

**Az élesztő Mgs1 és a humán WRNIP1 fehérjék szerepe a
G-kvadruplexet formáló DNS szakaszok replikációjában**

Ph.D. értekezés tézisei

Tóth Ágnes

Témavezetők:

Dr. Burkovics Péter
tudományos főmunkatárs

Dr. Haracska Lajos, D.Sc.
tudományos tanácsadó

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

Szeged
2020

Bevezetés

A sejtek számára létfontosságú a genetikai információ pontos és hibamentes másolása, mivel az elakadt replikációs villa mutációk, száltörések, és genomátrendeződések kialakulásához vezethet, aminek következménye rákos sejtek kialakulása vagy sejthalál is lehet. A replikáció folyamatát számos tényező akadályozhatja. Ilyenek lehetnek a külső és belső forrásokból származó DNS-hibák, DNS-száltörések és keresztkötések, valamint a kettős hélixről eltérő stabil másodlagos DNS szerkezetek is. A stabil másodlagos DNS szerkezetek közül az egyik legismertebb a G-kvadruplex (G4) szerkezet, amely egyszálú guanin-gazdag DNS-en tud kialakulni. Számos fontos biológiai funkciója ismert, ilyen a telomerek védelme, IgG immunglobulinok rekombinációja, emberben megtalálhatók replikációs origók közelében, valamint szabályozzák bizonyos gének transzkripció és transláció szintjét is. A genomban ezek a szerkezetek nem véletlenszerűen helyezkednek el, és az evolúció során nagyobb konzerváltságot mutatnak, mint a környező genomikus szekvenciák. Az emberi genomban nagy mennyiségben található G4 szerkezeteket az onkogének promóter régióiban, ezért amennyiben ezekben a szekvenciákban mutáció keletkezik, megnőhet az onkogének szintje a sejtben. Ezért is kiemelten fontos ezen szekvenciák pontos replikációja, azonban mivel stabil másodlagos szerkezetet alkothatnak, megakaszthatják a replikációs villát. Ismertek már helikázok, valamint polimerázok amelyek részt vesznek a G4 szekvenciák kitekerésében és átírásában, azonban a folyamat pontos mechanizmusa és a folyamatot szabályozó szereplők még nem ismertek.

A *S. cerevisiae* Mgs1 (Maintenance of genome stability 1) fehérje, valamint *H. sapiens* homológja, a WRNIP1 (Werner interacting protein 1) fehérje több szempontból is ígéretes jelöltnek bizonyultak, mint a G4 szerkezetek replikációjában résztvevő potenciális jelöltek. Az Mgs1 fehérje fontos szerepet játszik a genomstabilitás megőrzésében élesztőben. Mindkét fehérje szorosan kapcsolódik a replikációs apparátusban található fehérjékhez. Többek között ilyen a polimeráz δ , valamint a PCNA fehérje is. A WRNIP1 fehérje emellett kapcsolatba lép a WRN helikázzal és TLS polimerázokkal is. Mindkét fehérjéről leírták, hogy interakcióba lépnek különböző típusú DNS-szerkezetekkel, azonban a G4-kötő aktivitásukat még nem vizsgálták. Emellett németországi kollaborátoraink élesztő egyhibrid kísérletben kimutatták, hogy az Mgs1 fehérje *in vivo* interakcióba lép a G4 szerkezeteket tartalmazó régiókkal. Ezen ismeretek alapján munkánk az Mgs1 és a WRNIP1 fehérjék jellemzésére fókuszált a G4 szerkezetek replikációjában.

Célkitűzések

Munkánk során a G4 szerkezeteket tartalmazó DNS szekvenciák replikációjának folyamatát szeretnénk volna jobban megérteni. Ehhez a folyamatban résztvevő új fehérjéket kerestünk. A vizsgálatok során azonosítottunk a *S. cerevisiae* Mgs1 fehérjét, és annak *H. sapiens* homológját, a WRNIP1 fehérjét, mint potenciális résztvevőket és vizsgáltuk a G4 szerkezetek replikációjában játszott szerepüket. A kérdéseink megválaszolásához az alábbi kísérletek elvégzését tűztük ki célul:

S. cerevisiae Mgs1 fehérje:

- Az Mgs1 fehérje DNS-kötési affinitásának *in vitro* jellemzése G4 szerkezetet tartalmazó DNS-szubsztráttal (EMSA és fluoreszcens anizotrópia módszerekkel).
- Az Mgs1 fehérje ATP-áz aktivitásának *in vitro* jellemzése G4 szerkezetet tartalmazó DNS-szubsztrát jelenlétében.

H. sapiens WRNIP1 fehérje:

- A WRNIP1 fehérje DNS-kötési affinitásának *in vitro* jellemzése G4 szerkezetet tartalmazó DNS-szubsztráttal (EMSA és fluoreszcens anizotrópia módszerekkel).
- A WRNIP1 fehérje G4-kitekerő aktivitásának *in vitro* jellemzése FRET módszerrel.
- A WRNIP1 fehérje szerepének *in vivo* jellemzése a genomstabilitás fenntartásában.
- A WRNIP1 fehérje szerepének *in vivo* jellemzése a replikáció sebességének szabályozásában.

Alkalmazott módszerek

- Az élesztő Mgs1 és a humán WRNIP1 fehérjék tisztításához szükséges plazmidkonstrukciók létrehozásához restriktációs emésztést, LR reakciót, ligálást, plazmidtisztítást, valamint baktérium és élesztő transzformálást használtunk.
- A fehérjetisztítást GST-affinitáskromatográfia módszerrel végeztük, és a tisztítás eredményét gélelektroforézissel ellenőriztük, amelyhez denaturáló poliakrilamid gélt használtunk.
- A GST-Mgs1 és a GST-WRNIP1 fehérjék DNS kötési affinitását *in vitro* EMSA (electrophoretic mobility shift assay) módszerrel vizsgáltuk, amelyhez natív poliakrilamid gélt használtunk.
- A GST-Mgs1 és a GST-WRNIP1 fehérjék pontos DNS-kötési állandójának (K_d) meghatározását *in vitro* fluoreszcens anizotrópia módszerrel végeztük.
- A GST-Mgs1 fehérje ATP-áz aktivitásának vizsgálatát *in vitro* piruvát-kináz laktát-dehidrogenáz alapú kísérletben végeztük.
- A GST-WRNIP1 fehérje G4 szerkezetre gyakorolt hatását *in vitro* FRET módszerrel vizsgáltuk.
- A WRNIP1 fehérje genomstabilitásra gyakorolt hatását *in vivo* a γ H2AX és a kromoszómaaberrációk mennyiségének követésével ellenőriztük.
- A WRNIP1 fehérje G4-replikációban betöltött szerepét *in vivo* az EdU/IdU beépülésének követésével vizsgáltuk.

Eredmények

S. cerevisiae Mgs1 fehérje:

Az Mgs1 fehérje preferenciálisan köti a G4-et tartalmazó DNS szubsztrátokat azok kontroll párjával összehasonlítva *in vitro*

EMSA kísérletben tisztított fehérjepreparátum segítségével vizsgáltuk, hogy a fehérje interakcióba lépe-e a fluoreszcensen jelölt MYC G4 szerkezetet tartalmazó szubsztráttal, valamint a kontroll szubsztrátokkal. A tisztított fehérjepreparátum egyszálú, valamint parciális duplex formában is preferenciálisan kötötte a G4-et tartalmazó szubsztrátot annak kontroll párjával összehasonlítva.

Ezután a kötési állandó (K_d) értékek pontos meghatározásához fluoreszcens anizotrópia módszert használtunk, amellyel megerősítettük az EMSA kísérlet eredményeit. A kísérletben MYC G4-et, valamint különböző kontroll szekvenciákat tartalmazó szubsztrátokat használtunk. Az Mgs1 fehérje a G4-et tartalmazó egyszálú szubsztrátot 7 ± 2 nM kötési állandóval kötötte, a kontroll szubsztrátokat pedig 33–40-szer gyengébben. Parciális duplex formában a G4 esetében mért K_d érték 24 ± 4 nM volt, a kontroll szubsztrátok kötési állandója ennél 3–8-szor volt gyengébb.

A G4 motívum jelenléte nem befolyásolja az Mgs1 fehérje ATP-áz aktivitását *in vitro*

Piruvát-kináz laktát-dehidrogenáz alapú kísérletben vizsgáltuk a fehérje ATP-áz aktivitását MYC G4, valamint kontroll szubsztrát jelenlétében. A G4 motívum nem befolyásolta szignifikánsan az ATP-áz aktivitást a kontroll szubsztráttal összehasonlítva.

H. sapiens WRNIP1 fehérje:

A WRNIP1 fehérje preferenciálisan köti a G4 szerkezetet tartalmazó DNS szubsztrátokat *in vitro*

A tisztított GST-WRNIP1 fehérje DNS-kötő képességét először kompetíciós EMSA kísérletben vizsgáltuk MYC és CEB G4 szubsztrátokon. A fehérje mindkét típusú G4 szubsztrátot preferenciálisan kötötte azok kontroll párjával összehasonlítva. Ezután a kötési állandó (K_d) pontos meghatározásához fluoreszcens anizotrópia méréseket végeztünk. A fehérje a mindkét típusú G4 szubsztrátot szignifikánsabban erősebben kötötte azok kontroll párjaival összehasonlítva egyszálú és parciális duplex formában egyaránt.

A WRNIP1 fehérje megváltoztatja a G4 szerkezetét *in vitro*

FRET kísérletben vizsgáltuk, hogy a WRNIP1 fehérje megváltoztatja-e a CEB G4 szerkezetet. Kontrollként egy ismert G4-kiterékő helikázt, a BLM helikázt használtuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a

WRNIP1 fehérje kis mértékben képes megváltoztatni a G4 szerkezetét, ami azonban jelentősen elmarad a BLM helikáz aktivitásától.

A WRNIP1 fehérjének szerepe van a replikáció sebességének szabályozásában *in vivo*

Kontroll, valamint WRNIP1-csendesített sejteket kezeltünk PhenDC3-mal, ami egy széleskörűen használt G4-stabilizáló molekula, majd vizsgáltuk az EdU és IdU nukleotidanalógok beépülésének sebességét. A kísérlet eredményei azt mutatták, hogy WRNIP1-csendesített sejtekben PhenDC3-kezelés hatására nagy mértékben lecsökkent a replikáció sebessége a kontroll sejtekkel összehasonlítva.

A WRNIP1 fehérjének fontos szerepe van *in vivo* a genomstabilitás fenntartásában

γ H2AX mennyiségének követésével vizsgáltuk, hogy WRNIP1-csendesített sejtekben hogyan változik a kettősszálú törések száma PhenDC3-kezelés hatására. Kimutattuk, hogy a kezelés hatására szignifikánsan megnőtt a γ H2AX mennyisége a kontroll sejtekkel összehasonlítva.

Ezután annak ellenőrzéséhez, hogy a megfigyelt nagy számú kettősszálú törés milyen hatással van a genomintegritásra, vizsgáltuk a kromoszómák szerkezetét is. Kontroll, valamint WRNIP1-csendesített sejteket PhenDC3-mal kezeltünk, preparáltuk a kromoszómákat, és megszámloltuk az elváltozásokat mutató kromoszómákat. Eredményeink azt mutatták, hogy WRNIP1 hiányában nagy mértékben megnőtt a kromoszómaaberrációk száma PhenDC3-kezelés hatására.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy azonosítottuk az élesztő Mgs1 fehérjét, valamint humán homológját, a WRNIP1 fehérjét, mint a G4 replikációban résztvevő új szereplőket. EMSA és fluoreszcens anizotrópia kísérletekben kimutattuk, hogy mindkét fehérje preferenciálisan köti a G4 szerkezeteket *in vitro*. Emellett a WRNIP1 fehérje *in vitro* képes volt megváltoztatni a CEB G4 szerkezetet FRET mérésben. A WRNIP1 fehérjének továbbá fontos szerepe van *in vivo* a genomstabilitás fenntartásában és a replikáció zökkenőmentes haladásában is, mivel hiányában PhenDC3-kezelés hatására HeLa sejtekben megnőtt a kettős szálú törések száma, és ezáltal a kromoszómaaberrációk mennyisége, valamint lecsökkent a replikáció sebessége.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Burkovics Péternek és Dr. Haracska Lajosnak, hogy lehetőséget biztosítottak a kutatás elvégzéséhez, valamint a támogatást és a nélkülözhetetlen szakmai segítségüket.

Köszönöm Dr. Harami Gábornak és Dr. Kovács Mihálynak, valamint a Motor Enzimológia Kutatócsoport minden tagjának a fluoreszcens anizotrópia, ATP-áz és FRET kísérletekben nyújtott segítséget. Köszönöm Dr. Juhász Szilviának és Dr. Timinszky Gyulának az *in vivo* kísérletekben nyújtott segítséget, Dr. Pfeiffer Ilonának a fehérjetisztításban nyújtott segítséget, valamint Dr. Kóta Zoltánnak a FRET mérésekben nyújtott segítséget.

Köszönöm Dr. Pankotai Tibornak és Dr. Szüts Dávidnak, hogy rövid határidővel elvállalták a dolgozatom bírálatát.

Szeretném megköszönni Dr. Sajben-Nagy Enikőnek és Almási Karolának segítségét, és a dolgozatom írása során nyújtott támogatásukat. Emellett köszönöm Kovács Katalinnak a technikai segítséget, valamint a Mutagenesis és Karcionogenesis csoport tagjainak segítségét. Köszönöm Dr. Erdélyi Miklósnak, valamint a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetikai Intézet tagjainak a kutatás elvégzéséhez biztosított háttérrel.

Köszönöm egykori tanárainknak, hogy bevezettek a természettudományok csodálatos világába, legfőképp Máriás Ildikó támogatását.

Köszönöm Frittmann Orsolya, Sági-Zsigmond Eszter és Kovács Ildikó segítségét és támogatását, és hogy segítettek túljutni a nehéz időszakokon. Végül szeretném megköszönni családomnak, páromnak és barátaimnak, hogy végig támogattak és mellettem álltak.

Saját közlemények jegyzéke

MTMT azonosító: 10055161

Összesített impakt faktor: 9,852

A fokozatszerzési eljárás alapját képező közlemények jegyzéke:

Zacheja Theresa*, **Tóth Ágnes***, Harami M. Gábor, Yang Qianlu, Schwindt Eike, Kovács Mihály, Paeschke Katrin, Burkovics Péter: Mgs1 protein supports genome stability via recognition of G-quadruplex DNA structures, FASEB J. 34 (9): 12646-12662 (2020). MTMT: 31397391; IF: 5,391

Tóth Ágnes*, Hegedűs Lili*, Juhász Szilvia, Haracska Lajos, Burkovics Péter: The DNA-binding box of human SPARTAN contributes to the targeting of Pol η to DNA damage sites. DNA REPAIR 49 pp. 33-42., 10 p. (2017); MTMT: 3140736; IF: 4,461

*Megosztott első szerző

Konferencia

Előadás

Tóth Ágnes: Characterization of a novel G-quadruplex binding protein, 9th Central European Genome Stability and Dynamics Meeting, 2018 (Varsó, Lengyelország)

Tóth Ágnes, Harami Gábor, Almási Karola, Sajben-Nagy Enikő, Kovács Mihály, Burkovics Péter: Characterization of a novel G-quadruplex binding protein, Straub- napok, 2018 (Szeged, Magyarország)

Tóth Ágnes: The DNA-binding box of human SPARTAN contributes to the targeting of Polη to DNA damage sites, 7th Central European Genome Stability and Dynamics Meeting, 2016 (Zágráb, Horvátország)

Poszter

Tóth Ágnes, Burkovics Péter: Identifying new players in G-quadruplex unwinding and replication. Hungarian Molecular Life Sciences, 2017 (Eger, Magyarország)

Tóth Ágnes, Döme Lili, Burkovics Péter, Haracska Lajos: Regulation of DNA damage tolerance pathway by human Spartan, 7th DNA Repair Workshop, 2016 (Smolenice, Szlovákia)

Döme Lili, **Tóth Ágnes**, Dudás Kata, Haracska Lajos, Burkovics Péter: The regulatory function of ZBTB1 in the DNA Damage Tolerance pathway. Mechanisms of Recombination, 2016 (Alicante, Spanyolország)