

Ph.D. értekezés tézisei

# **A transzléziós DNS polimeráz éta szerepe a transzkripció elongációban**

**Vamsi Krishna Gali**

Témavezető: Dr. Unk Ildikó,  
tudományos főmunkatárs

**SZTE Természettudományi és Informatikai Kar  
Biológia Doktori Iskola**

**MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Genetikai Intézet**

**Szeged  
2017**

## BEVEZETÉS

A DNS megkettőződése során ha a replicatív polimeráz egy DNS károsodáshoz érve megakad, a replikáció folyamatosságának biztosítására más mechanizmusok lépnek fel. Ezek a DNS hibatolerancia útvonalak (DNA damage tolerance, DTT) folytatják a replikációt a károsodott templáton a károsodás eltávolítása nélkül. Az egyik hibatolerancia folyamat a transzléziós szintézis (translesion synthesis, TLS), mely során specializálódott, alacsony szelektivitású és fidelitású DNS polimerázok folytatják a beépítést a károsodással szemben és utána. A polimeráz éta (Pol $\eta$ ), amelyet *Saccharomyces cerevisiae*-ben a *RAD30* gén kódol, olyan TLS polimeráz, amely számos DNS károsodáson át tud haladni, az eredeti nukleotidnak megfelelőt beépítve hibamentes, míg eltérő nukleotidot beépítve mutációra hajlamosító hibaátírást eredményez. A Pol $\eta$  egyedülálló abban, hogy hatékonyan és hibamentesen átírja a ciklobután pirimidin dimereket, amelyek az UV sugárzás hatására keletkező leggyakoribb fototermékek. Az UV léziók hibaments átírásában betöltött szerepével összhangban élesztőben a Pol $\eta$  hiánya az UV-indukált mutagenézis megemelkedéséhez, míg emberben a variáns xeroderma pigmentosum rákra hajlamosító szindrómához vezet. Szintén hatékonyan és hibamentesen tud a Pol $\eta$  áthaladni az egyik leggyakoribb spontán oxidatív károsodáson, a 8-oxo-7,8-dihidroguanin-on (8-oxoG).

A DNS károsodások akadályozhatják a transzkripciót is. Például in vitro kísérletekben a CPD-k erős akadályt jelentenek az RNS polimeráz II-nek (RNAPII). A transzkripciót blokkoló hibákat a transzkripció-kapcsolt reparáció távolíthatja el, mely kivágja a hibát a dupla szálú DNS-ből, majd a reparációs szintézis az eredeti szekvenciát helyreállítja. Azonban az, hogy a *dihydrofolát reduktáz* gén transzkripciója UV-val besugarazott kínai hörcsög sejtekben hamarabb visszaállt, mint hogy a CPD-k vagy más fototermékek eltávolítása megtörténhetett volna, a transzkripció során működő hibaátírási mechanizmusok meglétére enged következtetni.

Ezidáig úgy gondolták, hogy a transléziós RNS szintézist az RNAPII maga végzi, elongációs és más, még azonosítatlan faktorok segítségével. Kimutatták, hogy HeLa sejtekből tisztított TFIIF, TFIIIS, Elongin és CSB segítik az RNAPII-t bizonyos DNS hibák átírásában. Azonban az kevésbé ismert, hogy más, transzkripciót blokkoló hibák, mint a CPD-k, hogyan íródnak át, és mely faktorok befolyásolják a transzkripció hűségét.

PhD munkám során *in vivo* és *in vitro* kísérletekkel kimutattam, hogy a transléziós DNS polimeráz éta szerepet játszik a transzkripcióban, továbbá, hogy polimeráz aktivitása révén képes DNS léziók átírására azáltal, hogy ribonukleotidokat épít be mRNS szintézis során.

## CÉLKITŰZÉSEK

Azt találtuk, hogy élesztőben a Pol $\eta$  deléciója transzkripció elongáció inhibitorokra érzékeny fenotípust eredményezett. Ennek, és más előzetes eredmények hatására felállítottunk egy hipotézist, mely szerint a Pol $\eta$  szerepet játszik a transzkripció folyamatában. Hipotézisünk igazolására a következő kérdésekre kerestük a választ:

- a) Közreműködik-e a Pol $\eta$  a transzkripció folyamatában ?
- b) A transzkripció mely lépésében játszik szerepet a Pol $\eta$  ?
- c) Mi a szerepe a Pol $\eta$  aktiv centrumánál ebben a folyamatban?
- d) Képes-e a Pol $\eta$  ribonukleotidok beépítésére nem-károsodott és károsodott DNS templáton?

## KÍSÉRLETI MEGKÖZELÍTÉS

- Élesztő genetika, génkiütés helyspecifikus mutagenezissel
- DNS klónozás és manipuláció
- Rekombináns fehérje tisztítás
- Transzkripció elongáció in vivo mérése
- Reverz transzkripció utáni kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció
- Kettős luciferáz riporter mérés
- Polimeráz aktivitás mérés ribonukleotid beépülés kimutatásával, enzim kinetika

## EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

Először is kimutattuk, hogy a Pol $\eta$ -t kódoló RAD30 gén delécióját hordozó élesztők érzékenyek a transzkripció elongáció inhibitoraira, például mikofenolsavra. Ezért megvizsgáltuk, hogy a Pol $\eta$  szerepet játszhat-e a transzkripció elongációban. Ehhez kettős luciferáz riporter assay-t alkalmaztunk, ahol a szentjánosbogár (*Photinus sp.*, ismertebb angol néven firefly) luciferáz gén expresszióját galaktóz indukálható promóter, míg a *Renilla* (*Renilla reniformis*, tengeri árvácsk) luciferáz gén expresszióját konstitutív promóter irányítja. Megállapítottuk, hogy Pol $\eta$  hiányában az expresszió alacsonyabb volt mindkét promóterről. Megvizsgáltuk az endogén *GALI* és *GALI10* gének indukált expresszióját vad típusú és *rad30* deléciós törzsben reverz transzkripciót követő valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) használatával. Azt tapasztaltuk, hogy Pol $\eta$  hiányában e gének indukciója is hibát szenved. A transzkripció elongáció tanulmányozására direkt *in vivo* kísérletet (G-mentesre futtatás, G-less based Run-on, GLRO) végeztünk a LacZ kódoló régió használatával, amely relatív hossza és magas GC tartalma miatt alkalmas az elongáció hatékonyságának vizsgálatára. Azt tapasztaltuk, hogy a *rad30* deléciós törzs az ismert elongációs mutánsokhoz hasonlóan rosszabb hatásfokkal írodik át a *lacZ* gén. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a *rad30* deléciós törzs mikofenolsav érzékenységét az okozza, hogy a Pol $\eta$  közvetlenül részt vesz a transzkripció elongációban.

A kapott eredmények annak elemzésére ösztönöztek bennünket, hogy vajon a transzkripció elongációban szükség van-e a Pol $\eta$  polimeráz aktivitására, vagy egyszerűen strukturális szerepet tölt be. A polimeráz aktív centrumát inaktiváló egyetlen pontmutáció hatását vizsgáltuk úgy, hogy azt a *RAD30* genomi lókuszába integráltuk. Mind a mikofenolsav érzékenység, mind a kettős luciferáz assay és az RT-qPCR azt mutatták, hogy a mutáns úgy viselkedett, mint a deléciós törzs, tehát a Pol $\eta$  polimeráz aktivitásnak szerepe van a transzkripció elongációban.

A Pol $\eta$  jól ismert funkciója a DNS károsodás hibamentes átírása. Feltételeztük, hogy hasonlóan, a transzkripció megtorpanását okozó DNS károsodás esetén Pol $\eta$  gyorsan menekítheti az elongációs komplexet, oly módon, hogy a károsodott nukleotiddal szemben ribonukleotidokat épít be a szintetizálódó RNS-be. E feltételezés megvizsgálására *in vitro* primer extenziós vizsgálatot végeztünk tisztított Pol $\eta$  valamint DNS-templátot, RNS primert és mind a négy rNTP-t tartalmazó szubsztrát felhasználásával. Pol $\eta$  képes volt RNS-hez ribonukleotidokat hozzáépíteni. Az egyes NTP-k beépítésének steady-state kinetikai elemzése kimutatta, hogy a Pol $\eta$  magasabb hatásfokkal épít be ribonukleotidokat RNS-be, mint DNS-be. Ez azt mutatja, hogy ribonukleotidok beillesztése RNS specifikus. Azt is kimutattuk, hogy a Pol $\eta$  DNS lézióval, például a 8-oxoguaninnal szemben is tud ribonukleotidokat beépíteni.

A fenti eredmények által a transzkripció egy új folyamatát fedeztük fel, amikor is egy DNS polimeráz transzkripciós elongációs faktorként funkcionál, és deléciója csökkent mRNS szintézishez vezet. Ezen kívül ez a polimeráz képes RNS-be ribonukleotidokat beépíteni, sőt egy gyakran előforduló károsodott nukleotidot, a 8-oxoguanint is képes templátjául használni. Ez által a transzkripció gyors és hatékony módon tud áthaladni bizonyos DNS károsodásokon, amelyek különben az RNS polimeráz II megakadását okoznák és sejthalálhoz vezethetnek. A humán Pol $\eta$  mutációk általi inaktivációja genetikai szindrómához, a Xeroderma pigmentózum variáns formájához (XP-V) vezetnek. E betegség megértéséhez közelebb vihet a humán Pol $\eta$  transzkripcióban betöltött esetleges funkciójának vizsgálata.

## PUBLIKÁCIÓK

### 1. A doktori eljárást alapját képező 2 db közlemény:

**Gali VK\***, Eva Balint\*, Nataliaia Serbyn, Orsolya Frittmann, Françoise Stutz, Ildiko Unk. Translesion synthesis DNA polymerase  $\eta$  exhibits a specific RNA extension activity and a transcription-associated function. Scientific Reports 2017. IF (2016): 4.259

\*egyenlő hozzájárulás

Johnson C, **Gali VK**, Takahashi TS, Kubota T. PCNA Retention on DNA into G2/M Phase Causes Genome Instability in Cells Lacking Elg1. Cell Rep. 2016 Jul 19;16(3):684-95. IF (2016): 8.282

### 2. Referált folyóiratokban megjelent közlemények:

**Gali VK\***, Eva Balint\*, Nataliaia Serbyn, Orsolya Frittmann, Françoise Stutz, Ildiko Unk. Translesion synthesis DNA polymerase  $\eta$  exhibits a specific RNA extension activity and a transcription-associated function. Scientific Reports 2017. IF (2016): 4.259

Halmi M, Frittmann O, Szabo Z, Daraba A, **Gali VK**, Balint E, Unk I. Mutations at the Subunit Interface of Yeast Proliferating Cell Nuclear Antigen Reveal a Versatile Regulatory Domain. PLoS One. 2016 Aug 18;11(8): e0161307. IF (2016): 3.057

Johnson C, **Gali VK**, Takahashi TS, Kubota T. PCNA Retention on DNA into G2/M Phase Causes Genome Instability in Cells Lacking Elg1. Cell Rep. 2016 Jul 19;16(3):684-95. IF (2016): 8.282

Andreea Daraba, **Gali VK**, Miklós Halmi, Lajos Haracska, Ildiko Unk. Def1 Promotes the Degradation of Pol3 for Polymerase Exchange to Occur During DNA-Damage-Induced Mutagenesis in Saccharomyces cerevisiae. PLoS Biol., 12 (2014), p. e1001771. IF (2016): 9.797

Total IF: 25.395

MTMT Number: 10043537



### **3. Egyéb szakmai anyagok**

#### **3.1. Konferencia előadások**

Andreea Daraba, **Gali VK**, Miklós Halmai, Lajos Haracska, Ildikó Unk. Polymerase exchange at replication forks stalled at DNA damage sites. 4th Central European Genome Stability and Dynamics Meeting, Vienna, 2013.

Andreea Daraba, **Gali VK**, Miklós Halmai, Lajos Haracska, Ildikó Unk. DNA damage induced polymerase exchange at stalled replication forks. Hungarian Molecular Life Sciences, Siófok, 2013.

**Gali VK**, Balint Eva, Ildiko Unk - A novel function of yeast translesion DNA polymerase eta; Bruno F. Straub memorial conference, Szeged, Hungary (2014).

#### **3.2. Poszterek**

**Gali VK**, Olga Nagy, Margit Pal, Attila Farkas, Zoltan Bozoky, Peter Friedrich and Peter Deak. Determining the Calpain gene function in *Drosophila melanogaster*; VII.Hungarian Genetics congress, Balatonfüred, Hungary (2007)

Daraba Andreea, **Gali VK**, Halmai Miklós, Unk Ildikó – Polymerase exchange at replication forks stalled at sites of DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*; 38<sup>th</sup> FEBS Congress; Saint Petersburg, Russia (2013)

**Gali VK**, Takashi Kubota, Yuki Katou, Katsuhiko Shirahige & Anne D. Donaldson Role of Elg1-RLC in Replication-Coupled Nucleosome Assembly. Chromatin, Replication and Chromosomal Stability 2016 meeting. Copenhagen, Denmark (2016)