni, sem sumoilálódni. Az ubiquitiláció biokémiai módszerrel történő kimutatásának menete a szakirodalomból ismeretes, viszont a módosítást élesztőben rendkívül instabil volta miatt vad típusú PCNA-n sem könnyű kimutatni. Nem rendelkezünk továbbá megbízható PCNA antitesttel, csupán nagy háttérrel adó szérummal. A PCNA fehérje ezenfelül nagyon érzékeny mind az N-, mind a C-terminális címkézésre akár kis címkék esetén is. A címkézett vad típusú PCNA-t hordozó törzsek érzékennyé váltak UV sugárzásra, így nem használhatóak DNS reparációs folyamatok vizsgálatára, hiszen bennük a címke jelenléte miatt sérült a DNS reparációs funkció. Jelenleg az ubiquitiláció szintjének megemelésén dolgozunk. Ha Rad18 ubiquitin ligáz túltermelő plazmidot juttatunk be a sejtekbe, emelhető a DNS károsodásra bekövetkező ubiquitiláció mértéke, és ez így módon talán háttérrel adó, rosszabb antitesttel használatával is kimutathatóvá válik.

A Rad6/Rad18 útvonal inaktivitását tovább bizonyítandó, ellenőriztük az indukált és a spontán mutációs rátát is a *pol30-L154A* törzsben. Az indukált mutagenézis, azaz a DNS károsító hatásra indukálódott pontmutációk képzése a Rad6/Rad18 útvonal transzlációs szintézis (TLS, vö. 1.2.4.2 fejezet) ágának köszönhető. Ez az útvonal pedig a genetikai analízis tanúsága szerint a *pol30-L154A* törzsben nem aktív. Azt vártuk tehát, hogy növekvő UV dózis alkalmazásával a vad típusú törzssel ellentétben, a *pol30-L154A* törzsben nem emelkedik a képzett pontmutációk száma. Ezt az eredményt meg is kaptuk (26/c. ábra), viszont a spontán mutációs ráta ellenőrzésekor meglepő értékeket tapasztaltunk. A *pol30-L154A* élesztő törzs spontán mutációs rátája 3-4-szeres emelkedést mutatott a vad típusú törzs spontán mutációs rátájához képest (26/b ábra). Ezt a megnövekedett spontán mutációképzést (spontán mutátor fenotípust) több, a mutagenézisben résztvevő, és a Rad6/Rad18 útvonalba tartozó gén deléciójával, és delécióik kombinációjával próbáltuk a vad típusú törzs szintjére csökkenteni. A kiválasztott gének deléciójával ezt nem sikerült elérnünk (26/b ábra). A szakirodalomból ismertek olyan, a replikatív DNS polimerázt (Pol ϵ , Pol δ) érintő aminosavcserék, amelyek spontán mutátor fenotípust okoznak (Northam, Garg et al. 2006). Ezeknél a spontán mutációs ráta

emelkedésének mértéke megegyezik az L154A mutáns PCNA által okozott spontán mutátor fenotípus mértékével. Miután deléciók előállításával nem sikerült a *pol30-L154A* törzs spontán mutátor fenotípusát csökkenteni, kézenfekvőnek tűnik, hogy a PCNA mutáció által előidézett szerkezeti változás befolyásolhatja a hozzá kapcsolódó replikatív polimeráz fidelitását, ezáltal- a replikatív polimeráz mutáns formáihoz hasonló mértékű-mutátor fenotípust okozva.

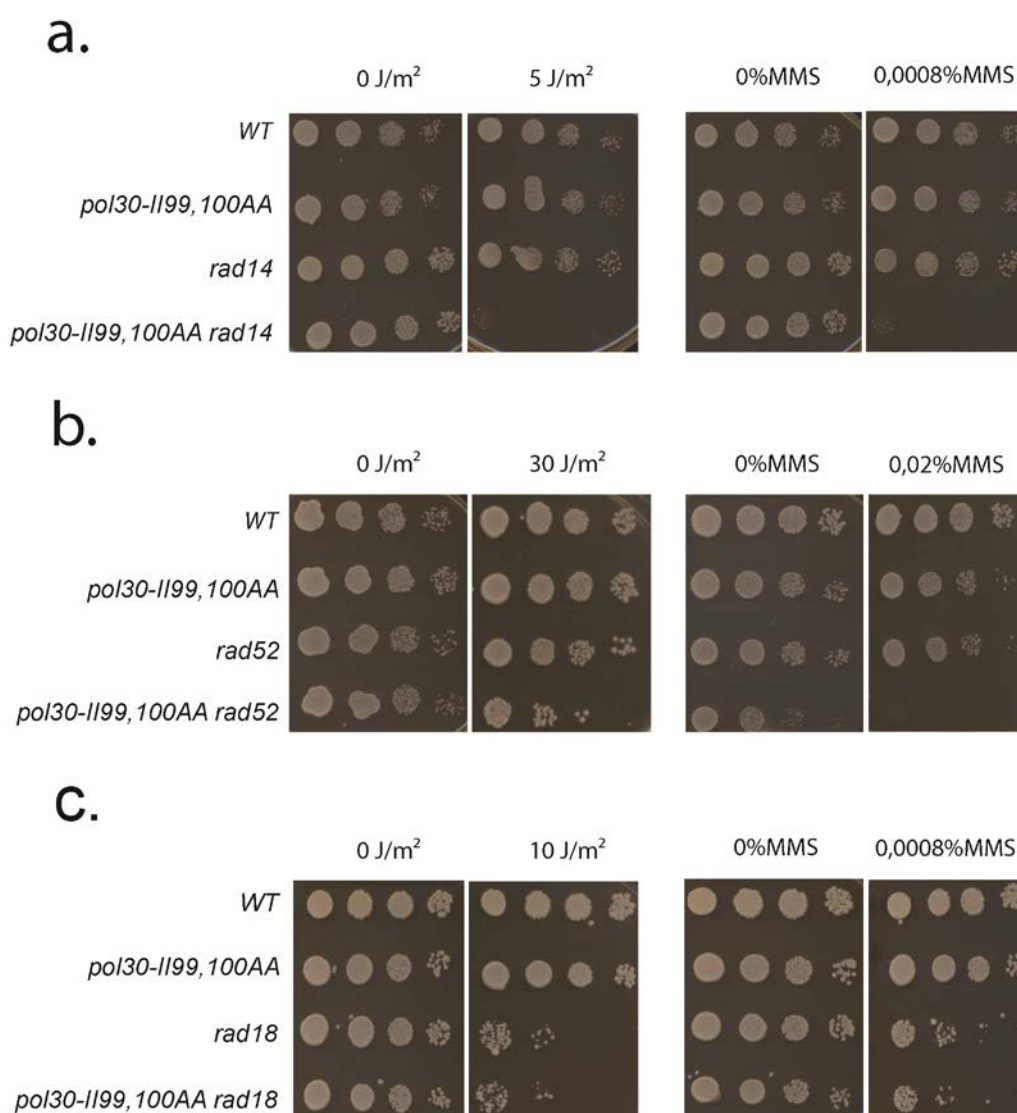


26.ábra: Pontmutációk képződése a *pol30-L154A* élesztő törzsbenA) A *pol30-L154A* gén episztatikus a *pol30-K164R* génnel. B) Az *pol30-L154A* törzs spontán mutátor fenotípusa. A *pol30-K164R* törzs nem mutat spontán mutátor fenotípust. C) Indukált mutagenézis hiánya a *pol30-L154A* törzsben.

Összefoglalva az L154A mutáns PCNA változatról rendelkezésünkre álló adatokat, leszögezhetjük, hogy a PCNA ezen változata egyrészt inaktiválja a Rad6/Rad18 útvonalat, és (bár erre vonatkozó biokémiai bizonyítékkal nem rendelkezünk) a genetikai vizsgálatok tanúsága szerint nem képes sem ubiquitilációra sem sumoilációra, másrészt egy állandóan működő, kifejezett spontán mutátor fenotípust okoz. A vad típusú és a mutáns PCNA változatok ubiquitilációjának kimutatásán jelenleg is dolgozunk.

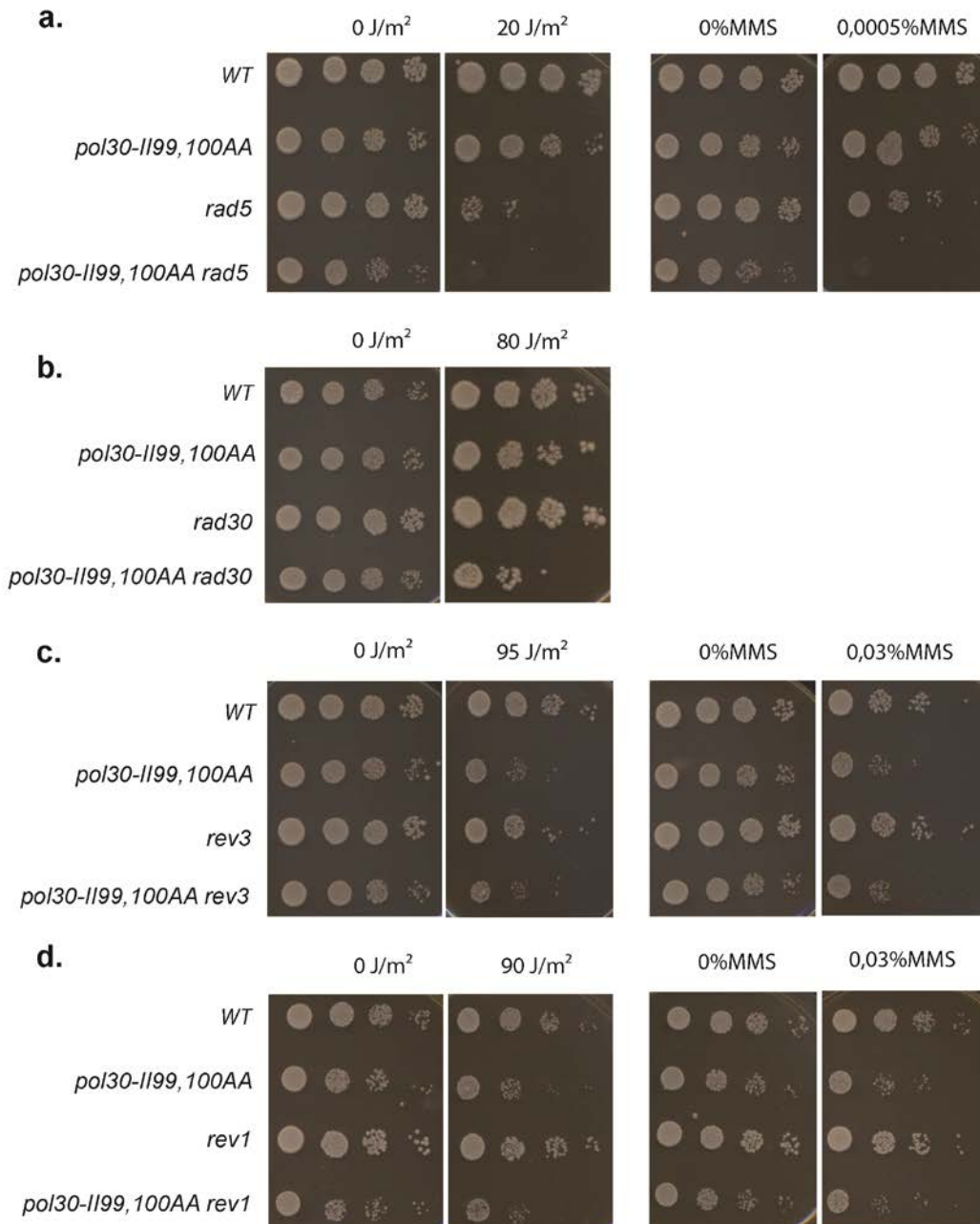
3.3.2 A *pol30-II99,100AA* PCNA allél

Az II99,100AA aminosavcserek a PCNA alegységeinek kapcsolódási felszínén elhelyezkedő β -lemez felszínét érintik. Az ezen változatot termelő törzs kifejezett, bár az L154A PCNA fehérjét expresszáló törzsnél jóval gyengébb érzékenységet mutat DNS károsító ágensekre (21, 22, 23 ábra). Episztázis analízis vizsgálatokban a NER, a rekombináció és a Rad6/Rad18 útvonalak közül egyértelműen a Rad6/Rad18 útvonalba sorolható (27. ábra)



27.ábra: Episztázis analízis vizsgálat az II99,100AA PCNA-t termelő törzssel. A) A *pol30-II99,100AA* gén nem episzatikus a *RAD14* génnel. B) A *pol30-II99,100AA* gén nem episzatikus a *RAD52* génnel. C) A *pol30-II99,100AA* gén episztázist mutat a *RAD18* génnel.

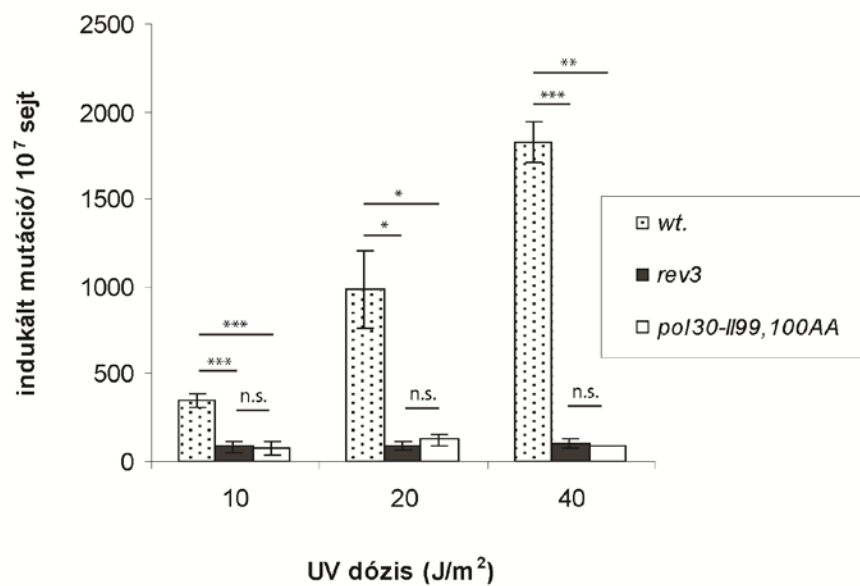
Miután igazolást nyert, hogy a *pol30-II99,100AA* allél a Rad6/Rad18 útvonalat érinti, ellenőriztük, hogy az útvonalnak mely ágát befolyásolja. A *pol30-99,100AA* nem volt episztatikus a templátváltással megvalósuló DNS hiba tolerancia *RAD5* (vö. 1.2.4.3 fejezet valamint 4. és 5. ábra) génjével (28/a ábra), sem a *RAD30* (vö.1.2.4.2 fejezet és 4. ábra) génnel, melynek terméke (Pol η) a TLS során a timin dimerek hibamentes átírását végzi (28/b ábra). Episztázist mutatott viszont a *REV3* és *REV1* génekkel (vö.1.2.4.2 fejezet és 4. ábra), amelyek a TLS Pol ζ által megvalósuló mutagén ágát képviselik (28/c, 28/d. ábra).



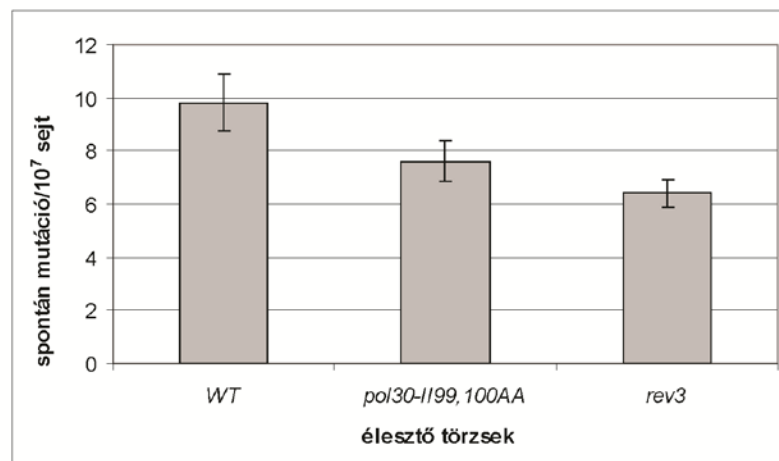
28.ábra: A *pol30-II99,100AA* gén és a Rad6/Rad18 útvonal génjeinek viszonya. Az *pol30-II99,100AA* gén episztázist mutat a Rad6/Rad18 TLS ágához tartozó *REV3* és *REV1* génekkel. (Mivel a *RAD30* gén deléciója önmagában nem okoz MMS érzékenységet, a *RAD30* génnel nem végeztünk kísérletet MMS lemezeken.)

A *pol30-II99,100AA* gén transzléziós szintézist befolyásoló hatásának tudatában ellenőriztük az UV által indukált mutációs rátát. Ismert, hogy a *REV3* gén delécióját hordozó törzsekben a keletkező mutációk száma állandóan alacsony, UV kezeléssel keletkezésük nem indukálható. A *pol30-II99,100AA* törzs ebben a tekintetben is teljes mértékben megegyezett a *rev3* törzzsel, benne sem működött az UV által indukált mutagenézis mechanizmusa (29./a ábra).

a.



b.

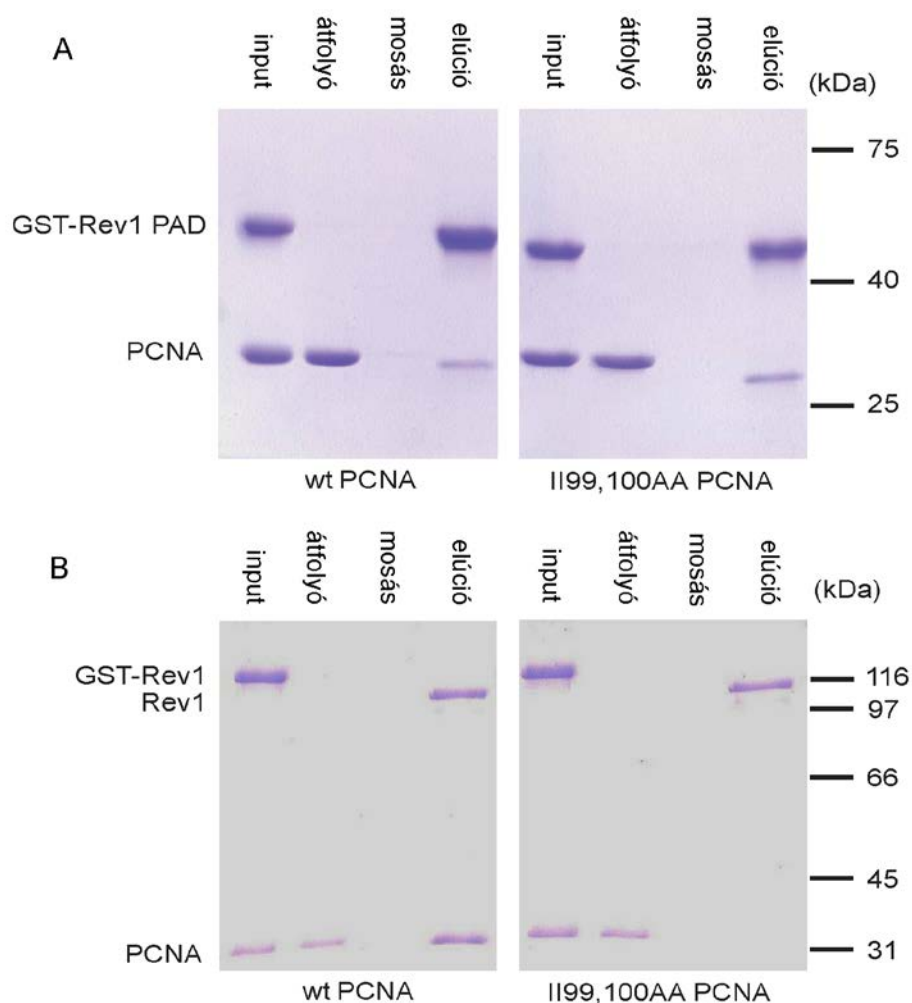


29.ábra: UV-indukált és spontán mutációs ráta mérése a *pol30-II99,100AA* élesztő törzsben. A) Az II99,100AA PCNA változatot termelő törzs nem képes UV indukált pontmutációk képzésére. B) A *pol30-II99,100AA* törzsben a spontán mutációs ráta a vad típusú törzsben tapasztalható ráta 80%-a körül mozog.

A *pol30-II99,100AA* törzsben a spontán mutációs ráta a *rev3* deléciós törzshöz hasonlóanoha nem teljesen azonos mértékben- csökkent, a vad típusú törzsben mérhető érték 80%-a körül mozog (29/b ábra).

Már ismertettem egy (vö. 1.3.4 fejezet), a szakirodalomból ismeretes PCNA pontmutációt hordozó törzset (*pol30-EL113,151GS*, 18/A ábra), amelyben az aminosavcserék akárcsak az II99,100AA aminosavak, szintén az alegységek kapcsolódási felszínének közelében helyezkednek el, és amely törzs szintén képtelen a Pol ζ -val való funkcionális „interakcióra” (Northam, Garg et al. 2006). Ez a munka fordította figyelmünket a PCNA alegységeinek kapcsolódási felszíne felé. Az említett PCNA mutánsról később kimutatták, hogy nem képes a TLS ben résztvevő Rev1 fehérje PAD (polimerase associated domain) doménjével fizikai kapcsolatra (Sharma, Kochenova et al. 2011). A szerzők ezáltal egy nem kanonikus fehérjekötési felszín meglétének lehetőségét vetették fel az alegységek közötti felszín közelében.

A *pol30-II99,100AA* törzs szakirodalmi párjához való hasonló fenotípusa, elhelyezkedése és funkcionális defektusa miatt, tisztított fehérjékkel megvizsgáltuk az II99,100AA PCNA fehérje és a Rev1 PAD doménjének, valamint az II99,100AA PCNA fehérje és a teljes Rev1 *in vitro* kölcsönhatását (30. ábra). A fehérjék tisztítását és a GST pulldown kísérletet a 2.11 fejezetben leírtak szerint végeztük. Az EL113,151GS fehérjeváltozattal ellentétben az II99,100AA PCNA megőrizte a Rev1 PAD doménjével való kölcsönható képességét (30/a. ábra). Nem volt viszont képes kölcsönhatni a teljes hosszúságú Rev1 fehérjével, amelyhez a vad típusú PCNA hatékonyan kapcsolódik (30/b ábra).

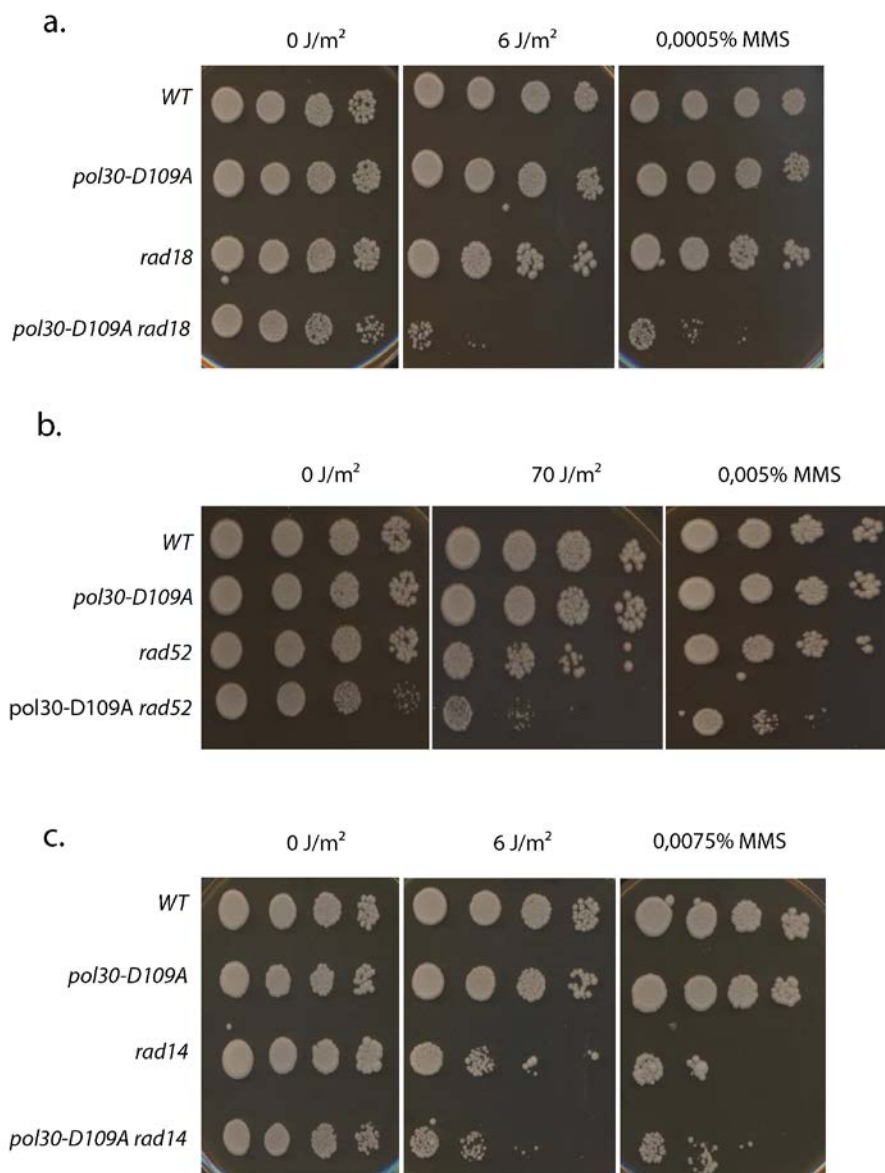


30.ábra: A vad típusú PCNA, és az II99,100AA PCNA fehérjék kölcsönhatása GST gyöngyön immobilizált Rev1-PAD (A.), illetve Rev1 (B.) fehérjével. A.) Az elúciós frakcióban mindkét PCNA változat esetében egyforma erősen jelenik meg a tisztított PCNA, az interakció bizonyítékeként. B.) A pontmutáns változat nem képes kapcsolódni a teljes Rev1 fehérjével.

A *pol30-II99,100AA* PCNA mutáns törzsről összefoglalhatjuk, hogy specifikusan inaktiválja a Rad6/Rad18 útvonal mutagenézisért felelős TLS ágát. A törzs a PCNA mutáció miatt a *rev3* deléciós törzshöz hasonlóan defektív mind az indukált, mind a spontán mutációk képzésében. Fenotípusának hátterében az állhat, hogy nem képes kölcsönhatni a Rev1 fehérjével. A Rev1 polimeráznak strukturális szerepe van a transzléziós DNS szintézisben, jelenléte nélkülözhetetlen a mutagén DNS hiba tolerancia útvonal és a Pol ζ működéséhez. Ha a Rev1 és a PCNA kölcsönhatása meggyengült az szükségszerűen maga után vonja a mutagén útvonal csökkent működését.

3.3.3 A *pol30-D109A* élesztő törzs

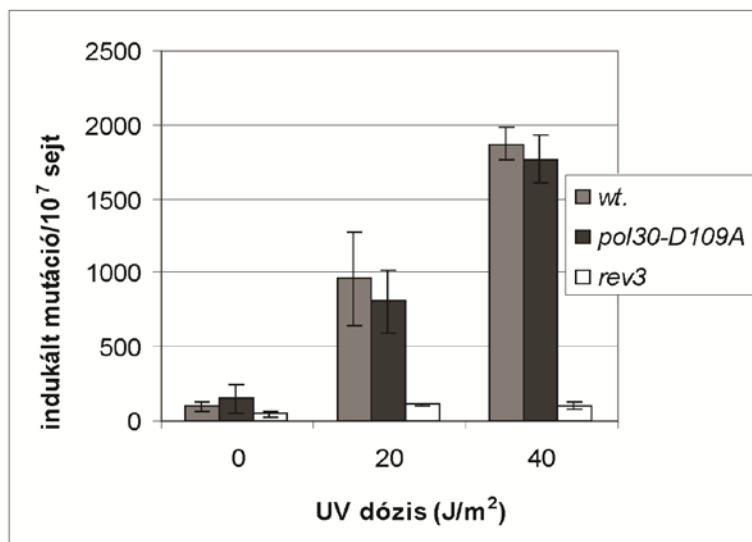
A D109A aminosavcsere az II99,100AA aminosavcseréhez hasonlóan az alegységek kapcsolódási felszínén lévő β -lemezek egyikét érinti (18/a ábra). Episztázis analízis vizsgálatokkal az előző két ismertetett pontmutációval ellentétben, amelyek a Rad6/Rad18 útvonal működését befolyásolták, a *pol30-D109A* gén hatása a NER útvonalát érinti. Nem mutat ugyanis episztázist a *RAD18* és a *RAD52* génekkel, viszont episztatikus viszonyt tapasztalhatunk a *RAD14*-el (31. ábra).



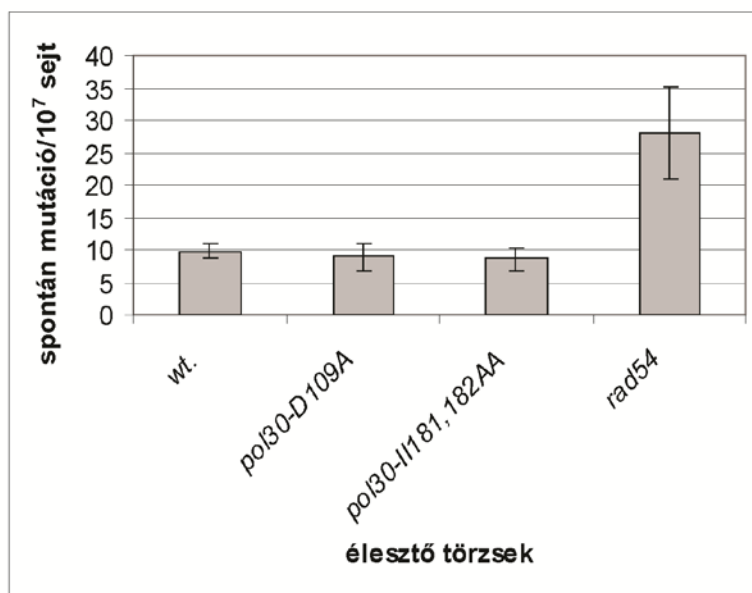
31.ábra: A D109A aminosavcsere a NER működését érinti. A) A *pol30-D109A* gén nem mutat episztázist a *RAD18*-al. B) A *pol30-D109A* gén nem episztatikus a *RAD52* génnel. C) A *pol30-D109A* gén, és a NER útvonalába tarozó *RAD14* gén episztázisa.

A fenti episztázis vizsgálatok azt sugallják, hogy a *pol30-D109A* törzsben nem érintett a Ra6/Rad18 DNS hiba tolerancia útvonal, tehát az ide tartozó transzléziós DNS szintézis zavartalanul működik. Ezt alátámasztandó ellenőriztük ezen törzsben is az UV által indukált és a spontán mutációs rátát (32. ábra). A törzsben az előző fejezetben tárgyalt *pol30-II99,100AA* törzzsel ellentétben (vö. 29. ábra) valóban nem csökkent a mutagenézis mértéke (32. ábra).

a.



b.



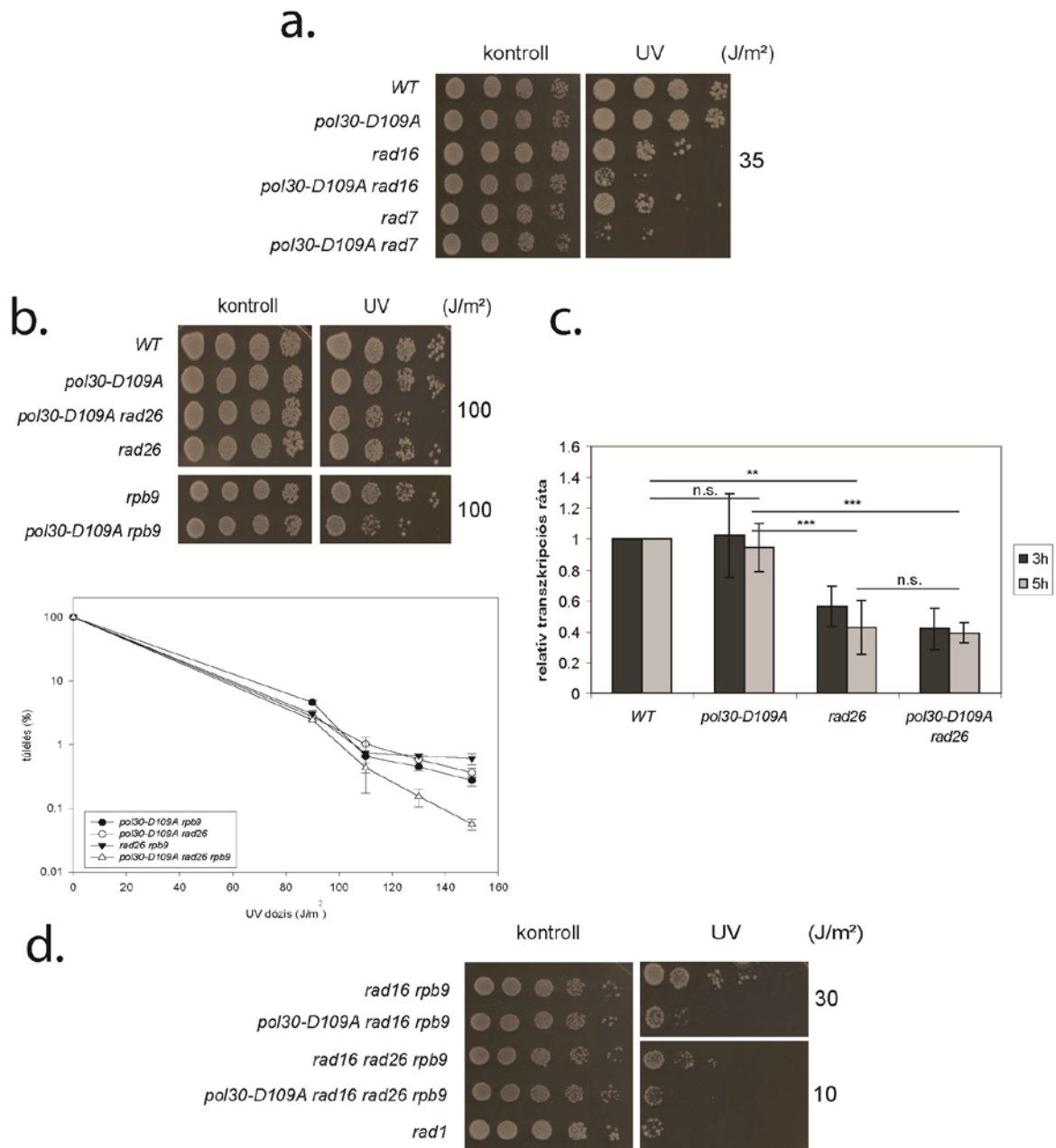
32. ábra: Mutációs ráták a D109A PCNA változatot termelő élesztő törzsben. A) és B) A kérdéses törzsben nem csökkent sem az UV által indukált, sem a spontán pontmutációképzés folyamata, továbbra is működik a Rad6/Rad18 irányítása alá tartozó transzléziós DNS szintézis.

A nukleotid excíziós reparáció az útvonal aktiválódásának mechanizmusa szerint két fő csoportra osztható (vö. 1.2.3 fejezet). A GGR (global genome repair) a folyamatban lévő transzkripciótól függetlenül a genomban bárhol képes érzékelni a hibát és aktiválódni. A hiba érzékeléséhez a Rad7-Rad16 fehérjekomplex szükségeltetik (vö. 1.2.3 fejezet). A TCR (transcription coupled repair) útvonal is két módon aktiválódhat. A kanonikus aktiválódásnál a hibába „ütköző” transzkripciós apparátus felszínéhez csatlakozó Rad26 fehérje toborozza a helyszínre a reparációt végző komplexet, míg az Rpb9 alútvonal esetében az Rpb9 fehérje-mely az RNS polimeráz II alegysége- észleli a replikáció elakadását (vö. 1.2.3 fejezet). A hiba érzékelésén, azaz az aktiválódás különböző voltán túl a NER folyamatának későbbi lépései és az azokban résztvevő fehérjék mindkét alútvonalban megegyeznek (vö. 1.2.3 fejezet).

A fent bemutatott episztatikus viszonyok ismeretében felmerült a kérdés, hogy a NER bonyolult mechanizmusának mely lépését befolyásolhatja a PCNA felszínén bekövetkező D109A aminosavcsere. Miután a *pol30-D109A* törzs DNS károsító szerekre mutatott érzékenysége önmagában sokkal kisebb mint a NER későbbi közös lépéseiben nélkülözhetetlen gének deléciója, amelyek hiánya a NER teljes folyamatát inaktíválja (pl. *rad14* deléció érzékenysége, 31. ábra), úgy tűnt, hogy a mutáció a NER valamely kezdeti lépését érinti. A kérdés tehát az, hogy a NER iniciációjának mely ágát, a GGR-t, avagy a TCR egy mechanizmusát zavarja-e a mutáció jelenléte. Előállítottuk a PCNA mutáns élesztő törzsben a GGR és a TCR iniciációjához szükséges gének delécióit, és a törzseket genetikai analízisnek vetettük alá. Rendkívül meglepő módon a vizsgálat tanúsága szerint habár a PCNA felszínén lévő D109A aminosavcsere a NER útvonal működését érinti, mégsem sorolható be az útvonal egyik ma ismert ágába sem. A *pol30-D109A* gén ugyanis nem episztatikus sem a *RAD7* és *RAD16* génekkel, melyek a GGR útvonalat aktiválják (33/a. ábra), sem a *RAD26* illetve *RPB9* génekkel, amelyek a TCR két ágában működnek (33/b. ábra). Hogy funkcionálisan is kizárhassuk, hogy a kérdéses mutáció a TCR útvonalát inaktíválja, megfigyeltük a transzkripció DNS károsodás utáni helyreállításának sebességét (33/c. ábra). Ismert, hogy UV kezelés után a *rad26* deléciót hordozó törzsben a génexpresszió mértéke csak lassan áll helyre, míg a vad típusú törzsben ez a helyreállítás gyorsabb. A transzkripciós ráta mérését a 2.13 fejezetben leírt módon *LacZ* riporter gén segítségével végeztük el. Azt tapasztaltuk, hogy míg a transzkripció a *rad26* deléciós törzsben rendkívül lassan áll helyre, addig a *pol30-D109A* törzsben a vad típusú törzsben mérhető értékkel megegyező mértékű a génexpresszió helyreállása mind 3, mind 5 órával az UV kezelés után.

Miután képtelenek voltunk a NER meglévő útvonalainak egyikébe térképezni a *pol30-D109A* allélt, előállítottuk a *pol30-D109A* törzsben a NER összes ismert ágát inaktíváló *pbr9 rad16 rad26* hármas deléciót. A *pol30-D109A pbr9 rad16 rad26* négyes mutáns törzs érzékenyebbnek bizonyult UV hatásra a *pbr9 rad16 rad26* hármas deléciós törzsnél arra utalva, hogy a PCNA aminosavcsere a kérdéses három útvonal működésén kívüli folyamatokat gátol. Mitöbb ez a *pol30-D109A pbr9 rad16 rad26* törzs pont a *rad1* mutáns törzs UV érzékenységét mutatta (33/d. ábra). A *rad1* deléciós törzsben a teljes NER inaktív, hiszen a Rad1 fehérje nem a hiba felismerésében vesz részt, hanem egy későbbi lépésben megkerülhetetlen, ugyanis az endonukleáz komplex része, amely a károsodást eltávolítja a DNS-ből.

Érdekes módon a NER három ismert ágának inaktiválása (*pbr9 rad16 rad26*) nem okoz akkora UV érzékenységet mint a *RAD1* vagy *RAD14* gének deléciója. Erre a szakirodalomban nincs magyarázat, noha a legkézenfekvőbb megoldás az, hogy a NER aktiválódásának egy további, ma még ismeretlen negyedik ága is létezik. Ezt támasztják alá a *pol30-D109A* törzzsel végzett genetikai vizsgálataink. A D109A aminosavcsere által érintett felszín éppen ennek az új, eddig ismeretlen aktiválódási ágnak a működéséhez lehet szükséges, ugyanis az aminosavcsere jelenléte a *rad1* deléció érzékenységi szintjére csökkenti a *pbr9 rad16 rad26* hármas deléciós törzs UV érzékenységét (33/d. ábra).



33. ábra: A *pol30-D109A* és a NER gének genetikai kapcsolatának vizsgálata. A) A *pol30-D109A* nem episztatikus a GGR útvonal génjeivel (*RAD7*, *RAD16*). B) A *pol30-D109A* nem episztatikus a TCR útvonalak génjeivel (*RAD26*, *RPB9*). C) A *pol30-D109A* törzsben nem károsodott a transzkripció UV kezelés utáni újraindulása. D) A D109A PCNA aminosavcserével érintett felszín a NER egy új ágának működését befolyásolja, ugyanis a NER ismert három ágában defektív törzs (*pbr9 rad16 rad26*) UV érzékenységét a teljes NER inaktiválásának megfelelő UV érzékenységre növeli

A D109A PCNA aminosavcsere tehát, amely az II99,100AA aminosavcseréhez hasonlóan a PCNA alegységek kapcsolódási felszínén helyezkedik el, az előzőekben ismertetett PCNA mutációktól eltérően nem gátolja a Rad6/Rad18 útvonal működését. A D109A aminosavcsere jelenléte specifikusan a NER egy új ágát, egy eddig még nem jellemzett

mechanizmusát inaktiválja, ugyanis a *pol30-D109A rpb9 rad16 rad26* négyes mutáns UV érzékenysége megegyezik a teljes NER folyamatot inaktiváló *rad1* deléción UV érzékenységgel (vö.1.2.3 fejezet). Az hogy ez az új fajta reziduális NER aktivitás a sejtciklus mely szakaszához, illetve milyen sejtélettani folyamathoz köthető egyelőre nem ismeretes. Miután a PCNA-nek a replikációban betöltött szerepe hangsúlyos, elképzelhető, hogy létezik a transzkripció kapcsolt DNS reparációhoz hasonlóan a NER-nek egy replikáció kapcsolt DNS reparáció ága is. Ennek a lehetőségnek a vizsgálata a jövő feladata.

A *pol30-D109A* törzs mellett egy D109A,I167A kettős aminosavcsere hordozó törzset is előállítottunk (21, 22, 23 ábrák). A kettős aminosavcsere az előállítani szándékozott I167A aminosavcsere helyett technikai hiba miatt jött létre. A kettős aminosavcsere hordozó PCNA mutáns törzs (a D109A változathoz hasonló mértékben) szintén érzékeny bizonyult DNS károsító hatásokra (21, 22, 23 ábrák). A *pol30-D109A,I167A* törzzsel is elvégeztük az episztázis analízist. A két aminosavcsere hordozó PCNA változat a kísérletekben a D109A PCNA változat fenotípusával megegyező fenotípust mutatta (jelen dolgozatban nem mellékelte eredmények). Ezen eredmények birtokában megállapítható, hogy az I167A aminosavcsere önmagában nem okoz a DNS reparációhoz köthető fenotípust.

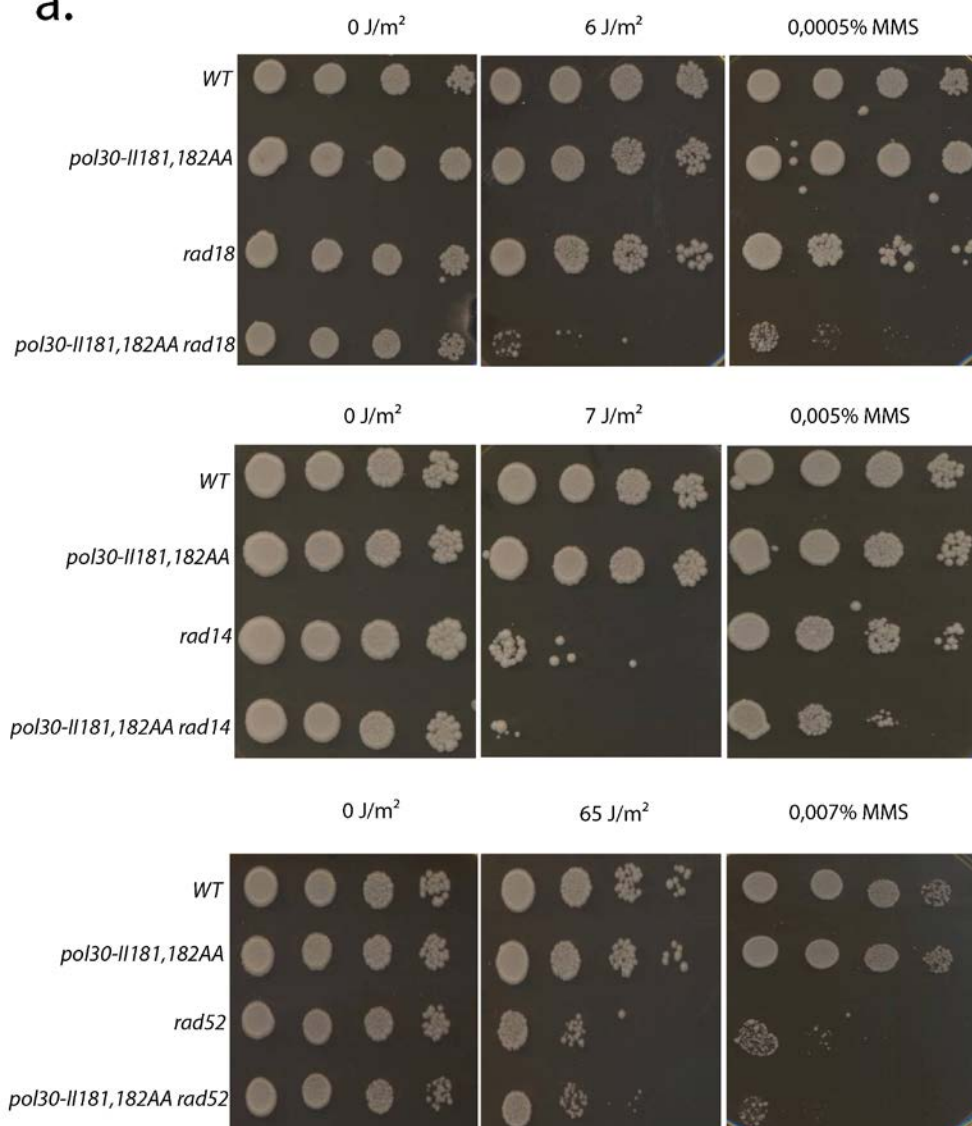
3.3.4 A *pol30-III181,182AA* élesztő törzs

Az előzőekben tárgyalt PCNA mutáns változatokhoz hasonlóan az III181,182AA aminosavcsere is az alegységek kapcsolódásának felszínén helyezkedik el. A mutáns PCNA változatot termelő törzs UV és MMS hatásra a D109A mutációt hordozó törzsnél egy kissé érzékenyebb. A DNS reparációs és DNS hiba tolerancia gének fő csoportjaival végzett episztázis vizsgálatok alapján a *pol30-III181,182AA* gént a *RAD52* episztázis csoportba, azaz a rekombinációs útvonalba sorolhatjuk (34. ábra).

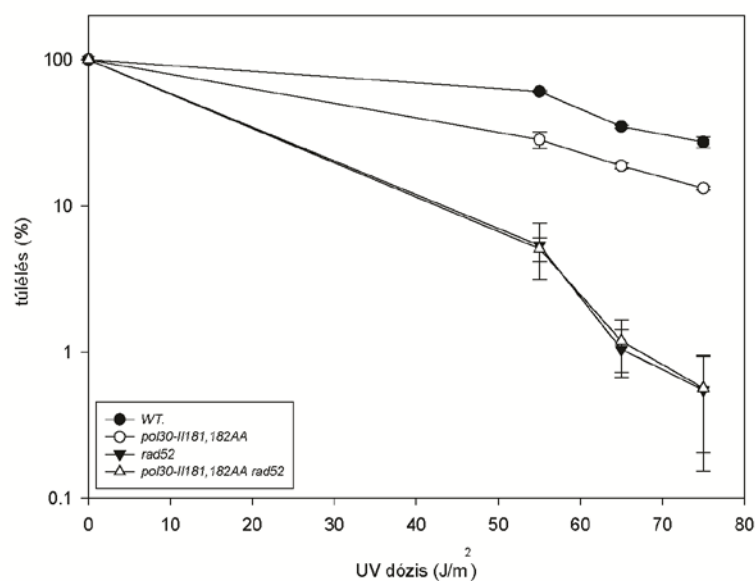
A *pol30-III181,182AA* allél UV és MMS kezelés esetén episztatikus a homológ rekombináció *RAD52* génjével, UV kezelés esetén a homológ rekombináció *RAD54* génjével is. (34. ábra, vö.1.2.5 fejezet). A PCNA-nek mint a replikációs folyamatok egyik fő szabályozójának szerepe lehet a rekombináció mechanizmusának szabályozásában is, hiszen a replikációs villa (mely struktúra amúgy is hosszú egyes szálú DNS szakaszokat

tartalmaz) sérülései esetén gyakran keletkeznek kettős szálú DNS törések, és templátként szolgáló ép testvérekromatidák (vö. 1.2.5 fejezet).

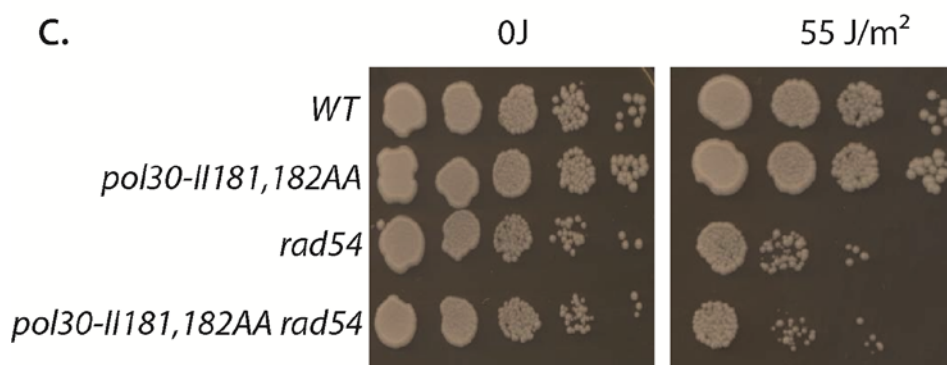
a.



b.



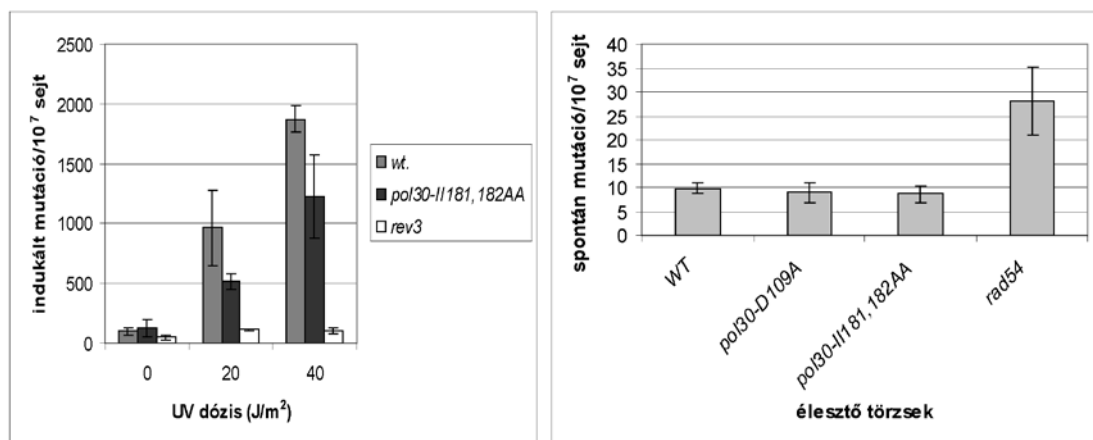
c.



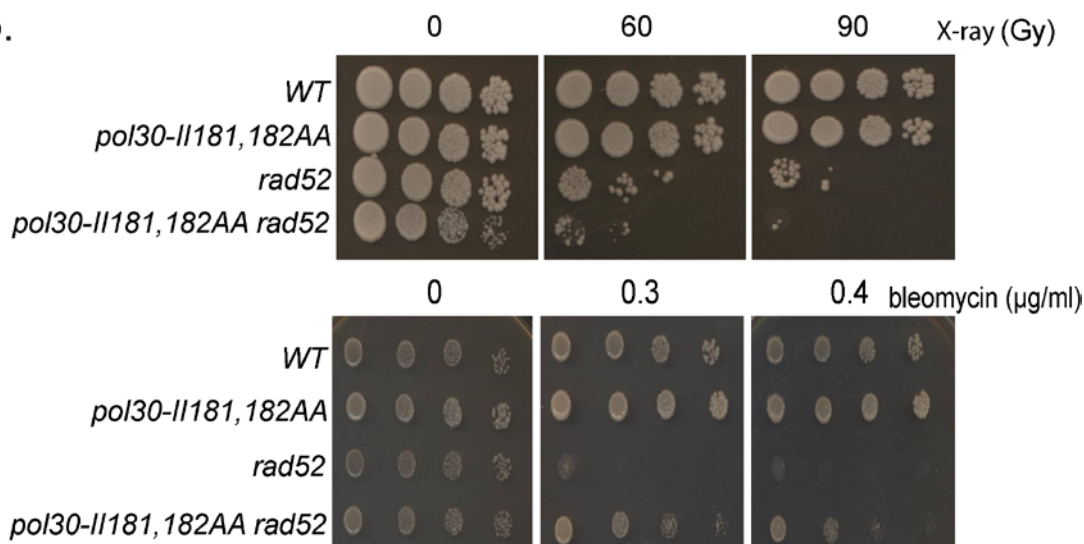
34. ábra: A *pol30-III181,182AA* a rekombinációs útvonal működését befolyásolja. A és B) A *pol30-III181, 182AA* gén UV és MMS hatásra a *RAD52* génnel episztatikus. C) A *pol30-III181,182AA* a *RAD54* génnel is episztatikus

Miután a Rad6/Rad18 útvonal működése az episztázis analízis vizsgálatok alapján érintetlennek tűnik, funkcionális esszével, az UV indukált és spontán mutagenézis mértékének ellenőrzésével is megvizsgáltuk a transzléziós DNS szintézis működésének hatékonyságát (35/a. ábra). Noha az UV által indukált pontmutációképzés némileg alacsonyabb mértékű mint a vad típusú törzs esetében, a TLS deficiens törzsekhez képest (*rev3*) még mindig jóval magasabb. Valójában ez a mutáns PCNA változat is képes a TLS általi mutációképzésre (35/a. ábra).

a.



b.

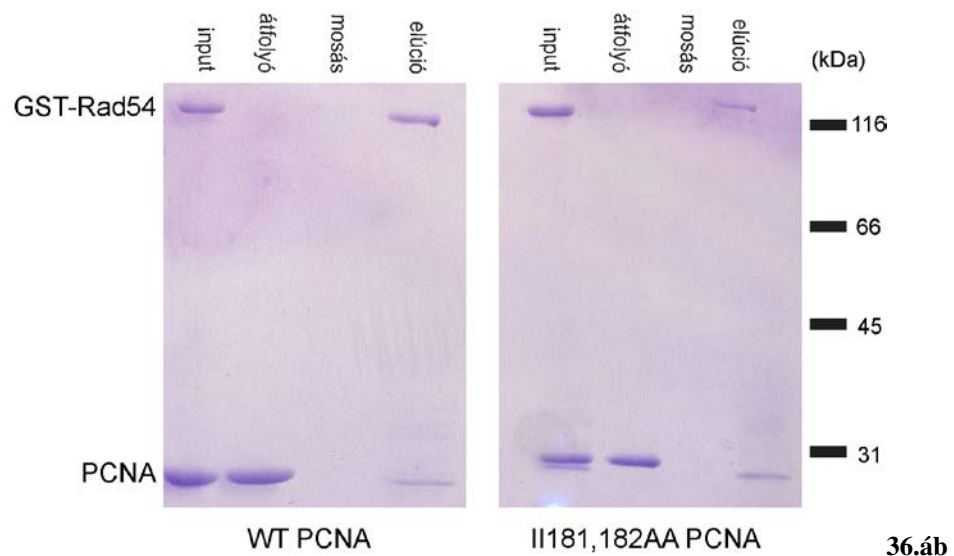


35. ábra: Az UV indukált mutációs ráta, és a spontán mutagenesis mértéke a *pol30-II181, 182AA* élesztő törzsben. A) Noha a mutáns PCNA változatot termelő törzsben némi csökkenést mutat az UV kezelés hatására keletkezett pontmutációk száma, a TLS deficiens törzshöz képest hatékonyan működik a mutagenesis folyamata. A spontán pontmutációk képződésében jelentős csökkenés nem tapasztalható. B) A *pol30-II181, 182AA* allél növeli a homológ rekombinációban deficiens genetikai háttérrel rendelkező élesztő (*rad52*) törzs röntgen sugárzás érzékenységét, viszont szupresszálja (csökkenti) annak bleomycin érzékenységét.

A homológ rekombináció a kettős szálú DNS törések javítását végzi. A kettős száltörések javításának vizsgálatához olyan DNS károsítást hatást is ajánlott tesztelni, amely az UV és MMS kezeléssel ellentétben direkt módon (és nem csak másodlagosan) is képes kettős száltörések létrehozására. Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy a *pol30-II181, 182AA* allél sem röntgensugárzás, sem egy radiomimetikus ágens, a bleomycin hatására nem

mutat episztázist a *RAD52* génnel 36/b ábra). A mutáns allél jelenléte érzékenyíti röntgensugárzásra a *rad52* genetikai háttérű törzset, míg ugyanazon törzs bleomycin érzékenységét elnyomja (szupresszálja). Noha a szakirodalom szerint mindkét előbb említett károsító hatás kettős szálú DNS törést okoz, úgy tűnik, hogy a hatásmechanizmusuk mégsem egyezik meg (35/b ábra).

Tisztított fehérjék segítségével korábban kimutatták a PCNA fizikai kapcsolatát a rekombinációban résztvevő Rad54 (vö. 1.2.5 fejezet) fehérjével (Burgess, Sebesta et al. 2013). Mitöbb ismereteink szerint a rekombináció folyamatában szerepet játszó gének episztázis csoportjából csupán a Rad54 lép kapcsolatba a PCNA fehérjével. Miután genetikai vizsgálatok szerint az II181,182AA PCNA változat a rekombinációs útvonal működését érinti, ellenőriztük, hogy a mutáns PCNA fehérje képes-e a vad típusú PCNA-hoz hasonlóan továbbra is kölcsönhatásba lépni a Rad54 fehérjével. Tisztított fehérjékkel elvégzett *in vitro* kísérleteink eredményei szerint a mutáns PCNA változat továbbra is képes volt a Rad54 fehérje hatékony kötésére (36. ábra).

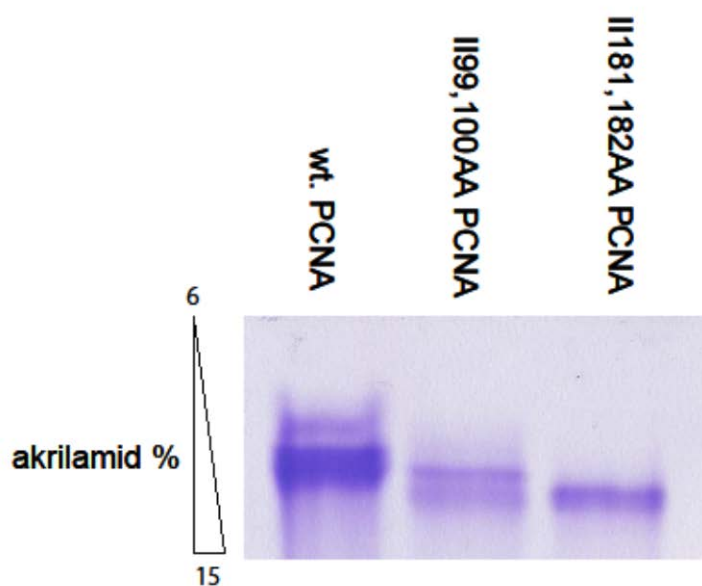


36.áb
ra: A vad típusú PCNA, és az II181,182AA PCNA fehérjék kölcsönhatása GST gyöngyön immobilizált Rad54 fehérjével. Az elúciós frakcióban mind a vad típusú PCNA változat, mind a mutáns PCNA változat esetében megjelenik a tisztított PCNA. A mutáns PCNA fehérje Rad54 kötő képessége tehát nem sérült.

A szakirodalomban találhatunk arra vonatkozó adatokat, hogy a PCNA alegységeinek kapcsolódási felszínén létrehozott aminosavcserék (pl. a már említett, és a 18/a ábrán piros rombuszsal jelölt E113G és egy másik, a G148S) a PCNA trimer szerkezetének stabilitását befolyásolja (Dieckman, Boehm et al. 2013). Mi is megvizsgáltuk tehát az előállított PCNA fehérje változatok trimer szerkezetének stabilitását. A trimer szerkezet stabilitását

natív, grádiens akrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük. A natív gélen és SDS mentes pufferben szuszpendálva az összetett fehérjék képesek megőrizni előzőleg felvett polimer formáikat (vö. 2.12 fejezet). Az összehasonlított fehérjéket a kísérlethez GST gyöngyön tisztítottuk. A monomer formák a gélen gyorsabban, míg a trimer formák lassabban futnak. Trimer formájú kontrollként a tisztított vad típusú PCNA fehérjét használtuk. A kísérlet eredményeképpen azt kaptuk, hogy az alegységek kapcsolódási felszínén előállított aminosavcserék mind az II99,100AA PCNA változat esetében, mind az II181,182AA PCNA változat esetében gyengítik a trimer gyűrű stabilitását. Az II181,182AA mutáns tisztított PCNA fehérje oldatban túlnyomórészt monomer formát vesz fel, míg az II99,100AA tisztított PCNA fehérje állapota megoszlik a monomer és a trimer formák között (37. ábra).

A trimer képzés hibája azonban nem befolyásolja az általunk előállított törzsek növekedési sebességét, és a replikációt gátló HU (hidroxi-urea) szerre mutatott érzékenységet sem (vö. 20. ábra, ill. (Halmai, Frittmann et al. 2016). Ezért bár az II181,182AA oldatban túlnyomórészt monomer formációt vesz fel, ennek *in vivo* hatása feltételezhetően nem érződik, és a mutagenézis is hatékonyan működik benne (35/a ábra).



37. ábra: A mutáns PCNA változatok trimer stabilitása. Az II99,100AA PCNA fehérje egy része a vad típusú fehérjével megegyező magasságban, míg egy másik frakciója gyorsabban fut, jelezve ezzel, hogy a trimer képződésének erőssége nem tökéletes. Az II181,182AA PCNA szinte teljes frakciója gyorsabban migrál, azaz oldatban főként monomer formában található.

A *pol30-III181,182* törzsben tapasztalható működőképes TLS szintézis bizonyítja, hogy a nála jóval enyhébb PCNA trimerizációs hibát mutató *pol30-II99,100AA* törzsben tapasztalt transléziós DNS szintézis (TLS) hiány nem a trimerizáció hibájából, hanem egy a TLS-hez szükséges interakciós partnerrel (Rev1 fehérje, vö. 3.3.2 fejezet) való kapcsolat megszűnéséből ered.

Összefoglalásképp elmondhatjuk, hogy az II181,182AA PCNA változatot termelő törzs a rekombinációs útvonalban működésében érintett, ugyanis UV sugárzás és MMS kezelés hatására a *pol30-III181,182AA* allél episztatikus a homológ rekombináció *RAD52* génjével. A *pol30-II181,182AA* allél jelenléte szupresszálja a homológ rekombináció hiányában jelentkező bleomycin érzékenységet, viszont növeli ugyanezen genetikai háttér röntgensugárzás hatására mutatott érzékenységet.

In vitro kísérletek tanúsága szerint a mutáns PCNA továbbra is képes a vad típusú PCNA hatékonyságával kapcsolódni a Rad54 fehérjéhez.

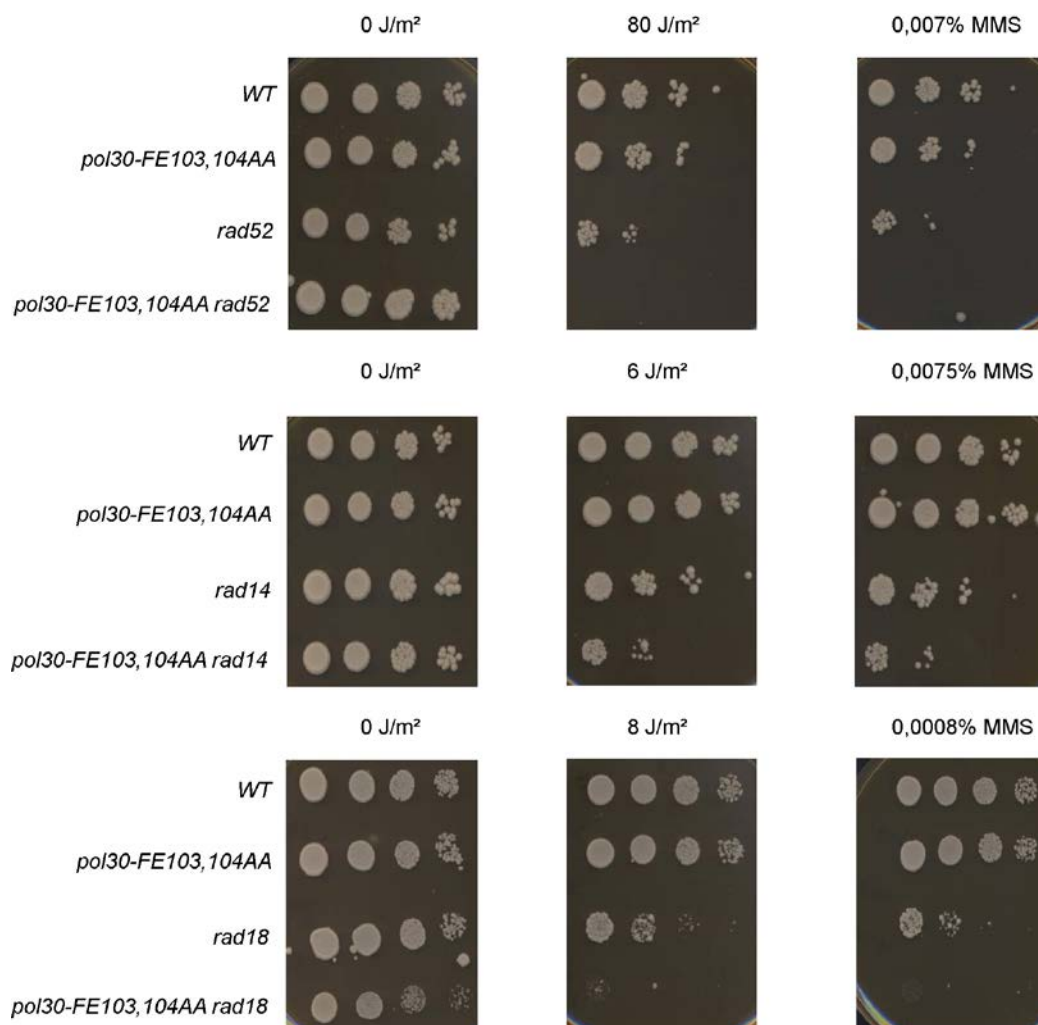
A *pol30-III181,182AA* allél rekombinációra gyakorolt hatását érdemes lenne a rekombinációs ráta mérésére alkalmas esszékben is megvizsgálni. Az erre irányuló előkészületeket csoportunkban jelenleg végezzük. A spontán illetve kettős szálú DNS törések által indukált rekombinációs rátákat mérő rendszerek beszerzése, tesztelése folyamatban van.

A mutáns PCNA változatok monomerjeinek (II181,182AA és az II99,100AA mutáns PCNA fehérjék) trimerképző képessége is gyengült, különösen az II181,182AA PCNA mutánsé, ugyanakkor ez a tény úgy tűnik a fenotípust, azaz sem a Rad6/Rad18 útvonalhoz tartozó transléziós DNS szintézist, sem a sejtek replikációs sebességét nem befolyásolja.

3.3.5 A *pol30-FE103,104AA* allél

Az FE103,104AA aminosavcsere az előzőekben tárgyalt mutációkhoz hasonlóan a PCNA monomerek kapcsolódási felszíneihez közeli régiót érinti (vö. 18/a ábra). A vizsgált törzs a már tárgyalt *pol30-III181,182AA* törzshöz mutáns törzshöz hasonló mértékű UV és MMS érzékenységet mutat (21. és 22. ábra). Episztatikus viszonyainak meghatározásakor némiképp akadályokba ütköztünk. A kérdéses mutációt hordozó gén ugyanis nem episztatikus a három nagy reparációs és DNS hiba tolerancia (NER, DDT, rekombináció) útvonalat irányító, és aktiváló génnekkel (38. ábra), következésképp DNS károsító szerekre mutatott megnövekedett érzékenysége ellenére nem sorolható be ezen útvonalakba.

Egy törzs ilyedten viselkedésének több oka is lehet. Először is a kérdéses három útvonalon kívül működnek még más reparációs útvonalak (lásd 1.2 fejezet), amelyek közül elsősorban a BER folyamatainak és az *pol30-FE103,104AA* törzsnek a kapcsolatát lenne érdemes vizsgálat alá vetni. Az UV kezelés mellékterméke ugyanis lehet oxidált bázis keletkezése is, az MMS károsítás eredménye pedig gyakorlatilag bázis alkiláció, amelyeket a BER is képes javítani. A tárgyalt pontmutáns törzsben tapasztalható DNS károsításra megnövekedett érzékenység tehát lehet a BER defektusából eredő. A BER mellett mint egy másik nagy reparációs útvonal, a MMR génjeinek a *pol30-FE103,104AA* génhez való viszonyát is ajánlatos ellenőrizni.



38. ábra: Episztázis vizsgálatok a *pol30-FE103,104AA* génnel. A *pol30-FE103,104AA* gén nem mutat episztázist a DNS reparációs és hiba tolerancia útvonalak (NER, DDT, rekombináció) egyik vizsgált génjével sem.

Másodsorban nem téveszthetőek szem elől az episztázis analízis korlátai és durva felbontóképessége sem. A tiszta élesztőgenetikai episztázis hiánya ugyanis (vö. 3.3 fejezet) nem feltétlenül jelenti funkcionális kapcsolat hiányát. Ha például a *pol30-FE103,104AA*

pontmutáció a három megvizsgált (NER, DDT, rekombináció) útvonal közül többnek a működését csökkenti, akkor a pontmutáns gén egyikkel sem lesz episztatikus. Ilyenkor bármelyik útvonal kulcsgénjének deléciója mellé juttatjuk be a pontmutáns *POL30* gént, a törzs DNS károsító szerekre mutatott érzékenysége növekedni fog. Látván a PCNA monomerek kapcsolódási felszínén előidézett aminosavcserék által okozott színes fenotípuskavalkádot erre meglehetősen jó elméleti esély adódik. Mégis ezen utóbbi lehetőség valószínűsége rendkívül alacsony, hiszen ahhoz, hogy egyszerre egynél több reparációs útvonalat befolyásolhasson az *pol30-FE103,104AA* mutáció, DNS károsító hatásra önmaga meglehetősen kevésbé érzékeny.

A PCNA monomerek kapcsolódási felszínén aminosavcserét előidéző elhelyezkedő *pol30-FE103,104AA* mutációról elmondhatjuk, hogy habár megnövekedett érzékenységet mutat UV és MMS kezelésre, látszólag nem befolyásolja a NER, és a DDT folyamatokat, valamint a kettős szálú DNS törések javítását. DNS károsító hatásra mutatott érzékenysége növekedését egy, a vizsgálatainkba nem foglalt DNS reparációs útvonal hibája okozhatja.

4. Megvitatás és összegzés

A PCNA fehérje a replikáció és a replikációhoz kapcsolódó folyamatok egyik nagy szabályozója (vö. 1.3 fejezet). A DNS reparációban illetve DNS hiba toleranciában betöltött szerepére először a PCNA ubiquitiláció felfedezésekor derült fény. Ezután a DNS reparációs folyamatok széles skálájában írták le a PCNA részvételét (vö 1.3.2 fejezet), ugyanis a replikáció kofaktoraként minden olyan DNS folyamatban szükséges lehet részvétele, amely DNS replikációt igényel.

A PCNA fehérje a fentieknek megfelelően sok interakciós partnerrel tart fenn kapcsolatot, és a felszínén több jellemzett interakciós felszín található (vö. 1.3.3 és 1.3.4 fejezetek). Az ismert, jelentős biológiai funkcióval rendelkező régiók mégis a PCNA felszínének csak egy kicsiny részét fedik le, és kísérleteink tervezésénél azt tűztük ki célul, hogy az eddig ismeretlen szerepű PCNA felszínnek a DNS reparációs folyamatokban való részvételét vizsgáljuk.

A *POL30* génben célzottan 10 helyen aminosavcserét létrehozó pontmutációkat állítottunk elő, közülük –a lefedettség növelése végett– némelyiknél a mutációkkal két egymás után következő aminosav cseréjét okoztuk (vö. 3.1 fejezet). Az előállított mutáns *POL30* géneket plazmid konstruktokon élesztő törzsekbe juttattuk, és ott egyedüli PCNA forrásként fejeztettük ki. Az összes előállított aminosavcserét előidéző PCNA változat életképes PCNA fehérjének bizonyult, hőmérsékletfüggő lassú növekedést csupán két törzs (a *pol30-III158,160AA*, illetve a *pol30-DE256,257AA*) okozott közülük.

Számunkra azon törzsek váltak érdekessé, amelyek megnövekedett érzékenységet mutattak DNS károsító szerekre, de a vad típusú törzzsel megegyező növekedési sebességgel rendelkeztek, azaz nem károsodott bennük a replikáció folyamata. Ezekben ugyanis a PCNA mutáció következtében sérült a DNS reparáció működése. Összesen hat ilyen törzset találtunk, közülük egyben az aminosavcsere (*pol30-L154A*) a PCNA trimer gyűrű belső felszínén lévő α -hélixek egyikén helyezkedik el (18/c ábra), a többi öt törzsben pedig (*pol30-II99,100AA*; *pol30-D109A*; *pol30-III181,182AA*; *pol30-DII09,167AA* és *pol30-FE103,104AA*) az alegységek kapcsolódási felszínének környezetében elhelyezkedő kiterjedt β -lemez régiót érinti a változtatás (18/a és 18/b ábra).

Megvizsgáltuk a fenti kritériumnak megfelelő hat mutáns gén viszonyát a jelentősebb DNS reparációs útvonalakkal, és azt találtuk, hogy közülük kettő (*pol30-L154A*, és *pol30-II99,100AA* változatok) befolyásolja a Rad6/Rad18 irányította DNS hiba tolerancia működését. Az L154A PCNA fehérje változat (az ubiquitilációra képtelen K164R PCNA

változathoz hasonlóan) teljesen inaktiválja a Rad6/Rad18 útvonalat, és egy erős spontán mutátor fenotípust hoz létre. Az II99,100AA PCNA változat szelektíven gátolja a Rad6/Rad18 útvonal pontmutációkat okozó transzléziós szintézis ágát, megszünteti a transzléziós polimerázok és a PCNA közötti funkcionális kapcsolatot, és az UV károsodás által indukálható mutagenézis folyamatát. A tapasztalt fenotípus hátterében az állhat, hogy az aminosavcsere hordozó fehérje fizikai kapcsolata a Rev1 transzléziós polimerázzal jelentősen meggyengült. Egy további mutáns *POL30* gén genetikai analízissel (*pol30-D109A* PCNA) a NER útvonalába térképezhető, viszont nem sorolható be a NER egyik ma ismert ágába sem. Episztázis analízis vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy a NER egy új, eddig ismeretlen aktiválódási mechanizmusához fontos az aminosavcsere által érintett felszín. Az hogy ez az új fajta NER aktivitás a sejtciklus mely szakaszához, illetve milyen sejtleletani folyamathoz köthető egyelőre nem ismeretes. Miután a PCNA-nak a replikációban betöltött szerepe hangsúlyos, elképzelhető, hogy létezik a transzkripció kapcsolt DNS reparációhoz hasonlóan a NER-nek egy replikáció kapcsolt DNS reparáció ága is. A *pol30-III181,182* gén változat a rekombináció folyamatát befolyásolja. UV kezelés hatására episztázist mutat a *RAD52* és *RAD54* génekkel. Végezetül az FE103,104AA PCNA változatot hordozó törzs DNS károsító hatásokra mutatott érzékenysége ellenére nem volt besorolható az általunk vizsgált egyik DNS reparációs és DNS hiba tolerancia útvonalba sem. Az FE103,104AA PCNA mutációnak jelenleg a BER-re gyakorolt lehetséges hatását vizsgáljuk.

Érdekes a PCNA monomerek kapcsolódási felszínére koncentrálnunk. Ebben a régióban a DNS reparációra eddig csupán egy aminosavcsere hatását vizsgálták (*pol30-E113G,L151S*, Northam, Garg et al. 2006). A kérdéses aminosav megváltoztatása az általunk előállított II99,100AA aminosavcsereéhez hasonlóan megszüntette a TLS függő indukált mutagenézist, és a Pol ζ -val való funkcionális kapcsolatot. A szerzők azt is kimutatták, hogy az általuk használt PCNA változat nem képes fizikai kapcsolatot létesíteni a Rev1 fehérje PAD doménjével. Az általunk előállított változat nem képes kölcsönhatni a teljes hosszúságú Rev1 polimeráz fehérjével.

A TLS folyamatot inaktiváló mutánssal nem ér véget az alegységek kapcsolódási felszínén elhelyezkedő, és a reparációs folyamatokat befolyásoló mutánsok sora. Találhatunk ebben a régióban a NER egyik ágának aktiválódását gátló (*pol30-D109A*), és a homológ rekombinációt érintő (*pol30-III181,182AA*) aminosavcsereket is. DNS károsításra mutatott megnövekedett érzékenysége miatt a szintén itt elhelyezkedő FE103,104AA

aminosavcsere is feltételezhetően érinti a DNS reparációs folyamatok egyikét, vagy akár egyszerre több útvonal működését is (vö.3.3.5 fejezet).

Vizsgálataink eredményeképp összefoglalhatjuk, hogy a PCNA alegységek kapcsolódási régiója, az itt elhelyezkedő β -lemez struktúrák jelentős szabályozási és fehérjekötési régiót formálnak, amelyről immár bátran állíthatjuk, hogy többféle DNS reparációs és DNS hiba tolerancia folyamatot befolyásol.

Azt is megfigyelhetjük, hogy ugyan több, az alegységek kapcsolódási felszínét érintő aminosavcsere okozott DNS reparációs fenotípust, ez mégsem az összes ezen régióban előállított mutánsra volt jellemző. Különösen érdekes a *pol30-Y114A* mutáció esete, amely csupán egyetlen aminosavnyi távolságra okoz cserét az irodalomból ismeretes E113G,L151S PCNA (Northam, Garg et al. 2006) kettős aminosavcsere helyétől, mégsem zavarja meg a DNS reparációs és DNS hiba tolerancia folyamatokat. Eszerint nem a teljes említett felszín, hanem annak kiemelt helyei fontosak. Ezek a kiemelt helyek, amint arról az általunk elvégzett genetikai analízis is tanúskodik, specifikus, és egymástól eltérő folyamatokat szabályoznak.

Eredményeink közlési folyamatával egyidőben, illetve kicsit később két olyan munka is megjelent, amely az élesztő *POL30* gén felszínén előállított pontmutációkkal igyekszik tisztázni a PCNA szerepét a DNS reparációban. Az egyik munka kifejezetten a monomerek kapcsolódási felszínére koncentrál, és több olyan itt elhelyezkedő aminosavcserét is leír, amelyek a mutagén transzléziós szintézist inaktíválják, akárcsak az általunk előállított II99,100AA PCNA változat (Kondratik, Boehm et al. 2016). Ezen munka viszont következtetéseinek levonásánál csupán az indukált mutációs ráta mérésére támaszkodik, részletes genetikai analízist, biokémiai vizsgálatokat nem végez. A második közlemény szintén több aminosavcserét vizsgál, de részletesen a 196-os pozícióban lévő lizin szerepét tárgyalja, amely ugyan nem a monomerek kapcsolódási felszínén helyezkedik el, de amelyről megállapítják, hogy cseréje megszünteti a PCNA fehérjének a Rad18 ubiquitin ligázzal való fizikai kapcsolatát (Fan and Xiao 2016).

A fentiekből látható, hogy a PCNA felszínek, közte különösen a monomerek kapcsolódásának felszíne további beható, a DNS reparáció és a mutagenézis folyamatát mélyebben tisztázó vizsgálatra hivatott.

A jövőben érdemes nagyobb hangsúlyt fektetni az itt ismertetett mutáns PCNA fehérjék biokémiai vizsgálatára, hogy hatásuknak pontosabb mechanisztikus leírását adhassuk. A fehérje interakciós folyamatok *in vitro* vizsgálata azonban rendkívül időigényes, az egyes fehérjék tisztítása azok génjeinek egyenkénti klónozását és túltermelését igényli. Ez a vad

típusú PCNA nagyszámú ismert interakciós partnere miatt nem más mint túkeresés a szalmakazalban. Modernebb és nagyobb áteresztőképességű, ún. „high through put” módszerek a probléma megoldására alkalmasabbak lennének. Ilyen lehetne például a mutáns PCNA változatok fehérjekomplexeinek tisztítása, és a tapasztalt fehérjekötési mintázatoknak a vad típusú PCNA fehérjekötési mintázatával való összevetése. Ennek a jó minőségű komplex tisztításához szükséges jelentős gyakorlat hiányán, és az anyagi források szűkös voltán túl határt szab az akadály, hogy az élesztő PCNA fehérje nagyon érzékeny, nehezen címkézhető. Laboratóriumunkban megpróbálkoztunk mind N-terminális, mind C-terminális, mind pedig a leolvasási keretbe épített különböző méretű és fajtájú címkézéssel (3HA, 2HA, 6HIS-STREP, TAP stb.), de míg a terminális címkék közül a legkisebb jelenléte is érzékenyebbé tette a törzset UV sugárzásra, a leolvasási keretbe építettek egyenesen letálisnak bizonyultak.

S ha most- eltekintve a tényről, hogy holmi szépirodalmi százízű poénkodás szétfeszíti egy tudományos értekezés szigorú formai kereteit- visszafogottan kifejezhetem érzéseimet, nem marad más számomra, mint a genetika szépségei és nehézségei előtt fejet hajtva magaménak vallani az elcsépett, de megkerülhetetlen Madách-i igazságot: „Ember küzdj, és bízva bízzál.”

5. Irodalomjegyzék

- Aaltonen, L. A., P. Peltomäki, F. S. Leach, P. Sistonen, L. Pylkkanen, J. P. Mecklin, H. Jarvinen, S. M. Powell, J. Jen, S. R. Hamilton and et al. (1993). "Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer." Science **260**(5109): 812-816.
- Aboussekhra, A. and R. D. Wood (1995). "Detection of nucleotide excision repair incisions in human fibroblasts by immunostaining for PCNA." Exp Cell Res **221**(2): 326-332.
- Acharya, N., R. E. Johnson, S. Prakash and L. Prakash (2006). "Complex formation with Rev1 enhances the proficiency of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase zeta for mismatch extension and for extension opposite from DNA lesions." Mol Cell Biol **26**(24): 9555-9563.
- Alani, E., L. Cao and N. Kleckner (1987). "A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains." Genetics **116**(4): 541-545.
- Amin, N. S. and C. Holm (1996). "In vivo analysis reveals that the interdomain region of the yeast proliferating cell nuclear antigen is important for DNA replication and DNA repair." Genetics **144**(2): 479-493.
- Araujo, S. J., F. Tirode, F. Coin, H. Pospiech, J. E. Syvaöja, M. Stucki, U. Hubscher, J. M. Egly and R. D. Wood (2000). "Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK." Genes Dev **14**(3): 349-359.
- Balajee, A. S., A. May, I. Dianova and V. A. Bohr (1998). "Efficient PCNA complex formation is dependent upon both transcription coupled repair and genome overall repair." Mutat Res **409**(3): 135-146.
- Bienko, M., C. M. Green, N. Crosetto, F. Rudolf, G. Zapart, B. Coull, P. Kannouche, G. Wider, M. Peter, A. R. Lehmann, K. Hofmann and I. Dikic (2005). "Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis." Science **310**(5755): 1821-1824.
- Blastyak, A., I. Hajdu, I. Unk and L. Haracska (2010). "Role of double-stranded DNA translocase activity of human HLTf in replication of damaged DNA." Mol Cell Biol **30**(3): 684-693.
- Blastyak, A., L. Pinter, I. Unk, L. Prakash, S. Prakash and L. Haracska (2007). "Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression." Mol Cell **28**(1): 167-175.
- Boiteux, S. and M. Guillet (2004). "Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*." DNA Repair (Amst) **3**(1): 1-12.
- Boothman, D. A., M. Meyers, E. Odegaard and M. Wang (1996). "Altered G1 checkpoint control determines adaptive survival responses to ionizing radiation." Mutat Res **358**(2): 143-153.
- Bowers, J., P. T. Tran, A. Joshi, R. M. Liskay and E. Alani (2001). "MSH-MLH complexes formed at a DNA mismatch are disrupted by the PCNA sliding clamp." J Mol Biol **306**(5): 957-968.
- Buermeyer, A. B., S. M. Deschenes, S. M. Baker and R. M. Liskay (1999). "Mammalian DNA mismatch repair." Annu Rev Genet **33**: 533-564.
- Burgess, R. C., M. Sebesta, A. Sisakova, V. P. Marini, M. Lisby, J. Damborsky, H. Klein, R. Rothstein and L. Krejci (2013). "The PCNA interaction protein box sequence in Rad54

is an integral part of its ATPase domain and is required for efficient DNA repair and recombination." *PLoS One* **8**(12): e82630.

Castrec, B., C. Rouillon, G. Henneke, D. Flament, J. Querellou and J. P. Raffin (2009). "Binding to PCNA in Euryarchaeal DNA Replication requires two PIP motifs for DNA polymerase D and one PIP motif for DNA polymerase B." *J Mol Biol* **394**(2): 209-218.

Chang, D. J. and K. A. Cimprich (2009). "DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes." *Nat Chem Biol* **5**(2): 82-90.

Chen, J. and J. Stubbe (2005). "Bleomycins: towards better therapeutics." *Nat Rev Cancer* **5**(2): 102-112.

Clark, A. B., F. Valle, K. Drotschmann, R. K. Gary and T. A. Kunkel (2000). "Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 complexes." *J Biol Chem* **275**(47): 36498-36501.

Daraba, A., V. K. Gali, M. Halmai, L. Haracska and I. Unk (2014). "Def1 promotes the degradation of Pol3 for polymerase exchange to occur during DNA-damage--induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *PLoS Biol* **12**(1): e1001771.

Dieckman, L. M., E. M. Boehm, M. M. Hingorani and M. T. Washington (2013). "Distinct structural alterations in proliferating cell nuclear antigen block DNA mismatch repair." *Biochemistry* **52**(33): 5611-5619.

Eissenberg, J. C., R. Ayyagari, X. V. Gomes and P. M. Burgers (1997). "Mutations in yeast proliferating cell nuclear antigen define distinct sites for interaction with DNA polymerase delta and DNA polymerase epsilon." *Mol Cell Biol* **17**(11): 6367-6378.

Engel, F. B., L. Hauck, M. Boehm, E. G. Nabel, R. Dietz and R. von Harsdorf (2003). "p21(CIP1) Controls proliferating cell nuclear antigen level in adult cardiomyocytes." *Mol Cell Biol* **23**(2): 555-565.

Fan, L. and W. Xiao (2016). "The Pol30-K196 residue plays a critical role in budding yeast DNA postreplication repair through interaction with Rad18." *DNA Repair (Amst)* **47**: 42-48.

Friedberg, E. C. (1991). "Eukaryotic DNA repair: glimpses through the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Bioessays* **13**(6): 295-302.

Gangavarapu, V., L. Haracska, I. Unk, R. E. Johnson, S. Prakash and L. Prakash (2006). "Mms2-Ubc13-dependent and -independent roles of Rad5 ubiquitin ligase in postreplication repair and translesion DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **26**(20): 7783-7790.

Garg, P., C. M. Stith, J. Majka and P. M. Burgers (2005). "Proliferating cell nuclear antigen promotes translesion synthesis by DNA polymerase zeta." *J Biol Chem* **280**(25): 23446-23450.

Gary, R., D. L. Ludwig, H. L. Cornelius, M. A. MacInnes and M. S. Park (1997). "The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21." *J Biol Chem* **272**(39): 24522-24529.

Gibbs, P. E., J. McDonald, R. Woodgate and C. W. Lawrence (2005). "The relative roles in vivo of *Saccharomyces cerevisiae* Pol eta, Pol zeta, Rev1 protein and Pol32 in the bypass and mutation induction of an abasic site, T-T (6-4) photoadduct and T-T cis-syn cyclobutane dimer." *Genetics* **169**(2): 575-582.

Guo, C., T. S. Tang, M. Bienko, I. Dikic and E. C. Friedberg (2008). "Requirements for the interaction of mouse Polkappa with ubiquitin and its biological significance." *J Biol Chem* **283**(8): 4658-4664.

Guo, C., T. S. Tang, M. Bienko, J. L. Parker, A. B. Bielen, E. Sonoda, S. Takeda, H. D. Ulrich, I. Dikic and E. C. Friedberg (2006). "Ubiquitin-binding motifs in REV1 protein are required for its role in the tolerance of DNA damage." *Mol Cell Biol* **26**(23): 8892-8900.

Halmai, M., O. Frittmann, Z. Szabo, A. Daraba, V. K. Gali, E. Balint and I. Unk (2016). "Mutations at the Subunit Interface of Yeast Proliferating Cell Nuclear Antigen Reveal a Versatile Regulatory Domain." *PLoS One* **11**(8): e0161307.

Hanawalt, P. C. and G. Spivak (2008). "Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(12): 958-970.

Hishiki, A., H. Hashimoto, T. Hanafusa, K. Kamei, E. Ohashi, T. Shimizu, H. Ohmori and M. Sato (2009). "Structural basis for novel interactions between human translesion synthesis polymerases and proliferating cell nuclear antigen." *J Biol Chem* **284**(16): 10552-10560.

Hoege, C., B. Pfander, G. L. Moldovan, G. Pyrowolakis and S. Jentsch (2002). "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO." *Nature* **419**(6903): 135-141.

Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *Nature* **411**(6835): 366-374.

Hofmann, R. M. and C. M. Pickart (1999). "Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair." *Cell* **96**(5): 645-653.

Hubscher, U., G. Maga and S. Spadari (2002). "Eukaryotic DNA polymerases." *Annu Rev Biochem* **71**: 133-163.

Ira, G., D. Satory and J. E. Haber (2006). "Conservative inheritance of newly synthesized DNA in double-strand break-induced gene conversion." *Mol Cell Biol* **26**(24): 9424-9429.

Iyer, R. R., A. Pluciennik, V. Burdett and P. L. Modrich (2006). "DNA mismatch repair: functions and mechanisms." *Chem Rev* **106**(2): 302-323.

Jackson, S. P. (2002). "Sensing and repairing DNA double-strand breaks." *Carcinogenesis* **23**(5): 687-696.

Jansen, J. G., A. Tsaalbi-Shtylik, P. Langerak, F. Calleja, C. M. Meijers, H. Jacobs and N. de Wind (2005). "The BRCT domain of mammalian Rev1 is involved in regulating DNA translesion synthesis." *Nucleic Acids Res* **33**(1): 356-365.

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

Johnson, R. E., M. T. Washington, S. Prakash and L. Prakash (2000). "Fidelity of human DNA polymerase ϵ ." *J Biol Chem* **275**(11): 7447-7450.

Jones, E. W. (1991). "Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*." *Methods Enzymol* **194**: 428-453.

Kondratyck, C. M., E. M. Boehm, L. M. Dieckman, K. T. Powers, J. C. Sanchez, S. R. Muetting and M. T. Washington (2016). "Identification of New Mutations at the PCNA Subunit Interface that Block Translesion Synthesis." *PLoS One* **11**(6): e0157023.

Koundrioukoff, S., Z. O. Jonsson, S. Hasan, R. N. de Jong, P. C. van der Vliet, M. O. Hottiger and U. Hubscher (2000). "A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation." *J Biol Chem* **275**(30): 22882-22887.

Krishna, T. S., X. P. Kong, S. Gary, P. M. Burgers and J. Kuriyan (1994). "Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA." *Cell* **79**(7): 1233-1243.

Lau, P. J., H. Flores-Rozas and R. D. Kolodner (2002). "Isolation and characterization of new proliferating cell nuclear antigen (POL30) mutator mutants that are defective in DNA mismatch repair." *Mol Cell Biol* **22**(19): 6669-6680.

Lawrence, C. W. and V. M. Maher (2001). "Mutagenesis in eukaryotes dependent on DNA polymerase ζ and Rev1p." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1405): 41-46.

Lea, D. E. and C. A. Coulson (1949). "The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations." *J Genet* **49**(3): 264-285.

Lindahl, T. and B. Nyberg (1972). "Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid." *Biochemistry* **11**(19): 3610-3618.

Lindahl, T. and R. D. Wood (1999). "Quality control by DNA repair." *Science* **286**(5446): 1897-1905.

Maga, G. and U. Hubscher (2003). "Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners." *J Cell Sci* **116**(Pt 15): 3051-3060.

Masutani, C., R. Kusumoto, A. Yamada, N. Dohmae, M. Yokoi, M. Yuasa, M. Araki, S. Iwai, K. Takio and F. Hanaoka (1999). "The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta." *Nature* **399**(6737): 700-704.

Matsumoto, Y., K. Kim, J. Hurwitz, R. Gary, D. S. Levin, A. E. Tomkinson and M. S. Park (1999). "Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/apyrimidinic sites with purified human proteins." *J Biol Chem* **274**(47): 33703-33708.

Mehta, A. and J. E. Haber (2014). "Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**(9): a016428.

Memisoglu, A. and L. Samson (2000). "Base excision repair in yeast and mammals." *Mutat Res* **451**(1-2): 39-51.

Moldovan, G. L., B. Pfander and S. Jentsch (2007). "PCNA, the maestro of the replication fork." *Cell* **129**(4): 665-679.

Naryzhny, S. N. (2008). "Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view." *Cell Mol Life Sci* **65**(23): 3789-3808.

Niu, H., W. H. Chung, Z. Zhu, Y. Kwon, W. Zhao, P. Chi, R. Prakash, C. Seong, D. Liu, L. Lu, G. Ira and P. Sung (2010). "Mechanism of the ATP-dependent DNA end-resection machinery from *Saccharomyces cerevisiae*." *Nature* **467**(7311): 108-111.

Northam, M. R., P. Garg, D. M. Baitin, P. M. Burgers and P. V. Shcherbakova (2006). "A novel function of DNA polymerase zeta regulated by PCNA." *EMBO J* **25**(18): 4316-4325.

Ohashi, E., Y. Murakumo, N. Kanjo, J. Akagi, C. Masutani, F. Hanaoka and H. Ohmori (2004). "Interaction of hREV1 with three human Y-family DNA polymerases." *Genes Cells* **9**(6): 523-531.

Papouli, E., S. Chen, A. A. Davies, D. Huttner, L. Krejci, P. Sung and H. D. Ulrich (2005). "Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p." *Mol Cell* **19**(1): 123-133.

Paunesku, T., S. Mittal, M. Protic, J. Oryhon, S. V. Korolev, A. Joachimiak and G. E. Woloschak (2001). "Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome." *Int J Radiat Biol* **77**(10): 1007-1021.

Pfander, B., G. L. Moldovan, M. Sacher, C. Hoege and S. Jentsch (2005). "SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase." *Nature* **436**(7049): 428-433.

Plosky, B. S., A. E. Vidal, A. R. Fernandez de Henestrosa, M. P. McLenigan, J. P. McDonald, S. Mead and R. Woodgate (2006). "Controlling the subcellular localization of DNA polymerases iota and eta via interactions with ubiquitin." *EMBO J* **25**(12): 2847-2855.

Podust, V. N., L. M. Podust, F. Goubin, B. Ducommun and U. Hubscher (1995). "Mechanism of inhibition of proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA synthesis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21." *Biochemistry* **34**(27): 8869-8875.

Prakash, S. and L. Prakash (2000). "Nucleotide excision repair in yeast." *Mutat Res* **451**(1-2): 13-24.

Prakash, S. and L. Prakash (2002). "Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair." Genes Dev **16**(15): 1872-1883.

Roche, H., R. D. Gietz and B. A. Kunz (1994). "Specificity of the yeast rev3 delta antimutator and REV3 dependency of the mutator resulting from a defect (rad1 delta) in nucleotide excision repair." Genetics **137**(3): 637-646.

Rothstein, R. (1991). "Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast." Methods Enzymol **194**: 281-301.

Sharma, N. M., O. V. Kochenova and P. V. Shcherbakova (2011). "The non-canonical protein binding site at the monomer-monomer interface of yeast proliferating cell nuclear antigen (PCNA) regulates the Rev1-PCNA interaction and Polzeta/Rev1-dependent translesion DNA synthesis." J Biol Chem **286**(38): 33557-33566.

Svejstrup, J. Q. (2007). "Contending with transcriptional arrest during RNAPII transcript elongation." Trends Biochem Sci **32**(4): 165-171.

Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein and F. W. Stahl (1983). "The double-strand-break repair model for recombination." Cell **33**(1): 25-35.

Thompson, L. H. (2012). "Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography." Mutat Res **751**(2): 158-246.

Torres-Ramos, C. A., R. E. Johnson, L. Prakash and S. Prakash (2000). "Evidence for the involvement of nucleotide excision repair in the removal of abasic sites in yeast." Mol Cell Biol **20**(10): 3522-3528.

Unk, I., I. Hajdu, A. Blastyak and L. Haracska (2010). "Role of yeast Rad5 and its human orthologs, HLTF and SHPRH in DNA damage tolerance." DNA Repair (Amst) **9**(3): 257-267.

Unk, I., I. Hajdu, K. Fatyol, J. Hurwitz, J. H. Yoon, L. Prakash, S. Prakash and L. Haracska (2008). "Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 3768-3773.

Unk, I., I. Hajdu, K. Fatyol, B. Szakal, A. Blastyak, V. Bermudez, J. Hurwitz, L. Prakash, S. Prakash and L. Haracska (2006). "Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18107-18112.

Vilenchik, M. M. and A. G. Knudson (2003). "Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12871-12876.

Wang, Z., X. Wu and E. C. Friedberg (1993). "DNA repair synthesis during base excision repair in vitro is catalyzed by DNA polymerase epsilon and is influenced by DNA polymerases alpha and delta in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **13**(2): 1051-1058.

Warbrick, E. (2000). "The puzzle of PCNA's many partners." Bioessays **22**(11): 997-1006.

Washington, M. T., R. E. Johnson, S. Prakash and L. Prakash (2000). "Accuracy of thymine-thymine dimer bypass by *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase eta." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3094-3099.

Watanabe, K., S. Tateishi, M. Kawasuji, T. Tsurimoto, H. Inoue and M. Yamaizumi (2004). "Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination." EMBO J **23**(19): 3886-3896.

Watts, F. Z. (2006). "Sumoylation of PCNA: Wrestling with recombination at stalled replication forks." DNA Repair (Amst) **5**(3): 399-403.

Woloschak, G. E., C. M. Chang-Liu, J. Chung and C. R. Libertin (1996). "Expression of enhanced spontaneous and gamma-ray-induced apoptosis by lymphocytes of the wasted mouse." Int J Radiat Biol **69**(1): 47-55.

Woloschak, G. E., T. Paunesku, C. R. Libertin, C. M. Chang-Liu, M. Churchill, J. Panozzo, D. Grdina, M. A. Gemmell and C. Giometti (1996). "Regulation of thymus PCNA expression is altered in radiation-sensitive wasted mice." Carcinogenesis **17**(11): 2357-2365.

Woudstra, E. C., C. Gilbert, J. Fellows, L. Jansen, J. Brouwer, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and J. Q. Svejstrup (2002). "A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage." Nature **415**(6874): 929-933.

Wyrobek, A. J., T. E. Schmid and F. Marchetti (2005). "Relative susceptibilities of male germ cells to genetic defects induced by cancer chemotherapies." J Natl Cancer Inst Monogr(34): 31-35.

Zhang, H. and C. W. Lawrence (2005). "The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(44): 15954-15959.

Zhuang, Z. and Y. Ai (2010). "Processivity factor of DNA polymerase and its expanding role in normal and translesion DNA synthesis." Biochim Biophys Acta **1804**(5): 1081-1093.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Unk Ildikónak a kutatócsoportjában eltöltött évekért, szakmai vezetéséért, a kísérletes munka tervezésében betöltött szerepéért, támogatásáért.

A kutatás megvalósulását a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal GINOP-2.3.2-15-2016-00001 pályázata, valamint az OTKA109521 számú pályázata is támogatta.

Köszönöm a DNS Reparáció csoport minden tagjának közreműködését, akik a kísérletek végrehajtásában is részt vettek.

Csoportunk laboránsa, Minorits Szilvia oldatok, táplemezek biztosításában volt segítségemre.

Hálával tartozom az SZBK Genetikai Intézet vezetésének, Raskó István professzor úrnak és Dr. Erdélyi Miklós igazgató úrnak, akik a Genetikai Intézet ösztöndíjának odaítélésével lehetővé tették PhD. tanulmányaim anyagi fedezetének biztosítását.

Örömmel gondolok a Genetikai Intézet egész közösségére, akiknek körében nyíltszívű, és kedves emberekre leltem.

7. Összefoglalás

A DNS-t gyakran érik különböző károsító hatások, amelyek az örökítő anyag szerkezetének megváltozását, azaz DNS károsodást idéznek elő. A károsodások gátolhatják mind a replikáció, mind a transzkripció folyamatát, a sejtciklus leállítását eredményezve. A sejtciklus elakadása programozott sejthalált indukálhat. Az apoptózis elkerülése érdekében eukarióta sejtekben több evolúciósan konzervált DNS reparációs és DNS hiba tolerancia útvonal alakult ki. A DNS reparációs folyamatok eltávolítják a károsodott DNS szakaszt a kettős hélixből, visszaállítván az eredeti DNS szekvenciát. A DNS hiba tolerancia mechanizmusok az elakadó replikációs apparátus továbbhaladását biztosítják a DNS károsodáson keresztül, a DNS károsodás kijavítása nélkül.

Mind a DNS reparációs, mind a DNS hiba tolerancia folyamatokban kulcsszerepet játszik a PCNA (proliferating cell nuclear antigen) molekula. A PCNA homotrimer formában gyűrű alakban veszi körül a DNS-t, és a DNS polimerázok kötőhelyéül szolgál, ezáltal biztosítva a processzív (hatékony) DNS szintézist. A legtöbb DNS reparációs és DNS hiba tolerancia folyamat bizonyos lépéseiben szükség van DNS szintézisre is. Ennek megfelelően a PCNA több DNS javító mechanizmusban vesz részt. Különösen jól jellemzett a DNS hiba toleranciában, azaz a Rad6/Rad18 útvonalban betöltött szerepe. A PCNA DNS károsodás hatására bekövetkező monoubiquitin általi poszttranszlációs módosulása a PCNA felszínén DNS polimeráz cserét indukál. A DNS polimeráz csere során egy lazább aktív centrummal rendelkező, bizonyos DNS hibákkal szemben bázist beilleszteni képes ún. transzlációs DNS polimeráz nyer hozzáférést a replikációs villához. A monoubiquitilált PCNA poliubiquitilációja a replikációs villa megfordítását és a DNS károsodásnak a DNS polimeráz általi elkerülését eredményezi.

A PCNA esszenciális, rendkívül konzervált fehérje. Monomerje két doménből, és az azokat összekapcsoló interdomén hurokból áll. Nagyfokú konzerváltsága ellenére nagyszámú változatos fehérjével hat kölcsön. Három jellemzett fehérjekötő régiója van. Fehérjekötő régióként több interakciós partner kapcsolódik. Az interdomén hurok területéhez csatlakozik a fehérjék legnagyobb része, míg néhány kölcsönható partner a PCNA kiálló C-terminális végéhez, mások a molekula belső felszínén elhelyezkedő N-terminális α -hélixekhez kapcsolódnak.

A jellemzett fehérjekötési régiók a PCNA molekula felszínének csupán kis részét fedik le, a további funkcionális szereppel bíró régiók feltérképezése még várat magára. Az efféle

kutatás jellegét nehezíti, hogy deléciós mutánsok vizsgálatára nincs lehetőség, hiszen viszonylag kis PCNA deléciók vagy inszerciók is életképtelenné teszik a sejteket.

Munkámban PCR alapú helyspecifikus mutagenézissel az élesztő (*S. cerevisiae*) PCNA-t kódoló *POL30* génben aminosavcserét okozó pontmutációkat hoztam létre. Olyan helyeket, felszíneket kerestem, amelyek a PCNA molekula DNS reparációs és DNS hiba tolerancia folyamatokban betöltött szerepéhez nélkülözhetetlenek.

A létrehozott 10 módosított PCNA változatot termelő élesztő törzs közül kettő hőmérséklet érzékeny növekedést mutatott. Ezeket a replikáció hatékonyságában károsodott törzseknek tekintettük, és további vizsgálatainkból kizártuk. A normál növekedési sebességű törzsek közül további kísérleteinkhez azokat válogattuk ki, amelyek megnövekedett érzékenységet mutattak DNS károsító szerek (UV, MMS) hatására. A fennmaradó nyolc törzsből kettőben nem tapasztaltunk megnövekedett érzékenységet DNS károsításra, hat pontmutáns PCNA változat viszont érzékenyebbé tette a sejteket arra utalva, hogy a benne lévő pontmutáció valamely DNS reparációs, illetve DNS hiba tolerancia útvonal működését csökkentette.

A kérdéses hat aminosavcsere közül öt (II99,100AA; D109A; II181,182AA; FE103,104AA és DI109,167AA) az alegységek közötti kapcsolódási felszínt alkotó β -lemezekben helyezkedik el, egy további pedig (L154A) a trimer gyűrű belső felszíne felé néző α -hélixek egyikén.

A hat mutáns *POL30* gént genetikai kölcsönhatásokat vizsgáló episztázis analízisnek vetettük alá a DNS reparációs és DNS hiba tolerancia útvonalak génjeivel.

Az alegységek kapcsolódási felszínén elhelyezkedő PCNA mutációk közül az II99,100AA az indukált pontmutációk képzéséért felelős Rev3/Rev7 (Pol ζ) DNS hiba tolerancia útvonalat inaktíválja. A genetikai vizsgálatokon túl, az indukált és spontán mutációs ráták mérésével funkcionálisan is igazoltuk az UV indukálta mutációképzés csökkenését. A kérdéses útvonal inaktíválódásáért az lehet a felelős, hogy a mutáns PCNA fehérje nem képes kapcsolódni a Rev1 transzléziós DNS polimerázzal, amely a mutagenézis nélkülözhetetlen adapter fehérjéje.

A *pol30-DI09A* allél a NER útvonalába térképezhető, és a NER egy új aktiválódási mechanizmusát befolyásolhatja. A *pol30-II181,182AA* gén UV károsodás hatására a homológ rekomináció *RAD52*, illetve *RAD54* génjével episztatikus. Az FE103,104AA PCNA változat, bár növeli a sejtek érzékenységét DNS károsító szerekre, genetikai analízissel nem sorolható be egyértelműen az általunk vizsgált DNS reparációs vagy DNS hiba tolerancia útvonalakba, ami arra utal, hogy a mutáció jelenléte egy további DNS

reparációs útvonalat inaktiválhat. Végül a monomerek kapcsolódási felszínén, a számba vett aminosavcserék közelében olyan aminosavcserét is előállítottunk, amely egyáltalán nem befolyásolta a DNS reparációt és a DNS hiba toleranciát (Y114A PCNA).

A trimer gyűrű belső felszínén elhelyezkedő L154A PCNA mutáció a teljes Rad6/Rad18 DNS hiba tolerancia (DDT) útvonalat inaktiválja, és közben szupresszálja a *rad18* és *rad6* deléciók DNS károsodás érzékenységét. Ezen fenotípusaiban megegyezik az irodalomból ismeretes K164R PCNA mutánssal, amely az ubiquitilációs helyet érinti, és képtelen a PCNA ubiquitilációra. Az L154A PCNA mutáns jellemzője továbbá egy erős spontán mutátor fenotípus, amely a mutagenesis effektorainak (DNS polimerázok, DNS reparációs fehérjék) deléciójával nem csökkenthető. A magas spontán mutációs ráta véleményünk szerint a mutáns PCNA és a replikatív DNS polimeráz megváltozott kölcsönhatásának eredménye lehet, amely befolyásolja a polimeráz proofreading képességét.

A fenti eredmények tanúsága szerint a PCNA alegységek kapcsolódási felszíne a DNS reparáció és DNS hiba tolerancia szempontjából kiemelten fontos területnek bizonyult, hiszen egymáshoz térbeli közelségben lévő aminosavak egymástól különböző folyamatok működését befolyásolják. Az alegységek kapcsolódási felszíne tehát valószínűleg a három már korábban jellemzett PCNA fehérjekötő régióhoz hasonlóan egy fontos szabályozó régiót alkot.

8. Summary

The DNA of the cells is continuously being damaged by various sources, creating lesions and alterations in its structure, called DNA lesions. Such lesions, depending on their nature could cause stalling of the replication machinery or pose an obstacle to transcription. Stalled replication, and distorted protein synthesis could in turn induce apoptosis, a highly undesirable outcome from a viewpoint of a cell. To avoid this scenario, highly conserved DNA repair and DNA damage tolerance pathways have evolved. DNA repair processes remove the damaged stretch of DNA from the double helix, and by doing so they restore the original DNA sequence. DNA damage tolerance mechanisms on the other hand help the replication bypass the damage, without removing the lesion itself.

PCNA (proliferatin cell nuclear antigen) plays a central role in both DNA repair and DNA damage tolerance pathways. It encircles DNA in a homotrimer form and serves as a processivity factor for DNA polymerases attached to it's surface. Since DNA synthesis is involved in most DNA repair or DNA damage tolerance processes, PCNA also becomes indispensable for many of these pathways. Especially well characterized is it's governing function in DNA damage tolerance (DDT). It's post translational modification, monoubiquitilation upon DNA damage induces polymerase switch, during which a high fidelity replicative DNA polymerase is replaced with a translesion DNA polymerase. Translesion DNA polymerases have a more open active centre, so they are capable of bypassing certain lesions. If at the site of primary modification PCNA becomes a subject of poliubiquitilation, regression and reversal of the replication fork is triggered which esencially enables the avoidance of the DNA damage by the replicative DNA polymerase.

PCNA is an essential, extremely conserved protein. One subunit consists of two domains, and an interdomain connecting loop (ICL). Despite the conserved structure, it binds a large number of diverse interacting partners. It has three characterized protein binding regions, each of them having multiple interacting proteins. Most of the partners attach to the inerdomain connecting loop (ICL), some of them to the C-terminal PCNA tail hanging out from the coiled sturcure, and few to an α -helix faced toward the inner surface of the trimer ring.

The above mentioned protein binding regions still cover only a fraction of the whole PCNA surface, and mapping further regions that bear functional importance is still ahead.

However there is a great difficulty in studying PCNA function, because introduction of even the smallest deletions (or insertions for that matter) renders the cells unviable.

In this study we created a set of yeast (*S. cerevisiae*) mutant PCNA versions, by introducing point mutations into the *POL30* gene using PCR based site directed mutagenesis. We were searching for sites, and surfaces on the PCNA protein which are indispensable for DNA repair, or DNA damage tolerance. The mutations represent as single or tandem amino acid replacements on protein level. All of the chosen amino acids were mutated to alanine.

All of the strains which express the various PCNA point mutant proteins as sole PCNA source proved to be viable, and only two out of ten showed temperature sensitive slow growth. We considered these two to be strains defective in the processivity of replication, thus excluded them from further evaluation. Out of remaining eight strains two did not show any increase in sensitivity to DNA damaging agents (UV and MMS) compared to wild type control. Those six strains in turn, which as a result of the point mutation became more sensitive to DNA damage were selected for genetic analysis, as they apparently carry defect to some of the DNA repair or DNA damage tolerance pathways.

Five of the latter six amino acid replacements (II99,100AA; D109A; II181,182AA; FE103,104AA and DI109,167AA) are located on the β -sheets forming the monomer-monomer interface, while another one sits on one of the α -helices facing toward the inner cavity of the trimer ring.

Genetic analysis was performed to clear the epistatic relations of these relevant PCNA mutant genes to the genes of the main DNA repair pathways.

Out of five mutations located on the subunit-subunit interface, the *pol30-II99,100AA* mutation completely inactivates the mutagenic branch of the DDT, the Rev3/Rev7 (Pol ζ) pathway. Besides epistasis analysis, that showed epistatic relation to *REV3* and *REV1*, by measuring the induced and spontaneous mutation rates, in this strain we could show a sharp decrease in the number of created mutations, similar to the one observed in the *rev3* deletion strain. The mutant PCNA variant also loses its ability to interact with Rev1 in GST pulldown assays, which seems to be the underlying molecular mechanism of the strain's observed phenotype. The *pol30-D109A* allele could be mapped into the NER pathway, showing epistasis to *RAD26*. However it was not epistatic to any of the genes belonging to the known subpathways of NER. Results of our genetic analysis suggests, that the surface affected by this amino acid replacement is important for a new branch, a new mechanism of activation of NER processes. The *pol30-II181,182AA* gene shows epistasis

with *RAD52* and *RAD54*, both major regulators of homologous recombination upon UV treatment, however the mutant PCNA still retains its ability to interact with *RAD54* protein. Although the presence of the FE103,104AA PCNA version does increase the sensitivity to DNA damaging agents, in contrast to the above discussed strains, it could not be matched to any of the studied DNA repair or DNA damage tolerance pathways. This indicates that it could affect some pathway outside the screening scope of this study (eg. BER, MMR etc.). Finally, still on the monomer-monomer interface we created an amino acid replacement, which despite being in spatial vicinity of the above discussed mutations, didn't affect any DNA repair or DNA damage tolerance mechanisms (Y114A PCNA).

The L154A PCNA point mutation, which unlike the above presented mutations targets the inner surface of the PCNA trimer ring, causes the inactivation of the whole DDT (Rad6/Rad18) pathway, and suppresses DNA damage sensitivity of the *rad18* and *rad6* deletions. In doing so, it displays the same phenotype as the iconic K164R PCNA mutant, defective in ubiquitilation. In fact, it's a very intriguing question, how a replacement of an amino acid buried deep on the inner side of the PCNA clamp can trigger the same phenotype as mutation of one of the most exposed and attractive lysines on the outer surface. The L154A PCNA mutant is further characterized by a unique spontaneous mutator phenotype, that cannot be suppressed by the deletion of the known DNA damage tolerance genes. At this point we are prone to think that this spontaneous mutator phenotype is a result of an altered interaction between the replicative DNA polymerase and PCNA, causing the decrease of its proofreading activity.

As a summary we can conclude that the subunit-subunit interface of the PCNA proved to be a region of high importance for DNA repair and DNA damage tolerance, since amino acid residues close to each other influence the activity of different pathways. We can state with high probability that the subunit-subunit interface forms a new regulatory region on the surface of the PCNA similar to other already characterized protein binding surfaces of the protein.