

A PARI fehérje szerepe a rekombináció-függő folyamatok szabályozásában elakadt replikációs villa esetén

Ph.D. értekezés tézisei

Hegedűs Lili

Témavezető: Dr. Haracska Lajos



Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

2021

Szeged

BEVEZETÉS

A sejtjeink felépítéséhez és működéséhez szükséges összes információt örökítőanyagunk, a DNS tartalmazza. A szerkezetében létrejött – külső vagy belső hatásra történő – módosulások megváltoztathatják működését, információtartalmát, ez pedig hatással lehet a sejt alapvető funkcióira. A DNS másolása egy nagy pontosságú folyamat, amelyet a replikatív polimerázok végeznek. Ezek az enzimek gyors és akkurátus másolásra specializálódtak, így, ha egy hibás DNS régióval találkoznak, azt nem képesek befogadni, és a duplikáció megáll. Ez súlyos következményekkel járhat: kettősszalú DNS-törésekhez, genomi átrendeződésekhez, a sejt halálához vagy rákos elfajulásához vezethet. Az elakadt replikációs villa menekítése tehát létfontosságú a sejtek számára. Az ismert, lehetséges mechanizmusok központi fehérjéje a PCNA, a replikatív polimeráz processzivitási faktora, mely gyűrűszerű homotrimert képez a DNS körül. Poszttranszlációs módosításai nagyon fontos szerepet töltenek be abban, hogy az elakadt replikációs villa menekítése milyen úton valósuljon meg. A PCNA fehérje a Rad6/Rad18 fehérjék működése révén monoubiquitilálódik a 164. lizinjén. Ez iniciálja az úgynevezett polimerázváltást, amely során a replikatív polimeráz helyét egy olyan alternatív (transzléziós) polimeráz veszi át, amely képes befogadni a hibás DNS-régiót, és azzal szemben nukleotidot beépíteni, így teszi lehetővé a DNS megkettőződésének befejezését. Ezek az enzimek azonban gyakran vétének hibát, így pontmutációk kialakulásához vezethetnek. A PCNA-hez kötött ubiquitinre további ubiquitinek kapcsolódhatnak azok 63. lizinjén keresztül, az Mms2/Ubc13 illetve a HLTF fehérjék összehangolt működése révén. Ez a folyamat iniciálja a replikációs villa visszafordulását, amely során az újonnan szintetizálódott, hibamentes DNS-szál fog templátként szolgálni a DNS duplikációjához, így ez hibamentes átírást tesz lehetővé. A harmadik lehetséges útvonal egy úgynevezett rekombináció-függő folyamat, amely során a DNS másolása egy homológ régióról történik. Ez a mechanizmus azonban mikrohomológiák keresésén alapul, így, ha nem a megfelelő DNS-szakasz szolgál templátként, súlyos genomi átrendeződéshez vezethet. A folyamat tehát szigorú szabályozás alatt áll, melynek központi eleme a SUMO fehérjével módosított PCNA, az ugyanis gátolja a nemkívánt homológ rekombinációs eseményeket.

Az elakadt replikációs villa menekítése és annak mechanizmusai, szabályozása *Saccharomyces cerevisiae*-ben nagyon alaposan feltérképezett folyamatok, humán sejtekben azonban keveset tudunk róluk. Az alapvető események nagyon hasonlóak az élesztőben tapasztaltakhoz, de az egyes lépések nem kizárólagosak, és nagyfokú redundanciát tapasztalhatunk. Az élesztőben végzett vizsgálatok azonban nagyon jó kiindulási pontként szolgálnak ahhoz, hogy megértsük az emberi sejtekben zajló folyamatokat. Élesztőben írták le ugyanis először, hogy a SUMOilált PCNA gátolja a rekombinációs eseményeket a sejtekben elakadt replikációs villa esetén, és együttműködik az Srs2 fehérjével. Az Srs2-nek több lehetséges humán funkcionális homológja is ismert, mint az RTEL1, az FBH1, a RECQ5 vagy a PARI fehérjék. Ezek közül csak a PARI (PCNA-Associated Recombination Inhibitor) fehérjéről mutatták ki, hogy képes interakcióba lépni a SUMOilált PCNA-vel és gátolja a homológ rekombinációt, de ennek molekuláris mechanizmusa részleteiben még nem ismert.

CÉLKITŰZÉS

Kutatásunk fő célkitűzése az volt, hogy mélyebb betekintést adjunk a PARI és a SUMOilált PCNA interakciójába a rekombinációs folyamatok szabályozásában. Ehhez sejtbioológiai és biokémiai módszereket is alkalmaztunk. Kutatási célunk eléréséhez a következő specifikus kísérleti terveket fogalmaztuk meg:

- Túlélési kísérletekkel azt kívántuk megvizsgálni, hogy a PARI fehérje milyen kapcsolatban áll a Rad18-függő DNS-hibatolerancia útvonalakkal UV-sugárzás következtében elakadt replikációs villa esetén.
- Egy, a homológ rekombinációs frekvenciát mérő riporterrendszer segítségével azt terveztük meghatározni, hogy a PARI fehérje túlermelletése hogyan befolyásolja a sejten zajló rekombinációs eseményeket.
- Szintén a fent említett riporterrendszer segítségével kívántuk meghatározni, hogy a PARI egyes doménjei (helikáz, PCNA-, illetve SUMO-interakciós motívumai) miként befolyásolják a rekombinációs eseményeket a sejtekben.
- Immunfestés és mikroszkópos analízis segítségével terveztük nyomon követni, hogy hogyan befolyásolják a PARI fehérje lokalizációját a PCNA- és SUMO-interakciós doménjeiben létrehozott pontmutációk, illetve mi történik, ha olyan PCNA van jelen a sejtekben, amely nem képes posztranszlációs módosulásra a 164. lizinjén.
- Kromoszómaaberrációs vizsgálatokkal terveztük meghatározni, mi történik a kromoszómákkal, ha kontrollálatlanul sok PARI fehérje van jelen a sejtekben.
- Egy biokémiai riporterrendszer segítségével azt a pontos molekuláris mechanizmust kívántuk modellezni, amely a rekombinációs események egyik kulcslépése, az úgynevezett D-hurok meghosszabbítása. Meg szeretnénk volna vizsgálni, milyen szerepe van ebben a PARI fehérjének, PCNA- és SUMO-interakciós motívumai hogyan befolyásolják ezt, és milyen szabályozó szerepe van ebben a PCNA illetve a SUMOilált PCNA fehérjének.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

- A kísérleteinkhez szükséges plazmidok klónozása (restrikciós emésztés, DNS fragment izolálása agaróz gélből, ligálás, plazmidtisztítás, LR reakció), pontmutások létrehozása mutagén PCR segítségével, baktériumok transzformálása
- Humán sejtek tenyésztése, transzfekciója, stabil sejtvonalak létrehozása
- Gélelektroforézis és Western blot
- Áramlási citométer alapú sejttúlélési vizsgálatok
- Homológ rekombinációt mérő sejt alapú riporterrendszer alkalmazása
- Immunfestés és mikroszkópos vizsgálatok
- Kromoszómaaberrációs vizsgálatok
- A biokémiai kísérletekhez szükséges fehérjék termelése és tisztítása affinitáskromatográfia segítségével
- PCNA SUMOilációs kísérlet
- A D-hurok meghosszabbítását vizsgáló *in vitro* riporterrendszer

EREDMÉNYEK

A PARI fehérje részt vesz az elakadt replikációs villa menekítésében

Munkánk során áramlási citométer alapú sejttúlélési vizsgálatokkal meghatároztuk, hogy a PARI RNS interferenciával történő csendesítése - az élesztő *SRS2*-delécióval élesztő sejtekhez hasonlóan - szuppresszálta a Rad18-hiányos sejtek UV-érzékenységét. Ez arra utal, hogy elakadt replikációs villa esetén a PARI fehérje gátolja a rekombináció-függő folyamatokat, ugyanis, ha a Rad18 nincs jelen a sejtekben, az elakadt replikációs villa menekítését a rekombináció-függő folyamat végzi. Ha jelen van a PARI fehérje a sejtekben, ez a folyamat gátolt, hiánya azonban utat enged ennek a mechanizmusnak, így a PARI-RAD18 kettős csendesített sejtvonal kevésbé lesz érzékeny UV-sugárzásra, mint a RAD18-csendesített sejtvonal önmagában. A PARI fehérje túltermeltetése éppen az ellenkező hatást váltotta ki: a sejtek érzékenysége UV-sugárzással szemben megnövekedett.

A PARI fehérje gátolja a homológ rekombinációt *in vivo*

Egy specifikus, a homológ rekombinációs eseményeket mérő *in vivo* riporterrendszer segítségével kimutattuk, hogy a PARI fehérje gátolja ezeket a folyamatokat a sejtben, és ez független helikáz doménjétől, azonban PCNA- és SUMO-interakciós motívumai fontos szerepet játszanak a fehérje működésében. Ez utóbbit túlélési vizsgálatokkal is igazoltuk.

A PARI fehérje lokalizációja főként PCNA-interakciós doménjétől függ

Immunfestés és mikroszkópos analízis segítségével kimutattuk, hogy a PARI fehérje lokalizációja főként PCNA-interakciós motívumától függ, ugyanis az ebben létrehozott pontmutációt tartalmazó PARI fehérje PCNA-vel való kolokalizációja sérült.

A PARI és a SUMO lálódni nem képes PCNA kolokalizációja sérül

Kísérleteink során megvizsgáltuk, mi történik a PARI fehérje lokalizációjával, amennyiben olyan PCNA van jelen a sejtekben, amely nem képes poszttranszlációs módosulásra a 164. lizinjén. Ebben az esetben a két fehérje kolokalizációja sérült.

A PARI fehérje túltermelése genomi instabilitást okozhat

Kromoszómaaberrációs vizsgálatok segítségével kimutattuk, hogy amennyiben túltermeltetjük a PARI fehérjét a sejtekben, a kromoszómatörések és -fúziók száma megnövekedett, azaz a PARI fehérje kontrollálatlan működése genomi instabilitáshoz vezet.

A PARI fehérje gátolja a D-hurok meghosszabbítását *in vitro*

Egy biokémiai riporterrendszer segítségével, amely a homológ rekombináció egy fontos eseményét, a D-hurok meghosszabbítását modellezi, kimutattuk, hogy a PARI fehérje gátolja ezt a folyamatot, és ezt PCNA-függő módon teszi. Ehhez nem szükséges a helikáz doménje, de PCNA-interakciós motívuma jelentős szerepet tölt be a folyamatban.

ÖSSZEFOGLALÁS

Egy DNS-hiba következtében elakadt replikációs villa menekítése többféleképpen is megvalósulhat a sejtekben. Az, hogy melyik útvonal aktív, szigorú szabályozás alatt áll, hiszen nem mindegy, hogy a sejtekben egy gyors, ám mutagén transzlációs szintézis zajlik vagy éppen egy bonyolult struktúrákon végbemenő, de pontos másolást lehetővé tevő templátváltás. Ezen mechanizmusok közötti molekuláris kapcsoló a PCNA fehérje, illetve annak poszttranszlációs módosításai. Míg ubiquitilációja a DNS-hibatolerancia útvonalakat aktiválja, addig SUMOilációja a rekombináció-függő folyamatot gátolja. Utóbbiban élesztőben végzett vizsgálatok alapján fontos szerepet tölt be az Srs2 fehérje, több szinten hatva. Helikáz aktivitása révén részt vesz a D-hurok szétszerelésében, SUMOilált PCNA-függő módon pedig a D-hurok meghosszabbítását gátolja. Humán sejtekben ezeket a funkciókat több fehérje látja el, melyek közül a PARI-ról mutatták ki, hogy kölcsönhatásba lép a SUMOilált PCNA-vel. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a PARI fehérje milyen molekuláris mechanizmusok révén valósítja meg a homológ rekombináció gátlását az elakadt replikációs villa menekítésekor: a D-hurok meghosszabbításának gátlása során megakadályozza, hogy a homológ szakaszcson hosszasan történjen meg a duplikáció, lecsökkentve az esélyét az átkereszteződéseknek és meggátolva a további rekombinációs eseményeket és az esetleges genomi átrendeződéseket.

SUMMARY

The replication stalled due to DNA damage can be rescued via several mechanisms. The choice of activating a certain pathway is strictly regulated; it is important whether a fast but mutagenic translesion synthesis should take place in the cell or template switching, which is error free but goes through complicated secondary structures. The role of the molecular switch between these pathways is fulfilled by the PCNA protein and its posttranslational modifications. Its ubiquitination activates the DNA damage tolerance pathways, while its SUMOylation inhibits recombination-dependent processes. In this latter, as demonstrated in yeast cells, the Srs2 protein is an important player. Moreover, inhibition of recombination is achieved at several levels. Srs2, with its helicase activity, participates in the disassembly of the D-loops and, in a SUMOylated PCNA-dependent manner, it inhibits the extension of the D-loops. In human cells, all these functions are shared by several proteins, with PARI having been shown to interact with PCNA. During our studies, we revealed the molecular mechanism via which PARI inhibits homologous recombination at the stalled replication fork: by inhibiting D-loop extension, PARI prevents duplication from a homologous region for a long period thus decreasing the chance of crossovers, inhibiting further recombination events, and possible genome rearrangements.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszöntet mondok témavezetőmnek, Dr. Haracska Lajosnak azért, hogy 2011 óta tagja lehetek a csoportjának, hogy lehetőséget biztosított több kutatási téma kidolgozására, számos technika elsajátítására, és magas színvonalú szakmai fejlődésre.

Köszönettel tartozom Dr. Burkovics Péternek a sok-sok szakmai és baráti tanácsért, a dolgozatomban nyújtott segítségéért, és a rengeteg támogatásért, amit tőle kaptam.

Köszönöm Dr. Juhász Szilviának, hogy az egyetemi éveim alatt segített elsajátítani a technikákat, és elindított a kutatói pályán.

Köszönetet mondok Kovács Katalinnak és Nótári Péternének a sok technikai segítségért és gyakorlati tudásért, amivel segítettek a mindennapjaim.

Köszönöm Tick Gabriellának a publikációk és egyéb közlemények, pályázatok megírásában nyújtott hatalmas segítségét.

Köszönöm Dudás Katának és Soltész Csillának a sok támogatást és vidám pillanatot, amit tőlük kaptam az elmúlt évek során.

Köszönettel tartozom Dr. Székvölgyi Lórántnak és Dr. Pankotai Tibornak, hogy elvállalták a dolgozatom bírálatát.

Köszönettel tartozom külföldi partnereinknek, különösen Dr. Lumir Krejcinnek, aki nélkül nem jöhetett volna létre a dolgozatom alapjául szolgáló publikáció.

Köszönöm középiskolai tanárimnak, Máriás Ildikónak és Rózsa Sipos Mónikának, hogy megszerettedek velem a természettudományokat, és elindítottak ezen az úton.

Köszönetet mondok csoportunk minden jelenlegi és korábbi tagjának, akik valamilyen módon támogattak.

Köszönettel tartozom a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetikai Intézet vezetőinek és minden tagjának, akik segítettek a munkámat.

Köszönöm a családomnak, Hegedűs Dánielnek és Hegedűs Rékának a rengeteg támogatást.

A disszertáció elkészítéséhez a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (GINOP-2.3.2-15-2016-00024 és GINOP-2.3.2-15-2016-00026) valamint a Horizont 2020 kutatási és innovációs program (támogatási megállapodás száma: 739593) nyújtott támogatást.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

MTMT szám: 10053349

Összesített IF: 39,058

A dolgozat alapját képező közlemény

Péter Burkovics*, Lili Döme*, Szilvia Juhász, Veronika Altmannova, Marek Sebesta, Martin Pacesa, Kasper Fugger, Claus Storgaard Sorensen, Marietta Y.W.T. Lee, Lajos Haracska, Lumir Krejci: The PCNA-associated protein PARI negatively regulates homologous recombination via the inhibition of DNA repair synthesis. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 44 : 7 pp. 3176-3189. , 14 p. (2016), MTMT: 3028656, IF: 10,162

*Megosztott első szerző

További közlemények

Gabriel Fenteany, Paras Gaur, Lili Hegedűs, Kata Dudás, Ernő Kiss, Edit Wéber, László Hackler, Tamás Martinek, László G. Puskás, Lajos Haracska: Multilevel structure–activity profiling reveals multiple green tea compound families that each modulate ubiquitin-activating enzyme and ubiquitination by a distinct mechanism. SCIENTIFIC REPORTS 9: 1 Paper: 12801, 16 p. (2019), MTMT: 30791081, IF: 4,525

Cong K Peng M, NJ Panzarino, S Nayak, J Calvo, B Deng, LJ Zh, M Morocz, L Hegedus, L Haracska, SB Cantor: Opposing Roles of FANCD1 and HLF1 Protect Forks and Restrain Replication during Stress, CELL REPORTS 24 : 12 pp. 3251-3261., 11 p. (2018), MTMT: 27695954, IF: 8,032

Csilla Brasko, Kevin Smith, Csaba Molnar, Nora Farago1, Lili Hegedus, Arpad Balind, Tamas Balassa, Abel Szkalitsy, Farkas Sukosd, Katalin Kocsis, Balazs Balint6 Lassi Paavolainen, Marton Z. Enyedi, Istvan Nagy, Laszlo G. Puskas, Lajos Haracska, Gabor Tamas, Peter Horvath: Intelligent image-based in situ single-cell isolation, NATURE COMMUNICATIONS 9 : 1 Paper: 226 , 7 p. (2018), MTMT: 3318793, IF: 11,878

Ágnes Tóth*, Lili Hegedűs *, Szilvia Juhász, Lajos Haracska, Péter Burkovics: 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

Nyilatkozat

Alulírott, Dr. Haracska Lajos, nyilatkozom, hogy Hegedűs Lili doktori disszertációjában bemutatott eredmények tükrözik a jelölt „*Péter Burkovics**, *Lili Döme**, *Szilvia Juhász*, *Veronika Altmannova*, *Marek Sebesta*, *Martin Pacesa*, *Kasper Fugger*, *Claus Storgaard Sorensen*, *Marietta Y.W.T. Lee*, *Lajos Haracska*, *Lumir Krejci*: *The PCNA-associated protein PARI negatively regulates homologous recombination via the inhibition of DNA repair synthesis. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 44: pp. 3176-3189., 14 p. (2016)*” közleményben bemutatott hozzájárulását. A doktori értekezésben bemutatott eredményekben, valamint a további közlemények fokozatszerzéshez felhasznált anyagrészeiben a jelölt munkája meghatározó fontosságú, és más doktori fokozatszerzésben nem kerültek és a jövőben sem kerülnek felhasználásra.

Szeged, 2021. október. 4.

Témavezető: Dr. Haracska Lajos

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott, Dr. Burkovics Péter, nyilatkozom, hogy Hegedűs Lili doktori disszertációjában bemutatott eredmények tükrözik a jelölt „*Péter Burkovics**, *Lili Döme**, *Szilvia Juhász*, *Veronika Altmannova*, *Marek Sebesta*, *Martin Pacesa*, *Kasper Fugger*, *Claus Storgaard Sorensen*, *Marietta Y.W.T. Lee*, *Lajos Haracska*, *Lumir Krejci*: *The PCNA-associated protein PARI negatively regulates homologous recombination via the inhibition of DNA repair synthesis. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 44: pp. 3176-3189., 14 p. (2016)*” közleményben bemutatott hozzájárulását. A doktori értekezésben bemutatott eredményekben a jelölt munkája meghatározó fontosságú, és más doktori fokozatszerzésben nem kerültek és a jövőben sem kerülnek felhasználásra.

Szeged, 2021. október. 4.

Dr. Burkovics Péter