

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

Ph.D. értekezés

Tóth Ágnes

Témavezetők: Dr. Burkovics Péter és Dr. Haracska Lajos

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

2020

Szeged

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	1
2. Bevezetés.....	2
2.1. A DNS replikáció.....	2
2.2. Az elakadt replikációs villa menekítése.....	2
2.3. A G-kvadruplex szerkezete.....	5
2.4. A G-kvadruplex funkciója	7
2.5. i-motívum.....	10
2.6. A G-kvadruplex szerkezetek replikációja.....	11
2.6.1. A G-kvadruplex szerkezet replikációjához köthető helikázok.....	11
2.6.2. A G4 átírásában résztvevő polimerázok	15
2.7. Az élesztő Mgs1 fehérje	18
2.7.1. Az Mgs1 hiányának fenotípusa.....	18
2.7.2. Az Mgs1 doménszerkezete és a domének szerepe.....	18
2.7.3. Az Mgs1 szerepe a genomstabilitás fenntartásában.....	19
2.8. A humán WRNIP1 fehérje.....	21
2.8.1. A WRNIP1 doménszerkezete	21
2.8.2. Általános jellemzők.....	21
2.8.3. A WRNIP1 szerepe a genomstabilitás fenntartásában.....	22
3. Célkitűzések	24
4. Anyagok és módszerek.....	25
4.1. Antibiotikumok.....	25
4.2. Tápfolyadékok	25
4.3. Enzimek	25
4.4. Poliakrilamid gél.....	25
4.5. Natív gél.....	26
4.6. Plazmidok létrehozása	26
4.7. Plazmidtisztítás baktériumból.....	26
4.8. Baktérium transzformálás	26
4.9. Élesztő transzformálás	27
4.10. Fehérjetisztítás	27
4.11. DNS szubsztrátok készítése	28
4.12. EMSA (electrophoretic mobility shift assay, DNS-fehérje interakció kimutatása).....	28
4.13. Fluoreszcens anizotrópia mérések	29
4.14. ATP-áz kísérlet	29
4.15. Egyensúlyi FRET (Förster resonance energy transfer) mérés	29
4.16. Kromoszómatörések vizsgálata	30
4.17. γ H2AX-intenzitás mérése	30
4.18. EdU és IdU beépülésének vizsgálata	30
5. Eredmények	32
5.1. A <i>S. cerevisiae</i> Mgs1 fehérjének G4-et formáló DNS szerkezetekhez kapcsolódó funkciója is lehet.....	32
5.1.1. Az Mgs1 fehérje specifikusan köti a G4-et formáló DNS szerkezeteket	32
5.1.2. Az ATP és Mg^{2+} jelenléte nem befolyásolja az Mgs1 DNS-kötési tulajdonságait.	37
5.1.3. A G4 DNS jelenléte nem befolyásolja az Mgs1 ATP-áz aktivitását	37
5.2. A humán WRNIP1 fehérje szerepe a G4 szerkezetek replikációjában.....	39
5.2.1. A humán WRNIP1 fehérje specifikusan köti a G4 szerkezetet tartalmazó DNS szubsztrátokat.....	39

5.2.2.	A WRNIP1 fehérje kötése megváltoztatja a G4 szerkezetet.....	43
5.2.3.	A WRNIP1 részt vesz a G4 szerkezetek replikációjában	46
5.2.4.	A WRNIP1 fehérjének fontos szerepe van a kromoszómaintegritás megőrzésében.....	50
6.	Eredmények megvitatása.....	52
7.	Magyar nyelvű összefoglaló	58
8.	Summary of the PhD thesis	61
9.	Köszönetnyilvánítás.....	64
10.	Saját közlemények jegyzéke	65
11.	Támogatások	65
12.	Irodalomjegyzék	66

1. Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Magyar elnevezés (angol elnevezés)
APS	ammónium-perszulfát (ammonium persulphate)
ATP	adenozin-trifoszfát (adenosine triphosphate)
BLM	Bloom helikáz (Bloom helicase)
BSA	marha szérumalbumin (bovine serum albumin)
DNS	dezoxiribonukleinsav (deoxyribonucleic acid)
DMSO	dimetil-szulfoxid (dimethyl sulfoxide)
E1	ubikvitin aktiváló enzim (ubiquitin-activating enzyme)
E2	ubikvitin konjugáló enzim (ubiquitin-conjugating enzyme)
E3	ubikvitin ligáz enzim (ubiquitin-ligase enzyme)
EdU	5-etinil-2-dezoxiuridin (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)
FITC	fluoreszcein-izotiocianát (fluorescein isothiocyanate)
FRET	Förster-féle rezonáns energiaátadás (Förster resonance energy transfer)
G4	G-kvadruplex (G-quadruplex)
GST	glutation S-transzferáz (glutathione S-transferase)
IdU	5-jód-2'-dezoxiuridin (5-iodo-2'-deoxyuridine)
Mgs1	élesztő Mgs1 fehérje (Maintenance of Genome Stability 1)
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat (phosphate-buffered saline)
PCNA	polimerázok processzivitási faktora (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
RFC	replikációs faktor C (replication factor C)
RPA	replikációs protein A (replication protein A)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulphate)
TEMED	tetrametil-etilén-diamin (tetramethyl ethylenediamine)
TLS	transzléziós szintézis (translesion synthesis)
UBZ	ubikvitin-kötő cinkujj domén (ubiquitin-binding zinc finger)
UV	ultraibolya sugárzás (ultraviolet irradiation)
WRN	Werner helikáz (Werner helicase)
WRNIP1	humán Werner interakciós fehérje 1 (Werner Interacting Protein 1)

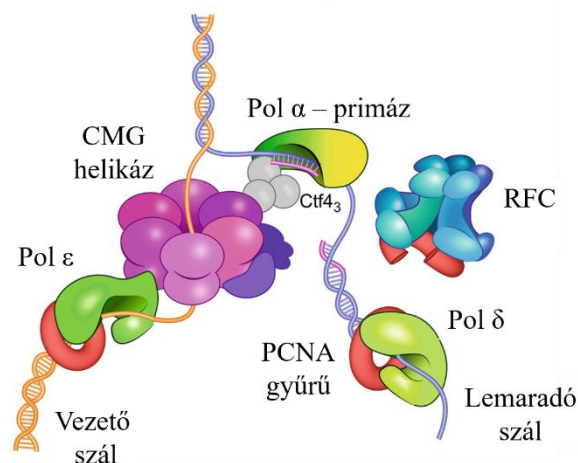
2. Bevezetés

2.1. A DNS replikáció

A replikáció során a genetikai információt hordozó dezoxiribonukleinsav (DNS) szemikonzervatív mechanizmus révén kettőződik meg, a folyamat során az eredeti DNS szál egy-egy szála szolgál templátként a DNS szintézishez. A megkettőződés után mindkét kettős hélix egy eredeti (templát) és egy másolt DNS szálból áll. Eukarióta sejtekben a replikáció kiindulópontját a replikációs origók jelölik ki, amelyekből a genom méretétől függően több száz vagy ezer található egy genomban. A *Saccharomyces cerevisiae* genomban a replikációs origók ARS (autonomously replicating sequences) néven ismertek és helyük jól meghatározott, míg az emberi genomban a replikációs origók helyei ismertek, de nincs egy meghatározott szekvencia, amihez köthetők lennének. [1]. A replikációs origókból két irányba kiindulva az MCM (Minichromosome maintenance) replikatív helikáz végzi a kettős hélix szétválasztását, ami során kialakul az egyszálú templát DNS. Ehhez kötődik az RPA (replication protein A) fehérje, hogy megvédje a dezoxiribonukleinsavat a replikáció folyamata során. Ezután a primáz és a DNS polimeráz α primereket szintetizálnak a replikáció megkezdéséhez, amit az RFC (replikációs faktor C) fehérje ismer fel. Az RFC fő funkciója a homotrimer PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) fehérje feltöltése a DNS-re. A PCNA fehérjére kapcsolódnak többek között a replikatív DNS polimerázok (Pol δ , Pol ϵ), amelyek a DNS szintézisét végzik [2]. A szintézis a vezető szálon folyamatos, és eukariótákban elsősorban a DNS polimeráz ϵ végzi, míg a lemaradó szál esetében a DNS szintézist a DNS polimeráz δ végzi [3,4]. A lemaradó szál szintézise során keletkező Okazaki-fragmentek érésében a Fen1 és Dna2 nukleázok, valamint a DNS ligáz I vesznek részt (**1. ábra**) [5,6].

2.2. Az elakadt replikációs villa menekítése

A replikációs villa elakadását a DNS szálon található sérülések (sérült nukleotidok (deamináció, oxidáció, metiláció), kovalensen összekapcsolódott nukleotidok, kovalens DNS-DNS vagy fehérje-DNS keresztkötések) vagy a kettős hélixről eltérő másodlagos szerkezetek is kiválthatják. A sérülések kiváltó okai származhatnak endogén és exogén forrásból is, a másodlagos szerkezetek pedig az adott DNS szekvenciának köszönhetően, természetes módon lehetnek jelen [7–11]. A DNS-sérülések javításáról már sok adat ismert, azonban a stabil másodlagos DNS-szerkezetek eltávolításáról/megszüntetéséről kevesebbet tudunk.



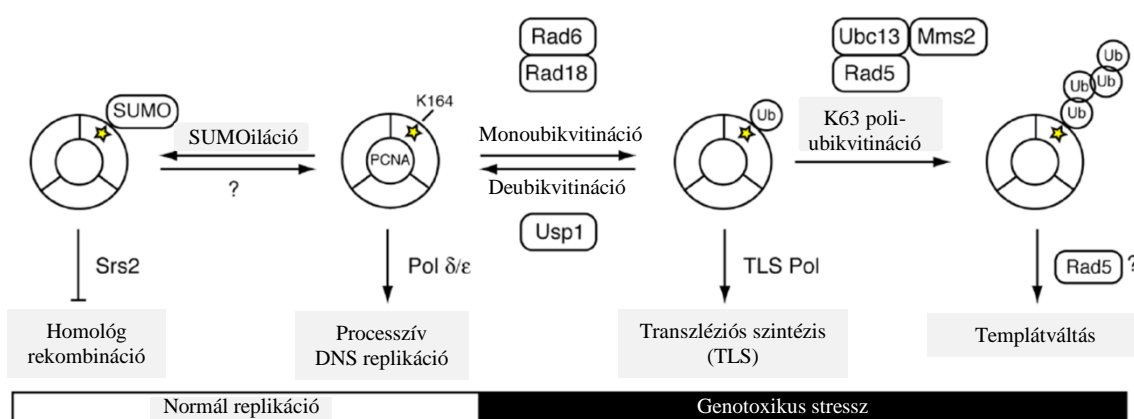
1. ábra: Az eukarióta replikációs villa sematikus ábrázolása.

Az ábra a kiadó engedélyével átvéve a „Yao és mtsai. (2019): Machinery of DNA Replication, Encyclopedia of Biophysics, Springer” publikációból.

Mivel a sejtek túléléséhez elengedhetetlen a genetikai információ hibátlan másolása, ezért számos mechanizmus alakult ki a DNS hibák mielőbbi javítására. A sejt nyugalmi fázisában (G1, G0) a bázis- és nukleotidkivágó útvonalak felelősek a DNS hibák javításáért [12,13], azonban előfordul, hogy a DNS károsodások fennmaradnak a DNS replikáció fázisára (S fázis), ahol ezek a hibák a replikációs villa elakadásához vezethetnek. Mivel az elakadt replikációs villa mutációk, kettős DNS száltörés, nagyobb genomi átrendeződések kialakulásához, és ez által a sejt halálához vezethetnek, a humán sejtekben több útvonal is létrejött az elakadt replikációs villa menekítésére. Ide tartoznak a DNS-hibatolerancia útvonal, a homológ rekombináció, és a Fanconi-anémia útvonalak. A PCNA fehérje, valamint a fehérje ubikvitilációja és szumoilációja szabályozza, hogy a DNS-hibatolerancia útvonal és a homológ rekombinációs útvonalak közül melyikre esik a választás (**2. ábra**). A keresztkötések javításáért emberben a Fanconi-anémia útvonal felel, élesztőben pedig a egyes FANC gének homológjai vesznek részt ezen hibák javításában [14,15].

A *DNS-hibatolerancia útvonal*ban a PCNA monoubikvitilációja a transzléziós szintézis (TLS) útvonalat aktiválja [16,17], a PCNA polibukvitinációja a templátváltást, míg a PCNA szumoilációja gátolja a homológ rekombinációs útvonalakat [14,18]. Az itt működő szabályozási mechanizmusok és a PCNA ubikvitinációja erősen konzervált folyamatok. Mind élesztőben, mind emberi sejtekben hasonlóan mennek végbe. Emberi sejtekben a *TLS* útvonalban a PCNA fehérje az UBA1 E1 ubikvitin aktiváló enzim és a RAD6/RAD18 ubikvitin konjugáz és ligáz (E2-E3) komplex segítségével monoubikvitinálódik, ami hatására a replikációs villánál található replikatív polimerázok transzléziós (TLS) polimerázokra cserélődnek [14,19]. A humán TLS polimerázok közé soroljuk pl. a polimeráz η, polimeráz ι,

polimeráz κ , polimeráz ζ , és REV1 fehérjéket. A TLS polimerázok aktív centruma – a replikatív polimerázokkal ellentétben – képes a módosult bázisokat is befogadni (pl. az UV-sugárzás következtében kialakult T-T dimert), így lehetővé válik az elakadt replikációs villa menekítése. Azonban a TLS polimerázok emiatt a sérülést nem tartalmazó DNS templáton nem annyira pontosak, mint a replikatív polimerázok, ezért a mutációs frekvencia is magasabb esetükben. A replikatív polimerázok mutációs frekvenciája polimeráztól függően $\sim 10^{-5}$ – 10^{-6} , tehát a polimeráz csak minden 100 000–1 000 000 bázis esetében épít be nem megfelelő komplementer bázist, míg a transzléziós polimerázok esetében a mutációs frekvencia $\sim 10^{-2}$ – 10^{-4} , azaz a polimerázok minden 100–10 000 bázis beépítésénél vétenek hibát [20–22].



2. ábra: Az elakadt replikációs villa menekítésének szabályozása a PCNA fehérje ubiquitinációja által. Elakadt replikációs villa esetén a PCNA először a 164-es lizinen monoubikvitilálódik a Rad6/Rad18 komplex által; ebben az esetben a transzléziós útvonal aktiválódik. Amennyiben a PCNA az Ubc13/Mms2 komplex vagy Rad5 fehérje által poliubikvitilálódik, az elakadt replikációs villa menekítése templátváltással történik. A PCNA szumoilációja esetén a homolog rekombinációs útvonalak gátlódnak. Az ábra a kiadó engedélyével átvéve a „Chang és Cimprich (2009): DNA damage tolerance: When it's OK to make mistakes, Nat. Chem. Biol., Nature” publikációból.

Templátváltás esetén a RAD6/RAD18 komplex által monoubikvitinált PCNA az MMS2/UBC13 E2 komplex, valamint élesztőben a Rad5, humánban pedig a HLTF vagy SHPRH E3 fehérjék segítségével poliubikvitinálódik az ubikvitin K63-as lizinén keresztül (ez nem egyenlő a 48-as lizinen lévő, degradációs jelet képező ubikvitinációval). A templátváltás során a sejt a hibás DNS szál helyett az ép szál másolatát használja templátként, így ez az útvonal hibamentes menekítést tesz lehetővé, amennyiben bizonyos polimerázok végzik az átírást [23]. A templátváltásnak két alútvonala ismert: a homolog-rekombinációszerű és a villa-visszafordítás. A homolog-rekombinációszerű útvonal során az újonnan szintetizált testvérkromatida szolgál templátként a szintézishez a hibás DNS szakasz elkerülése érdekében. A villa-visszafordítás során egy ún. csirkeláb szerkezet alakul ki, amely segít elkerülni és

áthidalni a hibás DNS szakaszt a replikáció során. Jelenleg még nem ismert, hogy mi határozza meg, hogy melyik útvonal aktiválódik az elakadt replikációs villa menekítése során [14].

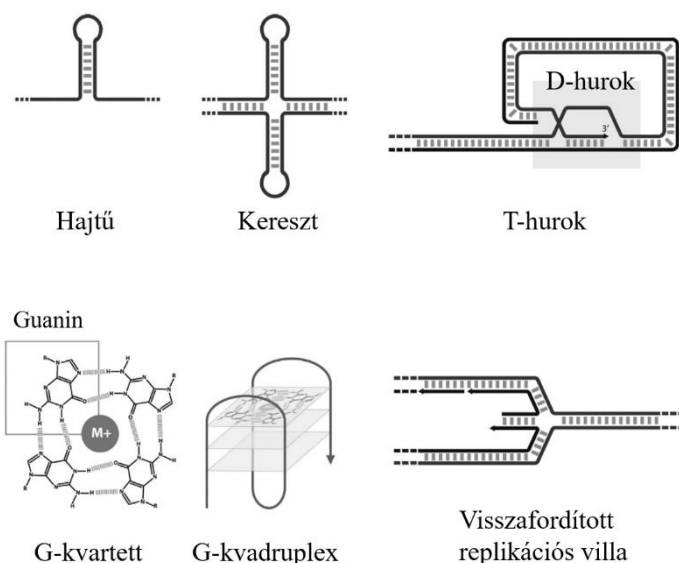
A replikációt ezen kívül akadályozhatják még a DNS-DNS és a DNS-fehérje keresztkötések. Emberben a *Fanconi-anémia* útvonal felelős a kialakult DNS-keresztkötések javításáért, az útvonal hibás működése esetén csontvelői vérképzés zavar alakul ki és magasabb a rák kialakulásának esélye. Eddig 22 olyan gént azonosítottak, amelyek a Fanconi-útvonal részét képezik. Ezek a homológ rekombináció, a nukleotidkivágó útvonal, valamint kis mértékben a TLS útvonal együttes működésével felelősek a genomstabilitás megőrzéséért [24,25]. Élesztőben a keresztkötéseket a Fanconi-útvonalhoz hasonló, azonban annál jóval egyszerűbb útvonal távolítja el [26].

2.3. A G-kvadruplex szerkezete

A DNS a kettős hélixen kívül számos különböző másodlagos szerkezetet is felvehet: ilyenek a hajtű, a kereszt alakú szerkezetek, a T-hurok, a D-hurok, a G-kvadruplex és az i-motívum is (**3. ábra**) [27]. Ezek közül az egyik legfontosabb és legjobban jellemzett a G-kvadruplex (G4) szerkezet. Mivel az egyesszájú templát DNS-en kialakuló stabil másodlagos szerkezetek a DNS károsodásoknál is erőteljesebben gátolják a DNS replikáció folyamatát (valamint a transzkripciót és transzlációt is), ezért a G4 szerkezetek kicsavarása és pontos átírása szintén elengedhetetlen a sejtek túléléséhez [27].

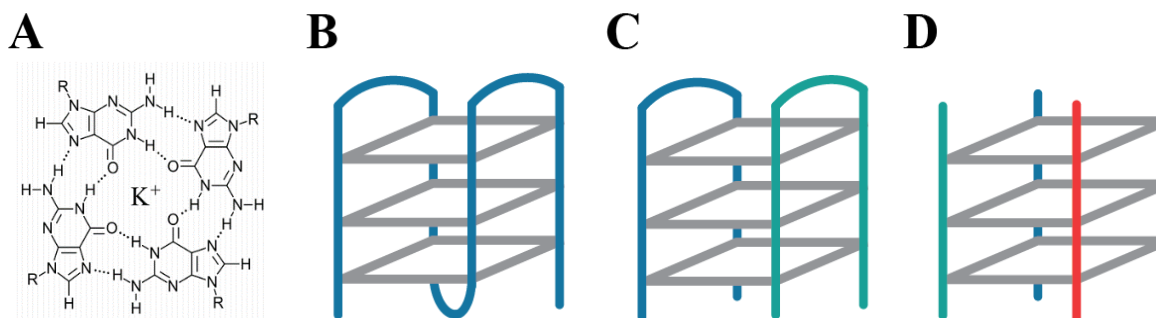
1910-ben számoltak be először arról, hogy a magas koncentrációjú guaninsav polikristályos gél alakot, ami arra utal, hogy a guanin-gazdag szekvenciák összetett szerkezeteket képezhetnek [28]. A G4-hez kapcsolódó következő jelentős felfedezésre 50 évet kellett várni, amikor Gellert és munkatársai röntgendiffrakciós mérések segítségével megállapították, hogy a guaninsav képes tetramer szerkezeteket alkotni [29]. A G4 szerkezet alapját ez a planáris tetramer adja, amelyben a guaninok Hoogsteen-bázispárosodással kapcsolódnak egymáshoz (**4. ábra**). A G4 motívumot ezek az egymásra épülő tetramerek, ún. G-tetrádok építik fel [30]. A szerkezetet egy egyértékű kation stabilizálja, ami általában a kálium (**4.A ábra**). Más egyértékű kationok jelenlétében (pl. Na^+ , NH_4^+) is kialakulhatnak G4 szerkezetek, azonban ezek szerkezete és stabilitása különbözhet a K^+ kationnal rendelkező G4 szerkezetektől [31]. Az egy DNS-szálból kialakuló G4 általános elfogadott konszenzus szekvenciája a $\text{G}_{\geq 3}\text{N}_{1-7}\text{G}_{\geq 3}\text{N}_{1-7}\text{G}_{\geq 3}\text{N}_{1-7}\text{G}_{\geq 3}$. Ebben a G a guaninokat, az N pedig a többi nukleotidot jelöli, amelyek az összekötő hurkokat alkotják. A tetrádokat alkotó, egymást követő guaninok száma a legtöbb esetben 3, azonban esetenként ez eltérhet. A hurkokat kialakító nukleotidok száma általában 1–7 között mozog, de bizonyos esetekben ettől

különböző is lehet. A hurkok hossza, valamint tulajdonságai is befolyásolhatják a G4 szerkezetek szerepét *in vivo*, azonban ennek pontos mechanizmusa még nem ismert [32].



3. ábra: A DNS lánc a kettős hélix szerkezeten kívül számos további másodlagos szerkezetet is felvehet. Ezek többek között lehetnek a hajtű, kereszt, T-hurok és D-hurok, G-kvadruplex vagy a visszafordított replikációs villa is. Az ábra a kiadó engedélyével átvéve a „León-Ortiz és mtsai. (2014): Metabolism of DNA secondary structures at the eukaryotic replication fork, DNA Repair, Elsevier” publikációból.

A G4 szerkezeteket többféleképpen is csoportosíthatjuk: a G4 szerkezet kialakulhat egy, kettő vagy négy DNS szálból is, mely esetekben *uni-*, *bi-* és *tetramolekuláris* G4 szerkezetekről beszélünk. Amennyiben a G4 szerkezet egy DNS szálból alakul ki, *intramolekuláris* (4.B ábra), ha pedig kettő vagy négy DNS szálból alakul ki, *intermolekuláris* G4 szerkezetéről beszélünk (4. C-D ábra) [30]. A G4 szerkezeteket továbbá feloszthatjuk a DNS szálak irányultsága alapján *parallel*, *antiparallel* és *hibrid* típusúra. A parallel szerkezet esetében a DNS szálak egymáshoz viszonyított irányultsága megegyezik, az antiparallel esetében a szomszédos szálak ellenkező irányultságúak, a hibrid G4 esetében pedig a szálak kevert irányultságúak. A különböző G4 típusok pontos biológiai jelentősége még nem ismert. A parallel, antiparallel és hibrid G4 DNS szerkezeteket cirkuláris dikroizmus (CD) spektrum méréssel tudjuk megkülönböztetni egymástól, mivel mindhárom típus jellegzetes spektrumot ad [33]. A G4 motívumok vizsgálatát segítik a G4-specifikus antitestek [34,35], valamint a G4-stabilizáló kis molekulák, mint például a PhenDC3, a telomestatin és a pyridostatin [36].



4. ábra: A G-kvadruplex felépítése és típusai. (A) Négy guaninból álló, planáris G-kvartett szerkezet, amelyet egy egyértékű kation (általában K^+) stabilizál; (B) intramolekuláris, (C) bi- és (D) tetramolekuláris G4 szerkezetek vázlatos rajza.

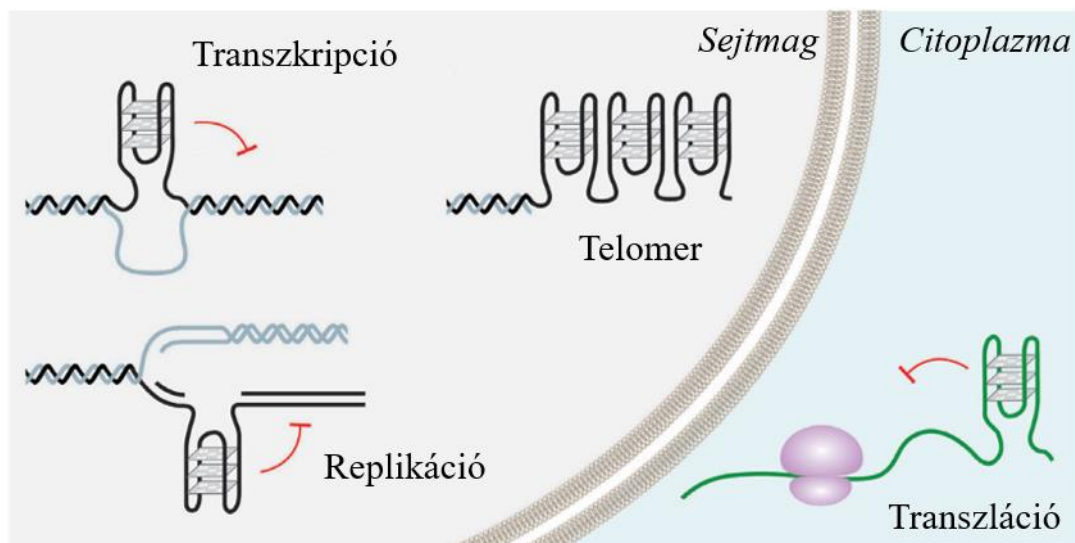
A G4 szerkezetet formáló DNS szekvenciák széleskörűen elterjedtek az élővilágban, előfordulásuk a magasabb rendű élőlényekben sokkal gyakoribb, mint az alacsonyabb rendűekben. A G4 szerkezetek megtalálhatóak emlősökben, növényekben [37,38], vírusokban [39], baktériumokban [40], és élesztőben [41] is. A klasszikus $G_{\geq 3}N_{1-7}G_{\geq 3}N_{1-7}G_{\geq 3}N_{1-7}G_{\geq 3}$ konszenzus szekvenciát használva az első *in silico* becslés szerint kb. 350 000 potenciálisan G4 szerkezetet formáló szekvencia található a humán genomban [42]. Azonban egy újabb, kísérletes módszerrel több mint 700 000 ilyen régiót találtak [43]. Az evolúció előrehaladtával a potenciálisan G4 szerkezetet formáló szekvenciák mennyisége és aránya is nő a genomban (organizmus: potenciálisan G4 szerkezetet formáló szekvenciák száma összesen, valamint azok százalékos aránya a genom teljes méretéhez viszonyítva: *H. sapiens*: ~700 000, 4,17%; *M. musculus*: ~780 000, 5,94%; *C. elegans*: 4 291, 0,89%; *E. coli*: 131, 0,42%; *S. cerevisiae*: 143, 0,25%) [44].

2.4. A G-kvadruplex funkciója

A legújabb kutatások eredményei azt mutatják, hogy a G4 szerkezeteknek számos biológiai funkciója van: rész vesznek a telomerek védelmében, a transzkripció és transzláció szabályozásában, valamint a replikációs origók kialakulásában és az immunglobulinok rekombinációjában is (**5. ábra**) [45]. Ez arra is magyarázat lehet, miért emelkedik meg a G4 szerkezetek mennyisége a magasabb rendű élőlények genomjában.

Elhelyezkedésük szerint a potenciálisan G4-formáló szekvenciák a kromoszómavégeken, valamint az intrakromoszómális régiókban találhatóak. A kromoszómavégeken található G4 szekvenciák alkotják a kromoszómákat védő *telomereket*, amelyek funkciója már jól jellemzett. Mivel az *intrakromoszómális* G4 szekvenciák csak az

utóbbi években kerültek a tudományos érdeklődés középpontjába, ezért ezekről kevesebb adat áll rendelkezésre [45].

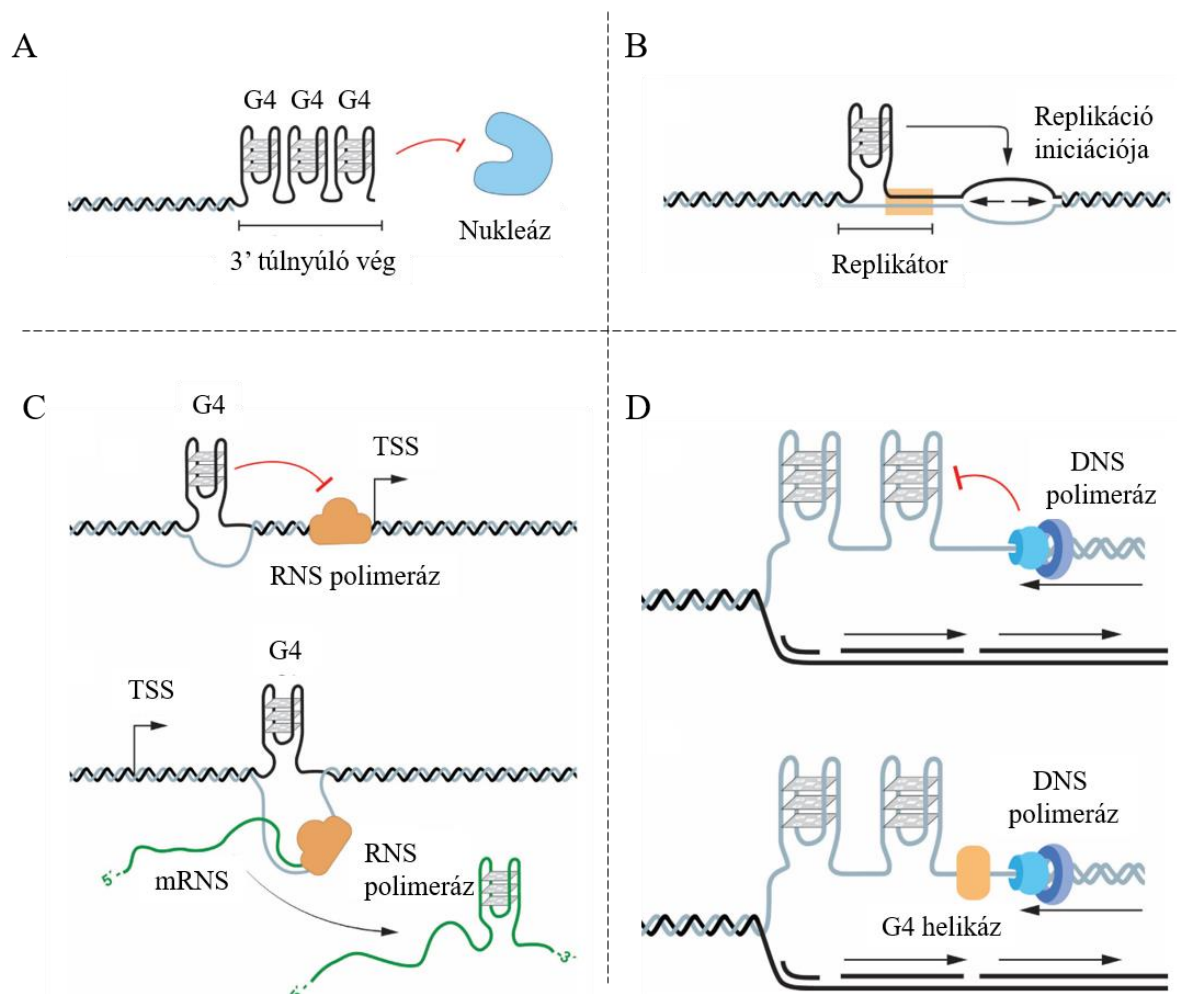


5. ábra: A G-kvadruplex szerkezetek kromoszómális elhelyezkedése és szerepe. Megtalálhatók a telomerikus, valamint az intrakromoszómális kromoszómarégiókban is, valamint részt vesznek a telomerek védelmében, a transzkripció, transzláció és replikáció szabályozásában is. Az ábra a kiadó engedélyével átvéve a „Rhodes és Lipps (2015): Survey and Summary: G-quadruplexes and their regulatory roles in biology, NAR, Oxford University Press” publikációból.

A telomerek a lineáris kromoszómák végén található nukleoprotein komplexek, melyek egy néhány ezer bázispár hosszúságú repetitív d(GGGTTA) kétszálú részből, valamint egy néhány száz bázis hosszú guanin-gazdag egyszálú 3' túlnyúló részből állnak. Mivel a telomerikus régiókhoz általában nagy számú fehérje kötődik, ezért a guanin-gazdag régiók által felvett *in vivo* szerkezetét nem lehet pontosan meghatározni. A telomerek jelenléte nélkülözhetetlen ahhoz, hogy megvédjék a kromoszómavégeket a nukleázoktól (6.A ábra), megakadályozzák a kromoszómák fúzióját és hogy a sejt a kromoszómavégeket ne kétszálú DNS törésként ismerje fel [11,46].

Az intramolekuláris G4 szerkezetek akkor alakulhatnak ki, mikor átmenetileg egyszálú nukleinsav van jelen a sejtben, ami lehetővé teszi, hogy a guanin-gazdag régiók felvegyék a G4 szerkezetet. Ezen folyamatok közé tartozik a replikáció, transzkripció (DNS) és a transzláció (RNS) is. A replikációs origók közelében található G4 szerkezetek elősegíthetik a replikáció folyamatának indulását (6.B ábra). A tény, hogy a humán génpromóterek kb. 50%-a tartalmaz potenciálisan G4-formáló szekvenciákat azt sugallja, hogy a G4 szerkezetek részt vehetnek a génexpresszió szabályozásában. A potenciálisan G4-formáló szekvenciáknak nagyobb az előfordulási aránya onkogéneknél és szabályzó géneknél, mint a tumorszuppresszor és a háztartási géneknél [45]. Emellett a mitokondriális DNS „nehéz”,

guanin-gazdag szála is tartalmaz potenciálisan G4-formáló szekvenciákat [47], amelyek a gyakori törési pontok közelében találhatók [48].



6. ábra: A G4 szerkezetek részt vesznek a különböző biológiai folyamatok szabályozásában.

A G4 szerkezetek (A) védik a kromoszóma végeket, (B) elősegíthetik a replikációs origók kialakulását, (C) elhelyezkedésüktől függően gátolhatják vagy elősegíthetik a transzkripciót, valamint (D) DNS helikázok hiányában akadályozhatják a DNS replikáció folyamatát. Az ábrák a kiadó engedélyével átvéve a „Rhodes és Lipps (2015): Survey and Summary: G-quadruplexes and their regulatory roles in biology, NAR, Oxford University Press” publikációból.

A reaktív oxigén gyökök szintje is befolyásolhatja azon gének kifejeződését, amelyek promóter régiójában potenciálisan G4-formáló szekvencia található. A reaktív oxigén gyökök jelenlétében a genomban nagy mennyiségű 8-oxoguanin képződik, ami pontmutációk kialakulásához, leggyakrabban G:C-T:A transzverzióhoz vezet. A 8-oxoguanin jelenléte, és a következtében kialakult pontmutáció is befolyásolhatja a G4 szerkezetek stabilitását [49], a G4 szerkezet stabilitásán keresztül pedig a génexpresszió szintjét. Számos onkogén estében kimutatták (pl. *VEGF*, *TNFα*, *KRAS*), hogy a 8-oxoguanin jelenléte a génpromóter régióban megnövelte az onkogén szintjét a sejtekben [50–52]. Ugyanezt a jelenséget megfigyelték a *PCNA* gén promótere esetében is [53].

A G4 szekvenciák jelenléte a promóterek közelében a *transzkripciót* negatív és pozitív irányba is befolyásolhatja (**6.C ábra**). Amennyiben a G4 szekvencia a templát szálon található, akadályozhatja a transzkripciós apparátus haladását. Viszont, ha a G4 szekvencia a kódoló szálon található, segít egyszálú állapotban tartani a templát szálát, és így elősegítheti a transzkripció folyamatát. A transzkripcióra emellett a G4-kötő fehérjék is hatással lehetnek attól függően, hogy elősegítik vagy gátolják a folyamatot [11].

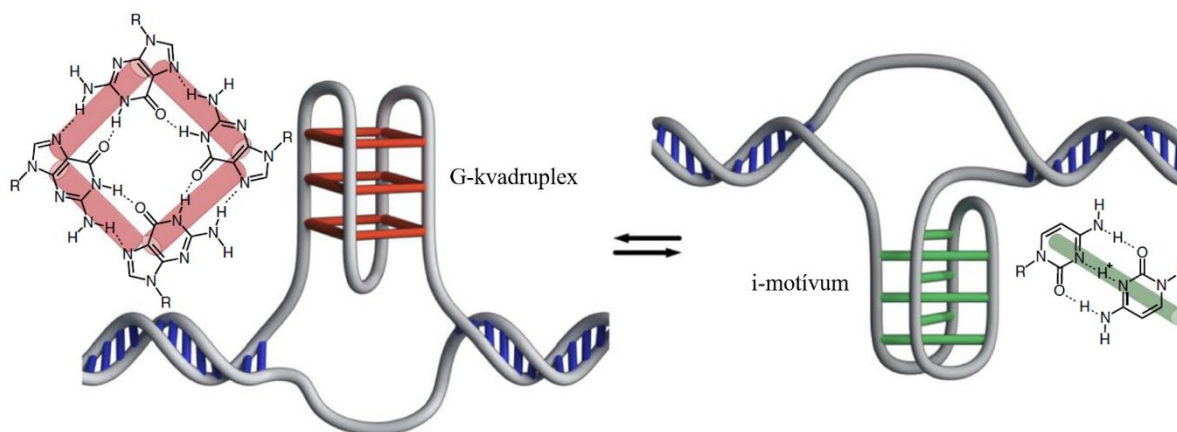
A DNS mellett az RNS molekulák is képesek felvenni a G4 szerkezetet, így ezek jelenléte befolyásolhatja a *transzláció* folyamatát [46]. Ennek egy példája az *NRAS* onkogén 5' UTR régiójában található G4 formáló szekvencia, amely *in vitro* képes G4 szerkezetet alkotni. A G4 szerkezet mutációja vagy törlése az *NRAS* gén transzlációs szintjének 3,5-szeres növekedéséhez vezetett [54].

A *DNS replikáció* során előforduló G4 szerkezetek két forrásból származhatnak: a replikáció során átmenetileg jelen lévő egyszálú DNS-en is kialakulhatnak, valamint a fent említettek szerint a transzkripció szabályozásában résztvevő G4 szerkezetek is jelen lehetnek a replikáció során. A kialakult G4 szerkezetek akadályt képeznek a replikációs apparátus számára [11]. Mivel a replikációs villa haladásának tartós blokkolása kettős száltörést, és genominstabilitást eredményez [55–57], ezért fontos a G4 szerkezetek hatékony és a replikációs komplex haladásával jól összehangolt feloldása (**6.D ábra**).

2.5. *i-motívum*

A G4 szerkezetek mellett egyéb másodlagos szerkezetet formáló szekvenciák is megtalálhatók a genomban. Az egyik ezek közül az ún. *i-motívum*, amely a G4 szekvenciával komplementer, citozin-gazdag szálon tud kialakulni (**7. ábra**). A G4 szerkezethez hasonlóan az *i-motívum* is tetramer szerkezetet vesz fel, melynek stabilitása nagyban függ a szekvenciától, valamint a környezeti feltételektől is. Hosszú ideig vitatták az *i-motívum* jelenlétét *in vivo*, mivel savasabb közegben stabilabb, mint fiziológias feltételek mellett [58]. Azonban egy nemrégiben megjelent tanulmányban *i-motívum*-specifikus antitestek segítségével bizonyították annak jelenlétét *in vivo* humán sejtekben [59]. Wright és munkatársai egy algoritmus segítségével azt találták, hogy több mint 5000 szekvencia található a humán genomban, amelyek ténylegesen *i-motívumot* formálhatnak. Természetesen minden intramolekuláris G4-et formáló szekvenciával szemben citozin-gazdag szekvencia található a komplementer szálon, mivel azonban az *i-motívum* kevésbé stabil fiziológias körülmények között, mint a G4 szerkezetek, ezért találhattak nagyságrendekkel kevesebb funkcionális *i-motívum* szerkezetet *in vivo*. Ezen szekvenciák megközelítőleg 12%-a található génpromóter

régióban, amelyek között megtalálhatóak a vázrendszerben fejlődésében résztvevő gének, valamint specifikus DNS-kötő és transzkripciót stimuláló gének is [60,61]. Mivel az i-motívumok jelenléte a sejtekben tranziens, pH- és sejtciklus függő, ezért fontos, eddig ismeretlen szabályozó szerepük is lehet a genomban [61].



7. ábra: Az i-motívum (jobb) és a G4 szerkezete (bal), valamint az i-motívum és a G4 szerkezet közötti dinamikus egyensúly. Az ábra a kiadó engedélyével átvéve a „Zeerati és mtsai. (2015): I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells, Nature Chemistry, Nature” publikációból.

2.6. A G-kvadruplex szerkezetek replikációja

Mivel a sejt működésében fontos szerepe van a G4 szerkezeteknek, kiemelten fontos a G4 szerkezetek pontos replikációja. Az eddigi kutatások elsősorban azokra a DNS és RNS helikázokra fókuszáltak, amelyek képesek kicsavarni a G4 szerkezetet. A helikázok mellett azonban DNS polimerázokra is szükség van a sikeres replikációhoz, de a G4 szerkezeteket átírásban részt vevő DNS polimerázokról egyelőre kevés információ áll rendelkezésre. A G4 replikáció szabályozásában, elsősorban a helikázok és a DNS polimerázok összehangolásában résztvevő fehérjéről pedig semmit nem tudunk, és a folyamat pontos mechanizmusa sem ismert még. Ebben a fejezetben röviden ismertetem a G4 replikációban résztvevő legismertebb DNS helikázokat és polimerázokat.

2.6.1. A G-kvadruplex szerkezet replikációjához köthető helikázok

Az eddigi kutatások során számos DNS és RNS helikázról leírták már, hogy *in vitro* képesek kicsavarni az intrakromoszómális vagy a telomerikus régióban található G4-szerkezeteket. Élesztőben a G4 szerkezetek kicsavarását elsősorban a Pif1 helikáz végzi, míg az emberi sejtekben elsősorban a FANCI és a bakteriális RecQ helikáz homológjai: a BLM

és a WRN helikázok. Az **1. táblázat** összefoglalja az eddig jellemzett G4 helikázokat, amelyek egy része a G4 replikáción kívül más biológiai folyamatban is részt vesz.

1. táblázat: A G4 replikációjában résztvevő fontosabb helikázok listája és tulajdonságai.

Az összefoglaló a [62–64] tanulmányokban megtalálható táblázatok alapján készült.

Szuper-család	Al-család	Helikáz	Szubsztrát	Írányultság	Humán betegség
SF1	PIF1	PIF1	DNS (G4: parallel, antiparallel, intramolekuláris, tetramolekuláris, telomerikus)	5' → 3'	Mellrák (L319P mutáció)
	DNA2/ NAM7	DNA2	DNS (G4: telomerikus)	5' → 3'	
SF2	Fe-S	FANCI	DNS (G4: parallel, intramolekuláris, tetramolekuláris; D-hurok)	5' → 3'	Fanconi-anémia, mellrák
		Dog-1 (<i>C. elegans</i>)	DNS	5' → 3'	
		DDX11	DNS (G4: antiparallel, intramolekuláris; triplex; 5' flap; D-hurok)	5' → 3'	
		RTEL1	DNS (G4: telomerikus)	5' → 3'	
		XPD	DNS (G4: tetramolekuláris parallel)	5' → 3'	
	RecQ	BLM	DNS (G4: intramolekuláris és tetramolekuláris parallel G4, triplex, Holliday szerkezet)	3' → 5'	Bloom-szindróma Werner-szindróma
		WRN	DNS (G4: intramolekuláris parallel; triplex; Holliday szerkezet)	3' → 5'	
		Sgs1 (<i>S. cerevisiae</i>)	DNS (G4: telomerikus, bimolekuláris, tetramolekuláris)	3' → 5'	
		RecQ (<i>E. coli</i>)	DNS (G4: intramolekuláris parallel, bimolekuláris antiparallel)	3' → 5'	
	DEAH	DHX9	DNS és RNS (G4: intramolekuláris és tetramolekuláris parallel; R-hurok)	3' → 5'	
		RHAU/ DHX36	DNS és RNS (G4: intramolekuláris és tetramolekuláris parallel; R-hurok)	3' → 5'	
	DEAD	DDX21	DNS és RNS	5' → 3'	
	Swi/Snf	ATRX	DNS	5' → 3'	ATRX-szindróma
SF3		SV40 T-ag	DNS	3' → 5'	
SF4		TWINKLE	mitokondriális DNS	3' → 5'	csecsemőkori spinocerebellaris ataxia (IOSCA) [65]

2.6.1.1. Pif1/PIF1 (*S. cerevisiae* és *H. sapiens*)

A Pif1 helikáz élesztőben és emberi sejtekben is megtalálható, mindkét homológ hasonló funkciókkal rendelkezik [66], azonban az élesztőben a Pif1 fehérje az egyik legfontosabb szereplő a G4 szerkezetek feloldásában [67–72]. A humán PIF1 is rendelkezik G4-feloldó aktivitással [73], de eddigi tudásunk szerint emberben más fehérjéknek fontosabb szerepe van a G4 replikációjában, amihez az is hozzájárulhat, hogy az emberi PIF1 fehérjéről eddig kevesebb adat ismert.

A G4 szerkezetek replikációjában a Pif1 helikázt *S. cerevisiae*-ben jelenleg az egyik kulcsfehérjének tartják. DNS-függő ATP-áz, valamint 5'–3' helikáz aktivitással rendelkezik [74,75]. Élesztőben két izoformája ismert, melyek közül az egyik a mitokondriumban, a másik pedig a sejtmagban található [76–78]. A mitokondriális Pif1 fehérjének szerepe lehet az mtDNS replikációjában és rekombinációjában [79], a sejtmagi Pif1 fehérjének pedig számos funkciója ismert, amelyek a genom integritásának megőrzésében játszanak fontos szerepet. A Pif1 fehérje képes eltávolítani a telomeráz enzimet a telomerről, így részt vesz a telomerhossz szabályozásában [77,78]. A telomerhossz szabályozásában betöltött szerepét továbbá az is alátámasztja, hogy a sejtmagi Pif1 szintje az S/G2 fázisban a legmagasabb [80], és élesztőben a telomerek meghosszabbítása szinten az S/G2 fázisban történik [81]. Élesztőben a Pif1 részt vesz a vezető szálon található G4 replikációjában [82]. Kimutatták, hogy Pif1-hiányos sejtekben a G4 szekvenciák közelében lelassul a replikáció és megnő a DNS száltörések száma [67–69,82]. A fehérje emellett részt vesz a riboszómális RNS-eket kódoló DNS szakaszok replikációjában [83] és az Okazaki-fragmentek érésében is [84].

A humán PIF1 nem esszenciális a sejtek túlélése szempontjából, azonban hiányában hosszabb S fázis tapasztalható. Habár a humán PIF1 tulajdonságai nagyrészt megegyeznek az élesztő Pif1 fehérjéével, a humán fehérje pontos szerepe még nem tisztázott. Humán sejtekben a sejtmagi és a mitokondriális PIF1 izoforma egyaránt megtalálható [85]. A fehérjének fontos szerepe lehet a replikációs villa haladásában, legfőképp replikációs stressz során. Mivel a kemoterápia során használt szerek is replikációs stresszt okozhatnak, ezért a PIF1 potenciális rákterápiás célpont lehet [86,87]. Emellett ismert még, hogy a fehérje *in vitro* nagyobb hatékonysággal csavarja ki az intramolekuláris G4 szubsztrátokat, mint a parciális duplex DNS-t [73].

2.6.1.2. FANCIJ (*H. sapiens*)

A humán fehérjék közül a FANCIJ-ről mutatták ki, hogy fontos szerepet játszik a GC-gazdag szekvenciák stabilitásának fenntartásában [88–90]. A Fanconi-anémia útvonalba tartozó FANCIJ (Fanconi anemia group J protein) fehérjét eredetileg a BRCA1 interakciós partnereként írták le BACH1 néven (BRCA1 Associated C-terminal Helicase) [91]. Több eukariótában is megtalálhatóak a FANCIJ homológok, csirkében a BRIP1 [92], *C. elegans*-ban pedig DOG-1 néven ismert [93,94].

A FANCIJ fehérje a Fanconi-útvonal tagjaként részt vesz a keresztkötések eltávolításában, hiánya pedig megnövekedett emlő- és petefészekrák-kockázatot mutat, ezért valószínű, hogy fontos szerepe lehet a genomstabilitás megőrzésében [95–97]. DNS-függő ATP-áz és ATP-függő 5'–3' helikáz [98], jelenléte elengedhetetlen a megfelelő homológ rekombinációs folyamatok lezajlásához [99]. A G4 szerkezeteket ATP-függő módon képes kicsavarni [88], hiánya a replikációs villa elakadásához vezet a G4 szekvenciák közelében [100], valamint FANCIJ-hiányos sejtekben a G4 szekvenciák közelében nagy genomi átrendeződések figyelhetők meg [89]. A FANCIJ-hiányos humán sejtek erős érzékenységet mutatnak a telomestatin G4-stabilizáló molekulával szemben, telomestatin hatására megnő DNS károsodások száma, valamint apoptózis figyelhető meg [88].

2.6.1.3. Sgs1 (*S. cerevisiae*)

Az Sgs1 (Slow growth suppressor 1) fehérje az egyetlen ismert RecQ helikáz élesztőben, fontos funkciója van a genomintegritás megőrzésében. Sgs1 hiányában jelentősen megnő a rekombinációs események száma, valamint a rekombinációs rendszer hibája miatt a kromoszómaaberrációk száma [101,102]. Habár az Sgs1 fehérje *in vitro* ATP és Mg^{2+} jelenlétében 3'–5' irányban képes kicsavarni a G4 szerkezeteket [103], az *sgs1* deléciónak nincs jelentős hatása a G4 miniszatelliták stabilitására élesztőben [82].

2.6.1.4. BLM (*H. sapiens*)

A Bloom (BLM) fehérje a RecQ helikázok családjába tartozó ATP-függő, 3'–5' DNS helikáz [104], hiányában Bloom-szindróma alakul ki. A Bloom-szindróma egy autoszomális recesszív módon öröklődő ritka betegség, tünetei közé tartozik a törpeség, napfénnel szembeni érzékenység, magas cukorbetegség-, rák- és fertőzőkockázat. BLM-hiányos sejtekben megnő a kromoszómakárosodások száma a nagyszámú DNS-átrendeződés, egyszálú régió (gap) és DNS-törés jelenlétének eredményeként [105]. Habár képes kicsavarni a kettős

DNS hélixet is, nagyobb hatékonysággal tekeri ki az olyan egyéb másodlagos DNS szerkezeteket, mint a G4, D-hurok, replikációs-villaszerű szerkezetek és a Holliday szerkezet [106–108]. Számos interakciós partnere ismert, melyek részt vesznek a replikációs, rekombinációs és hibajavító folyamatokban is. Ezek például: a WRN [109], a FANCI [110], és a DNS polimeráz δ [111].

2.6.1.5. WRN (*H. sapiens*)

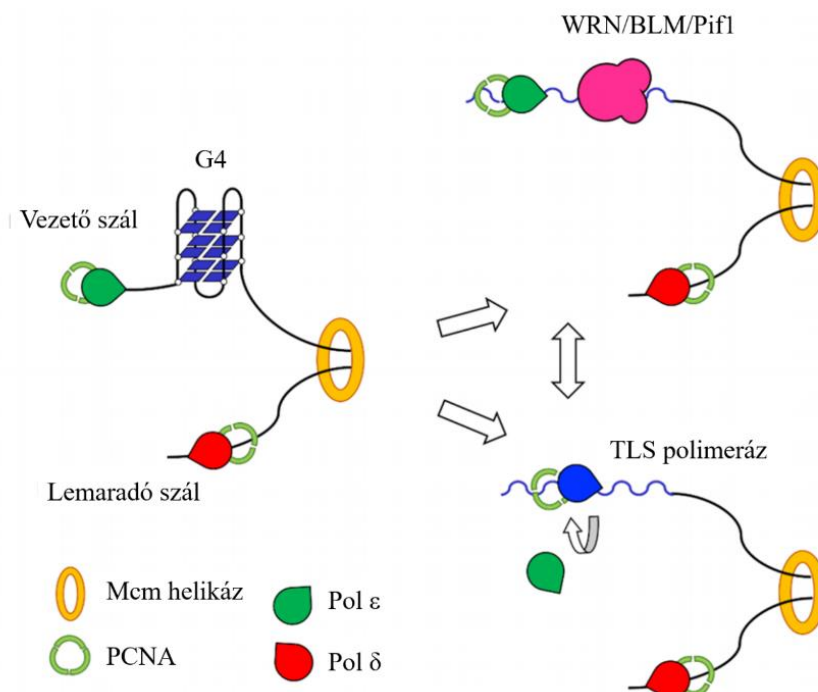
A WRN fehérje szintén a RecQ családba tartozó 3'-5' helikáz, számos a BLM helikázhoz hasonló aktivitással rendelkezik [108]. Hiányában Werner-szindróma alakul ki, amely korai öregedéssel, magas rák, diabétesz és ateroszklerózis kockázattal jár [112]. A WRN helikáz számos másodlagos DNS szerkezetet képes feloldani, ilyenek a replikációs villához hasonló szubsztrátok, Holliday-szerkezet, D-hurok [108]; a G4-et tartalmazó DNS szerkezeteket ATP- és Mg^{2+} -függő módon képes kicsavarni [113]. Fontos szerepe van a telomerek replikációjában, hiányában genominstabilitás figyelhető meg [114]. Elősegíti a replikációs villa haladását és újraindítását, valamint a pol δ -val együttműködve részt vesz az elmaradó szál átírásában [115–117].

2.6.2. A G4 átírásában résztvevő polimerázok

Az eukarióta sejtek genomi DNS-ének replikációjában három fő replikatív polimeráz vesz részt: a polimeráz α a hibrid DNS/RNS primereket szintetizálja [118,119], a polimeráz δ a lemaradó [120,121], míg a polimeráz ϵ a vezető szál szintézisét végzi [122]. Mivel a replikatív polimerázok a genom pontos másolásáért felelősek, rigid aktív centrummal rendelkeznek, és a sérült nukleotidokhoz hasonlóan a stabil másodlagos szerkezetekkel szemben sem tudnak nukleotidot beépíteni [20]. A G4 szekvencia jelenléte gátolja a polimeráz α , polimeráz δ és a polimeráz ϵ aktivitását is [115,123–125].

A TLS polimerázok is részt vehetnek a kialakult G4 szerkezetek átírásában, habár a stabil G4 szerkezet számukra is áthatolhatatlan akadályt jelent. Mivel a G4 szerkezet előtt a replikációs villa megakad, ezért elképzelhető, hogy G4 jelenlétében a replikatív polimerázok TLS polimerázokra cserélődnek a G4 szerkezet átírásának idejére [125], pont úgy, mint egy DNS sérülés esetén. Már több TLS polimerázról is leírták, hogy részt vehet a G4-et tartalmazó szakaszok átírásában, ilyen például a REV1 is [126,127]. A polimeráz η a G4-et tartalmazó DNS hibák átírásában is részt vehet [128], a polimeráz κ pedig a G4 szekvenciák előtti régiók átírásáért lehet felelős [129]. A polimeráz θ a kialakult G4 szerkezetek miatt létrejött kettős

DNS száltörések javításában játszhat szerepet [130]. Lemmens és munkatársai kimutatták, hogy a kialakult G4 szerkezetek több replikációs cikluson keresztül is fennmaradhatnak. A replikáció során fennmaradó G4 szerkezetekkel szemben a TLS polimerázok építenek be nukleotidokat, de mivel a G4 szerkezetet alkotó szekvencia csak részlegesen íródik át így mikrodélációk és genominstabilitás is kialakul [131].



8. ábra: A G4 replikációjában résztvevő szereplők és funkciójuk vázlatos rajza. Az Mcm helikáz és a replikatív polimerázok munkáját segítik a G4-et feloldó helikázok, valamint a TLS polimerázok, amelyek így elérhetővé teszik a G4-et tartalmazó DNS szál átírását. Az ábra a kiadó engedélyével átvéve a „Maffia és mtsai. (2020): From R-loops to G-quadruplexes: Emerging new threats for the replication fork, Int. J. Mol. Sci., MDPI” publikációból.

Látható, hogy a G4-et tartalmazó szekvenciák átírását számos tényező befolyásolhatja: az adott G4 szekvencia a replikáció során vezető vagy lemaradó szálon található [82], valamint a kicsavarást végző helikázok és az átírást végző polimerázok specificitása is meghatározza a replikáció hatékonyságát [132,133]. A hiányos ismeretek ellenére is egyértelmű, hogy a folyamat sikeres lejátszódásához a résztvevő fehérjék összehangolt működése szükséges. A hibátlan G4 replikációhoz elengedhetetlen fehérjék valószínűleg kiegészítik a replikációban résztvevő alap szereplőket. A **8. ábra** bemutatja az eddigi ismeretek vázlatos modelljét. A folyamattal kapcsolatban azonban még számos kérdés megválaszolásra vár: Mennyi ideig van jelen az egyszálú DNS a replikáció során? Milyen százalékban alakulnak ki a G4-ek, mielőtt az RPA fehérje stabilizálná az egyszálú DNS-t? Mi befolyásolja, hogy melyik helikáz végzi az adott G4 szerkezet kicsavarását? Mikor van szükség a helikázok működésére (a replikációs

villa érkezése előtt, közben vagy után)? Adott helikázok specifikusak-e valamelyik G4 szerkezettípusra? Mely DNS polimerázok végzik elsősorban a G4 szerkezetek replikációját? Milyen fehérjék hangolják össze a helikázok és DNS polimerázok működését?

2.7. Az élesztő Mgs1 fehérje

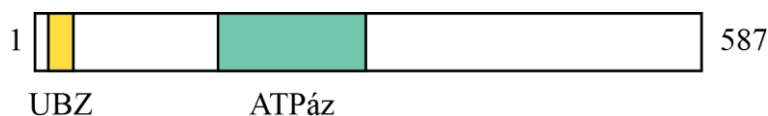
Munkánk az élesztő Mgs1 fehérje és annak emberi homológja, a WRNIP1 fehérje funkciójára fókuszál. A *S. cerevisiae* Mgs1 (Maintenance of Genome Stability 1) fehérjét 2001-ben azonosították Hishida és munkatársai. Hiányában genominstabilitás tapasztalható, ami a megnövekedett rekombinációs frekvencia következményeként alakul ki. DNS-függő ATP-áz aktivitással rendelkezik, az AAA⁺ ATP-ázok családjába tartozik, valamint magasfokú aminosavszekvencia-homológiát mutat az *E. coli* RuvB fehérjével, amely a Holliday szerkezetek feloldásában játszik szerepet, és az RFC (replikációs faktor C) fehérjével, amely a PCNA homotrimer gyűrűt kapcsolja össze a DNS szál körül a replikáció folyamán [134–136].

2.7.1. Az Mgs1 hiányának fenotípusa

Mgs1 fehérje hiányában a sejteknek enyhén megrövidül az élettartamuk [137]. Az *mgs1Δ* sejtek nem mutatnak érzékenységet a különböző DNS-károsító ágensekre (MMS, HU, UV), azonban a rekombinációs események száma megnövekszik az *mgs1Δ* sejtekben. Amennyiben az Mgs1 fehérjét túltermeltetik, a sejtek fokozott érzékenységet mutatnak MMS, HU és kamptotecin kezelésre a vad típusú sejtekkel összehasonlítva [134,138].

2.7.2. Az Mgs1 doménszerkezete és a domének szerepe

Az Mgs1 fehérje (az N-terminális régiót kivéve) erősen konzervált prokarióták és eukarióták körében egyaránt. Az Mgs1 fehérje 587 aminosav hosszú, található benne egy UBZ domén (ubiquitin-binding zinc finger, ubikvitin-kötő) az N-terminális végén, valamint egy ATP-áz domén is (**9. ábra**) [134,137].



9. ábra: A *S. cerevisiae* Mgs1 fehérje doménszerkezete

Az UBZ domén, az ubikvitin-kötő domének egyik alcsoportját alkotja, többek között a TLS polimerázokban is megtalálható. Az UBZ domén kötődik az elakadt replikációs villában található Ub-PCNA-n található ubikvitinhez, és részt vesz a DNS-hibatolerancia útvonalak szabályozásában [139]. Inaktív UBZ domén jelenlétében nem tapasztalható az *mgs1Δ* törzseknél fellépő megrövidült élettartam, valamint funkcionális UBZ domén hiányában elmarad a vad típusú Mgs1 túltermelésnél tapasztalható érzékenység a különböző

DNS-károsító anyagokkal szemben [137]. Ez arra utal, hogy az UBZ domén jelenléte és funkciója szerepet játszik a különböző fenotípusok kialakulásában. [137].

Az Mgs1 fehérje DNS-függő ATP-áz *aktivitással* rendelkezik; az ATP-áz aktivitást stimulálja a DNS szubsztrátok jelenléte (egyszálú, kétszálú és egyszálú/kétszálú DNS csatlakozási pontja (junction) egyaránt). A legnagyobb stimulálás a junction és az egyszálú DNS jelenlétében mérhető [134,140]. Emellett magnézium jelenlétében az Mgs1 fehérjének DNS strand annealing aktivitása is van [134]. Az Mgs1 ATP-áz mutáns túltermeltetése a vad típusú sejtekhez hasonló fenotípust ad, azaz a sejtek nem mutatnak megnövekedett érzékenységet a DNS károsító ágensekkel szemben, és megnövekedett rekombinációs szint sem tapasztalható. Ebből arra következtethetünk, hogy az UBZ domén mellett a fehérje ATP-áz aktivitása is szükséges az érzékenységet kiváltó funkciókhoz [134,138].

EMSA kísérletekben kimutatták, hogy az Mgs1 fehérje egy *DNS-kötő* fehérje, amely köti az 5' egyszálú túlnyúló DNS szakaszokat, valamint a parciális duplex DNS szerkezeteket is [140]. Jelenleg a fehérje DNS-kötő doménje még nem ismert.

2.7.3. Az Mgs1 szerepe a genomstabilitás fenntartásában

Látható, hogy az Mgs1 fehérje megfelelő fiziológias szintje fontos a sejtek számára, mivel mind hiányában, mind túl magas koncentrációnál megnövekedett genominstabilitás tapasztalható. Számos kutatásban vizsgálták már, hogy az Mgs1 milyen kapcsolatban áll a DNS replikációban és DNS-hibatolerancia útvonalakban résztvevő fehérjékkel.

Több publikációban is leírták már, hogy az Mgs1 fehérje szoros kapcsolatban áll a replikációs fehérjekomplexszel. A replikációs villával való kapcsolat egyik legfőbb bizonyítéka az Mgs1 és a PCNA között kimutatott *in vitro* interakció [141]. A vad típusú Mgs1 fehérje nagy affinitással köt a mono- és poliubikvitin PCNA-hez is, azonban mutáns UBZ domén esetén ez az interakció majdnem teljesen megszűnik. Mindez arra utal, hogy az UBZ doménnek szerepe lehet az elakadt replikációs villa felismerésében [137].

Az Mgs1 és a DNS-hibatolerancia útvonalak kapcsolatának további elemzéséhez érdemes megvizsgálni az Mgs1, valamint a Rad6, Rad18 (transzléziós szintézis), és Rad5 (templátváltás) kapcsolatát. Az *mgs1Δ rad6Δ* törzsek szintetikus letalitást, míg az *mgs1Δ rad18Δ* és az *mgs1Δ rad5Δ* törzsek lassú növekedést mutatnak [142]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az Mgs1 nem csak a transzléziós szintézis vagy a templátváltás DNS-hibatolerancia útvonalba tartozik, hanem a DNS-hibatolerancia útvonaltól függetlenül is

működik. Emellett azt is kimutatták, hogy az Mgs1-nek fontos szerepe van a „fokozott” rekombinációs események megakadályozásában az elakadt replikációs villánál [143].

Az Mgs1 replikációhoz kötődő kapcsolatát tovább erősíti az Mgs1-polimeráz δ interakció. Az Mgs1 fehérje interakcióba lép az élesztő polimeráz δ három alegységéből (pol 3, pol 31, pol 32) kettővel (pol 31, pol 32) [144,145]. A *pol31 Δ* és *pol32 Δ* törzsek érzékenyek HU- és MMS-kezelésre, ami csökkenthető az Mgs1 eltávolításával a sejtől, emellett *pol31 Δ* és *pol32 Δ* háttérben az Mgs1 túltermeltetése szintetikus letális fenotípust ad [138]. Szintén az Mgs1 és replikáció szoros kapcsolatát mutatja az is, hogy az Mgs1 fehérje elősegíti az Okazaki-fragmentekérésének folyamatát azáltal, hogy stimulálja a Fen1 szubsztrátspecifikus nukleáz aktivitását. [140].

Vizsgálták még az Mgs1, valamint az Sgs1 fehérje kapcsolatát, amely G4-feloldó aktivitással is rendelkező RecQ családba tartozik. Az *mgs1 Δ sgs1 Δ* kettős deléciós törzs lassú növekedésű fenotípust mutat az egyes mutáns törzsekkel összehasonlítva. Emellett az *mgs1 Δ sgs1 Δ* törzsben magasabb testvérkromatida és rDNS rekombinációs szint mérhető, és megnő a G2 fázisban ragadt, és emiatt eltérő sejtmorfológiát mutató sejtek száma is. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az Mgs1 és Sgs1 fehérjék különálló útvonalakban működnek [138,142].

Összefoglalásképp elmondhatjuk, hogy az Mgs1 fehérje fontos szerepet játszik a genomstabilitás fenntartásában, valamint az UBZ és ATP-áz doménjeinek funkciója elengedhetetlen a megfelelő működéséhez. Bár ismert, hogy a fehérje több ponton is kapcsolódik a replikációs villához és a replikációs villához kapcsolódó szereplőkhöz (PCNA, polimeráz δ), azonban továbbra sem egyértelmű a fehérje pontos szerepe és funkciói, melyeknek a felderítése további vizsgálatokat igényel.

2.8. A humán WRNIP1 fehérje

Az élesztő Mgs1 fehérje humán homológja a WRNIP1 (Werner Interacting Protein 1), amelyet a WRN helikáz interakciós partnereként azonosítottak [146]. Homo-oligomer komplexet alkot, amely oktamer formában van jelen [147].



10. ábra: A humán WRNIP1 fehérje doménszerkezete

2.8.1. A WRNIP1 doménszerkezete

A WRNIP1 fehérje 665 aminosav hosszú, melyben eddig ismert egy UBZ domén az N-terminális részen (9–48 aminosavak), egy ATP-áz domén a középső részen (268–275: Walker A, 324–329: Walker B), valamint 2 leucin-cipzár a C-terminális részen (519–533, valamint 604–655 aminosavak) (10. ábra) [148]. A fehérje N-terminális részen található egy UBZ domén, amely képes megkötni a monoubikvitint, valamint a K48 és K63 típusú poliubikvitin láncokat is [149,150]. A fehérje ATP jelenlétében köti a hosszabb egyszálú DNS-t, a parciális duplex és a replikációs villához hasonló DNS szerkezeteket [151,152]. A fehérje DNS-függő ATP-áz aktivitásához primer-templát junction vagy kétszálú DNS végek jelenléte szükséges [147].

2.8.2. Általános jellemzők

A WRNIP1 fehérje számos humán szövetben és a sejtciklus minden fázisában kifejeződik [146,149]. A legnagyobb mennyiségben az S fázisban van jelen, amely során kolokalizál a PCNA és az RPA fehérjék által kijelölt replikációs apparátussal. Ez arra utal, hogy a fehérjének humán sejtekben az élesztőéhoz hasonló replikációs funkciója lehet. Emellett a WRNIP1 fehérje a promielocitás leukémia-testek (PML-testek) egy részében is megtalálható a sejtciklustól függetlenül, ami arra utal, hogy a WRNIP1 fehérje vagy a PML-testekben tárolódik vagy részt vesz a heterokromatin létrehozásában [149]. Továbbá a WRNIP1 fehérje interakcióba lép a magpórus komplexben található Nup107-160 fehérjével és sejtmaghártyái lokalizációt mutat [153]. UVC sugárzás hatására a WRNIP1 fókuszok száma megnő, melyek kialakulásához nélkülözhetetlen a fehérje C-terminális része [149,154]. A WRNIP1 a lézer által kiváltott DNS károsodások helyéhez lokalizál [154].

A WRNIP1 fehérjén *in vivo* számos poszt-transzlációs módosítás megtalálható: foszforiláció, ubikvitináció és szumoiláció is, amelyek nagy valószínűséggel részt vesznek a fehérje lokalizációjának, funkciójának és interakciós partnereinek szabályozásában is [153]. A WRNIP1 fehérje teljes felületén találhatóak ubikvitinációs helyek, eddig összesen 12-t azonosítottak. A WRNIP1 fehérje bizonyítottan mono- és poliubikvitinálódhat is, azonban a csatolt poliubikvitin láncok fajtája és funkciója még nem ismert. Funkcionális UBZ domén hiányában a WRNIP1 fehérje nem ubikvitinálódik. Az ubikvitinációs helyek mellett egy szumoilációs helyet is azonosítottak a fehérjén [150,155].

2.8.3. A WRNIP1 szerepe a genomstabilitás fenntartásában

A WRNIP1 fehérjének szerepe lehet az elakadt replikációs villa megvédésében és újraindításában, mivel a RAD51 fehérjével együtt megakadályozza replikációs villa degradációját az MRE11 nukleáz által [156]. A replikációs villa megvédésében betöltött szerepének ellenére eddig nem mutatták ki a PCNA és az RFC fehérjékkel való kölcsönhatását [147].

Élesztőben az *mgs1Δ rad18Δ* kettős deléciós törzs szintetikus letális fenotípust mutat [142]. Ezzel ellentétben a *WRNIP1-RAD18* kettős deléciós törzs (*WRNIP1^{-/-}/RAD18^{-/-}*) csirke DT40 sejtekben életképes, és az egyes deléciós törzsektől kicsivel lassabb növekedési rátát mutat. A rekombinációs események száma magasabb a kettős, mint az egyes deléciós törzsekben. A *WRNIP1-RAD18* kettős deléciós törzs MMS, CDDP és CPT kezelésre hasonló érzékenységet mutatott, mint a *RAD18* deléciós törzs [157]. A WRNIP1 fehérje valószínűleg képes felismerni a RAD18–DNS komplexet a WRNIP1–RAD18 interakción keresztül. Az interakció során eltávolítja a RAD18 fehérjét a DNS-ről és így elősegítheti például a polimerázok közötti váltást az elakadt replikációs villánál [157].

Az élesztő Mgs1-hez hasonlóan, a humán WRNIP1 és polimeráz δ között is kimutatták a kapcsolatot. A WRNIP1 a humán pol δ négy alegységéből hárommal képes kölcsönhatást kialakítani (p125, p50 és p12), amely fokozza a pol δ DNS-szintetizáló aktivitását [147] és erősíti a fehérje replikációs funkciójának meglétét. A replikációban betöltött szerepét továbbá alátámasztja az a felfedezés, hogy a WRNIP1 kölcsönhatásba lép a TLS polimerázokkal is. A WRNIP1 és a polimeráz η (DT40 sejtekben *POLH*) között gyenge interakciót sikerült kimutatni Co-Immunprecipitációs kísérletekben. Csirke DT40 sejtekben a *WRNIP1-POLH* kettős deléciós törzs (*WRNIP1^{-/-}/POLH^{-/-}*) kicsivel lassabban nő az egyes deléciós törzsnél. A *WRNIP1-POLH* kettős deléciós törzsnek kisebb az UV szenzitivitása, mint a *POLH* deléciós

törzsnek, ami arra utal, hogy a WRNIP1 a TLS útvonalban a pol η felett helyezkedik el és az UV által okozott DNS károsodás javítása WRNIP1 hiányában polimeráz η -független útvonalon történik.

A WRNIP1 fehérjét eredetileg a humán RecQ helikázok családjába tartozó WRN helikáz interakciós partnereként írták le. Kimutatták, hogy a WRN és a WRNIP1 kolokalizálnak a sejtmagban, és a WRNIP1 stimulálja a WRN templát-primer DNS-kötését [152]. DT40 csirkesejtekben a *WRNIP1-WRN* kettős deléciós sejtvonalt (*WRNIP1^{-/-}/WRN^{-/-}*) a vad típushoz és az egyes deléciós sejtekhez hasonló növekedést mutatott. Ugyanez igaz a különböző DNS-károsító szerekkel (MMS, CDDP és 4-NQO) szemben mutatott érzékenységre is. A kettős deléciós sejtvonaltban a rekombinációs események száma magasabb, mint az egyes deléciós sejtvonaltokban [158]. A másik, G4 replikációban érintett humán RecQ helikáz a BLM fehérje. A *WRNIP1-BLM* (*WRNIP1^{-/-}/BLM^{-/-}*) kettős deléciós sejtvonalt kicsit lassabban nő a BLM egyes deléciós sejtvonaltnál, valamint a kettős deléciós sejtvonaltban a homológ rekombinációs események száma enyhén megnőtt az egyes mutáns sejtvonaltokhoz képest. CPT-kezelés hatására a kettős mutáns érzékenyebb, mint a *BLM*-deléciós sejtvonalt. Ezen adatok alapján a WRNIP1 és a BLM fehérjék hasonló, azonban legalább részben más a DNS hibák javításában résztvevő útvonalakban találhatóak [159].

Láthatjuk, hogy az élesztő Mgs1 fehérjéhez hasonlóan a humán WRNIP1 fehérjének is fontos szerepe van a genomstabilitás fenntartásában. Az UBZ doménnek fontos szerepe van a fehérje normális működésében, valamint az Mgs1-hez hasonlóan a WRNIP1 fehérje szintén kapcsolódik a replikációs villához. Kimutatták a WRNIP1 kapcsolatát többek között a pol δ bizonyos alegységeivel, TLS polimerázokkal és a WRN helikázzal is. A WRNIP1 funkciójával kapcsolatban ismert számos részlet ellenére, a sejtben betöltött pontos szerepe további kutatásokat igényel.

3. Célkitűzések

Az intrakromoszómális G-kvadruplex szerkezeteknek számos fontos szerepe ismert a különböző sejt folyamatokban (replikáció, transzkripció és transzláció szabályozása), ezért kiemelten fontos ezen szakaszok pontos másolása. Bár ismert néhány, a G4 replikációjában résztvevő szereplő, azonban a folyamat pontos mechanizmusa és szabályozása eddig még nem tisztázott. Kutatásom fő célja az intrakromoszómális G4 szerkezetek replikációjának megértése. Specifikus célként tűztem ki a G4 DNS szerkezetet kötő új fehérjék azonosítását és jellemzését. Jelen munkám során sikerült egy új G4 replikációban résztvevő fehérjét, a *S. cerevisiae* Mgs1 fehérjét, és annak *H. sapiens* homológját, a WRNIP1 fehérjét azonosítani és szerepét jellemezni a G4 szerkezetek replikációjában.

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.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Antibiotikumok

- Ampicillin 100 mg/ml
- Kanamicin 50 mg/ml

4.2. Tápfolyadékok

- LB tápoldat: 10 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat, 10 g/l NaCl
- LB táptalaj: 10 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat, 10 g/l NaCl, 15 g/l agar
- TB puffer (10x): 108 g/l TRIS, 55 g/l bórsav
- SDS puffer (10x): 30,2 g/l TRIS, 144 g/l glicin, 10 g/l SDS
- Omission media (OMM): 0,72% omission media mix (600 ml térfogathoz: 0,96 gramm élesztő nitrogén alap, 3 gramm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 18 mg adenin, 12 mg arginin, 12 mg hisztidin, 18 mg izoleucin, 18 mg leucin, 18 mg lizin, 12 mg metionin, 30 mg fenilalanin, 12 mg triptofán, 18 mg tirozin, 12 mg uracil, 90 mg valin), 2% D-glükóz. Táptalajhoz: 1,67% bacto-agar
- +12: minden aminosavat tartalmaz
- -LEU: OMM – leucin
- Exp -LEU: -LEU, 3% glicerol, 2% tejsav
- Sejtenyésztő médium: DMEM (500 ml) kiegészítve 10% FBS-sel, 5% penicillinnel/streptomycinnel

4.3. Enzimek

A Thermo Fischer Scientific cég által gyártott enzimek a gyártói utasítások szerinti pufferekkel és protokolloknak megfelelően használva.

4.4. Poliakrilamid gél

A fehérjetisztítás eredményének ellenőrzéséhez 0,75 mm vastagságú, 8%-os denaturáló poliakrilamid gélt használtunk. Először az elválasztó gélt készítettük el, ami 4 ml 30% akrilamid/0,8% biszakrilamid, 3,75 ml 1,5 M TRIS pH 8,8, 7,25 ml desztillált steril víz, 50 µl 10% APS és 10 µl TEMED keverékéből állt. Az elválasztó gélre a polimerizáció után gyűjtő gélt öntöttünk. A 3,9%-os gyűjtő gél 0,65 ml 30% akrilamid/ 0,8% biszakrilamid, 1,25 ml 1,5 M TRIS pH 6,8, 3,05 ml steril desztillált víz, 25 µl 10% APS és 5 µl TEMED elegyből készült.

4.5. *Natív gél*

A DNS-fehérje interakciós kísérletekhez 4%-os natív poliakrilamid gélét használtunk, amelynek összetevői a következők: 1,66 ml 30% akrilamid/0,8% biszakrilamid, 10,21 ml steril desztillált víz, 0,62 ml 10xTB, 50 µl 10% APS, 10 µl TEMED. A keverékből 1,5 milliméter vastagságú gélét öntöttünk és felhasználás előtt 4 °C-ra hűtöttük.

4.6. *Plazmidok létrehozása*

Az Mgs1 fehérjét kódoló cDNS-t *NcoI/EcoRI* enzimekkel emésztettük, majd szintén *NcoI/EcoRI* emésztett pENTR4 vektorba klónoztuk, így megkaptuk a pBP 298-as plazmidot. Az élesztő expressziós vektor létrehozásához az Mgs1-et kódoló szakaszt pBP 298-as plazmidból LR reakció (Invitrogen) segítségével pBJ842 vektorba klónoztuk a gyártó utasításai szerint, így megkaptuk a pBP309-es plazmidot.

A WRNIP1 fehérjét kódoló cDNS-t *BamHI* enzimmel emésztettük, majd szintén *BamHI* emésztett pENTR2B vektorba klónoztuk, így megkaptuk a pBP 378-as plazmidot. Az élesztő expressziós vektor létrehozásához a WRNIP1-et kódoló szakaszt pBP 378-as plazmidból LR reakció (Invitrogen) segítségével pBJ842 vektorba klónoztuk a gyártó utasításai szerint, így megkaptuk a pBP069-as plazmidot.

Az emberi WRNIP1 fehérjét csendesítő shDNS-t expresszáló konstrukció előállításához az O2791 és O2792 oligonukleotidokat hibridizáltuk, majd pBP208 plazmid konstrukcióba klónoztuk *BglII/HindIII* restriktációs enzimek segítségével. A létrejött plazmidkonstrukció a pBP398-as számot kapta. A kísérletben kontrollként a pBP208-as plazmidot használtuk.

O2791: 5'-GATCTGGAGATCCGACAGATGCTATTCAAGAGATAGCATCTGTCGGATCTCTCTTTTA-3'

O2792: 5'-AGCTTAAAAAGAGGAGATCCGACAGATGCTATCTTGAATAGCATCTGTCGGATCTCCA-3'

4.7. *Plazmidtisztítás baktériumból*

A plazmidokat DH5α baktériumban termeltettük és GeneAid High-Speed Plasmid Mini Kit segítségével tisztítottuk a gyártói utasításnak megfelelően.

4.8. *Baktérium transzformálás*

A baktériumok transzformálásához a DH5α kompetens sejteket jégen kiolvasztottuk, hozzáadtunk ~50 ng plazmidot, 30 percig jégen inkubáltuk, majd 42 °C-on hősokkoltuk 90 másodpercig. A baktériumokat megfelelő antibiotikummal kiegészített LB lemezre szélesztettük és egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk.

4.9. Élesztő transzformálás

Kiolvasztottunk 50 µl kompetens élesztősejtet, majd hozzáadtuk a plazmid DNS-t (~0,5 µg) és 300 µl 40%-os PEG lítium-acetátot. Ezután a sejteket 30 percig rázattuk 30 °C-on, majd 38 µl DMSO hozzáadása után még 15 percig inkubáltuk őket 42 °C-on. Ezután 2000 fordulat/perc sebességgel 2 percig centrifugáltuk őket, a felülúszót leszívtuk, majd a sejteket felvettük 1 ml +12 tápoldatban, és 12 órán át inkubáltuk őket 30 °C-on. Végül a sejteket 2000 fordulat/perc sebességgel 2 percig centrifugáltuk, a felülúszót leszívtuk, a sejteket szuszpendáltuk, majd szélesztettük őket -LEU táptalajra és a lemezt 30 °C-on 3 napig inkubáltuk.

4.10. Fehérjetisztítás

A GST-Mgs1 és a GST-WRNIP1 fehérjéket BJ5464 proteáz-hiányos élesztő sejtekből tisztítottuk. A sejteket a GST-Mgs1 expresszálo plazmiddal (pBP309) vagy GST-WRNIP1 expresszálo plazmiddal (pBP069) transzformáltuk és a lemezeket 3 napig 30 °C-on inkubáltuk. A starter kultúrát szintetikus tápoldatban indítottuk, amely nem tartalmazott leucint (Leu-) és stacioner fázisig növesztettük. Ezután a kultúrát 10-szeres térfogatra hígítottuk és 12 órán át növesztettük Exp Leu- tápoldatban, amely nem tartalmazott dextrózt, viszont tartalmazott 2% tejsavat és 3% glicerolt. Az inkubáció letelte után 0,2% galaktózt adtunk a kultúrához, majd 8 órát inkubáltuk. Ezután a sejteket 7000 rpm-en centrifugáltuk 3 percig.

Az Mgs1 vagy WRNIP1 fehérjét tartalmazó élesztősejteket felvettük P pufferben (20 mM TRIS pH 7,5, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0,01% v/v Nonidet P-40, 10% v/v glicerol) kiegészítve 1 M NaCl és 5 mM EDTA hozzáadásával, majd feltártuk a sejteket. A lizátumot GST-gyöngyöt tartalmazó oszlopon átfolyattuk, majd a gyöngyöket először P+1 M NaCl pufferrel, majd P puffer+500 mM KCl pufferrel mostuk. A GST-Mgs1 vagy GST-WRNIP1 fehérjét P puffer + 500 mM KCl + 20 mM redukált glutation segítségével eluáltuk. Az elúciós frakciókat Microcon-30 oszlopon töményítettük, folyékony nitrogénben fagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk.

A BLM helikáz preparátumot Dr. Harami Gábort biztosította Dr. Kovács Mihály laboratóriumából. A Bloom fehérjét a „Karow és mtsai., 1997” közleményben található protokoll alapján tisztították: [104].

4.11. DNS szubsztrátok készítése

A DNS szubsztrátok elkészítéséhez a megfelelő oligonuklotidokat 25 mM TRIS pH 7,5 és 150 mM KCl-t tartalmazó pufferben 5 percig 95 °C-on inkubáltuk, lassan lehűtöttük, majd felhasználásig 4 °C-on tároltuk. A felhasznált oligonuklotidok szekvenciája a **2. táblázatban** található.

2. táblázat: EMSA, fluoreszcens anizotrópia, ATP-áz és FRET kísérletekben használt oligonukleotidok szekvenciája. A G4 kialakításában résztvevő guaninokat félkövér betűkkel jelöltük.

Név	Típus	Szekvencia (5'-3')	Jelölés	
MYC (Myc2345)	G4	TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTGCGTCTG CGGCTGGCTCGAGGC	5' FITC	EMSA, fluoreszcens anizotrópia és ATP-áz
	Kontroll	GTGAGATGTTGACCATGGGTGCGTCTGC GGCTGGCTCGAGGC	5' FITC vagy 5' Cy3	
	GC-gazdag kontroll	TGAGTGTGAGTGGTGTGAGAGCGGCGG CGGCTGGCGCGAGGC	5' FITC	
	C-gazdag kontroll	ACTCCACCCATCCACCCACGCAGAC GCCGACCGAGCTCCG	5' FITC	
CEB (CEB25)	G4	AAGGGTGGGTGTAAGTGTGGGTGGGT GCGTCTGCGGCTGGCTCGAGGC	5' FITC	EMSA, fluoreszcens anizotrópia és ATP-áz
	Kontroll	AAGCCTTATCTGTAAGTGTATGTCAAT GCGTCTGCGGCTGGCTCGAGGC	5' FITC vagy 5' Cy3	
Komplementer szál		TTTGCCCTCGAGCCAGCCGCAGACG	-	
CEB	G4	AAGGGTGGGTGTAAGTGTGGGTGGGT GTTTTTTTTTTTTT	5' Cy5, 3' Cy3	FRET
	Kontroll	AAGCCTTATCTGTAAGTGTATGTCAAT GTTTTTTTTTTTTT	5' Cy5, 3' Cy3	

4.12. EMSA (electrophoretic mobility shift assay, DNS-fehérje interakció kimutatása)

Különböző mennyiségű GST-Mgs1 vagy GST-WRNIP1 fehérjét (az ábrán jelölt mennyiségben) 50 nM 5' fluoreszcein-jelölt DNS szubsztráttal inkubáltunk 15 percig 25 °C-on R pufferben (25 mM TRIS pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 20 ng/μl BSA). A mintákat ezután elektroforézis segítségével, 4%-os natív akrilamid gélen választottuk el 0,5 x TB pufferben (45 mM TRIS-borát). Az eredményeket Typhoon Trio Imager segítségével vizualizáltuk és elemeztük. A DNS-fehérje interakció erősségét a szabad és kötött DNS mennyisége alapján ImageJ szoftver segítségével számítottuk ki. A kompetíciós EMSA kísérletekben a 3' Cy3-jelölt kontroll szubsztrát, és az 5' FITC-jelölt G4 szubsztrát azonos

menyiségben (50-50 nM) volt jelen az adott kísérletben. A DNS-kötés ATP- és Mg^{2+} -függésének vizsgálatakor az R puffert 5 mM MgCl_2 -vel és 1 mM ATP-vel egészítettük ki.

4.13. *Fluoreszcens anizotrópia mérések*

A fluoreszcens anizotrópia méréseket 15 μl térfogatban, A pufferben (50 mM TRIS pH 7,5, 90 mM KCl, és 5 mM EDTA) végeztük 25 °C-on. Az 5' fluoreszceinnel jelölt DNS mennyisége 10 nM volt növekvő GST-Mgs1 vagy GST-WRNIP1 fehérjekoncentráció mellett (az ábrán jelölt mennyiségben). A mérésekhez Synergy H4 Hybrid Multi-Mode (BioTek) műszert használtunk, és az eredményeket Origin 8.0 szoftver segítségével elemeztük. A kötési állandó (K_d) értékeket és a kooperativitás mértékét Hill1-függvény illesztéssel számoltuk ki, amelynek képlete:

$$y = \text{kezdőpont} + (\text{végpont} - \text{kezdőpont}) \frac{x^n}{k^n + x^n}$$

amelyben:

x = a fehérje koncentrációja

y = fluoreszcens anizotrópia

k = kötési állandó

n = kooperációs helyek száma

4.14. *ATP-áz kísérlet*

A kísérletet ATP-áz pufferben végeztük (50 mM TRIS pH 7,5, 50 mM KCl, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 1 mM DTT) piruvát-kináz laktát-dehidrogenáz alapú kísérletben (14 U/ml PK, 20 U/ml LDH, 1 mM ATP, 1 mM foszfoenol-piruvát, 600 μM NADH) 25 °C-on. A kísérletben 400 nM-os GST-Mgs1 és 500 nM-os DNS koncentrációval dolgoztunk. Az NADH abszorbanciáját ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) Infinite F Nano+ (Tecan) microplate olvasóval követtük. Az eredményeket Origin 8.0 szoftverben elemeztük.

4.15. *Egyensúlyi FRET (Förster resonance energy transfer) mérés*

A FRET kísérletben 12,5 nM kettős (5' Cy5-3' Cy3) jelölésű egyszálú CEB G4 vagy CEB kontroll szubsztátot tartalmazó ATP-áz pufferhez (50 mM TRIS pH 7,5, 60 mM KCl, 60 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 1 mM DTT) növekvő mennyiségű tisztított fehérjét (GST-WRNIP1 vagy BLM) adtunk, BLM esetében 5 mM ATP-vel és

ATP-regenerációs rendszerrel kiegészítve (20 mM kreatin-foszfát és 20 µg/ml kreatin-kináz). A méréseket 150 µl-es kvarcküvetében végeztük, 2 perc inkubáció után 25 °C-on, az alábbi paraméterekkel: gerjesztés: 548 nm, 5 nm-es rés; emissziós spektrum: 560–700 nm, rés: 5 nm, lépésköz: 1 nm. A méréseket Fluorolog (Horiba) készüléken végeztük.

4.16. Kromoszómatörések vizsgálata

HeLa sejteket shCtrl (kontroll) és shWRNIP1 (WRNIP1-csendesített) konstrukciókkal transzfektáltuk, majd 10 µM PhenDC3 ágenssel kezeltük 24 órán keresztül. A sejteket ezután 0,5 µg/ml kolhicin tartalmú tápoldattal inkubáltuk 6 órán át a mitotikus sejtek számának feldúsítása érdekében. A kromoszómák preparálásához a sejteket összegyűjtöttük, 75 mM KCl-ban felfuszpendáltuk és 25 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd 10 percig 200 x g-n centrifugáltuk 4 °C-on. Ezt követően a sejteket 3-szor fixáltuk (3:1 arányú metanol:ecetsav keverékkel), a kromoszómákat tárgylemezre helyeztük, levegőn hagytuk megszáradni és Hoechst-oldattal festettük (Sigma, 1:10 000). Minden sejttípus esetében 40-40 kromoszómaszetről készítettünk felvételt LSM 800, Axio Observer 7 állvány és Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27 objektív, valamint 405 nm-es (5 mW) és 488 nm-es (10 mW) diódalézer segítségével. A kísérletek során ZEN 2.3 szoftvert használtunk és mintánként megszámloltuk a kromoszómaaberrációk számát.

4.17. γ H2AX-intenzitás mérése

A HeLa sejtek transzfekcióját követően 24 óra elteltével a kontroll (shCtrl), valamint WRNIP1-csendesített (shWRNIP1) sejteket tárgylemezre ültettük ki. Mivel a PhenDC3 molekula DMSO-ban oldódik, ezért a sejtek egy részét kontrollként 0,5% DMSO-val kezeltük, a másik részét pedig 10 µM PhenDC3-mal. A kezelést követően 4, 6 és 8 órával 3% paraformaldehid segítségével fixáltuk a sejteket, majd 0,5% Triton X-100/1×PBS oldattal permeabilizáltuk 10 percig. A kettősszálú DNS töréseket nyúlban készült anti- γ H2AX és anti-nyúl Alexa Fluor 488 segítségével tettük láthatóvá. A sejtmagokat Hoechst-festéssel vizualizáltuk, majd ImageJ szoftver segítségével lemértük a γ H2AX jel intenzitását a kezeletlen, valamint kezelt mintákban. A méréseket 3 független kísérletben készítettük, majd grafikonon ábrázoltuk.

4.18. EdU és IdU beépülésének vizsgálata

HT1080 sejteket 30 percig jelöltünk 10 µM EdU-val (5-etinil-2-dezoxiuridin), majd friss médiummal mostuk őket pár percen keresztül. Ezután a sejtek egy részét 0,5% DMSO-val, a másik részét 10 µM PhenDC3-mal kezeltük 1 órán át, majd 200 µM IdU

(5-jód-2'-dezoxiuridin) timidinanalóggal jelöltük ismét őket 30 percig. A sejteket 3%-os paraformaldehiddel fixáltuk 10 percig, majd a DNS denaturáláshoz 30 percig 2,5 M-os HCl-dal kezeltük őket. Ezután a sejteket háromszor mostuk 1×PBS-sel, majd anti-IdU anittestekkel jelöltük az IdU-beépülést az aktív replikációs villába. Az EdU-beépülést Click-IT Kit (Baseclick) segítségével vizualizáltuk a gyártói utasításoknak megfelelően. A sejtmagokat Hoechst-festéssel jelöltük (1:10 000).

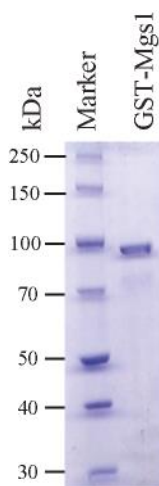
5. Eredmények

5.1. A *S. cerevisiae* Mgs1 fehérjének G4-et formáló DNS szerkezetekhez kapcsolódó funkciója is lehet

5.1.1. Az Mgs1 fehérje specifikusan köti a G4-et formáló DNS szerkezeteket

Az Mgs1 fehérjének fontos szerepe van a replikációs villa zavartalan haladásában [137,160], így a genomstabilitás megőrzésében is [134], azonban a folyamat biokémiai mechanizmusa és a fehérje szerepének pontos funkciója még nem ismert. Németországi kollaborátorunk, Katrin Paeschke laboratóriumában élesztő egyhibrid kísérletben kimutatták, hogy az élesztő Mgs1 fehérje kötődik a G4-et tartalmazó régiókhoz [161]. Emellett ismert, hogy az Mgs1 fehérje humán homológja, a WRNIP1, kapcsolatban áll a G4 szekvenciák kicsavarására is képes WRN helikázzal [146]. Ezen adatok tükrében először élesztőben megvizsgáltuk, hogy az Mgs1 fehérjének milyen szerepe lehet a G4-et formáló szekvenciák replikációjában, az Mgs1 fehérje DNS-kötő képességét G4-et tartalmazó szubsztrátok jelenlétében ellenőriztük *in vitro*.

A kísérlethez *S. cerevisiae* Mgs1 fehérjét tisztítottuk élesztőből (**11. ábra**). A tisztított GST-Mgs1 fehérje a várt mérettartományban jelent meg (GST: 26 kDa, Mgs1: 66,5 kDa; $\approx 92,5$ kDa).

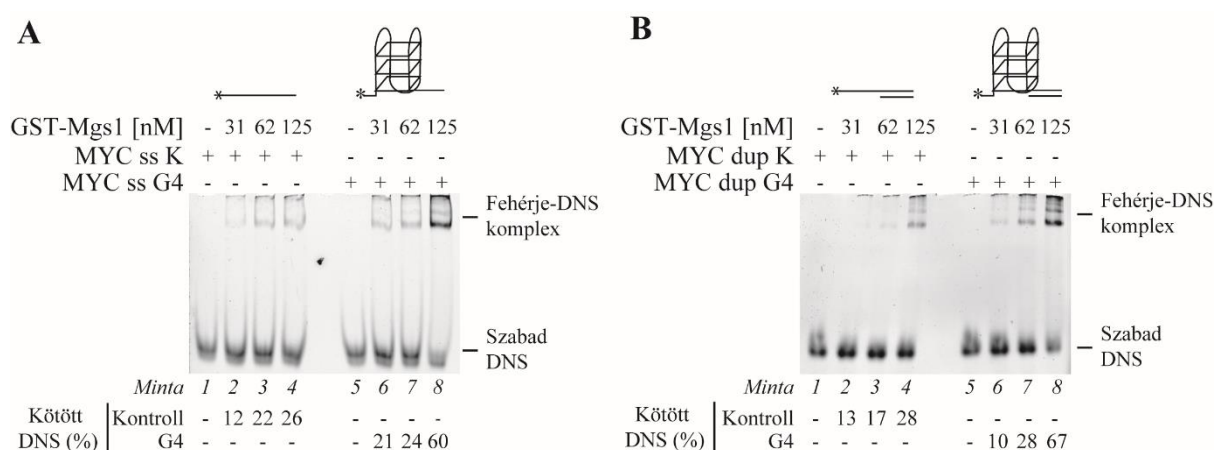


11. ábra: Élesztőből tisztított GST-Mgs1 fehérje (GST: 26 kDa, Mgs1: 66,5 kDa; $\approx 92,5$ kDa) 8%-os denaturáló poliakrilamid gélen elválasztva, Coomassie kék festéssel megjelenítve.

Az Mgs1 DNS-kötésének vizsgálatához elsőként az egyik legáltalánosabban használt G4 szekvenciát, a c-MYC proto-onkogén promóterében található Myc2345 régiót választottuk, amely parallel G4-et formál [33,126,129,162,163]. A kísérletben használt szubsztráton a Myc2345 G4-et formáló régió a szubsztrát 5' végén helyezkedett el, amit egy 21 nukleotid

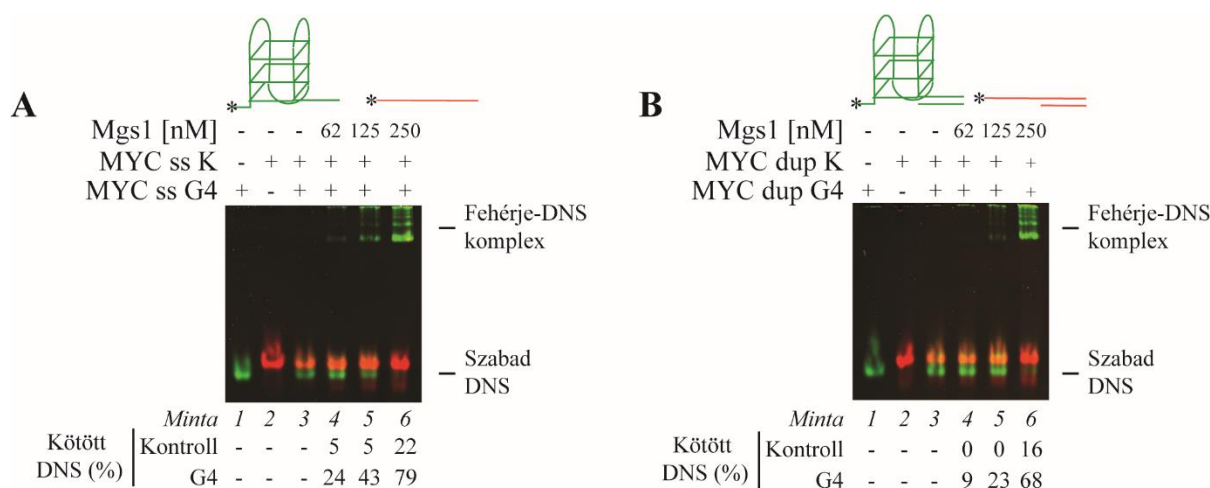
hosszú egyszálú (single-stranded, ss) régió követett (**12. ábra**). Ezt a szubsztrátot MYC ss G4-nek neveztük el. A kötési erősséget összehasonlítottuk egy kontroll szubsztráttal (MYC ss K) is, amelyhez a MYC ss G4 szekvenciában a G4 szerkezetet formáló guaninokat más nukleotidokra cseréltük (**2. táblázat**). A fehérje kötési affinitását a MYC ss G4 és MYC ss K szubsztrátokkal EMSA kísérletben vizsgáltuk; a kísérletben használt oligók 5' FITC jelölést hordoztak (**12.A ábra**). A MYC ss G4 esetében a 125 nM-os GST-Mgs1 koncentrációnál jól látható fehérje–DNS komplexet (azaz „shiftet”) alkot, míg a MYC ss K esetében azonos koncentrációnál ennél gyengébb kötés figyelhető meg (kötött DNS % 125 nM-os GST-Mgs1 koncentrációnál: G4 60%, K 26%). A specifikus kötést a fehérje–DNS komplexben lévő DNS szubsztrát mennyisége is jelzi, az ábrán százalékban kifejezve (kötött DNS %).

Mivel az Mgs1 fehérjének a replikációs villához köthető funkciói is ismertek [137,160], ezért létrehoztunk egy egyszálú-kétszálú DNS-t tartalmazó parciális duplex szubsztrátot, hogy megvizsgáljuk a fehérje DNS-kötési affinitását replikációs villához hasonló szubsztráton is. A parciális duplex szubsztrát létrehozásához az egyszálú MYC K és MYC G4 oligonukleotidok 3' túlnyúló szakaszához egy jelöletlen komplementer oligonukleotidot hibridizáltunk. Ezeket a szubsztrátokat MYC dup K és MYC dup G4 néven jelöltük a továbbiakban. Az előző kísérlethez hasonlóan a fehérje itt is erősebben kötötte a G4-et tartalmazó szubsztrátot a kontrollhoz viszonyítva (kötött DNS% 125 nM-os GST-Mgs1 koncentrációnál: G4 67%, K 28%) (**12.B ábra**).



12. ábra: Az GST-Mgs1 fehérje specifikusan köti a MYC G4 szubsztrátot (1–4. minta) a MYC K szubsztráttal (5–8. minta) összehasonlítva (A) egyszálú és (B) parciális duplex formában is. A fehérje–DNS interakciót EMSA kísérletben vizsgáltuk, a DNS szubsztrátok 5' FITC- jelöléssel voltak ellátva. A fehérje–DNS komplexben lévő szubsztrát mennyiségét százalékos arányban fejeztük ki.

Annak érdekében, hogy megerősítsük, hogy az Mgs1 preferenciálisan köti a G4 szerkezeteket a G4 szerkezetet nem tartalmazó szubsztrátokkal összehasonlítva, kompetíciós EMSA kísérletet végeztünk. Ebben a kísérleti elrendezésben a kontroll és G4 szubsztrátok egyszerre, egyenlő mennyiségben voltak jelen a reakcióban (**13. ábra**). A MYC ss K és MYC dup K szubsztrátokat ebben az esetben 5' Cy3 jelöléssel (piros), míg a MYC ss G4 és MYC dup G4 szubsztrátokat 5' FITC jelöléssel (zöld) láttuk el. Ebben a kísérleti elrendezésben kimutattuk, hogy a GST-Mgs1 fehérje elsősorban a G4-et tartalmazó szubsztrátot köti meg a kontroll szubsztrát jelenlétében is. Ez az eredmény egyszálú (**13.A ábra**), valamint parciális duplex (**13.B ábra**) esetében is megfigyelhető volt. Egyszálú szubsztrátok esetén a legnagyobb, 250 nM-os GST-Mgs1 koncentráció mellett a kontroll szubsztrát 22%-a, míg a G4-et tartalmazó szubsztrát 79%-a volt fehérje-DNS komplexben. Parciális duplex estében ez 16% volt a kontroll, és 68% a G4-et tartalmazó szubsztrát esetén. A 250 nM-nál alacsonyabb GST-Mgs1 koncentrációk esetén megfigyelhető volt a G4 szubsztrát kötése, ellenben a kontroll DNS szubsztráté nem.



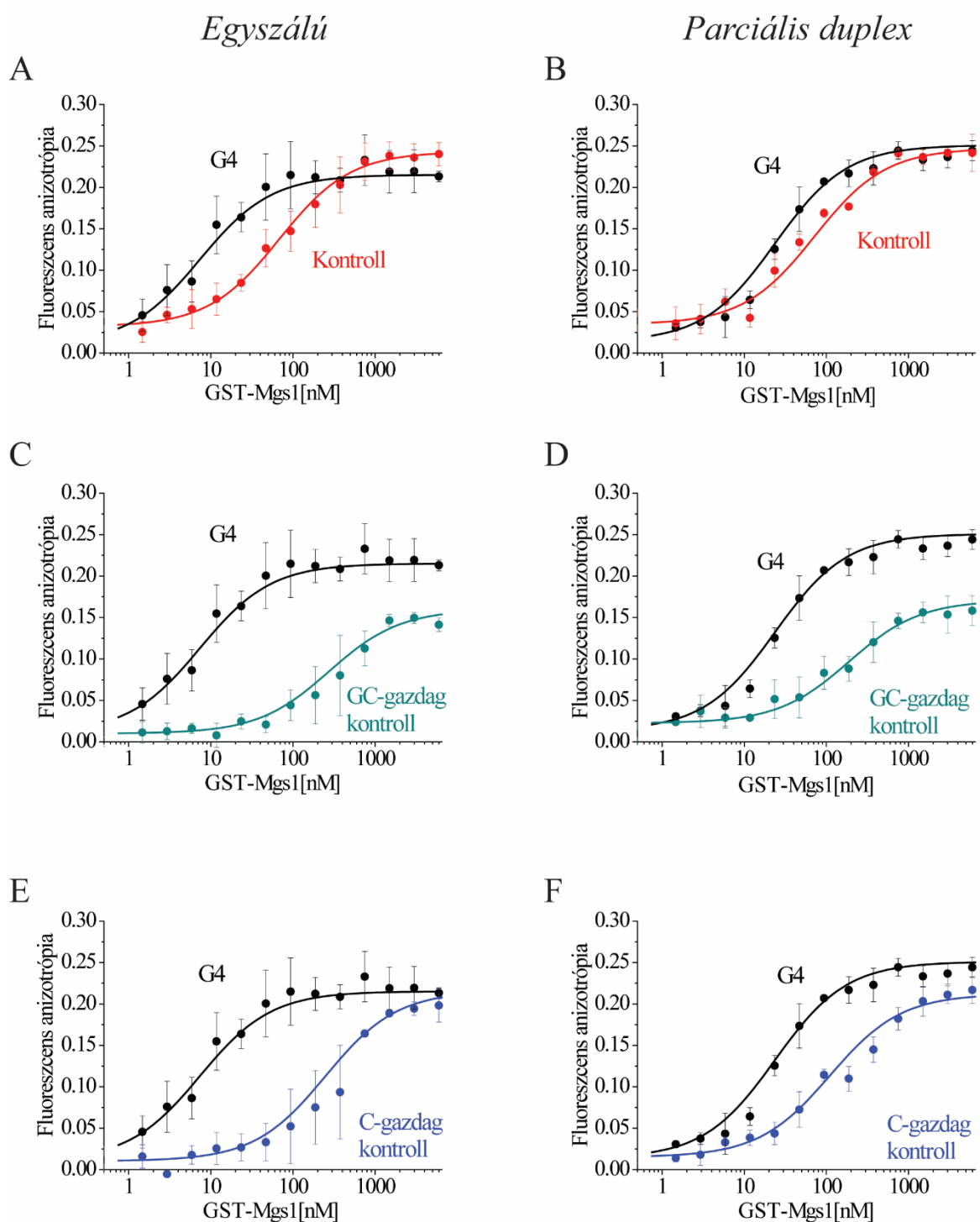
13. ábra: Kompetíciós gél shift kísérlet GST-Mgs1 fehérjével (A) egyszálú (ss) és (B) parciális duplex (dup) MYC K és MYC G4 DNS szubsztrátok jelenlétében. Az egyszálú és parciális duplex kontroll szubsztrátok 5' Cy3 jelöléssel (piros), míg az egyszálú és parciális duplex G4 szubsztrátok 5' FITC jelöléssel (zöld) láthatóak. A kontroll és G4 szubsztrátok egyenlő mennyiségben, egyszerre voltak jelen az egyes reakciókban önmagukban vagy a jelzett fehérjemennyiséggel inkubálva. A fehérje-DNS komplexben lévő szubsztrát mennyiségét százalékos arányban fejeztük ki.

Mivel az EMSA kísérletek eredménye alapján arra következtettünk, hogy az Mgs1 fehérje nagyobb affinitással köt a G4 szerkezethez, mint a szerkezetet nem tartalmazó kontroll DNS szubsztrátokhoz, meghatároztuk a pontos kötési állandókat (K_d) fluoreszcens anizotrópia módszerrel. A mérések során az EMSA kísérletekben is használt kontroll és G4, 5' FITC-jelölt egyszálú és parciális duplex DNS szubsztrátokat használtuk, valamint két további DNS

szubsztrát kötési állandóját is meghatároztuk. Az említett kontroll mellett egy ún. GC-gazdag kontrollt is megvizsgáltunk, amelynek a MYC G4 szubsztráttal megegyező GC-tartalma volt. Emellett a MYC G4 szubsztrát komplementer szálának kötési állandóját is lemértük (C-gazdag kontroll néven hivatkozunk rá). A kísérletben állandó DNS koncentrációhoz (10 nM) növekvő mennyiségű tisztított GST-Mgs1 fehérjét adtunk. A mérési pontokra Hill-függvényt illesztettünk (**14. ábra**), a kötési állandók meghatározásához (**3. táblázat**). Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy az Mgs1 fehérje nagyobb affinitással köti a MYC G4-et tartalmazó szubsztrátokat a kontroll szubsztrátokkal összehasonlítva egyszálú és parciális duplex formában egyaránt. Egyszálú szubsztrát esetén a GST-Mgs1 fehérje és a MYC G4 szubsztrát közötti kötési állandó 7 ± 2 nM volt. A MYC G4 szubsztráthoz képest a fehérje a kontroll szubsztrátokat 10–40-szer gyengébben kötötte (kontroll: 68 ± 7 nM, GC-gazdag kontroll: 275 ± 85 nM, C-gazdag kontroll: 249 ± 33 nM). Parciális duplex szubsztrát esetén a GST-Mgs1 fehérje és a MYC G4 szubsztrát közötti kötési állandó 24 ± 4 nM volt, amihez képest a fehérje a kontroll szubsztrátokat ~3–8-szor gyengébben kötötte (kontroll: 72 ± 15 nM, GC-gazdag kontroll: 189 ± 29 nM, C-gazdag kontroll: 110 ± 20 nM). A Hill-függvénnyel való illesztés során a fehérjék közötti kooperativitás is meghatározható a DNS-kötési reakcióban. Ezt a Hill együttható (n) szám mutatja; amennyiben 1-től nagyobb számot kapunk eredményként, az pozitív kooperativitásra utal. A GST-Mgs1 DNS-kötési mérési pontok illesztése során nem tapasztaltunk kooperativitást, a Hill együttható minden esetben ~1 körüli érték volt.

3. táblázat: A GST-Mgs1 és a G4, valamint kontroll szubsztrátok közötti, fluoreszcens anizotrópiával megállapított kötési állandók (K_d) értékei [nM]. A K_d értékek a 14. ábrán látható illesztésekből származnak. A táblázatban feltüntetett értékek a jelölt számú biológiai ismétlés átlagát jelölik, a p -értékeket kétágú Student-próbával számítottuk ki.

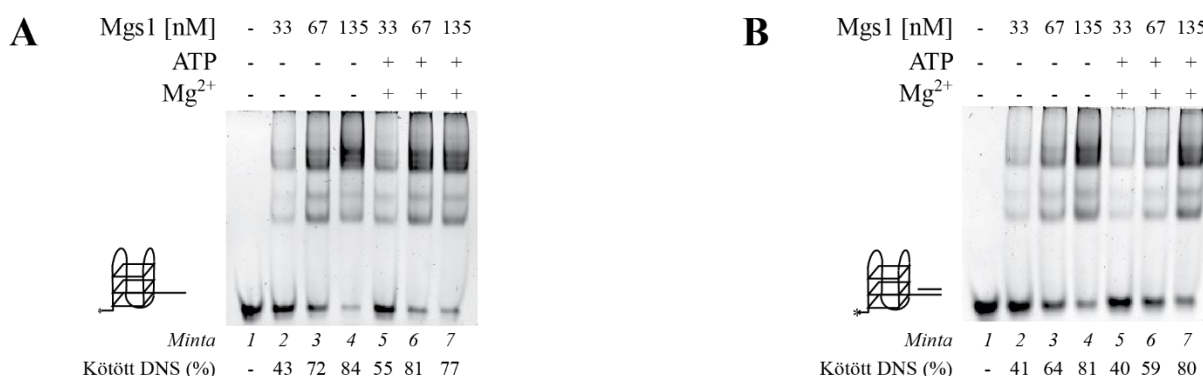
Szubsztrát		$K_d \pm$ illesztési hiba [nM]	Biológiai ismétlés száma	p -érték (G4-hez képest)
MYC egyszálú	G4	7 ± 2	4	
	Kontroll	68 ± 7	5	<0,001
	GC-gazdag kontroll	275 ± 85	3	<0,05
	C-gazdag kontroll	249 ± 33	3	<0,05
MYC parciális duplex	G4	24 ± 4	3	
	Kontroll	72 ± 15	3	<0,05
	GC-gazdag kontroll	189 ± 29	3	<0,05
	C-gazdag kontroll	110 ± 20	3	<0,05



14. ábra: Fluoreszcens anizotrópia kísérletekben mért kötési görbék illesztései tisztított GST-Mgs1 fehérje és 5' fluoreszceinnel jelölt egyszálú (A) kontroll, (C) GC-gazdag kontroll és (E) C-gazdag kontroll, valamint parciális duplex (B) kontroll, (D) GC-gazdag kontroll, és (F) C-gazdag kontroll szubsztátok esetében. A szórások 3 vagy több biológiai ismétlés átlagát jelölik (lásd 3. táblázat). A MYC G4 szubsztáttal végzett mérést összehasonlításképp minden panelen feltüntettük. Az ábrán Hill-függvénnyel történő illesztések láthatók, az illesztésekből számított kötési állandó (K_d) értékek a 3. táblázatban láthatók.

5.1.2. Az ATP és Mg^{2+} jelenléte nem befolyásolja az Mgs1 DNS-kötési tulajdonságait

Korábbi tanulmányokból ismert, hogy az Mgs1 fehérje gyenge DNS-függő ATP-áz aktivitással rendelkezik [134], ezért megvizsgáltuk, hogy az ATP és a Mg^{2+} jelenléte hogyan hat az Mgs1 DNS-kötő aktivitására. Jelen kísérletben a korábbi EMSA és fluoreszcens anizotrópia kísérletekben használt egyszálú és parciális duplex MYC G4 szubsztrátokat használtuk. Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a GST-Mgs1 fehérje ATP és Mg^{2+} nélkül is képes a DNS-kötésre. Ez igaz volt az egyszálú (15.A ábra) és a parciális MYC G4 (15.B ábra) esetében is. ATP és Mg^{2+} jelenlétében, valamint hiányában is hasonló volt a fehérje-DNS komplexben lévő DNS szubsztrát aránya.



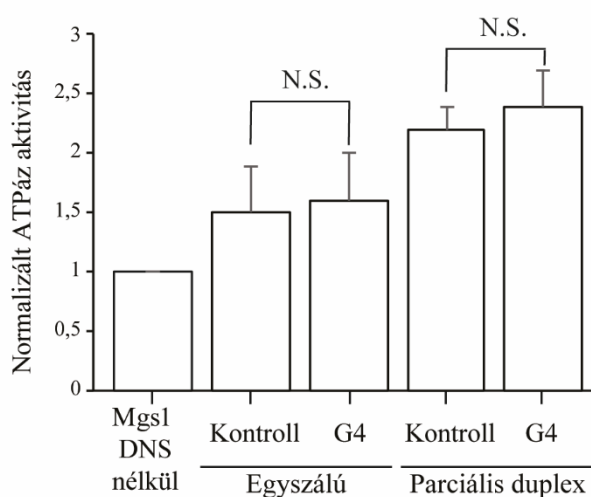
15. ábra: GST-Mgs1 fehérje DNS-kötési jellemzőinek vizsgálata EMSA kísérletben ATP és Mg^{2+} jelenlétében, valamint hiányában (A) egyszálú MYC G4 és (B) parciális duplex MYC G4 szubsztrát jelenlétében. Az ATP és Mg^{2+} jelenléte nem befolyásolja jelentősen a GST-Mgs1 DNS-kötő aktivitását. A fehérje-DNS interakciót EMSA kísérletben vizsgáltuk, a DNS szubsztrátok 5' FITC jelöléssel voltak ellátva. A fehérje-DNS komplexben lévő szubsztrát mennyiségét százalékos arányban fejeztük ki.

5.1.3. A G4 DNS jelenléte nem befolyásolja az Mgs1 ATP-áz aktivitását

Ismert, hogy a DNS-kötés stimulálja az Mgs1 fehérje ATP-áz aktivitását [134], ezért megvizsgáltuk, hogy a MYC G4 szubsztrát milyen hatással van az Mgs1 fehérje ATP-áz aktivitására (16. ábra, 4. táblázat). Eredményeink megegyeztek az irodalmi adatokkal [134,140], miszerint a GST-Mgs1 önmagában gyenge ATP-áz aktivitással rendelkezik ($4,07 \pm 1,83 \text{ min}^{-1}$). Egyszálú MYC K vagy MYC G4 szubsztrát hozzáadásával $1,5 \pm 0,4$ és $1,6 \pm 0,4$ -szeres stimulálás mérhető a DNS nélküli ATP-áz aktivitással összehasonlítva. Parciális duplex MYC K jelenlétében $2,2 \pm 0,2$; míg parciális duplex MYC G4 jelenlétében $2,4 \pm 0,3$ -szeres a stimulálás mértéke. Látható, hogy a MYC G4 DNS jelenlétében és hiányában is hasonló a GST-Mgs1 ATP-áz aktivitása, így megállapíthatjuk, hogy a G4 motívumok jelenléte nem növeli tovább szignifikánsan a GST-Mgs1 ATP-áz aktivitását.

4. táblázat: A GST-Mgs1 fehérje ATP-áz aktivitásának meghatározása DNS jelenléte nélkül, egyszálú, valamint parciális duplex MYC G4 és kontroll szubsztrát jelenlétében.

		[ATP/Mgs1/min]	Normalizált
Mgs1 (DNS nélkül)		$4,07 \pm 1,8$	1
MYC egyszálú	Kontroll	$5,79 \pm 1,85$	$1,5 \pm 0,4$
	G4	$5,29 \pm 2,03$	$1,6 \pm 0,4$
MYC parciális duplex	Kontroll	$7,16 \pm 3,57$	$2,2 \pm 0,2$
	G4	$6,27 \pm 3,48$	$2,4 \pm 0,3$



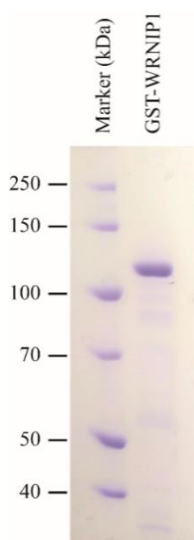
16. ábra: Az Mgs1 fehérje ATP-áz aktivitásának összehasonlítása egyszálú, valamint parciális duplex MYC kontroll és MYC G4 DNS szubsztrát jelenlétében. Az értékeket a DNS-t nem tartalmazó GST-Mgs1 fehérje ATP-áz aktivitásához normalizáltuk. Az ábrán a 4. táblázatban látható értékek kerültek ábrázolásra.

5.2. A humán WRNIP1 fehérje szerepe a G4 szerkezetek replikációjában

Az Mgs1 fehérjéhez hasonlóan a WRNIP1 fehérjéről is már számos tanulmányban kimutatták, hogy több ponton kapcsolatban áll a replikációs villával, valamint védi az elakadt replikációs villát. A WRNIP1 fehérjét eredetileg, ahogy neve is mutatja (Werner Interacting Protein 1), a WRN helikáz interakciós partnereként azonosították [147,149,152,156]. Az élesztő Mgs1 fehérje után a WRNIP1 fehérjénél is megvizsgáltuk, hogy köti-e a G4-et tartalmazó DNS szubsztrátokat *in vitro*.

5.2.1. A humán WRNIP1 fehérje specifikusan köti a G4 szerkezetet tartalmazó DNS szubsztrátokat

A humán WRNIP1 fehérjét, az élesztő Mgs1-ről szóló részben leírtakhoz hasonlóan, élesztőből tisztítottuk a 4.10-es fejezetben leírtak szerint. A **17. ábra** a tisztított GST-WRNIP1 fehérje látható denaturáló poliakrilamid gélen elválasztva, coomassie kék festéssel.

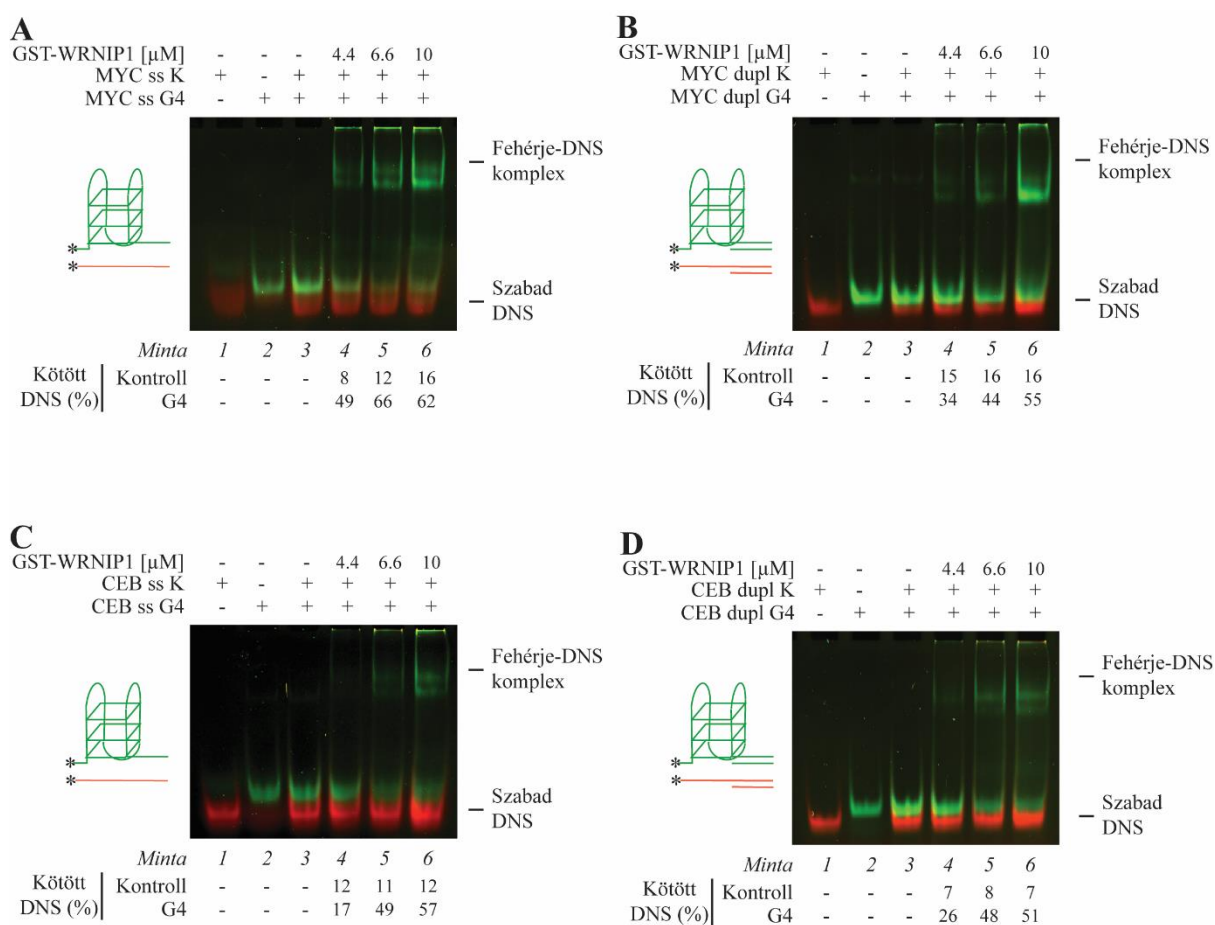


17. ábra: Tisztított GST-WRNIP1 fehérje (GST: 26 kDa, WRNIP1: 75 kDa; \approx 101 kDa).

A fehérjepreparátumot gélelektroforézissel 8%-os denaturáló poliakrilamid gélen választottuk el és coomassie kékkel festettük.

A GST-WRNIP1 fehérje sikeres tisztítását követően megvizsgáltuk a fehérjepreparátum DNS-kötő tulajdonságát, pontosabban annak G4-kötő specificitását. Először kompetíciós EMSA kísérletekben vizsgáltuk a fehérje DNS-kötő tulajdonságait. Ebben a kísérleti elrendezésben két különböző G4-formáló szekvencia kötését is megvizsgáltuk a megfelelő kontroll DNS-ek mellett. Az egyik a már korábban ismertetett, és az Mgs1 fehérje esetében használt, MYC G4 és MYC K szubsztrát volt. Emellett még a humán CEB25 miniszatellita [164,165] szekvenciát használtuk. Mindkét típusú szubsztráton a G4 motívum a szubsztrát 5' végén volt, amit egy egyszálú túlnyúló rész követett. A kontroll szubsztrátnál, a

G4 szerkezetet alkotó nukleotidokat más nukleotidokra cseréltük. A kompetíciós EMSA kísérletekben a MYC G4 és MYC K szubsztrátokat hasonlítottuk össze egyszálú és parciális duplex formában (**18.A és B ábra**), valamint CEB G4 és CEB K szubsztrátokat egyszálú és parciális duplex formában (**18.C és D ábra**). A GST-WRNIP1 fehérje minden esetben erősebben kötötte a G4-et tartalmazó szubsztrátokat, mint azok kontroll párját (10 μ M-os GST-WRNIP1 koncentrációnál: egyszálú MYC K 16% vs. MYC G4 62%, parciális duplex MYC K 16% vs. MYC G4 55%; egyszálú CEB K 12% vs. CEB G4 57%, parciális duplex MYC K 7% vs. MYC G4 51%).



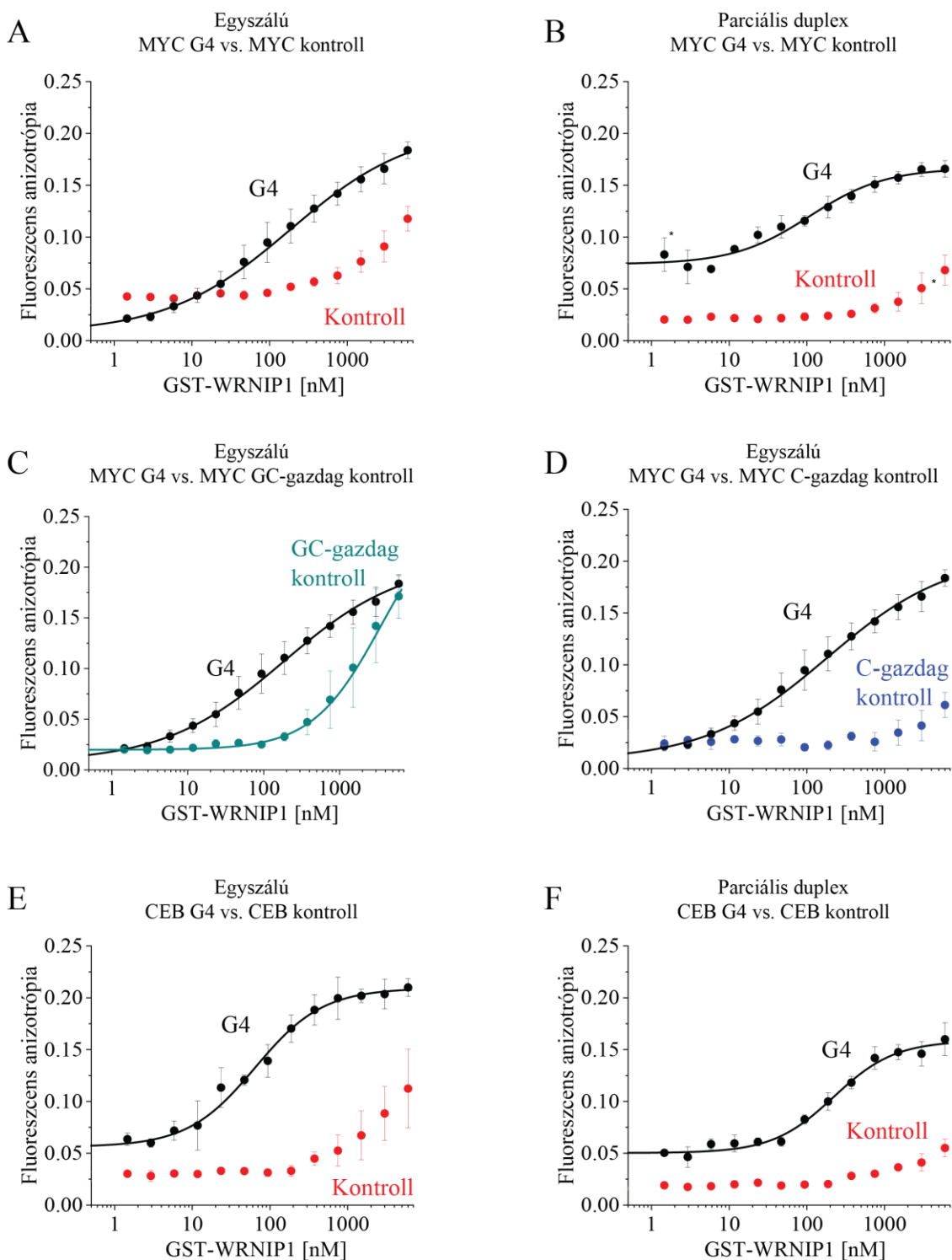
18. ábra: GST-WRNIP1 fehérje DNS-kötési aktivitásának jellemzése kompetíciós EMSA

kísérletben. A GST-WRNIP1 fehérje DNS-kötési affinitásának összehasonlítása (A) egyszálú MYC kontroll és MYC G4, (B) parciális duplex MYC kontroll és MYC G4, (C) egyszálú CEB kontroll és CEB G4, valamint (D) parciális duplex CEB kontroll és CEB G4 szubsztrátok esetében. A G4 motívumot tartalmazó szubsztrátokat 5' FITC jelöléssel láthatók (zöld), a kontroll szubsztrátok pedig 5' Cy3 jelöléssel (piros). A kontroll és G4 szubsztrátok egyenlő mennyiségben, egyszerre voltak jelen az egyes reakciókban önmagukban vagy a jelzett fehérjemennyiséggel inkubálva. A fehérje-DNS komplexben található kötött DNS mennyiségét a kép alatt százalékos formában fejeztük ki a teljes DNS mennyiséghez képest.

5. táblázat: A 19. ábrán látható, fluoreszcens anizotrópia illesztésekből számított kötési állandó (K_d), Hill-koefficiens (n), valamint p -értékek. Bizonyos esetekben (egyszálú MYC kontroll, MYC GC-gazdag kontroll, parciális duplex MYC kontroll, egyszálú CEB kontroll, valamint parciális duplex CEB kontroll) a kötési állandó értékek nem határozhatók meg pontosan, mivel túl gyenge a GST-WRNIP1 fehérje és az adott szubsztrát közötti interakció. Ezen esetekben a pontos K_d értékek hiányában a p -értékek sem kerültek meghatározásra. Az illesztéseket 3 biológiai ismétlés átlagából számítottuk, kivéve a csillaggal jelölt esetekben, ahol az ábrán jelölt mérési pontoknál 2 biológiai ismétlés átlagából számítottuk. A Hill-függvénnyel illesztett mérések esetében meghatároztuk a Hill-koefficiens (n), ami a kooperativitást jelöli. A p -értékeket kétágú Student-próbával számítottuk.

Szubsztrát		$K_d \pm$ illesztési hiba [nM]	n (Hill-koefficiens) \pm illesztési hiba	Biológiai ismétlés száma	p -érték (G4-hez képest)
MYC egyszálú	G4	184 ± 36	$0,55 \pm 0,053$	3	-
	Kontroll	> 5000	nem meghatározható	3	nem meghatározható
	GC-gazdag kontroll	> 5000	nem meghatározható	3	nem meghatározható
	C-gazdag kontroll	3496 ± 511	$0,96 \pm 0,176$	3	$<0,05$
MYC parciális duplex	G4	108 ± 45	$0,88 \pm 0,16$	3*	-
	Kontroll	> 5000	nem meghatározható	3*	nem meghatározható
CEB egyszálú	G4	65 ± 6	$0,95 \pm 0,12$	3	-
	Kontroll	> 5000	nem meghatározható	3	nem meghatározható
CEB parciális duplex	G4	221 ± 44	$1,1 \pm 0,15$	3	-
	Kontroll	> 5000	nem meghatározható	3	nem meghatározható

A G4-specifikus kötés további alátámasztása céljából fluoreszcens anizotrópia kísérletekben meghatároztuk a kötési állandó értékeket (K_d) a kontroll és a G4 szerkezetet tartalmazó DNS szubsztrátok esetében. Az EMSA kísérletekben használt egyszálú és parciális duplex MYC K és MYC G4, valamint CEB K és CEB G4 szubsztrátok mellett az Mgs1 DNS-kötési kísérletek során már bemutatott, MYC GC-gazdag kontroll és MYC C-gazdag kontrollok esetében is meghatároztuk a kötési állandókat. A kísérletekhez tartozó kötési görbék, valamint az illesztések a **19. ábrán** láthatók, az illesztések alapján számított K_d értékek pedig az **5. táblázatban** találhatók. A GST-WRNIP1 fehérje minden esetben erősebben kötötte a G4-et tartalmazó szubsztrátot, mint azok kontroll párjait. A GST-WRNIP1 fehérje az egyszálú MYC G4 szubsztrátot 184 ± 36 nM-os, a CEB G4 szubsztrátot pedig 65 ± 6 nM-os kötési állandóval kötötte. Ezzel összehasonlítva a kontroll szubsztrátok esetében, a MYC GC-gazdag kontrollt kivéve (3496 ± 511 nM), nem tudtuk pontosan meghatározni a kötési állandó értékeket, mivel az interakció ehhez túl gyenge volt.

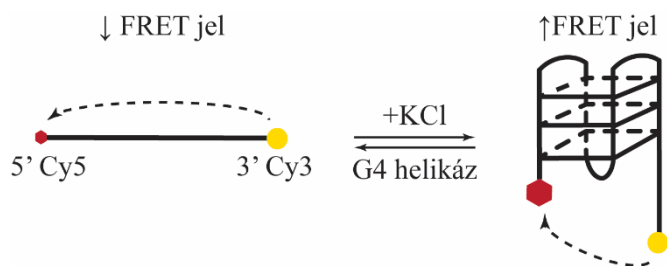


19. ábra: Fluoreszcens anizotrópia kísérletekben mért kötési görbék illesztései tisztított GST-WRNIP1 fehérje és 5' fluoreszceinnel jelölt egyszálú vagy parciális duplex MYC (A-D) és CEB (E-F) szubsztrátokkal. (A) Egyszálú MYC G4 és MYC kontroll, (B) parciális duplex MYC G4 és MYC kontroll, (C) egyszálú MYC G4 és MYC GC-gazdag kontroll és (D) egyszálú MYC G4 és C-gazdag kontroll, (E) egyszálú CEB G4 és CEB kontroll, valamint (F) parciális duplex CEB G4 és CEB kontroll. A szórások 3 vagy több biológiai ismétlés átlagát jelölik (kivéve a B panelen a csillaggal jelölt pontok 2 biológiai ismétlés átlagát jelölik). Az ábrán látható illesztésekből meghatározott K_d értékek az 5. táblázatban láthatók.

Ezen szubsztrátok esetében (egyszálú MYC kontroll, MYC GC-gazdag kontroll, CEB kontroll) a kötési állandó értéke 5000 nM felett van. Parciális duplex MYC G4 esetén a kötési állandó 108 ± 45 nM, CEB G4 szubsztrátnál pedig 221 ± 44 nM volt. Az egyszálú kontroll szubsztrátokhoz hasonlóan a parciális duplex kontroll szubsztrátoknál sem tudtuk pontosan megállapítani a kötési állandókat a gyenge kötés miatt. A kötési állandó értékeket ezen esetben is 5000 nM feletti értékre becsüljük (parciális duplex MYC kontroll, CEB kontroll). Irodalmi adatokból ismert, hogy a WRNIP1 fehérje homo-oktamer formában van jelen [147], azonban a DNS-kötési mérések során a Hill-függvény illesztése során kapott Hill-együtthatók (n) alapján nem tapasztaltunk pozitív kooperativitást. A GST-Mgs1 fehérjénél látható eredményekhez hasonlóan a GST-WRNIP1 fehérje esetben sem volt kooperativitás a legtöbb DNS-szerkezet kötése során ($n \approx 1$). Az egyszálú MYC G4 kötés esetében moderált negatív kooperativitást tapasztaltunk szemben a duplex MYC G4-gyel.

5.2.2. A WRNIP1 fehérje kötése megváltoztatja a G4 szerkezetet

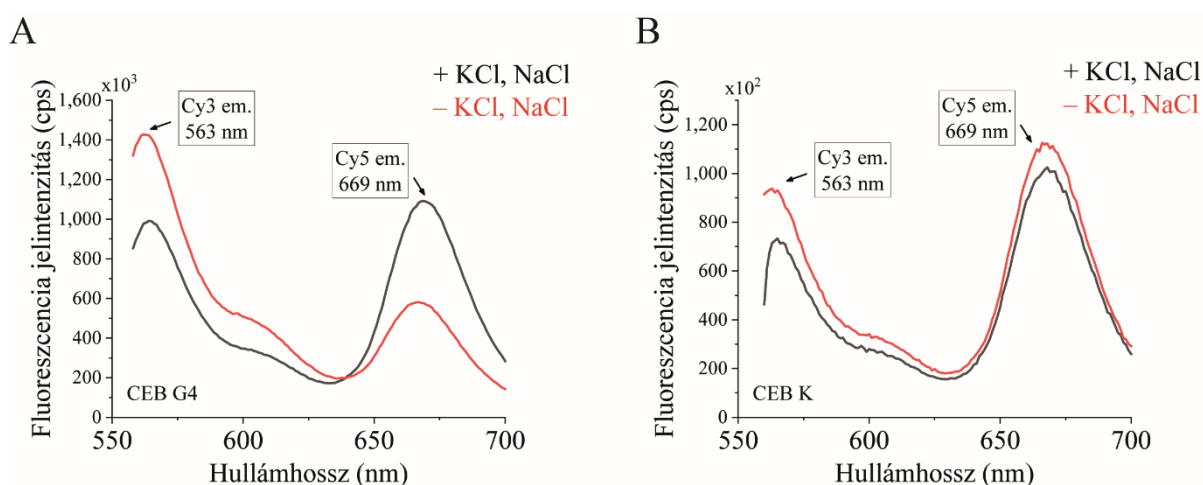
Az előzőekben bemutattuk, hogy mind az Mgs1, mind a WRNIP1 fehérje nagy affinitással és specifikusan köt a G4 szerkezetekhez. Ezután FRET (Förster resonance energy transfer, Förster-féle rezonáns energiaátadás) kísérlet segítségével megvizsgáltuk, hogy a WRNIP1 fehérje képes-e megváltoztatni a G4 szerkezetet. Ehhez egy 5' Cy5- és 3' Cy3-jelölt, CEB G4 szekvenciát tartalmazó egyszálú DNS-t használtunk. Jelen esetben a Cy3 a donor fluorofór, amelyet gerjesztünk, és a Cy5 az akceptor fluorofór, amelyet a Cy3 emissziós energiája gerjeszt. Amennyiben a DNS szubsztrát felveszi a G4 szerkezetet, a két fluorofór közötti távolság csökken, és elég közel kerülnek egymáshoz, hogy megtörténjen az energiaátadás. Azonban, ha a G4 szerkezet nem alakul, a fluorofórok túl messze kerülnek egymástól, így a FRET-jel jóval alacsonyabb lesz (20. ábra).



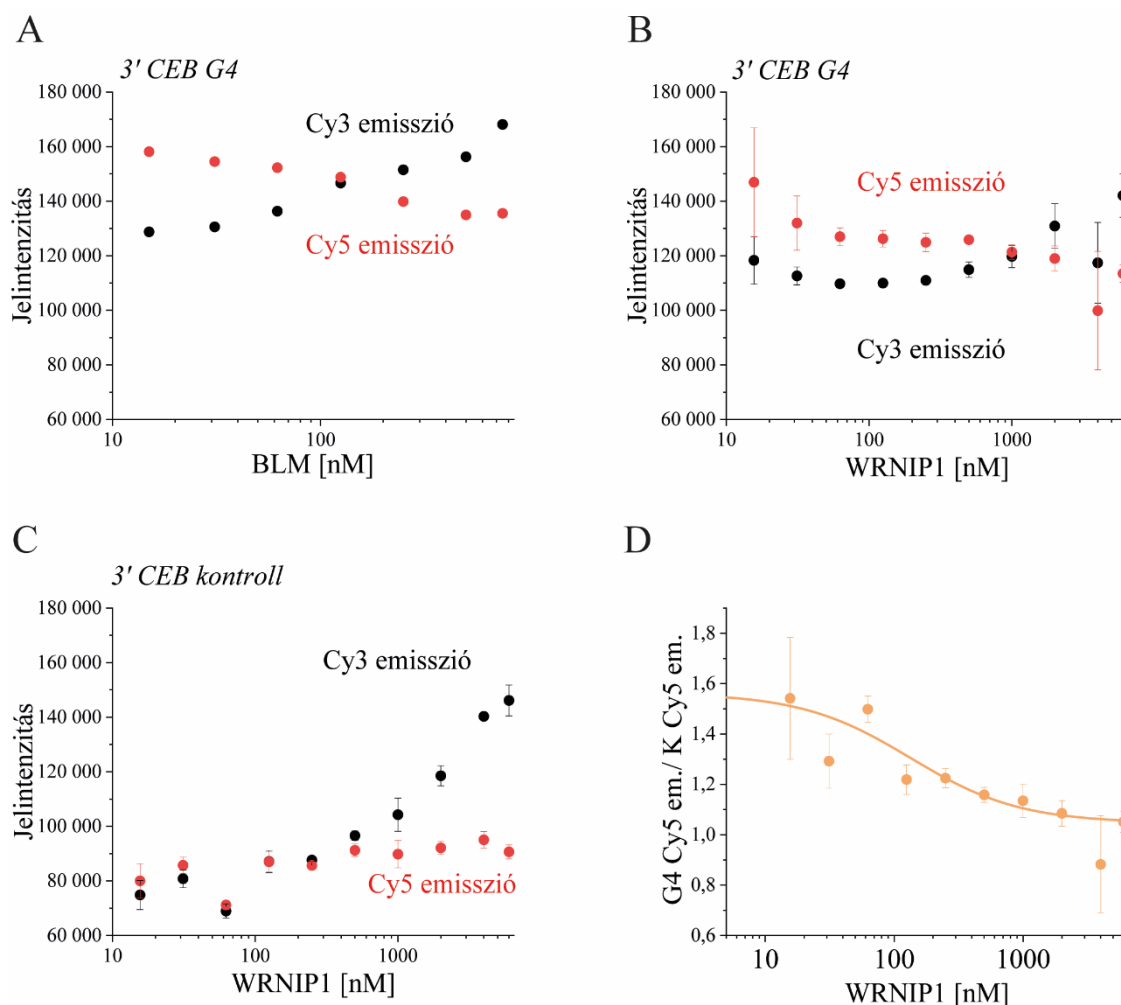
20. ábra: A FRET kísérlet sematikus ábrázolása. Amennyiben DNS szál nem veszi fel a G4 szerkezetet, a Cy3 (sárga) és Cy5 (vörös) fluorofórok távol vannak egymástól és nem történik meg az energiaátadás (bal). Ha kialakul a G4 szerkezet, a fluorofórok megfelelő távolságba kerülnek az energiaátadáshoz és az általunk gerjesztett Cy3 fluorofór gerjeszteni fogja a Cy5 fluorofórt (jobb).

A két állapot között dinamikus egyensúly van, amelyet különböző környezeti tényezők befolyásolhatnak, például a K^+ ionok vagy G4 helikázok jelenléte. Az ábra a [60]-as tanulmányában található ábra alapján készült.

A kísérlet során egy CEB25 miniszatellita szekvenciát tartalmazó szubsztrátot használtunk, amelyben a G4 az oligonukleotid 5' végén helyezkedett el, amit egy 3' túlnyúló egyszálú szakasz követett (**2. táblázat, 20. ábra**). Először ellenőriztük a FRET jel meglétét, ehhez sót (KCl, NaCl) tartalmazó, valamint sót nem tartalmazó pufferben végeztük a kísérletet (**21. ábra**). Mivel a G4 stabilizáláshoz szükségesek az egyértékű kationok, ezért K^+ jelenléte nélkül a másodlagos szerkezet nem tud kialakulni. A spektrumon jól látható, hogy só hiányában (piros) nincs energiaátadás, a Cy5 jel alacsony marad, azonban egyértékű kationok jelenlétében (fekete) jelentősen megnő a Cy5 emissziós maximumának jelintenzitása (669 nm) (**21.A ábra**). Mivel a fehérje DNS-interakció befolyásolhatja a fluorofór viselkedését, ezért ezen hatás kizárásnak érdekében a méréseket egy CEB kontroll szubsztráttal is elvégeztük. Ebben a szubsztrátban a G4-et alkotó nukleotidokat más nukleotidokra cseréltük, így a CEB kontroll szubsztrát nem tud G4-et formálni. A **21.B ábrán** látható, hogy a CEB K szubsztrát esetében KCl és NaCl hozzáadására sem tapasztalható a Cy5 jel emissziós maximumának növekedése, azonban a vártnál magasabb Cy5 emissziós intenzitást tapasztaltunk. Ez valószínűleg a két szubsztrát közötti különbségnek, valamint a CEB K szubsztrát szerkezetének köszönhető.



21. ábra: (A) 3' CEB G4 és (B) 3'CEB K szubsztrát emissziós spektruma KCl és NaCl jelenlétében (fekete), valamint KCl és NaCl hiányában (piros). A Cy3 emissziós maximuma 563 nm-en látható, a Cy5 emissziós maximuma pedig 669 nm-en. A G4 szubsztrát esetében, ha kialakul a G4 szerkezet (egyértékű kationok jelenlétében), lehetővé teszi a Cy3 és a Cy5 közötti energiaátadást, ami a Cy5 emissziós intenzitásának növekedéséhez vezet. A kontroll szubsztrát esetében egyértékű kationok jelenlétében sem alakul ki a szerkezet, így nem jöhet létre az energiátadás és a Cy5 emissziós intenzitása nem változik.



22. ábra: A WRNIP1 fehérje megváltoztatja a CEB G4 szerkezetet. (A) Cy3 és Cy5 emissziós maximumának jelintenzitása BLM koncentrációjának függvényében ábrázolva; Cy3 és Cy5 emissziós maximumának jelintenzitása GST-WRNIP1 koncentrációjának függvényében ábrázolva (B) CEB G4 szubsztrát esetében és (C) CEB kontroll szubsztrát esetében, (D) CEB G4 Cy5 emissziós maximum és CEB K Cy5 emissziós maximum hányadosa GST-WRNIP1 koncentrációjának függvényében ábrázolva.

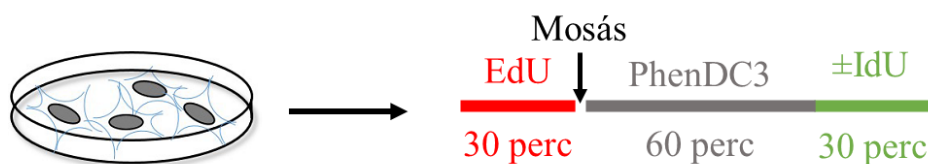
Miután megbizonyosodtunk róla, hogy a CEB G4 szubsztrát megfelelő FRET-jelet ad, megvizsgáltuk, hogy a WRNIP1 fehérje képes-e megváltoztatni a G4 szerkezetet. Állandó koncentrációjú FRET szubsztráthoz (12,5 nM) növekvő mennyiségű GST-WRNIP1 fehérjét adtunk, és a méréshez a Cy3 fluorofórt 548 nm-en gerjesztettük. Az emissziós spektrumot 560 nm és 700 nm között vettük fel. Ellenőrzésképp egy ismert G4-kicsavaró helikázzal, a BLM helikázzal [106,108,166] végeztünk méréseket a CEB G4 szubsztráton (**22.A ábra**). Az ábrán a Cy3 (563 nm) és Cy5 (669 nm) emissziós maximumait ábrázoltuk BLM koncentráció függvényében. Az ábráról leolvasható, hogy míg a Cy3 emissziós maximumán mért jelintenzitás együtt nő a fehérjekoncentrációval (vagy a fehérje és a DNS közötti interakció eredményeként vagy a fellazuló G4 szerkezet miatt), addig a Cy5 emissziós maximuma csökken. A CEB G4 szubsztrátnál tapasztalható Cy5 jel csökkenése feltehetőleg arra utal, hogy

a G4 szerkezet fellazult, a két fluorofór távolabb került egymástól, és így csökken a Cy5 felé irányuló energiaátadás hatékonysága. Ezután GST-WRNIP1 fehérjével is végeztünk méréseket az említett CEB G4 szubsztráton (**22.B ábra**) valamint a CEB K szubsztráton is (**22.C ábra**). A CEB K szubsztráttal azért végeztünk méréseket, hogy elkerüljük a fehérje-DNS interakcióból származó, DNS-szerkezetet nem érintő fluorofór jelváltozás nem megfelelő értelmezését. A BLM méréshez hasonlóan, a G4 szubsztrát esetében a Cy5 jel is itt arányosan csökkent a GST-WRNIP1 koncentrációjának növekedésével (ATP jelenlétében és hiányában azonos mértékű volt a jelváltozás, a grafikonon az ATP- mintát ábrázoltuk). Azonban megfigyelhető, hogy még magasabb WRNIP1 koncentrációnál sem volt tapasztalható akkora mértékű jelváltozás, mint alacsonyabb BLM koncentráció esetében. Ez a BLM esetében hatékonyabb G4-kicsavarásra utal. Ellenben, a CEB K szubsztrátnál a Cy5 emissziós maximumán mért jelintenzitás állandó marad, mivel nincs a G4 szerkezet fellazulásához hasonló léptékű szerkezetváltozás és a fluorofórok távolsága nem változik jelentősen. Továbbá ez alapján a WRNIP1 kötődése nem befolyásolja a Cy5 fluorofór spektrális sajátosságait. Azonban megfigyelhető, hogy a Cy3 jel jelentősen emelkedik a WRNIP1 kötődés hatására mind a CEB G4, mind a CEB K esetében. A FRET hatás számszerűsítéséhez, a normalizált CEB G4 Cy5 és CEB K Cy5 jelszintek arányát ábrázoltam (**22.D ábra**). Ezen ábrázolás alapján látható, hogy a GST-WRNIP1 mennyiségének növelésével arányosan csökken a Cy5 jel intenzitása, tehát megállapíthatjuk, hogy CEB G4 szubsztrát esetében GST-WRNIP1 jelenlétében megváltozik a DNS szerkezete.

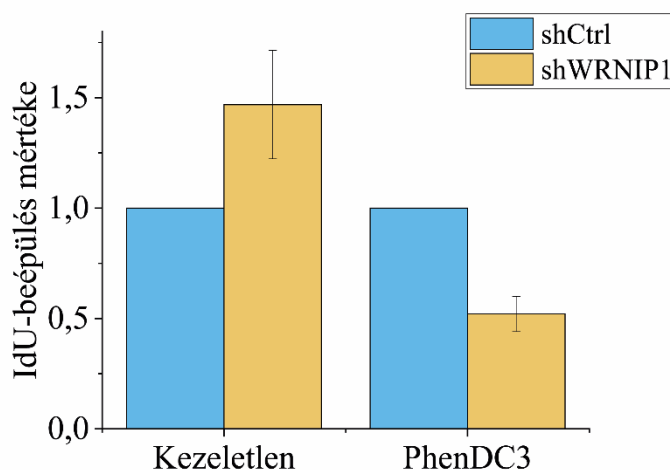
5.2.3. A WRNIP1 részt vesz a G4 szerkezetek replikációjában

Az *in vitro* kísérleteink eredményei bizonyítják, hogy a WRNIP1 fehérje nagy affinitással és preferenciálisan köt a G4 szerkezetekhez, ezért megvizsgáltuk, hogy a WRNIP1 *in vivo* hogyan hat a G4 szerkezetek replikációjára. Ezekhez a vizsgálatokhoz shRNS-sel csendesített WRNIP1-csendesített emberi sejtkultúrát használtunk, amelyeket HT1080 sejtekben hoztunk létre. Első lépésként megvizsgáltuk, hogy a WRNIP1 mennyiségének csökkenése hogyan befolyásolja a replikációs villa haladásának a sebességét. Kontroll (shCtrl) és WRNIP1-csendesített (shWRNIP1) sejteket 10 μ M PhenDC3-mal kezeltük, amely egy ismert G4-stabilizáló molekula, és vizsgáltuk az IdU beépülésének mértékét. A kísérleti elrendezést a **23. ábra** szemlélteti. A kezeltlen WRNIP1-csendesített mintákban váratlan módon megemelkedett az IdU-beépülés mértéke. Ennek magyarázata az lehet, hogy a WRNIP1 szabályozó funkciójának hiányában megemelkedett, de kontrollálatlan DNS szintézis folyik.

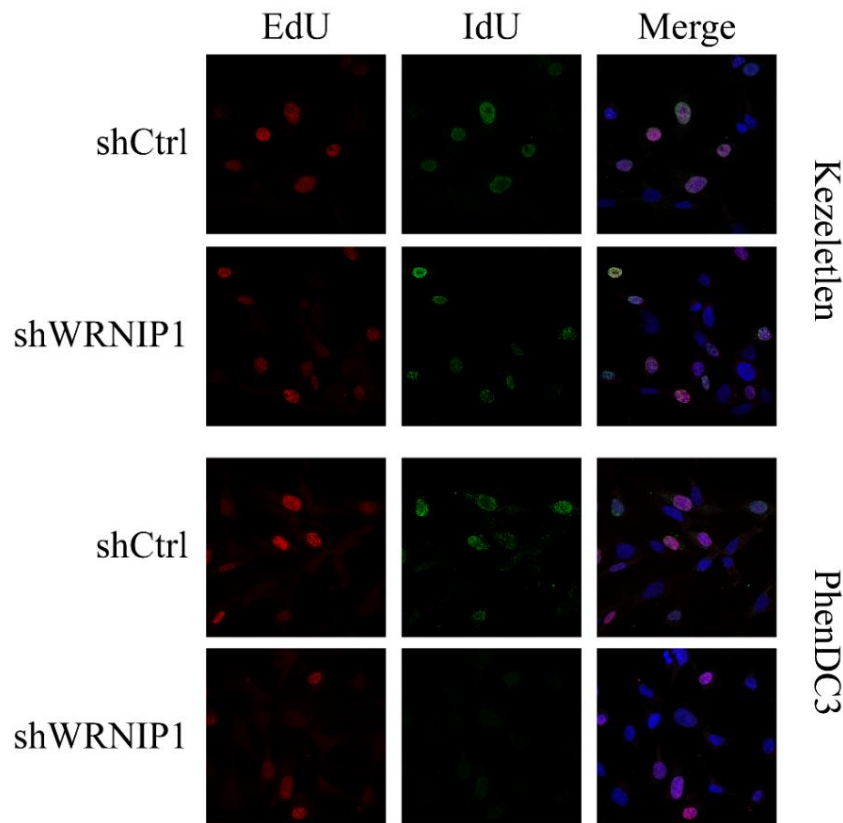
Ugyanakkor, PhenDC3-kezelés hatására a WRNIP1-csendesített sejtekben nagy mértékben lecsökkent az IdU-beépülés mértéke a kezelt kontroll sejtekkel összehasonlítva (**24. ábra**). Ez az eredmény arra utal, hogy a WRNIP1 fehérje részt vehet a G4 szerkezetek replikációjában és hiányában lelassul a G4 szerkezetek replikációja. A kísérletből származó reprezentatív képeken is jól látható, hogy a WRNIP1-csendesített PhenDC3-mal kezelt mintákban nagy mértékben csökkent az IdU-beépülés (**25. ábra**).



23. ábra: EdU és IdU beépülésének sematikus ábrázolása a replikáció sebességének vizsgálatához. A sejteket 30 percig EdU-val jelöljük, mossuk, majd 60 perc PhenDC3-kezelés és 30 perc IdU-jelölés következik.



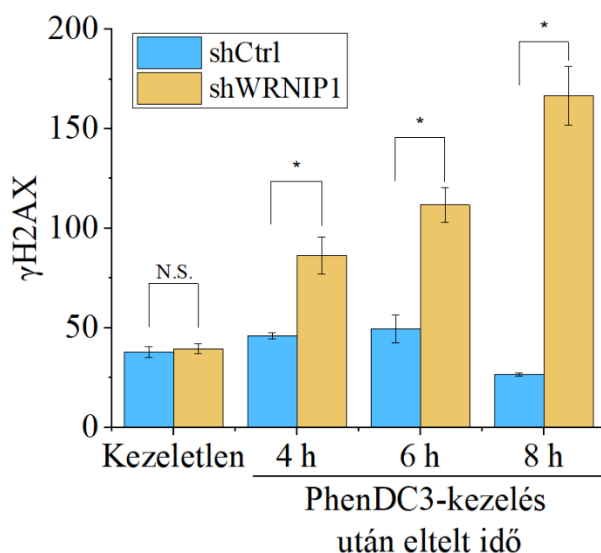
24. ábra: A WRNIP1-csendesített sejtekben PhenDC3-kezelés hatására lecsökken a replikáció sebessége. A replikáció sebességét EdU/IdU-beépülés követésével vizsgáltuk kontroll (shCtrl) és WRNIP1-csendesített (shWRNIP1) sejtekben 10 μ M PhenDC3-kezelés hatására vagy anélkül. Mintánként 100 darab sejtet vizsgáltunk. A szórások 3 biológiai ismétlés átlagát jelölik.



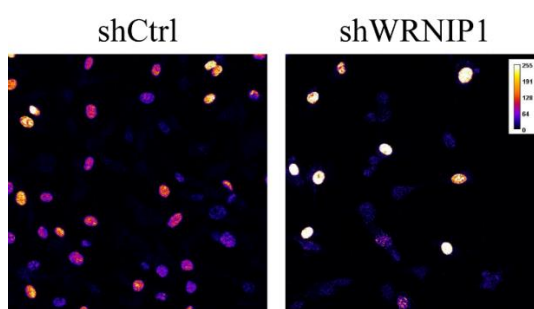
25. ábra:A 24. ábrán látható, a replikáció sebességét vizsgáló kísérletből származó reprezentatív képek. Az ábrán az EdU- és IdU-beépülés látható kontroll (shCtrl) és WRNIP1-csnesített (shWRNIP1) sejtkben kezelés nélkül, valamint PhenDC3-kezelés után. EdU–piros, IdU–zöld. Az IdU-beépülést anti-IdU anittestekkel jelöltük, az EdU-beépülést Click-IT Kit segítségével vizualizáltuk, a sejtmagokat pedig Hoechst-festéssel jelöltük.

Amennyiben a WRNIP1 hiányában probléma tapasztalható a G4 szerkezetek replikációjában, az a replikációs villa elakadását okozhatja a G4 szerkezetek előtt. Emiatt kettős szálú törések alakulhatnak ki, amelyek genominstabilitást okozhatnak [55–57]. A H2AX kettős szálú törés hatására foszforilálódik a 139-es szerinen, amely formáját γ H2AX-nek hívjuk. A γ H2AX mennyisége jól jelzi, ha a sejtben megnő a DNS szál-törések száma. Mivel kimutattuk, hogy a WRNIP1-nek szerepe lehet a G4 szerkezetek replikációjában, ezért megvizsgáltuk, hogy WRNIP1-csnesített sejtekben megnő-e a γ H2AX mértéke. Kezeletlen mintáknál a WRNIP1-csnesített (shWRNIP1) sejteknél nem volt szignifikáns változás tapasztalható a kontroll sejtekhez viszonyítva (shCtrl). Azonban a 10 μ M PhenDC3-mal kezelt sejtek estében, a WRNIP1-csnesített sejtekben jelentősen megnőtt a γ H2AX mennyisége a kontrollhoz viszonyítva mindhárom vizsgált mérési pont esetében (4, 6 és 8 óra) (26. ábra). Habár a kontroll sejtekben is kissé megnőtt a γ H2AX mennyisége, azonban 8 órával a kezelés után már visszaállt az enyhén megnövekedett γ H2AX szint az alapállapotra. Ugyanakkor a WRNIP1-csnesített mintákban a γ H2AX szintje továbbra is magas maradt, sőt a korábbi

mintavételi időpontokhoz viszonyítva is tovább emelkedett. Ez az eredmény arra utal, hogy a WRNIP1 szerepet játszhat a DNS kettősszalú törések kialakulásában és azok javításában is. A kísérletből származó, reprezentatív sejtek a **27. ábrán** láthatók.



26. ábra: A WRNIP1-csendesített sejtekben megnő a kettősszalú DNS törések száma PhenDC3-kezelés hatására. Az ábrán a γ H2AX mértéke látható kezeletlen, valamint 10 μ M PhenDC3-mal kezelt kontroll (shCtrl) és WRNIP1-csendesített (shWRNIP1) sejtek esetében a kezelést követően 4, 6 és 8 órával. A WRNIP1-csendesített sejtekben szignifikánsan megnő a γ H2AX mértéke PhenDC3-kezelés hatására a kontroll sejtekhez viszonyítva. A szórások 3 biológiai ismétlés átlagát jelölik, a statisztikai analízist Student-féle t-próbával végeztük (N.S. – nem szignifikáns, * $p < 0,05$).

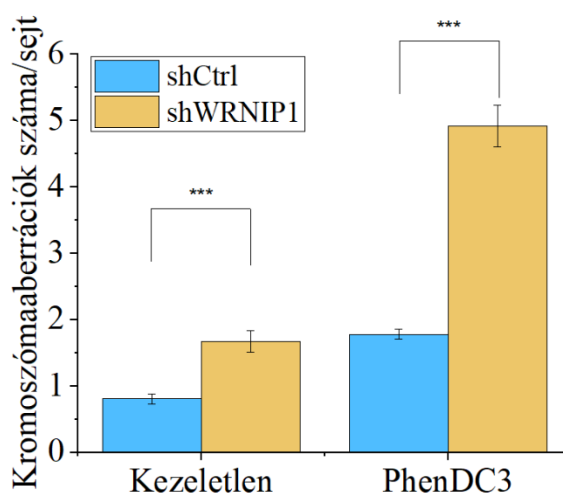


8 órával a PhenDC3-kezelés után

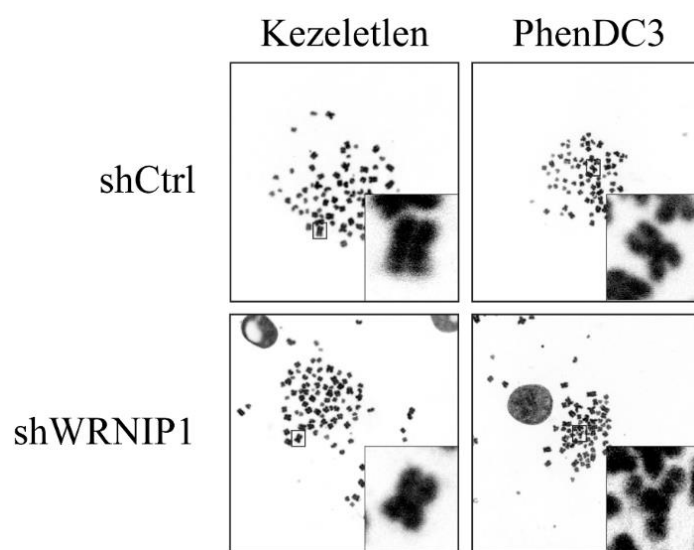
27. ábra: A 26. ábrán látható, kettősszalú DNS töréseket vizsgáló kísérlet reprezentatív képei 8 órával a PhenDC3-kezelés után. A képeken a γ H2AX intenzitása látható, amelyeket ImageJ szoftver segítségével kvantitáltunk.

5.2.4. A WRNIP1 fehérjének fontos szerepe van a kromoszómaintegritás megőrzésében

Az előző kísérleti eredmények fényében, miszerint a WRNIP1-csendesített sejtekben jelentősen lelassult a G4 szerkezetek replikációja és megnőtt a G4 szerkezetek jelenlétéhez kapcsolódó kettős szálú törések száma, azt is megvizsgáltuk, hogy ezek a folyamatok okoznak-e változást a kromoszómák szerkezetében. A sejteket 10 μ M PhenDC3-mal kezeltük, a kromoszómákat preparáltuk, majd összehasonlítottuk a kezelt sejtek kromoszómaikat. A kontroll sejtekben (shCtrl) jelentősen kisebb számú kromoszómatörés volt látható, mint a WRNIP1-csendesített sejtekben (28. ábra). Kezeletlen minták esetében a WRNIP1-csendesített sejtekben (shWRNIP1) a kontroll (shCtrl) mintákhoz képest 2-szer több kromoszómatörés volt mérhető. Ez az érték PhenDC3-mal kezelt minták esetén 2,8-szor volt több WRNIP1-csendesített sejtek esetén. A kísérlet során preparált reprezentatív kromoszómák a 29. ábrán láthatók.



28. ábra: WRNIP1-csendesített sejtekben megnő a kromoszómaaberrációk száma PhenDC3-kezelés hatására. Kontroll (shCtrl) és WRNIP1-csendesített (shWRNIP1) sejtekben vizsgáltuk a kromoszómaaberrációk számát PhenDC3-kezelés hatására vagy anélkül. Mintánként 40 sejtet vizsgáltunk meg. A szórások 3 biológiai ismétlés átlagát jelölik, a statisztikai analízist Student-próbával végeztük (***) $p < 0,001$.



29. ábra: A 28. ábrán látható, kromoszómaaberrációt vizsgáló kísérletből származó reprezentatív képek. Kontroll (shCtrl) és WRNIP1-csendesített (shWRNIP1) sejtekben vizsgáltuk a kromoszómaaberrációk számát PhenDC3-kezelés hatására vagy anélkül.

6. Eredmények megvitatása

Minden sejt számára alapvető fontosságú saját örökítőanyaguk pontos másolása. A hibás másolás a sejt hibás működését okozhatja, ami sejthalált, vagy többsejtű élőlényekben rákos elváltozást is okozhat. Ugyanakkor a hibás másolás egyben az evolúció motorja is. A replikáció során a replikációt végző fehérjekomplex működését két tényező gátolhatja és kényszerítheti hibák generálására: ha sérült a templát DNS, vagy ha a templát valamilyen másodlagos struktúrát vesz fel. Munkánk során a másodlagos szerkezetek által okozott replikációs stresszt vizsgáltuk, mivel ez külső hatásoktól független és a genom szerkezetéből adódó, a sejtekben minden osztódásánál fennálló probléma. Kísérleteinkben a G-kvadruplex szerkezetet használtuk modellként, mint az egyik leggyakoribb és legjobban tanulmányozott másodlagos struktúrát. Mivel a G4 szerkezet nagyon komoly replikációs blokádot okoz (biokémiai kísérletekben kimutatták, hogy a DNS polimerázok egyedül nem képesek nukleotidot beépíteni ilyen szerkezeteket tartalmazó templáttal szemben [115,123–125], ezért arra számítanánk, hogy az evolúció során ennek a szerkezetnek a mennyisége csökken, így segítve a nagy komplex genomok hatékonyabb és pontosabb másolását. Valójában ennek az ellenkezője igaz. Az evolúció előrehaladtával a potenciálisan G4 szerkezetet formáló szekvenciák mennyisége a genomban nem csak számszerűleg nő, hanem azok százalékos mennyisége is a genom teljes méretéhez viszonyítva [44]. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a G4 szerkezetek valamilyen fontos szerepet töltenek be a genomokban/genomunkban. A G4 szerkezetek egy régóta ismert és alaposan tanulmányozott formája a telomer. A kromoszómák végén található telomerikus ismétlődő szekvenciák (5'-TTAGGG-3') először kettősszálú, majd a kromoszómák legvégén egyszálú formában vannak jelen. Az egyszálú telomerikus ismétlődő szekvencia pedig G-kvadruplex szerkezetet formál, ami biztosítja a kromoszómavégek stabilitását, ellenállását a nukleázokkal szemben, illetve hogy a sejt DNS-javító mechanizmusai ne kettős szálú törésként azonosítsák a kromoszómavégeket [11,46]. Azonban, azt csak az utóbbi időben fedezték fel, hogy a nagy mennyiségben előforduló intrakromoszómális, azaz kromoszómán belül elhelyezkedő G4 szerkezetek számos esszenciális sejtmagi folyamatban részt vesznek, például szabályozzák a transzkripciót, transzlációt, részt vesznek a DNS replikáció iniciációjában, valamint az IgG gének hiperrekombinációjában [45]. Ezek fényében már érthető, hogy a G4 szerkezetek mennyisége miért dúsul fel a magasabb rendű eukarióta élőlények genomjában, hiszen ezen élőlényeknek komplexebb génexpressziós szabályozásra van szükségük, és az eddigi eredmények alapján ebben a G4 szerkezetek fontos szerepet játszhatnak. Ennek eredményeként viszont előáll az a kettős helyzet, hogy a genomban nagy

menyiségű replikációt gátló DNS struktúra található, amelyeknek pontos replikációja létfontosságú a sejt túléléséhez és normális működéséhez. Bár ez a felismerés már megszületett, mégis nagyon keveset tudunk a G4 szerkezetek replikációjáról. Eddig többnyire a G4 kicsavarását végző DNS helikázok azonosítása és a G4 szekvenciák átírásában résztvevő DNS polimerázok utáni kutatások voltak az érdeklődés középpontjában [11,45,124,129,167,168]. Ugyanakkor, mivel egy vad típusú sejt normális működés során nagyon hatékonyan és pontosan másolja G4 szerkezeteket, nyilvánvaló, az említett helikázok és polimerázok összehangoltan működnek. Munkánk során olyan G4-kötő fehérjét/fehérjéket szerettünk volna azonosítani, amelyek részt vehetnek a G4 szerkezetek replikációjának szabályozásban.

Munkánk során az élesztő Mgs1 és a humán WRNIP1 fehérjéket vizsgálatuk, amelyeket az alábbi okok miatt választottunk:

1. Számos ponton kapcsolatban állnak a replikációt végző fehérjekomplexszel (DNS polimeráz δ [144,145,147], Ub-PCNA interakció [141], genetikai kapcsolat az élesztő Rad18 génnel [142,157]).
2. Kapcsolatban állnak DNS helikázokkal, amelyek G4-kicsavaró funkcióval is rendelkeznek (WRNIP1–WRN interakció[146], BLM és WRNIP1 hasonló funkciókkal rendelkeznek [159]).
3. Az élesztő mgs1 gén deléciója G4 replikációval összefüggő fenotípust okoz (rRNS gének hiperrekombinációja) [134].
4. Külföldi kollaborátoraink élesztő egyhibrid kísérletben, amelyben G4-kötő fehérjéket kerestek, az élesztő Mgs1-et pozitív találatként azonosították (ezt a kísérletet jelen dolgozat nem tartalmazza) [161].

Vizsgálataink során a GST-Mgs1 és GST-WRNIP1 fehérjéket élesztőből tisztítottuk (**11. ábra, 17. ábra**), és kompetíciós EMSA kísérletben kimutattuk, hogy az élesztő Mgs1 fehérje és az emberi WRNIP1 fehérje egyaránt nagy affinitással és specifikusan kötik a G4 szerkezetet tartalmazó DNS szubsztrátokat. Ez az eredmény az egyszálú, valamint parciális duplex G4 szerkezetet tartalmazó DNS szubsztrátok esetében egyaránt igaz volt (**12. ábra, 13. ábra, 18. ábra**). Továbbá kimutattuk, hogy az Mgs1–G4 interakció ATP- és Mg^{2+} -független (**15. ábra**). Emellett, az irodalmi adatokkal megegyezően a DNS jelenléte gyengén stimulálta az Mgs1 ATP-áz aktivitását [134], de a G4 szerkezet a stimulálást tovább nem befolyásolta (**16. ábra, 4. táblázat**). Fluoreszcens anizotrópia kísérletekben meghatároztuk az Mgs1 és a WRNIP1 fehérjék, valamint a G4 szerkezetet tartalmazó és a G4 szerkezet nem tartalmazó (kontroll) DNS szubsztrátok közötti kötési állandókat (K_d értékeket). Az Mgs1 fehérje és a WRNIP1 fehérje is preferenciálisan köti a G4 szerkezetet tartalmazó

szubsztrátokat azok kontroll párjaival összehasonlítva (**14. ábra, 3. táblázat, 19. ábra, 5. táblázat**). Az Mgs1 fehérje esetében a kötési állandóban mért különbség a G4 szubsztráthoz viszonyítva 33–40-szeres volt egyszálú, és 3–8-szoros parciális duplex szubsztrát esetében. Korábban egy tanulmányban vizsgálták az Mgs1 fehérje DNS-kötési affinitását. Itt EMSA kísérletekkel kimutatták, hogy a fehérje a vizsgált szubsztrátok közül (kétszálú, nicket tartalmazó kétszálú, parciális duplex, 5' és/vagy 3' flapet tartalmazó kétszálú DNS) a parciális duplexet kötötte a legerősebben [140]. Kísérleteink eredményeiből láthatjuk, hogy a kötés erősségét a G4 jelenléte tovább erősítette. A WRNIP1 fehérje esetében a WRNIP1 és kontroll szubsztrátok közötti gyenge interakció miatt a K_d értékeket nem tudtuk pontosan meghatározni, azonban egyszálú szubsztrát esetében a G4 szubsztráthoz viszonyítva a legalacsonyabb különbség 19-szeres, a legmagasabb pedig minimum 77-szeres volt; parciális duplex esetén a G4 szubsztráthoz viszonyítva ez a különbség minimum 47-szeres volt. A WRNIP1 fehérje esetében ismert, hogy a hosszú egyszálú DNS-t (120 nt) és a parciális duplexet gyengébben, míg a replikációs villához hasonló szerkezetet (kétszálú karokat tartalmazó Y-villa) erősebben köti [151,152]. Az Mgs1-hez hasonlóan a G4 motívum jelenléte a WRNIP1 estében is megnövelte a kötési erősséget a parciális duplex szubsztráton. Habár korábban kimutatták, hogy a WRNIP1 fehérje homo-oktamer formában lehet jelen az emberi sejtekben [147], a DNS-kötési kísérletek eredményeinek illesztése során nem tapasztaltunk kooperativitást (**5. táblázat**).

Mivel a G4 szerkezet blokkolja a replikációt és transzkripciót, és a WRNIP1 fehérje ezt a struktúrát köti specifikusan, felmerült a kérdés, hogy a fehérje képes-e megváltoztatni a G4 szerkezetet így csökkentve a polimerázokra gyakorolt blokkoló hatást. Ennek vizsgálatához FRET kísérletet végeztünk, amelyben kimutattuk, hogy a WRNIP1-CEB G4 interakció szerkezeti változást okoz a G4 szerkezetet tartalmazó szubsztráton. A fehérje kötésekor tapasztalható alacsonyabb FRET-jel alapján a WRNIP1 fehérje megváltoztatja, és nagy valószínűséggel fellazítja a DNS szubsztráton lévő G4 szerkezetet (**22. ábra**).

Mivel *in vitro* vizsgálatainkban az élesztő Mgs1 és a humán WRNIP1 fehérje is egy G4 struktúrát kötő fehérjének bizonyult, felmerült a kérdés, hogy *in vivo* ezen fehérjék milyen szerepet játszanak a G4 replikációban. Németországi kollaborátorunk, Katrin Paeschke laboratóriumából származó eredmények bizonyították [161], hogy az Mgs1 fehérje nagy mennyiségben jelen van G4 szerkezetet tartalmazó kromoszómarégiókon. Emellett *mgs1Δ* *S. cerevisiae* sejtekben PhenDC3-kezelés hatására szignifikánsan megnőtt a sejtek megkettőződésének időtartama a vad típusú kezelt sejtekkel összehasonlítva, valamint megnőtt a nagy kromoszómális átrendeződések gyakorisága és a kettősszálú törések száma a G4-et

tartalmazó régiókban. Azt is kimutatták, hogy az Mgs1 asszociációja a G4 gazdag kromoszómarégiókhoz nagyban függ a Pif1 DNS helikáztól és független az Sgs1 helikáztól. Ez arra utal, hogy az Mgs1 és a Pif1 DNS helikáz együttműködik a G4 szerkezetek replikációjában, így azt a modellt feltételezi, hogy a Pif1 DNS helikáz (vagy más, eddig nem azonosított faktor) ismeri fel a G4 szerkezetet. Az Mgs1 a Pif1 helikáz interakciós partnereként (akár alegységeként) kerül a G4 szerkezethez, ahol a G4 kötéssel stabilizálja helyzetét, majd amíg a Pif1 helikáz kicsavarja a G4 szerkezetet addig az Mgs1 odatoborozza a replikációs komplexet, hogy a még kicsavart állapotú G4 szerkezetet alkotó szekvencia replikációja hatékonyan végbemenjen. Természetesen jelen állapotban ez a modell még csak hipotézis, de dolgozunk a folyamat pontos megértésén.

A humán WRNIP1 fehérje szerepének vizsgálatához a G4 replikációban humán sejt kultúrában shRNS expresszióval csendesítettük a WRNIP1 fehérje kifejeződését, majd ezeket a sejteket több kísérleti elrendezésben is vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy az általunk használt kísérleti rendszerben a WRNIP1 csendesítése önmagában nem okozott nagy változást a replikáció sebességében, illetve nem emelkedett meg szignifikáns mértékben a kettős szálú lánc törések mennyisége sem, amelyek a hosszú időre elakadt replikációs villát jelzik. Ugyanakkor a WRNIP1-csendesített sejtekben G4-stabilizáló PhenDC3-kezelés hatására jelentősen lecsökkent a replikáció sebessége a PhenDC3-mal kezelt kontroll sejtekhez képest (**24. ábra, 25. ábra**). Ennek megfelelően, a replikációs villa gyakori és hosszas elakadása miatt, nagymértékben megemelkedett a kettős szálú lánc törések száma (**26. ábra, 27. ábra**). Kiemelten érdekes, hogy habár a vad típusú, PhenDC3-mal kezelt sejtekben is megfigyelhető nagyon kis mértékű emelkedés a kettős szálú lánc törések mennyiségében, azok mennyisége a kezelést követő 8. óra után visszaáll a kezletlen állapot szintjére. Ezzel szemben a WRNIP1-csendesített sejtekben a kezelés utáni 8. óráig folyamatosan nő a kettős szálú lánc törések száma. Ennek egyik oka lehet, hogy a replikációs villa elakadása miatt újabb, alternatív replikációs origók aktiválódnak, amelyek azután a G4 szerkezeteknél szintén elakadnak, tovább növelve a kettős szálú törések számát. A kettősszálú törések folyamatos növekedésének másik oka pedig az lehet, hogy mivel a WRNIP1 fehérje szerepet játszhat a rekombináció folyamatában is, így a sejt a keletkezett kettősszálú lánc töréseket nem tudja megfelelő ütemben kijavítani. Az, hogy pontosan mi történik a WRNIP1-hiányos sejtekben a stabilizált G4 szerkezetek replikációja során további vizsgálatok tárgyát képezi. Különösen annak fényében, hogy a WRNIP1 fehérje interakciós partnere, a Werner (WRN) helikáz képes a G4 szerkezetek feloldására *in vitro*. A WRN és esetleg más RecQ helikázok szerepének vizsgálata ebben a rendszerben egy érdekes és előremutató lépése

lehet annak, hogy feltárjuk a G4 replikáció szabályozásának működését. Kimutattuk továbbá azt is, hogy a WRNIP1-hiányos sejtekben történő PhenDC3 kezelésnek köszönhetően lelassult replikációnak és az emiatt kialakuló kettős szálú törések nem maradnak következmények nélkül, mivel ezekben a sejtekben nagy mennyiségű kromoszómaaberrációt mutattunk ki (28. ábra, 29. ábra).

Az irodalmi adatokból, valamint a kísérleteink eredményeiből is látszik, hogy az Mgs1 és a WRNIP1 fehérjék valószínűleg multifunkcionális fehérjék. Mindkét fehérje számos ponton kapcsolódik a replikációs villához, többek között az Ub-PCNA-hez is [137], ami a hibatolerancia útvonalban betöltött szerepre utalhat. Emellett egy friss tanulmány szerint az Mgs1 fehérje gátolja a templátváltáson átesett replikációs villák nemkívánatos rekombinációját, így csökkentve a genominstabilitást [143]. Ugyanakkor az a tény, hogy az Mgs1 és a WRNIP1 fehérje is kölcsönhat a replikatív polimeráz δ -val, és befolyásolja a polimeráz aktivitást [144,145,147] azt mutatja, hogy a DNS hibatolerancia útvonalon kívül más szerepük is lehet a fehérjéknek. Ezen funkció nélkülözhetetlenségét mutatja, hogy a DNS-hibatolerancia útvonalban defektív élesztő törzsek (*rad6 Δ rad18 Δ*) szintetikus letalitást mutatnak *mgs1 Δ* élesztő háttéren [142]. Munkánk eredményei arra utalnak, hogy az Mgs1 DNS-hibatolerancia útvonaltól független szerepe a G4 szerkezetek és más blokkoló struktúrák replikációjához kapcsolódhat, és a *rad6 Δ rad18 Δ mgs1 Δ* törzsek ezért mutatnak szintetikus letális fenotípust.

Továbbá a WRNIP1 fehérjét a WRN interakció partnereként azonosították [146], valamint ismert, hogy mind a WRN, mind a BLM helikáz képes kicsavarni a G4 szerkezeteket és rész vesz azok replikációjában [106,108,166,169–171]. Korábban csirke DT40 sejteken vizsgálták a WRNIP1–WRN és WRNIP1–BLM genetikai kölcsönhatást [159]. Ezen vizsgálatok során az eredmények azt mutatták, mind a WRN, mind a BLM helikázzal való vizsgálata során, hogy a WRNIP1 fehérje bár hasonló hibajavító útvonalakban működik, csak részlegesen működik együtt a BLM vagy WRN helikázzal. Emellett azt is kimutatták, hogy bizonyos esetekben a BLM és WRN helikázok is egy komplexben működnek [109], így az is elképzelhető, hogy *in vivo* valójában egy BLM–WRN–WRNIP1 heterotrimer komplex működik bizonyos esetekben.

Összefoglalva eredményeinket, kimutattuk, hogy az élesztő Mgs1 és a humán WRNIP1 fehérje is nagy affinitással, preferenciálisan köti a G-kvadruplex DNS szerkezeteket *in vitro*, valamint a WRNIP1 fehérje képes megváltoztatni (fellazítani) a G4 szerkezetet. Kísérleteink eredményei alapján *in vivo* mindkét fehérje hiányában nagy mértékben sérül a G4 replikáció mechanizmusa. Továbbá kollaborátorunk kimutatta, hogy az Mgs1 fehérje együttműködik a

Pif1 DNS helikázzal, amely a legjelentősebb DNS helikáz a G4 replikáció folyamatában élesztőben [161]. Mindezek tükrében úgy gondoljuk, hogy *in vivo* mindkét fehérje fontos, bár lehetséges, hogy részben különböző szerepet játszik a G4 szerkezetek replikációjában és ezáltal a genomintegritás megőrzésében. Jelenlegi munkánk arra fókuszál, hogy tisztázzuk ennek a három fehérjének a szerepét a G4 replikációban.

7. Magyar nyelvű összefoglaló

A sejtek túlélése szempontjából kiemelten fontos a genetikai információ pontos másolása, azonban a DNS replikációt számos tényező akadályozhatja: a DNS károsodások mellett a stabil másodlagos DNS szerkezetek is gátolhatják a folyamatot. A másodlagos szerkezetek közül az egyik legfontosabb a guanin-gazdag egyszálú DNS-en kialakuló G-kvadruplex (G4) szerkezet. A kromoszómán való elhelyezkedésük helyétől függően feloszthatjuk őket telomerikus és intrakromoszómális G4-ekre. Az intrakromoszómális G4-ek nem véletlenszerűen helyezkednek el a genomban, hanem replikációs origók közelében, valamint génpromóterekben vannak jelen leggyakrabban. Emberben a számukat a használt algoritmustól és szekvenciától függően 300 000 és 700 000 közötti értékre becsülik. Számos szerepük van a sejtben: részt vesznek a replikáció, a transzláció és a transzkripció szabályozásában, számos onkogén promóterében is megtalálhatóak, ahol jelenlétükkel szabályozzák az adott gén transzkripciós szintjét, szabályozzák a replikációs origók működését, az IgG immunoglobulinok rekombinációját, valamint a telomerikus G4-ek védik a kromoszómavégeket.

A G4-ek a replikáció során akadályt képezhetnek a replikációs apparátus számára, azonban a fent említett szerepük miatt kiemelten fontos ezen szekvenciák hibamentes másolása. Amennyiben mutációk alakulnak ki a G4 szekvenciában, az eredeti másodlagos szerkezet megváltozhat és így például megszűnhet az onkogének transzkripciós gátlása, ezért a replikáció során a sejtek számára elengedhetetlen a G4 szerkezet kicsavarása és pontos másolása. Az eddigi tanulmányokban már számos helikázról és DNS polimerázról beszámoltak, amelyek képesek feloldani és másolni a G-gazdag szekvenciákat, azonban a folyamat pontos mechanizmusa és a folyamatot szabályozó egyéb fehérjék sem ismertek még. Munkánk során a G4 replikáció jellemzését és a folyamathoz köthető szereplők azonosítását tűztük ki célul.

Az élesztő Mgs1 (Maintenance of genome stability 1) fehérje, valamint humán homológja a WRNIP1 (Werner interacting protein 1) fehérje megfelelő jelöltnek bizonyultak, mint a G4 replikáció potenciális új résztvevői. Mindkét fehérjének fontos szerepe van a genomstabilitás fenntartásában és funkciójuk szorosan kapcsolódik a replikációs villához. Ismert az Mgs1 és a PCNA közötti kölcsönhatás, valamint az Mgs1 és a WRNIP1 is képes interakcióba lépni az élesztő, valamint humán polimeráz δ bizonyos alegységeivel. Emellett mindkét fehérje kapcsolatba hozható a G4 replikációban résztvevő helikázokkal: élesztőben ismert az Sgs1 helikáz és az Mgs1, humánban pedig a WRN RecQ helikáz és a WRNIP1

kapcsolata. Továbbá Mgs1 hiányában a G4 replikációval összefüggésbe hozható fenotípus, az rRNS gének hiperrekombinációja tapasztalható. Feltételezéseinket alátámasztotta még, hogy németországi kollaborátoraink egy élesztő egyhibrid kísérletben, amelyben G4-kötő fehérjét kerestek, kimutatták az Mgs1-G4 motívumok közötti interakciót. Ezen adatok alapján ígéretes jelöltnek gondoltuk az Mgs1 és a WRNIP1 fehérjét, mint a G4 replikációban résztvevő potenciális szereplőket.

Megvizsgáltuk, hogy az Mgs1 fehérje *in vitro* kölcsönhatásba lép-e G4-et tartalmazó DNS szubsztrátokkal. A DNS-kötési affinitás vizsgálatához egy onkogén, a Myc gén promóterében található Myc2345 parallel G4 szerkezetet formáló szekvenciát használtuk. Először EMSA kísérletekben vizsgáltuk a MYC G4 és a GST-Mgs1 fehérje közötti kölcsönhatást, amit egy kontroll szubsztráthoz hasonlítottunk. A kísérleteket egyszálú, valamint parciális duplex szubsztráttal is elvégeztük, mivel a parciális duplex szubsztrát jól modellezi az esetlegesen G4 szerkezet miatt elakadt replikációs villát. Kísérleteink azt mutatták, hogy az Mgs1 fehérje preferenciálisan köti a G4-et tartalmazó szubsztrátokat azok kontroll párjával összehasonlítva, ami egyszálú, valamint parciális duplex szubsztrátot tartalmazó kísérletekben is igaz volt. Továbbá kimutattuk, hogy a Mg^{2+} és az ATP jelenléte nem befolyásolta a DNS-kötés erősségét. A preferenciális kötés további bizonyítását, valamint a kötés állandó (K_d) pontos meghatározását fluoreszcens anizotrópia kísérlettel végeztük. A fluoreszcens anizotrópia kísérletekben az EMSA kísérletekben már említett G4 és kontroll szubsztrátok mellett megvizsgáltunk egy GC-gazdag kontrollt is, amely GC-tartalma megegyezett a MYC G4 szubsztrátéval, valamint a MYC G4 komplementer szálával, egy C-gazdag oligonukleotid szubsztráttal is végeztünk méréseket. A GST-Mgs1 és a MYC G4 szubsztrát közötti interakció erőssége egyszálú, valamint parciális duplex formában egyaránt szignifikánsan erősebb volt, mint a kontroll szubsztrátoknál. Továbbá ATP-áz kísérletben bizonyítottuk, hogy az Mgs1 DNS-függő ATP-áz aktivitását nem befolyásolja a G4 jelenléte; MYC G4 és kontroll szubsztrát esetében is hasonló mértékű stimulálást tapasztaltunk. Kollaborátoraink *in vivo* kísérletei kimutatták, hogy az *mgs1Δ* sejtek szignifikánsan lassabb növekedést mutatnak PhenDC3-kezelés hatására, amely egy G4-stabilizáló kis molekula. Emellett Mgs1 hiányában magasabb a nagy kromoszómális átrendeződések, valamint a kettősszálú törések száma a G4-et tartalmazó kromoszómális régiókban. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az Mgs1-nek fontos szerepe van a G4 szerkezetek feloldásában, és ezáltal a genomstabilitás megőrzésében.

Az Mgs1 fehérjéhez hasonlóan, a WRNIP1 fehérje esetében is megvizsgáltuk, hogy *in vitro* kölcsönhatásba lép-e a G4 szerkezetekkel. EMSA kísérlettel vizsgáltuk a WRNIP1

fehérje, valamint a korábban említett MYC G4 és MYC kontroll közötti interakciót. Emellett egy másik G4 szerkezet formáló szekvenciát, a humán CEB miniszatellita szekvenciáját is megvizsgáltuk, amely parallel G4-et formál. Kompetíciós EMSA kísérletekben kimutattuk, hogy a GST-WRNIP1 fehérje preferenciálisan köti a MYC G4 és a CEB G4 szubsztrátokat a kontroll párjukkal összehasonlítva egyszálú, valamint parciális duplex formában is. Ezután, a kötési állandó pontos meghatározása céljából, fluoreszcens anizotrópia kísérleteket végeztünk az alábbi szubsztrátokkal: egyszálú és parciális duplex MYC G4, MYC kontroll, CEB G4 és CEB kontroll, valamint egyszálú MYC GC-gazdag kontroll és MYC C-gazdag kontroll. A GST-WRNIP1 fehérje minden esetben szignifikánsan erősebben kötötte a G4-et tartalmazó szubsztrátokat azok kontroll párjával összehasonlítva. Ezután megvizsgáltuk, hogy a WRNIP1 fehérje képes-e kitekerni a G4 szerkezetet. Ezt egymolekula FRET kísérlettel ellenőriztük, amelyben Cy5-Cy3 jelöléssel ellátott CEB G4-et tartalmazó szubsztrátot használtunk. Eredményeink azt mutatják, hogy a GST-WRNIP1 fehérje képes megváltoztatni a G4 szerkezetet, mivel a fehérje hozzáadásával csökkent a FRET-jel, ami a fluorofórok eltávolodására, és ezáltal a DNS szubsztrát szerkezetváltozására utal. Továbbá *in vivo* kísérletekben igazoltuk a WRNIP1 fehérje szerepét a G4 replikációban. Eredményeink azt mutatták, hogy WRNIP1 hiányában nagy mértékben megnő a kettős szálú törések, valamint a kromoszómaaberrációk száma PhenDC3-kezelés hatására. Emellett EdU-IdU beépülés követésével azt is megállapítottuk, hogy WRNIP1 hiányában lelassul a replikáció sebessége a PhenDC3-mal kezelt sejtekben.

Összefoglalva eredményeinket elmondhatjuk, hogy kimutattuk, hogy az élesztő Mgs1 és a humán WRNIP1 fehérjék és a G4 szerkezetek közötti interakciót, valamint azt, hogy ezen fehérjék hiányában problémák tapasztalhatók a G4 szerkezetek replikációjában, ami genomstabilitást eredményez.

8. Summary of the PhD thesis

Correct copying of genetic information is of the utmost importance for the survival of cells, but several factors can hinder DNA replication: besides DNA damage, the process can be also inhibited by stable secondary DNA structures. One of the most important secondary structures is the G-quadruplex (G4), which is formed on guanine-rich, single-stranded DNA. Based on their chromosomal location the G4s can be classified as telomeric and intrachromosomal. The intrachromosomal G4s are not randomly distributed in the genome, they are found most often near replication origins and gene promoters. In humans, depending on the employed algorithm and consensus sequence, their number is estimated approximately between 300 000 and 700 000. G4s have numerous functions in the cells: they are involved in the regulation of replication, translation and transcription, they can be found in oncogene promoters, where they can regulate the transcriptional level of these genes, they are involved in the regulation of replication origin firing, the recombination of IgG immunoglobulins, and telomeric G4s protect the chromosome ends.

During replication the G4s can block the replication apparatus, however, because of their substantial roles, the correct replication of these sequences is particularly important. If mutations occur in the G4 sequence, the original secondary structure can be modified, and so the transcriptional repression of the oncogenes may be hindered. Because of this, the unwinding and correct replication of G4 structures is indispensable for the cells. Several studies described helicases and polymerases which are able to resolve and replicate G-rich sequences, however, the precise mechanism of the process and its other regulatory proteins of it are not known yet. During this work, our aim was to characterize the G4 replication and identify players in this process.

The yeast Mgs1 (Maintenance of genome stability 1) protein and its human homologue, the WRNIP1 (Werner interacting protein 1) protein proved to be suitable candidates as potential new players in G4 replication. Both proteins are important for the maintenance of genome stability and their functions are closely linked to the replication fork. The Mgs1-PCNA interaction is known; additionally, Mgs1 and WRNIP1 also can interact with certain subunits of the yeast and human polymerase δ , respectively. Besides, both proteins can interact with helicases involved in G4 replication: in yeast the connection between the Sgs1 helicase and Mgs1 is known, and in human the connection between the WRN RecQ helicase and the WRNIP1 proteins was described. Furthermore, in the absence of Mgs1 a G4-related phenotype is observed, the hyper-recombination of rRNA genes. Our presumptions were also strengthened

by our German collaborator's data; in yeast one-hybrid experiments, where they were looking for G4-binding proteins, Mgs1-G4 interaction was found. Based on these data, the Mgs1 and WRNIP1 proteins were promising candidates as potential players in G4 replication.

First, we examined if the Mgs1 protein can interact with G4-containing DNA substrates *in vitro*. For DNA-binding experiment the Myc oncogene promoter, the Myc2345 parallel G4-forming sequence was used. The interaction between MYC G4 and GST-Mgs1 protein was compared to a control substrate in an EMSA setup. The experiments were performed with single-stranded as well as partial duplex substrates, as the partial duplex is a good model as a G4-blocked replication fork. Our experiments showed that the Mgs1 protein preferentially binds the G4-containing substrates compared to their control pairs. This result was shown with single-stranded and partial duplex substrates as well. Furthermore, we demonstrated that the presence of Mg^{2+} and ATP does not affect the strength of the DNA-binding. Fluorescence anisotropy method was used to further confirm the preferential binding and to precisely determine the binding constant (K_d). In fluorescence anisotropy experiments, besides the previously mentioned G4 and control substrates used in EMSA experiments, a GC-rich substrate was also used, which GC-content was identical to the MYC G4 substrate, as well as the MYC G4 complementary strand, a C-rich oligonucleotide was used in these measurements. The interaction between GST-Mgs1 and the MYC G4 substrate was significantly stronger compared to the control substrates both in single-stranded and in partial duplex form. In ATPase experiments we provided evidence that the DNA-dependent ATPase activity of Mgs1 is not affected by the presence of G4; the stimulation of the ATPase activity was similar in the presence of MYC G4 and control substrate as well. Our collaborator's data showed that $\Delta mgs1$ cells show significantly slower growth upon PhenDC3 treatment, which is a G4-stabilizing small molecule. Besides, the number of gross chromosomal rearrangements and double strand breaks increases in the absence of Mgs1 in G4-containing chromosomal regions. These results indicate that Mgs1 has an important role in resolving G4 structures and thus in the maintenance of genome stability.

Similarly to Mgs1 protein, we also investigated if WRNIP1 interacts with G4 structures *in vitro*. The interaction between the WRNIP1 protein and the previously mentioned MYC G4 and MYC control substrates was measured using the EMSA method. Besides the MYC sequence, another G4 structure forming sequence, the human CEB minisatellite sequence, which forms a parallel G4, was also investigated. In competitive EMSA experiments we showed that the GST-WRNIP1 protein preferentially binds the MYC G4 and the CEB G4 substrates compared to their control pairs both in single-stranded and partial duplex form. Next,

in order to precisely determine the binding constant, fluorescence anisotropy measurements were performed with the following substrates: single-stranded and partial duplex MYC G4, MYC control, CEB G4 and CEB control, as well as single stranded MYC GC-rich control and MYC C-rich control. The binding efficiency of GST-WRNIP1 towards G4-containing substrates was significantly stronger in every instance compared to their control pairs. Afterwards we investigated if the WRNIP1 protein is able to unwind the G4 structure. This was performed with a single-molecule FRET experiment, where a Cy5-Cy3-labelled CEB G4 containing substrate was used. Our results showed that the GST-WRNIP1 protein is able to unwind/alter the G4 structures, as upon addition of higher protein concentration the FRET-signal decreases, which implicates bigger distance between the fluorophores and thus change in the structure of the DNA substrate. Furthermore, the role of WRNIP1 in G4 replication was confirmed in *in vivo* experiments. The results showed that in the absence of WRNIP1 the number of double-strand breaks and chromosome aberrations is increased upon PhenDC3 treatment. Additionally, by monitoring EdU-IdU incorporation we determined that in the absence of WRNIP1 the replication speed is slowed down in PhenDC3-treated cells.

In summary, our results showed the interaction between yeast Mgs1 and human WRNIP1 proteins and G4 structures, and in the absence of these proteins problems occur in the replication of G4 structures resulting genome instability.

9. 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 bírálását.

Szeretném megköszönni Dr. Sajben-Nagy Enikőnek és Almási Karolának a segítségüket és a dolgozatom írása során nyújtott támogatásukat. Emellett köszönöm Kovács Katalinnak a technikai segítséget, valamint a Mutagenézis és Karcionogenézis 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.

10. Saját közlemények jegyzéke

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

A „Zacheja és mtsai. (2020)” közleményből bemutatott összes kísérlet Tóth Ágnes munkája. A humán WRNIP1 fehérjéhez kapcsolódó kutatási eredmények publikálás előtt állnak; ebben a közleményben Tóth Ágnes szintén megosztott első szerző lesz.

11. Támogatások

- A stabil másodlagos struktúrával rendelkező DNS szakaszok replikációjának biokémiai vizsgálata (OTKA K119361)
- Bioanalitikai műszerpark fehérjeszintű gyógyszerjelöltek molekuláris és sejtszintű vizsgálataihoz (GINOP-2.3.3-15-2016-00020)
- Molekuláris biológiai kutatóműhely az egészség- és környezetvédelem szolgálatában: Társadalmi igényt kielégítő kutatások a kiválósági centrum nemzetközi versenyképességének fokozására (GINOP-2.3.2-15-2016-00001)

12. Irodalomjegyzék

- [1] B. Ekundayo, F. Bleichert, Origins of DNA replication, *PLoS Genet.* 15 (2019). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008320>.
- [2] N.Y. Yao, M.E. O'Donnell, Machinery of DNA Replication, in: G. Roberts, A. Watts (Eds.), *Encycl. Biophys.*, Springer, Berlin, 2019: pp. 1–10. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35943-9_435-1.
- [3] M. Hedglin, B. Pandey, S.J. Benkovic, Stability of the human polymerase δ holoenzyme and its implications in lagging strand DNA synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) E1777–E1786. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523653113>.
- [4] R.E. Georgescu, L. Langston, N.Y. Yao, O. Yurieva, D. Zhang, J. Finkelstein, T. Agarwal, M.E. O'donnell, N. Struct, M. Biol, Mechanism of asymmetric polymerase assembly at the eukaryotic replication fork HHS Public Access Author manuscript, *Nat Struct Mol Biol.* 21 (2014) 664–670. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2851>.
- [5] B. Alberts, DNA replication and recombination, *Nature.* 421 (2003) 431–435. <https://doi.org/10.1038/nature01407>.
- [6] L. Balakrishnan, R.A. Bambara, Okazaki Fragment Metabolism, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5 (2013) a010173. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01087-1>.
- [7] L. Pikor, K. Thu, E. Vucic, W. Lam, The detection and implication of genome instability in cancer, *Cancer Metastasis Rev.* 32 (2013) 341–352. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9429-5>.
- [8] S. Negrini, V.G. Gorgoulis, T.D. Halazonetis, Genomic instability an evolving hallmark of cancer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 220–228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>.
- [9] W.P. Roos, A.D. Thomas, B. Kaina, DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology, *Nat. Rev. Cancer.* 16 (2016) 20–33. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.2>.
- [10] N. Chatterjee, G.C. Walker, Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis, *Environ. Mol. Mutagen.* 58 (2017) 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>.
- [11] M.L. Bochman, K. Paeschke, V.A. Zakian, DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures, *Nat. Rev. Genet.* 13 (2012) 770–780. <https://doi.org/10.1038/nrg3296>.
- [12] R. Hakem, DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly, *EMBO J.* 27 (2008) 589–605. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.15>.
- [13] S. Jalal, J.N. Earley, J.J. Turchi, DNA repair: From genome maintenance to biomarker and therapeutic target, *Clin. Cancer Res.* 17 (2011) 6973–6984. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0761>.
- [14] D.J. Chang, K.A. Cimprich, DNA damage tolerance: When it's OK to make mistakes, *Nat. Chem. Biol.* 5 (2009) 82–90. <https://doi.org/10.1038/nchembio.139>.
- [15] T.A. Ward, Z. Dudášová, S. Sarkar, M.R. Bhide, D. Vlasáková, Components of a Fanconi-Like Pathway Control Pso2-Independent DNA Interstrand Crosslink Repair in Yeast, *PLoS Genet.* 8 (2012) 1002884. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002884>.
- [16] A.R. Lehmann, A. Niimi, T. Ogi, S. Brown, S. Sabbioneda, J.F. Wing, P.L. Kannouche, C.M. Green, Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch, *DNA Repair (Amst).* 6 (2007) 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.02.003>.
- [17] J.E. Sale, A.R. Lehmann, R. Woodgate, Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 141–152. <https://doi.org/10.1038/nrm3289>.
- [18] D. Branzei, Ubiquitin family modifications and template switching, *FEBS Lett.* 585 (2011)

- 2810–2817. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.053>.
- [19] D. Branzei, I. Psakhye, DNA damage tolerance, *Curr. Opin. Cell Biol.* 40 (2016) 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.03.015>.
 - [20] S. Prakash, R.E. Johnson, L. Prakash, Eukaryotic Translesion Synthesis DNA Polymerases: Specificity of Structure and Function, *Annu. Rev. Biochem.* 74 (2005) 317–353. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133250>.
 - [21] S.D. McCulloch, T.A. Kunkel, The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases, *Cell Res.* 18 (2008) 148–161. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.4>.
 - [22] W. Yang, Y. Gao, Translesion and Repair DNA Polymerases: Diverse Structure and Mechanism, *Annu. Rev. Biochem.* 87 (2018) 239–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012405>.
 - [23] A. Deem, A. Keszthelyi, T. Blackgrove, A. Vayl, B. Coffey, R. Mathur, A. Chabes, A. Malkova, Break-induced replication is highly inaccurate, *PLoS Biol.* 9 (2011) 1000594. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000594>.
 - [24] R. Ceccaldi, P. Sarangi, A.D. D’Andrea, The Fanconi anaemia pathway: New players and new functions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17 (2016) 337–349. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.48>.
 - [25] J. Zhang, M. Nepal, C. Ma, P. Fei, R. Che, Fanconi Anemia Signaling and Cancer, *Trends in Cancer.* 3 (2017) 840–856. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.10.005>.
 - [26] D.L. Daee, K. Myung, Fanconi-like crosslink repair in yeast., *Genome Integr.* 3 (2012) 7. <https://doi.org/10.1186/2041-9414-3-7>.
 - [27] A.M. León-Ortiz, J. Svendsen, S.J. Boulton, Metabolism of DNA secondary structures at the eukaryotic replication fork, *DNA Repair (Amst).* 19 (2014) 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.016>.
 - [28] I. Bang, Untersuchungen über die Guanylsäure, *Biochem. Z.* (1910) 293–311.
 - [29] D.. Gellert M., Lipsett, M.N. Davies, Helix formation by guanilic acid, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 48 (1962) 2013–2018. <https://doi.org/10.1145/3084381.3084430>.
 - [30] S. Burge, G.N. Parkinson, P. Hazel, A.K. Todd, S. Neidle, Quadruplex DNA: Sequence, topology and structure, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 5402–5415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl655>.
 - [31] D. Bhattacharyya, G. Mirihana Arachchilage, S. Basu, Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability, *Front. Chem.* 4 (2016) 38. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00038>.
 - [32] A. Guédin, J. Gros, P. Alberti, J.L. Mergny, How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 7858–7868. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq639>.
 - [33] J. Zhou, A.M. Fleming, A.M. Averill, C.J. Burrows, S.S. Wallace, The NEIL glycosylases remove oxidized guanine lesions from telomeric and promoter quadruplex DNA structures, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 4039–4054. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv252>.
 - [34] G. Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty, S. Balasubramanian, Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells, *Nat. Chem.* 5 (2013) 182–186. <https://doi.org/10.1038/nchem.1548>.
 - [35] A. Henderson, Y. Wu, Y.C. Huang, E.A. Chavez, J. Platt, F.B. Johnson, R.M. Brosh, D. Sen, P.M. Lansdorp, Detection of G-quadruplex DNA in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.* 42 (2013) 860–869. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt957>.
 - [36] R. Hänsel-Hertsch, M. Di Antonio, S. Balasubramanian, DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, functions and therapeutic potential, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (2017) 279–

284. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.3>.
- [37] V. Yadav, Hemansi, N. Tuteja, P. Yadav, N. Kim, G Quadruplex in Plants: A Ubiquitous Regulatory Element and Its Biological Relevance, *Front. Plant Sci.* 8 (2017) 1163. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01163>.
 - [38] B.D. Griffin, H.W. Bass, Review: Plant G-quadruplex (G4) motifs in DNA and RNA; abundant, intriguing sequences of unknown function, *Plant Sci.* 269 (2018) 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.01.011>.
 - [39] M. Metifiot, S. Amrane, S. Litvak, M.L. Andreola, G-quadruplexes in viruses: Function and potential therapeutic applications, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 12352–12366. <https://doi.org/10.1093/nar/gku999>.
 - [40] N. Saranathan, P. Vivekanandan, G-Quadruplexes: More Than Just a Kink in Microbial Genomes, *Trends Microbiol.* 27 (2018) 148–163. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.011>.
 - [41] S.G. Hershman, Q. Chen, J.Y. Lee, M.L. Kozak, P. Yue, L.S. Wang, F.B. Johnson, Genomic distribution and functional analyses of potential G-quadruplex-forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 144–156. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm986>.
 - [42] J.L. Huppert, S. Balasubramanian, Prevalence of quadruplexes in the human genome, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 2908–2916. <https://doi.org/10.1093/nar/gki609>.
 - [43] V.S. Chambers, G. Marsico, J.M. Boutell, M. Di Antonio, G.P. Smith, S. Balasubramanian, High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 877–881. <https://doi.org/10.1038/nbt.3295>.
 - [44] G. Marsico, V.S. Chambers, A.B. Sahakyan, P. McCauley, J.M. Boutell, M. Di Antonio, S. Balasubramanian, Whole genome experimental maps of DNA G-quadruplexes in multiple species, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) 3862–3874. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz179>.
 - [45] D. Rhodes, H.J. Lipps, Survey and Summary G-quadruplexes and their regulatory roles in biology, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 8627–8637. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv862>.
 - [46] J.L. Huppert, Structure, location and interactions of G-quadruplexes, *FEBS J.* 277 (2010) 3452–3458. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07758.x>.
 - [47] W.-C. Huang, T.-Y. Tseng, Y.-T. Chen, C.-C. Chang, Z.-F. Wang, C.-L. Wang, T.-N. Hsu, P.-T. Li, C.-T. Chen, J.-J. Lin, P.-J. Lou, T.-C. Chang, Direct evidence of mitochondrial G-quadruplex DNA by using fluorescent anti-cancer agents, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) gkv1061. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1061>.
 - [48] S.K. Bharti, J.A. Sommers, J. Zhou, D.L. Kaplan, J.N. Spelbrink, J.L. Mergny, R.M. Brosh, DNA sequences proximal to human mitochondrial DNA deletion breakpoints prevalent in human disease form G-quadruplexes, a class of DNA structures inefficiently unwound by the mitochondrial replicative twinkle helicase, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 29975–29993. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567073>.
 - [49] Y. Nakabeppu, E. Ohta, N. Abolhassani, MTH1 as a nucleotide pool sanitizing enzyme: Friend or foe?, *Free Radic. Biol. Med.* 107 (2017) 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.002>.
 - [50] G.C. Bardwell, D.W. Clark, A.-B. Al-Mehdi, G.M. Borchert, J.T. Roberts, V. Pastukh, M.N. Gillespie, M. Patel, An oxidative DNA “damage” and repair mechanism localized in the VEGF promoter is important for hypoxia-induced VEGF mRNA expression, *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 309 (2015) L1367–L1375. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00236.2015>.
 - [51] L. Pan, B. Zhu, W. Hao, X. Zeng, S.A. Vlahopoulos, T.K. Hazra, M.L. Hegde, Z. Radak, A. Bacsí, A.R. Brasier, X. Ba, I. Boldogh, Oxidized guanine base lesions function in 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated epigenetic regulation of nuclear factor κ B-driven gene expression, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 25553–25566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.751453>.

- [52] S. Cogoi, A. Ferino, G. Miglietta, E.B. Pedersen, L.E. Xodo, The regulatory G4 motif of the Kirsten ras (KRAS) gene is sensitive to guanine oxidation: Implications on transcription, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 661–676. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1142>.
- [53] S.C.J. Redstone, A.M. Fleming, C.J. Burrows, Oxidative modification of the potential G-quadruplex sequence in the PCNA gene promoter can turn on transcription, *Chem. Res. Toxicol.* 32 (2019) 437–446. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00332>.
- [54] S. Kumari, A. Bugaut, J.L. Huppert, S. Balasubramanian, An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation, *Nat. Chem. Biol.* 3 (2007) 218–221. <https://doi.org/10.1038/nchembio864>.
- [55] E. Petermann, M.L. Orta, N. Issaeva, N. Schultz, T. Helleday, Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair, *Mol. Cell.* 37 (2010) 492–502. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.021>.
- [56] U. Rass, Resolving branched DNA intermediates with structure-specific nucleases during replication in eukaryotes, *Chromosoma.* 122 (2013) 499–515. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0431-z>.
- [57] R. Appanah, D. Jones, B. Falquet, U. Rass, Limiting homologous recombination at stalled replication forks is essential for cell viability: DNA2 to the rescue, *Curr. Genet.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01106-7>.
- [58] H.A. Day, P. Pavlou, Z.A.E. Waller, I-Motif DNA: Structure, stability and targeting with ligands, *Bioorganic Med. Chem.* 22 (2014) 4407–4418. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.05.047>.
- [59] M. Zeraati, D.B. Langley, P. Schofield, A.L. Moye, R. Rouet, W.E. Hughes, T.M. Bryan, M.E. Dinger, D. Christ, I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells, *Nat. Chem.* 10 (2018) 631–637. <https://doi.org/10.1038/s41557-018-0046-3>.
- [60] E.P. Wright, J.L. Huppert, Z.A.E. Waller, Identification of multiple genomic DNA sequences which form i-motif structures at neutral pH, *Nucleic Acids Res.* 45 (2016) 2951–2959. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx090>.
- [61] H. Abou Assi, M. Garavís, C. González, M.J. Damha, i-Motif DNA: structural features and significance to cell biology, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 8038–8056. <https://doi.org/10.1093/nar/gky735>.
- [62] O. Mendoza, A. Bourdoncle, J.B. Boulé, R.M. Brosh, J.L. Mergny, G-quadruplexes and helicases, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 1989–2006. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw079>.
- [63] M. Sauer, K. Paeschke, G-quadruplex unwinding helicases and their function in vivo, *Biochem. Soc. Trans.* 45 (2017) 1173–1182. <https://doi.org/10.1042/BST20170097>.
- [64] L.K. Lerner, J.E. Sale, L.K. Lerner, J.E. Sale, Replication of G Quadruplex DNA, *Genes* 2019, Vol. 10, Page 95. 10 (2019) 95. <https://doi.org/10.3390/GENES10020095>.
- [65] K. Nikali, A. Suomalainen, J. Saharinen, M. Kuokkanen, J.N. Spelbrink, T. Lönnqvist, L. Peltonen, Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 2981–2990. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi328>.
- [66] A.K. Byrd, K.D. Raney, Structure and function of Pif1 helicase, *Biochem. Soc. Trans.* 45 (2017) 1159–1171. <https://doi.org/10.1042/BST20170096>.
- [67] A. Piazza, J.B. Boulé, J. Lopes, K. Mingo, E. Largy, M.P. Teulade-Fichou, A. Nicolas, Genetic instability triggered by G-quadruplex interacting Phen-DC compounds in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 4337–4348. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq136>.
- [68] K. Paeschke, J.A. Capra, V.A. Zakian, DNA Replication through G-Quadruplex Motifs Is

- Promoted by the *Saccharomyces cerevisiae* Pif1 DNA Helicase, *Cell*. 145 (2011) 678–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.015>.
- [69] K. Paeschke, M.L. Bochman, P. Daniela Garcia, P. Cejka, K.L. Friedman, S.C. Kowalczykowski, V.A. Zakian, Pif1 family helicases suppress genome instability at G-quadruplex motifs, *Nature*. 497 (2013) 458–462. <https://doi.org/10.1038/nature12149>.
 - [70] X.M. Hou, W.Q. Wu, X.L. Duan, N.N. Liu, H.H. Li, J. Fu, S.X. Dou, M. Li, X.G. Xi, Molecular mechanism of G-quadruplex unwinding helicase: Sequential and repetitive unfolding of G-quadruplex by Pif1 helicase, *Biochem. J.* 466 (2015) 189–199. <https://doi.org/10.1042/BJ20140997>.
 - [71] D. Dahan, I. Tsirkas, D. Dovrat, M.A. Sparks, S.P. Singh, R. Galletto, A. Aharoni, Pif1 is essential for efficient replisome progression through lagging strand G-quadruplex DNA secondary structures, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 11847–11857. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1065>.
 - [72] J. Muellner, K.H. Schmidt, Yeast genome maintenance by the multifunctional PIF1 DNA helicase family, *Genes (Basel)*. 11 (2020) 224. <https://doi.org/10.3390/genes11020224>.
 - [73] C.M. Sanders, Human Pif1 helicase is a G-quadruplex DNA-binding protein with G-quadruplex DNA-unwinding activity, *Biochem. J.* 430 (2010) 119–128. <https://doi.org/10.1042/BJ20100612>.
 - [74] A. Lahaye, H. Stahl, PIF1: a DNA helicase in yeast mitochondria, *EMBO J.* 10 (1991) 997–1007. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC452744/pdf/emboj00102-0260.pdf> (accessed January 29, 2019).
 - [75] A. Lahaye, S. Leterme, F. Foury, PIF1 DNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 26155–26161.
 - [76] M.L. Bochman, N. Sabouri, V.A. Zakian, Unwinding the functions of the Pif1 family helicases, *DNA Repair (Amst)*. 9 (2010) 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.01.008>.
 - [77] V.P. Schulz, V.A. Zakian, The *saccharomyces* PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation, *Cell*. 76 (1994) 145–155. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90179-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90179-1).
 - [78] J.Q. Zhou, E.K. Monson, S.C. Teng, V.P. Schulz, V.A. Zakian, Pif1p helicase, a catalytic inhibitor of telomerase in yeast, *Science* (80-.). 289 (2000) 771–774. <https://doi.org/10.1126/science.289.5480.771>.
 - [79] F. Foury, E. Van Dyck, A PIF-dependent recombinogenic signal in the mitochondrial DNA of yeast., *EMBO J.* 4 (1985) 3525–30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC554692/pdf/emboj00278-0161.pdf> (accessed January 29, 2019).
 - [80] L.R. Vega, J.A. Phillips, B.R. Thornton, J.A. Benanti, M.T. Onigbanjo, D.P. Toczyski, V.A. Zakian, Sensitivity of Yeast Strains with Long G-Tails to Levels of Telomere-Bound Telomerase, *PLoS Genet.* 3 (2007) e105. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030105>.
 - [81] S. Marcand, V. Brevet, C. Mann, E. Gilson, Cell cycle restriction of telomere elongation, *Curr. Biol.* 10 (2000) 487–490. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00450-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00450-4).
 - [82] C. Ribeyre, J. Lopes, J.-B. Boulé, A. Piazza, A. Guédin, V.A. Zakian, J.-L. Mergny, A. Nicolas, The Yeast Pif1 Helicase Prevents Genomic Instability Caused by G-Quadruplex-Forming CEB1 Sequences In Vivo, *PLoS Genet.* 5 (2009) e1000475. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000475>.
 - [83] A.S. Ivessa, J.Q. Zhou, V.A. Zakian, The *Saccharomyces* Pif1p DNA helicase and the highly related Rrm3p have opposite effects on replication fork progression in ribosomal DNA, *Cell*. 100 (2000) 479–489. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80683-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80683-2).

- [84] J.E. Pike, P.M.J. Burgers, J.L. Campbell, R.A. Bambara, Pif1 helicase lengthens some Okazaki fragment flaps necessitating Dna2 nuclease/helicase action in the two-nuclease processing pathway, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 25170–25180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.023325>.
- [85] K. Futami, A. Shimamoto, Y. Furuichi, Mitochondrial and Nuclear Localization of Human Pif1 Helicase, *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2007) 1685–1692. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.1685>.
- [86] M.E. Gagou, A. Ganesh, G. Phear, D. Robinson, E. Petermann, A. Cox, M. Meuth, Human PIF1 helicase supports DNA replication and cell growth under oncogenic-stress, *Oncotarget*. 5 (2014). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2501>.
- [87] M.E. Gagou, A. Ganesh, R. Thompson, G. Phear, C. Sanders, M. Meuth, Suppression of apoptosis by PIF1 helicase in human tumor cells, *Cancer Res.* 71 (2011) 4998–5008. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4404>.
- [88] Y. Wu, K. Shin-ya, R.M. Brosh, FANCI Helicase Defective in Fanconi Anemia and Breast Cancer Unwinds G-Quadruplex DNA To Defend Genomic Stability, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 4116–4128. <https://doi.org/10.1128/MCB.02210-07>.
- [89] T.B.C. London, L.J. Barber, G. Mosedale, G.P. Kelly, S. Balasubramanian, I.D. Hickson, S.J. Boulton, K. Hiom, FANCI is a structure-specific DNA helicase associated with the maintenance of genomic G/C tracts, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 36132–36139. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808152200>.
- [90] D.C. Odermatt, W.T.C. Lee, S. Wild, S.K. Jozwiakowski, E. Rothenberg, K. Gari, Cancer-associated mutations in the iron-sulfur domain of FANCI affect G-quadruplex metabolism, *PLOS Genet.* 16 (2020) e1008740. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008740>.
- [91] S.B. Cantor, D.W. Bell, S. Ganesan, E.M. Kass, R. Drapkin, S. Grossman, D.C.R. Wahrer, D.C. Sgroi, W.S. Lane, D.A. Haber, D.M. Livingston, BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function, *Cell*. 105 (2001) 149–160. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00304-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00304-X).
- [92] H. Kitao, I. Nanda, R.P. Sugino, A. Kinomura, M. Yamazoe, H. Arakawa, M. Schmid, H. Innan, K. Hiom, M. Takata, Fanci/Brip1 helicase protects against genomic losses and gains in vertebrate cells, *Genes to Cells*. 16 (2011) 714–727. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01523.x>.
- [93] I. Cheung, M. Schertzer, A. Rose, P.M. Lansdorp, Disruption of dog-1 in *Caenorhabditis elegans* triggers deletions upstream of guanine-rich DNA, *Nat. Genet.* 31 (2002) 405–409. <https://doi.org/10.1038/ng928>.
- [94] E. Kruisselbrink, V. Guryev, K. Brouwer, D.B. Pontier, E. Cuppen, M. Tijsterman, Mutagenic Capacity of Endogenous G4 DNA Underlies Genome Instability in FANCI-Defective *C. elegans*, *Curr. Biol.* 18 (2008) 900–905. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.05.013>.
- [95] C. Di Cristofano, G. Bevilacqua, M. Tancredi, A. De Nicolo, B. Sobhian, G. Lombardi, S. Barbuti, R. Drapkin, M.A. Caligo, C.C. Flemma, A Novel Breast Cancer-Associated BRIP1 (FANCI/BACH1) Germ-line Mutation Impairs Protein Stability and Function, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 4672–4680. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-0087>.
- [96] S. Seal, D. Thompson, A. Renwick, A. Elliott, P. Kelly, R. Barfoot, T. Chagtai, H. Jayatilake, M. Ahmed, K. Spanova, B. North, L. McGuffog, D.G. Evans, D. Eccles, D.F. Easton, M.R. Stratton, N. Rahman, Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles, *Nat. Genet.* 38 (2006) 1239–1241. <https://doi.org/10.1038/ng1902>.
- [97] S.N. Stacey, J. Bjornsson, H.T. Helgadóttir, A. Panadero, D.F. Gudbjartsson, M.D. García-Prats, K.R. Benediksdóttir, A. de Juan, J.G. Jonasson, A. Sigurdsson, P. Lundin, K.K.H. Aben, L.A. Aaltonen, A. Salvarsdóttir, J. Gudmundsson, K. Olafsson, J. Gulcher, S. Besenbacher, C. Mayordomo, G. Masson, J.I. Mayordomo, M. Aavikko, T. Rafnar, E. Ortega, J.M. Ramon-Cajal, S. Staff, L.A. Kiemeny, G. Orlygsdóttir, O.T. Magnusson, K. Stefansson, F. Rivera, H.

- Saemundsson, A. Gylfason, U. Thorsteinsdottir, K. Olafsdottir, A.M. van Altena, A. Jonasdottir, H. Johannsdottir, P.M. Kujala, A. Kong, P. Sulem, L.F.A.G. Massuger, L. le Roux, L. Tryggvadottir, A. Jonasdottir, Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer, *Nat. Genet.* 43 (2011) 1104–1107. <https://doi.org/10.1038/ng.955>.
- [98] S. Cantor, R. Drapkin, F. Zhang, Y. Lin, J. Han, S. Pamidi, D.M. Livingston, The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004) 2357–2362. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8658>.
- [99] R. Litman, M. Peng, Z. Jin, F. Zhang, J. Zhang, S. Powell, P.R. Andreassen, S.B. Cantor, BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCI, *Cancer Cell*. 8 (2005) 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.08.004>.
- [100] P. Castillo Bosch, S. Segura- Bayona, W. Koole, J.T. Heteren, J.M. Dewar, M. Tijsterman, P. Knipscheer, FANCI promotes DNA synthesis through G- quadruplex structures, *EMBO J.* 33 (2014) 2521–2533. <https://doi.org/10.15252/emboj.201488663>.
- [101] S. Gangloff, J.P. McDonald, C. Bendixen, L. Arthur, R. Rothstein, The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 8391–8398. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.12.8391>.
- [102] P.M. Watt, I.D. Hickson, R.H. Bortst, E.J. Louist, Sgs1, a Homologue of the Bloom's and Werner's Syndrome Genes, Is Required for Maintenance of Genome Stability in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*. 144 (1996) 935–945. <http://www.genetics.org/content/genetics/144/3/935.full.pdf> (accessed March 11, 2019).
- [103] H. Sun, R.J. Bennett, N. Maizels, The *Saccharomyces cerevisiae* Sgs1 helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs, *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 1978–1984. <https://doi.org/10.1093/nar/27.9.1978>.
- [104] J.K. Karow, R.K. Chakraverty, I.D. Hickson, The Bloom's syndrome gene product is a 3'-5' DNA helicase, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 30611–30614. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.49.30611>.
- [105] W.K. Chu, I.D. Hickson, RecQ helicases: Multifunctional genome caretakers, *Nat. Rev. Cancer*. 9 (2009) 644–654. <https://doi.org/10.1038/nrc2682>.
- [106] H. Sun, J.K. Karow, I.D. Hickson, N. Maizels, The Bloom's Syndrome Helicase Unwinds, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 27587–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27587>.
- [107] M.D. Huber, M.L. Duquette, J.C. Shiels, N. Maizels, A Conserved G4 DNA Binding Domain in RecQ Family Helicases, *J. Mol. Biol.* 358 (2006) 1071–1080. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.077>.
- [108] P. Mohaghegh, J.K. Karow, R.M. Brosh, V.A. Bohr, I.D. Hickson, The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 2843–2849. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55766/pdf/gke396.pdf> (accessed January 31, 2019).
- [109] C. Von Kobbe, P. Karmakar, L. Dawut, P. Opresko, X. Zeng, R.M. Brosh, I.D. Hickson, V.A. Bohr, Colocalization, physical, and functional interaction between Werner and Bloom syndrome proteins, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 22035–22044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200914200>.
- [110] Y. Wu, A.N. Suhasini, R.M. Brosh, Welcome the Family of FANCI-like Helicases to the Block of Genome Stability Maintenance Proteins, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 1209–1222. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8580-6>.
- [111] N. Selak, C.Z. Bachrati, I. Shevelev, T. Dietschy, B. van Loon, A. Jacob, U. Hübscher, J.D. Hoheisel, I.D. Hickson, I. Stagljar, The Bloom's syndrome helicase (BLM) interacts physically and functionally with p12, the smallest subunit of human DNA polymerase δ , *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 5166–5179. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn498>.

- [112] S. Mukherjee, D. Sinha, S. Bhattacharya, K. Srinivasan, S. Abdisalaam, A. Asaithamby, Werner syndrome protein and DNA replication, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 3442. <https://doi.org/10.3390/ijms19113442>.
- [113] M. Fry, L.A. Loeb, Human Werner Syndrome DNA Helicase Unwinds Tetrahelical Structures of the Fragile X Syndrome Repeat Sequence d(CGG)_n, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 12797–12802. <http://www.jbc.org/> (accessed March 12, 2019).
- [114] L. Crabbe, R.E. Verdun, C.I. Hagglom, J. Karlseder, Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity, *Science* (80-.). 306 (2004) 1951–1953. <https://doi.org/10.1126/science.1103619>.
- [115] A.S. Kamath-Loeb, L.A. Loeb, E. Johansson, P.M.J. Burgers, M. Fry, Interactions between the Werner Syndrome Helicase and DNA Polymerase δ Specifically Facilitate Copying of Tetraplex and Hairpin Structures of the d(CGG)_n Trinucleotide Repeat Sequence, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 16439–16446. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100253200>.
- [116] J.M. Sidorova, K. Kehrl, F. Mao, R. Monnat, Distinct functions of human RECQ helicases WRN and BLM in replication fork recovery and progression after hydroxyurea-induced stalling, *DNA Repair (Amst.)* 12 (2013) 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.11.005>.
- [117] J.M. Sidorova, N. Li, A. Folch, R.J. Monnat, The RecQ helicase WRN is required for normal replication fork progression after DNA damage or replication fork arrest, *Cell Cycle* 7 (2008) 796–807. <https://doi.org/10.4161/cc.7.6.5566>.
- [118] H.-P. Nasheuer, F. Grosse, DNA Polymerase α -Primase from Calf Thymus, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 8981–8986. <http://www.jbc.org/content/263/18/8981.full.pdf> (accessed March 11, 2019).
- [119] C. Santocanale, M. Foiani, G. Lucchini, P. Plevani, The isolated 48,000-Dalton subunit of yeast DNA primase is sufficient for RNA primer synthesis, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 1343–1348. <http://www.jbc.org/content/268/2/1343.full.pdf> (accessed March 11, 2019).
- [120] Y.H. Jin, R. Ayyagari, M.A. Resnick, D.A. Gordenin, P.M.J. Burgers, Okazaki Fragment Maturation in Yeast, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 1626–1633. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209803200>.
- [121] Y.H. Jin, R. Obert, P.M.J. Burgers, T.A. Kunkel, M.A. Resnick, D.A. Gordenin, The 3'→5' exonuclease of DNA polymerase can substitute for the 5' flap endonuclease Rad27/Fen1 in processing Okazaki fragments and preventing genome instability, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2002) 5122–5127. <https://doi.org/10.1073/pnas.091095198>.
- [122] Z.F. Pursell, I. Isoz, E.-B. Lundström, E. Johansson, T.A. Kunkel, Yeast DNA Polymerase ϵ Participates in Leading-Strand DNA Replication, *Science* (80-.). 317 (2007) 127–130. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1144067>.
- [123] L.S. Kaguni, D.A. Clayton, Template-directed pausing in in vitro DNA synthesis by DNA polymerase α from *Drosophila melanogaster* embryos, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79 (1982) 983–987. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.4.983>.
- [124] J.D. Lormand, N. Buncher, C.T. Murphy, P. Kaur, M.Y. Lee, P. Burgers, H. Wang, P.L. Kunkel, Thomas AOpresko, DNA polymerase δ stalls on telomeric lagging strand templates independently from G-quadruplex formation, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 10323–10333. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt813>.
- [125] S. Eddy, L. Maddukuri, A. Ketkar, M.K. Zafar, E.E. Henninger, Z.F. Pursell, R.L. Eoff, Evidence for the kinetic partitioning of polymerase activity on G-quadruplex DNA, *Biochemistry* 54 (2015) 3218–3230. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00060>.
- [126] S. Eddy, A. Ketkar, M.K. Zafar, L. Maddukuri, J.Y. Choi, R.L. Eoff, Human Rev1 polymerase disrupts G-quadruplex DNA, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 3272–3285. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1314>.

- [127] D. Schiavone, G. Guilbaud, P. Murat, C. Papadopoulou, P. Sarkies, M. Prioleau, S. Balasubramanian, J.E. Sale, Determinants of G quadruplex- induced epigenetic instability in REV 1- deficient cells , *EMBO J.* 33 (2014) 2507–2520. <https://doi.org/10.15252/embj.201488398>.
- [128] S.D. Mcculloch, R.J. Kokoska, T.A. Kunkel, Efficiency, Fidelity and Enzymatic Switching During Translesion DNA Synthesis, *Cell Cycle.* 3 (2004) 580–583. <http://www.landesbioscience.com/journals/cc/abstract.php?id=893> (accessed February 7, 2019).
- [129] S. Eddy, M. Tillma, L. Maddukuri, A. Ketkar, M.K. Zafar, R.L. Eoff, Human Translesion Polymerase κ Exhibits Enhanced Activity and Reduced Fidelity Two Nucleotides from G-Quadruplex DNA, *Biochemistry.* 55 (2016) 5218–5229. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00374>.
- [130] M. Seki, F. Marini, R.D. Wood, POLQ (Pol θ), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 6117–6126. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg814>.
- [131] B. Lemmens, R. Van Schendel, M. Tijsterman, Mutagenic consequences of a single G-quadruplex demonstrate mitotic inheritance of DNA replication fork barriers, *Nat. Commun.* 6 (2015) 8909. <https://doi.org/10.1038/ncomms9909>.
- [132] K. Estep, T.J. Butler, J. Ding, R.M. Brosh, G4-Interacting DNA Helicases and Polymerases: Potential Therapeutic Targets, *Curr. Med. Chem.* 24 (2017) 1–15. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171116123345>.
- [133] A. Maffia, C. Ranise, S. Sabbioneda, From R-loops to G-quadruplexes: Emerging new threats for the replication fork, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21041506>.
- [134] T. Hishida, H. Iwasaki, T. Ohno, T. Morishita, H. Shinagawa, A yeast gene, MGS1, encoding a DNA-dependent AAA+ ATPase is required to maintain genome stability, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 8283–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.121009098>.
- [135] C.D. Putnam, S.B. Clancy, H. Tsuruta, S. Gonzalez, J.G. Wetmur, J.A. Tainer, Structure and mechanism of the RuvB holliday junction branch migration motor, *J. Mol. Biol.* 311 (2002) 297–310. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4852>.
- [136] G.D. Bowman, M. O'Donnell, J. Kuriyan, Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex, *Nature.* 429 (2004) 724–730. <https://doi.org/10.1038/nature02585>.
- [137] I. Saugar, J.L. Parker, S. Zhao, H.D. Ulrich, The genome maintenance factor Mgs1 is targeted to sites of replication stress by ubiquitylated PCNA, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 245–257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr738>.
- [138] D. Branzei, M. Seki, F. Onoda, H. Yagi, Y.I. Kawabe, T. Enomoto, Characterization of the slow-growth phenotype of *S. cerevisiae* whip/mgs1 sgs1 double deletion mutants, *DNA Repair (Amst).* 1 (2002) 671–682. [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(02\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(02)00073-3).
- [139] I. Dikic, S. Wakatsuki, K.J. Walters, Ubiquitin-binding domains from structures to functions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 659–671. <https://doi.org/10.1038/nrm2767>.
- [140] J.H. Kim, Y.H. Kang, H.J. Kang, D.H. Kim, G.H. Ryu, M.J. Kang, Y.S. Seo, In vivo and in vitro studies of Mgs1 suggest a link between genome instability and Okazaki fragment processing, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 6137–6150. <https://doi.org/10.1093/nar/gki900>.
- [141] T. Hishida, T. Ohya, Y. Kubota, Y. Kamada, H. Shinagawa, Functional and Physical Interaction of Yeast Mgs1 with PCNA: Impact on RAD6-Dependent DNA Damage Tolerance, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 5509–5517. <https://doi.org/10.1128/MCB.00307-06>.
- [142] T. Hishida, T. Ohno, H. Iwasaki, H. Shinagawa, *Saccharomyces cerevisiae* MGS1 is essential in strains deficient in the RAD6-dependent DNA damage tolerance pathway, *EMBO J.* 21 (2002) 2019–2029. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.8.2019>.

- [143] A. Jiménez-Martín, I. Saugar, C.R. Joseph, A. Mayer, C.P. Lehmann, B. Szakal, D. Branzei, J.A. Tercero, The Mgs1/WRNIP1 ATPase is required to prevent a recombination salvage pathway at damaged replication forks, *Sci. Adv.* 6 (2020) 3327–3335. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz3327>.
- [144] K.J. Gerik, X. Li, A. Pautz, P.M.J. Burgers, Characterization of the Two Small Subunits of *Saccharomyces cerevisiae* DNA Polymerase δ , 1998. <http://www.jbc.org/> (accessed May 16, 2019).
- [145] N.D. Vijeć Motlagh, M. Seki, D. Branzei, T. Enomoto, Mgs1 and Rad18/Rad5/Mms2 are required for survival of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with novel temperature/cold sensitive alleles of the DNA polymerase δ subunit, Pol31, *DNA Repair (Amst)*. 5 (2006) 1459–1474. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.07.006>.
- [146] Y.I. Kawabe, D. Branzei, T. Hayashi, H. Suzuki, T. Masuko, F. Onoda, S.J. Heo, H. Ikeda, A. Shimamoto, Y. Furuichi, M. Seki, T. Enomoto, A Novel Protein Interacts with the Werner's Syndrome Gene Product Physically and Functionally, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 20364–20369. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100035200>.
- [147] T. Tsurimoto, A. Shinozaki, M. Yano, M. Seki, T. Enomoto, Human Werner helicase interacting protein 1 (WRNIP1) functions as a novel modulator for DNA polymerase δ , *Genes to Cells*. 10 (2005) 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2004.00812.x>.
- [148] A. Yoshimura, M. Seki, T. Enomoto, The role of WRNIP1 in genome maintenance, *Cell Cycle*. 16 (2017) 515–521. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1282585>.
- [149] N. Crosetto, M. Bienko, R.G. Hibbert, T. Perica, C. Ambrogio, T. Kensche, K. Hofmann, T.K. Sixma, I. Dikic, Human Wrnip1 is localized in replication factories in a ubiquitin-binding zinc finger-dependent manner, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 35173–35185. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803219200>.
- [150] R.A. Bish, M.P. Myers, Werner helicase-interacting protein 1 binds polyubiquitin via its zinc finger domain, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 23184–23193. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701042200>.
- [151] A. Yoshimura, M. Seki, M. Kanamori, S. Tateishi, T. Tsurimoto, S. Tada, T. Enomoto, Physical and functional interaction between WRNIP1 and RAD18., *Genes Genet. Syst.* 84 (2009) 171–8. <https://doi.org/10.1266/ggs.84.171>.
- [152] M. Kanamori, M. Seki, A. Yoshimura, T. Tsurimoto, S. Tada, T. Enomoto, Werner Interacting Protein 1 Promotes Binding of Werner Protein to Template-Primer DNA, *Biol. Pharm. Bull.* 34 (2011) 1314–1318. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.1314>.
- [153] S. Kaur, T.E. White, A.L. DiGuilio, J.S. Glavy, The discovery of a werner helicase interacting protein (WHIP) association with the nuclear pore complex, *Cell Cycle*. 9 (2010) 3106–3111. <https://doi.org/10.4161/cc.9.15.12524>.
- [154] H. Nomura, A. Yoshimura, T. Edo, S.I. Kanno, S. Tada, M. Seki, A. Yasui, T. Enomoto, WRNIP1 accumulates at laser light irradiated sites rapidly via its ubiquitin-binding zinc finger domain and independently from its ATPase domain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417 (2012) 1145–1150. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.080>.
- [155] R.A. Bish, O.I. Fregoso, A. Piccini, M.P. Myers, Conjugation of complex polyubiquitin chains to WRNIP1, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 3481–3489. <https://doi.org/10.1021/pr800217q>.
- [156] G. Leuzzi, V. Marabitti, P. Pichierri, A. Franchitto, WRNIP1 protects stalled forks from degradation and promotes fork restart after replication stress, *EMBO J.* 35 (2016) 1437–1451. <https://doi.org/10.15252/embj.201593265>.
- [157] A. Yoshimura, M. Seki, T. Hayashi, Y. Kusa, S. Tada, Y. Ishii, T. Enomoto, Functional relationships between Rad18 and WRNIP1 in vertebrate cells, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) 2192–6. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.2192>.

- [158] Y. Kawabe, M. Seki, A. Yoshimura, K. Nishino, T. Hayashi, T. Takeuchi, S. Iguchi, Y. Kusa, M. Ohtsuki, T. Tsuyama, O. Imamura, T. Matsumoto, Y. Furuichi, S. Tada, T. Enomoto, Analyses of the interaction of WRNIP1 with Werner syndrome protein (WRN) in vitro and in the cell, *DNA Repair (Amst)*. 5 (2006) 816–828. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.04.006>.
- [159] T. Hayashi, M. Seki, E. Inoue, A. Yoshimura, Y. Kusa, S. Tada, T. Enomoto, Vertebrate WRNIP1 and BLM are required for efficient maintenance of genome stability, *Genes Genet. Syst.* 83 (2008) 95–100. <https://doi.org/10.2206/kyushujm.56.419>.
- [160] D. Branzei, M. Seki, F. Onoda, T. Enomoto, The product of *Saccharomyces cerevisiae* WHIP/MGS1, a gene related to replication factor C genes, interacts functionally with DNA polymerase δ , *Mol. Genet. Genomics*. 268 (2002) 371–386. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0757-3>.
- [161] T. Zacheja, A. Toth, G.M. Harami, Q. Yang, E. Schwindt, M. Kovács, K. Paeschke, P. Burkovics, Mgs1 protein supports genome stability via recognition of G-quadruplex DNA structures, *FASEB J.* 34 (2020) 12646–12662. <https://doi.org/10.1096/fj.202000886R>.
- [162] R.I. Mathad, E. Hatzakis, J. Dai, D. Yang, C-MYC promoter G-quadruplex formed at the 5'-end of NHE III 1 element: Insights into biological relevance and parallel-stranded G-quadruplex stability, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 9023–9033. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr612>.
- [163] H. You, J. Wu, F. Shao, J. Yan, Stability and kinetics of c- MYC promoter G-quadruplexes studied by single-molecule manipulation, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 2424–2427. <https://doi.org/10.1021/ja511680u>.
- [164] A. Piazza, M. Adrian, F. Samazan, B. Heddi, F. Hamon, A. Serero, J. Lopes, M.-P. Teulade-Fichou, A.T. Phan, A. Nicolas, Short loop length and high thermal stability determine genomic instability induced by G-quadruplex-forming minisatellites, *EMBO J.* 34 (2015) 1718–1734. <https://doi.org/10.15252/emboj.201490702>.
- [165] S. Amrane, M. Adrian, B. Heddi, A. Serero, A. Nicolas, J.L. Mergny, A.T. Phan, Formation of pearl-necklace monomorphic G-quadruplexes in the human CEB25 minisatellite, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 5807–5816. <https://doi.org/10.1021/ja208993r>.
- [166] M.D. Huber, D.C. Lee, N. Maizels, G4 DNA unwinding by BLM and Sgs1p: substrate specificity and substrate-specific inhibition, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 3954–3961. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf530>.
- [167] A.L. Valton, M.N. Prioleau, G-Quadruplexes in DNA Replication: A Problem or a Necessity?, *Trends Genet.* 32 (2016) 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.09.004>.
- [168] S.K. Bharti, S. Awate, T. Banerjee, R.M. Brosh, Getting ready for the dance: FANCI Irons out DNA wrinkles, *Genes (Basel)*. 7 (2016) 31. <https://doi.org/10.3390/genes7070031>.
- [169] F.E. Indig, I. Rybanska, P. Karmakar, C. Devulapalli, H. Fu, F. Carrier, V.A. Bohr, Nucleolin inhibits G4 oligonucleotide unwinding by werner helicase, *PLoS One*. 7 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035229>.
- [170] N. Van Wietmarschen, S. Merzouk, N. Halsema, D.C.J. Spierings, V. Guryev, P.M. Lansdorp, BLM helicase suppresses recombination at G-quadruplex motifs in transcribed genes, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02760-1>.
- [171] W.Q. Wu, X.M. Hou, B. Zhang, P. Fossé, B. René, O. Mauffret, M. Li, S.X. Dou, X.G. Xi, Single-molecule studies reveal reciprocating of WRN helicase core along ssDNA during DNA unwinding, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep43954>.