

A Saccharomyces cerevisiae Rad5
aktivitásainak genetikai vizsgálata

Ph.D. értekezés

Tóth Róbert

Témavezető: Dr. Haracska Lajos

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

2022

Szeged

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	7
2.1. A DNS-károsodás és biológiai következményei	7
2.2. A DNS-hibajavítási útvonalak	7
2.3. A DNS-hibatolerancia útvonal	9
2.4. A transzléziós DNS-szintézis	10
2.5. A Rad5 és a posztreplikációs hibajavítás	12
2.6. A HIRAN domén	14
2.7. A <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
2.8. Az élesztő Rad5 homológjai	15
2.9. A <i>RAD5</i> genetikai kapcsolatai	19
3. Célkitűzések	21
4. Anyagok és módszerek	22
4.1. Élesztő törzsek	22
4.2. Plazmidok	25
4.3. Antibiotikumok	26
4.4. Ellenanyagok	26
4.5. Tápoldatok	27
4.6. Oldatok	28
4.7. Élesztő kettős mutánsok készítése	30
4.8. Genomi DNS izolálása élesztő sejtekből	31
4.9. PCR	31
4.10. Mutagenézis PCR	31
4.11. Élesztő kompetens sejtek készítése	32

4.12. Élesztő kompetens sejtek transzformálása	32
4.13. Élesztő sejtek tárolása glicerolban.....	33
4.14. Spot assay	33
4.15. Túlélési görbe	33
4.16. Növekedési görbék	33
4.17. Kanavanin rezisztens spontán mutagenézis kísérlet.....	34
4.18. Teljes genom szekvenálás	34
4.19. A Rad5 expressziójának a vizsgálata.....	35
4.20. <i>In vivo</i> PCNA poliubikvitinálás vizsgálata.....	35
4.21. Fehérjetisztítás	36
4.22. <i>In vitro</i> ubikvitin ligáz assay	36
4.23. Helikáz assay	37
4.24. Fehérje szekvenciák illesztése	37
5. Eredmények.....	39
5.1. A <i>rad5</i> mutánsok <i>in vivo</i> érzékenységeinek vizsgálata mutagén ágensekre túlélési tesztekben	39
5.2. A Rad5 mutánsok vizsgálata <i>in vitro</i> ubikvitin ligáz és helikáz kísérletekben	42
5.3. A mutáns Rad5 fehérjék expressziójának a vizsgálata	45
5.4. A PCNA <i>in vivo</i> poliubikvitinálása <i>rad5</i> mutáns törzsekben.....	47
5.5. A <i>rad5-IA</i> mutáns és az <i>MMS2/UBC13</i> genetikai kapcsolata.....	47
5.6. A <i>rad5</i> helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz mutánsok genetikai kapcsolata	48
5.7. A spontán mutációk gyakorisága a <i>rad5</i> mutáns törzsekben	52
5.8. Az UV-indukált mutációk típusainak az aránya a <i>rad5</i> mutáns törzsekben.....	54
5.9. A <i>rad5</i> mutánsok és a TLS polimerázok genetikai kapcsolata	57
5.10. A HIRAN domén mutáns törzsek <i>in vivo</i> vizsgálata.....	59
5.11. A HIRAN domén mutáns fehérjék <i>in vitro</i> biokémiai vizsgálata	63
6. Értékelés	66

7. Köszönetnyilvánítás	74
8. Irodalomjegyzék	75
9. Összefoglaló	88
10. Summary.....	93
12. Saját közlemények jegyzéke.....	97
12.1. A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény.....	97
12.2. Referált folyóiratban megjelent közlemények.....	97

1. Rövidítések jegyzéke

AP	Apurinic/Apyrimidinic	Apurinált/Apirimidinált
APS	Ammonium Persulfate	Ammónium-perszulfát
ATP	Adenosine Triphosphate	Adenozin-trifoszfát
BER	Base Excision Repair	Báziskivágó hibajavítás
BIR	Break-Induced Replication	Törés indukálta replikáció
BSA	Bovine Serum Albumin	Szarvasmarha szérum albumin
CDDP	Cisplatin (cis-Diamineplatinum(II) dichloride)	Ciszplatin
COBALT	Constraint-based Multiple Alignment Tool	Konzervált domén alapú többszörös illesztés
DDT	DNA Damage Tolerance	DNS-hibitolerancia
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Dimetil-szulfoxid
DNS	Deoxyribonucleic Acid	Dezoxiribonukleinsav
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate	Dezoxinukleotid-trifoszfát keverék
DTT	Dithiothreitol	Ditiotreitol
dsDNS	double-stranded DNA	dupla-szálú DNS
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	Etilén-diamin-tetraecetsav
GST	Glutathione S-transferase	Glutation-S-transzferáz
G418	Geneticin	Geneticin
HIRAN	HIP116, Rad5p N-terminal domain	HIRAN domén
HLTF	Helicase-Like Transcription Factor	Helikázszerű transzkripciós faktor
HRP	Horseradish Peroxidase	Torma peroxidáz
HRR	Homologous Recombinational Repair	Homológ rekombinációs hibajavítás
H15	Linker histone H1 and H5 family domain	Hiszton kapcsoló H1 és H5 típusú domén
KanMX4	Kanamycin/Geneticin resistance gene	Kanamycin/Geneticin rezisztenciáért felelős gén
k.sz.	-	katalógus szám
LB	Luria-Bertani media	Luria-Bertani tápoldat
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast	Egér embrionális fibroblaszt

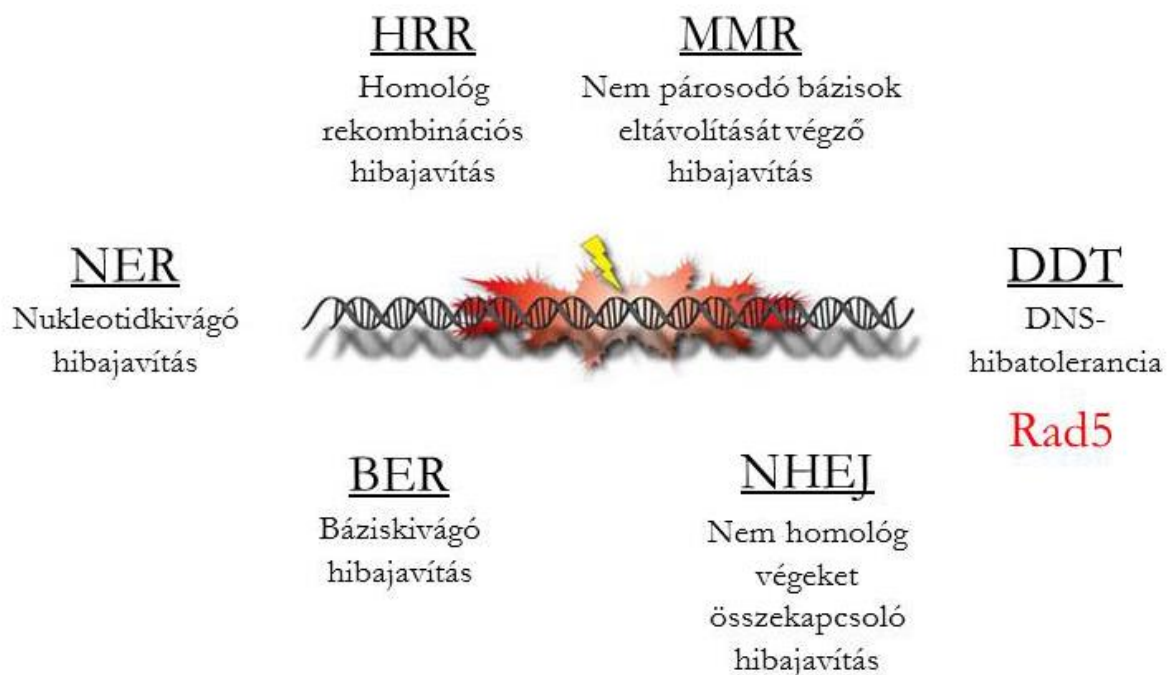
MMC	Mitomycin-C	Mitomycin-C
MMR	Mismatch Repair	Nem párosodó bázisok eltávolítását végző hibajavítás
MMS	Methyl Methanesulfonate	Metil-metánszulfonát
MQ	Milli-Q water	Milli-Q rendszerrel desztillált víz
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Biotechnológiai Információk Nemzetközi Központja
NER	Nucleotide Excision Repair	Nukleotidkivágó hibajavítás
NHEJ	Non-homologous end joining	Nem homológ végeket összekapcsoló hibajavítás
NP40	Detergent compound	Detergens vegyület
OD	Optical Density	Optikai denzitás
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	Poliakrilamid gélelektroforézis
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	Osztódó sejtek nukleáris antigénje
PCR	Polymerase Chain Reaction	Polimeráz láncreakció
PEG	Polyethylene Glycol	Polietilén-glikol
PGK	Phosphoglycerate Kinase	Foszfoglicerát kináz
PHD	PHD-finger domain	PHD-ujj domén
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride	Fenilmetilszulfonil-fluorid
PRR	Postreplication Repair	Posztreplikációs hibajavítás
RFC	Replication Factor C	Replikációs faktor C
RING	Really Interesting New Gene	RING domén
RPM	Round Per Minute	Percenkénti fordulatszám
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	Nátrium-dodecil-szulfát
SHPRH	SNF2 Histone linker PHD RING Helicase	SNF2 hiszton kapcsoló PHD RING helikáz
SWI/SNF	SWItching/Sucrose Non Fermenting	SWI/SNF domén
TB	TRIS-Borate Buffer	TRIS és bórsav tartalmú puffer
TCA	Trichloroacetic acid	Triklór-ecetsav
TE	TRIS-EDTA Buffer	TRIS és EDTA tartalmú puffer
TEMED	Tetramethylethylenediamine	Tetrametil-etiléndiamin
TLS	Translesion Synthesis	Transzléziós DNS-szintézis

TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Trisz(hidroximetil)-aminometán
UBA1	Ubiquitin-Activating E1 enzyme	Ubikvitin aktiváló E1 enzim
UBM	Ubiquitin-binding motif	Ubikvitin-kötő motívum
UV	Ultraviolet	Ultraibolya
UBZ	Ubiquitin-binding Zinc finger	Ubikvitin-kötő Cink-ujj domén
YBB	Yeast Breaking Buffer	Élesztő törő puffer
YPD	Yeast Pepton Dextrose	Élesztő kivonat, pepton és dextróz tartalmú tápoldat
4-NQO	4-nitroquinoline N-oxide	4-nitroquinolin N-oxid

2. Bevezetés

2.1. A DNS-károsodás és biológiai következményei

Számos környezeti hatás a DNS károsodásához, ezáltal mutációk kialakulásához vezet. Ilyen károsító hatás például a radioaktív- vagy az ultraibolya (UV) sugárzás, mely timin-dimereket hozhat létre, vagy akár DNS-töréseket is generálhat [1]. A reaktív oxigén gyökök, az anyagcsere során keletkező aldehidek és a metil-metánszulfonát (MMS) is módosíthatja DNS molekulát. Az MMS képes az adenin és guanin nukleotidokat metilálni [2,3]. Ezek a károsodások a DNS megváltozásán keresztül a genomban kódolt fehérjék aminosav sorrendjének megváltozását, vagy a gének regulációjának hibáját okozhatják. A többsejtű élőlények számára különösen fontos, hogy a DNS károsodásokat mielőbb eltávolítsák, mert bizonyos mutációk az érintett sejtek korlátlan osztódását indíthatják el, ami daganat kialakulásához, ezáltal rákbetegség létrejöttéhez vezethet.



1. ábra: A főbb DNS-hibajavítási útvonalak. A Rad5 a DNS-hibitolerancia folyamatában vesz részt.

2.2. A DNS-hibajavítási útvonalak

A DNS-károsodások eltávolítására több hibajavítási útvonal is kialakult (1. ábra). A hibajavítási útvonalak legtöbbje a sejtciklus minden fázisában aktív, és feladatuk a károsodott DNS szakasz kijavítása. A DNS-hibitolerancia útvonal kivétel, itt ugyanis nem történik javítás, az útvonal szerepe a replikációs blokk feloldása a DNS átíródásának idején, az S-fázisban. A DNS-hibitolerancia útvonal kulcsfontosságú, az átírást lehetetlenné tevő

károsodások ugyanis a replikáció leállásán keresztül rövid időn belül a sejt halálához vezetnek.

A teljes sejtciklus során három hibajavító útvonal is képes a károsodott, vagy rosszul replikálódott DNS javítására. Ha csak egyetlen ponton történt károsodás a báziskivágó hibajavítás (base excision repair - BER), a nukleotidkivágó hibajavítás (nucleotide excision repair - NER) és a nem párosodó bázisok eltávolítását végző hibajavítás (mismatch repair - MMR) egyaránt kijavíthatja a hibát (**1. ábra**). A BER első lépésében a károsodott bázist egy DNS N-glikoziláz távolítja el, így apurinált/apirimidinált (AP) hely keletkezik. Az AP helyek jelenléte a genomban leggyakrabban jelen lévő DNS-hiba [4,5]. A keletkező AP helyek helyreállítására két külön útvonal is kialakult (Short Patch és Long Patch) [6,7]. A rövidebb folyamat során egy AP endonukleáz hasítja a DNS-t az AP helytől 5' irányban, majd a DNS szintézist követően - amikor csupán egyetlen nukleotid épül be - egy liáz eltávolítja a dezoxiribóz-foszfát csoportot, ami az AP helyen volt. A hosszabb folyamat során a DNS szintézise folytatódik az AP helytől 3' irányban is és végül az így leválasztott egyesszálú DNS szakaszt egy flap endonukleáz távolítja el. A BER folyamatában a sérült bázis kivágódik, de ez csak akkor jelent megoldást, ha egyetlen bázis károsodott. Ha több bázis is sérült, például timin-dimerek alakulnak ki, ezek eltávolítását a NER hatékonyabban képes elvégezni. A NER esetében hosszabb egyszálú DNS-szakasz, 25-30 nukleotid, kerül eltávolításra, így ez a hibajavítási útvonal több hibás bázis egyidejű eliminálását is lehetővé teszi [8].

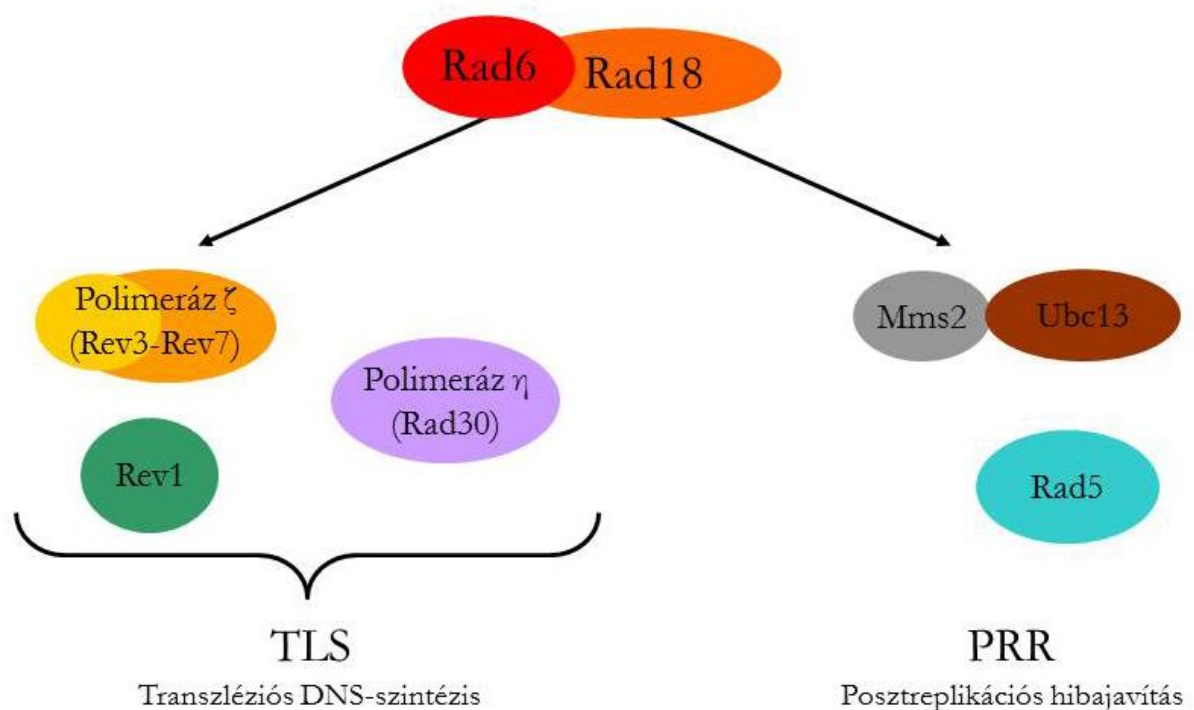
Mind a NER mind a BER alkalmas a sérült bázisok javítására, de nem minden DNS szerkezeti torzulás ered ilyen típusú károsodásból. Replikációs hiba esetén ép, de nem a komplementer nukleotid épül be a DNS-száiba. Az ilyen típusú hibák javítását a mismatch repair MMR végzi. Az MMR a replikáció során hibásan beépült nukleotid, és a tőle 5' irányban található nukleotid szakasz, azonnali eltávolítására képes [9,10].

Az UV sugárzás által létrehozott duplaszálú töréseket javítására a fenti útvonalak egyike sem képes. A duplaszálú törések javításában két eltérő hibajavító útvonal vesz részt, a nem homológ végeket összekapcsoló hibajavítás (non-homologous end joining - NHEJ) [11,12] és a homológ rekombinációs hibajavítás (homologous recombinational repair - HRR). A NHEJ esetében a törött kettős szálú végek egyszerűen összeligálódnak. A szabad DNS-végek ligálását a Ku70 és Ku80 fehérjékből álló heterodimer aktiválja. Ha azonban a kettős szálú DNS törés nem azonnal javítódik ki, az érintett szakasz károsodhat, ami kisebb deléciók létrejöttéhez vezethet. Egyidejű kettős törések esetén a NHEJ a genomban egymástól távol található DNS-szekvenciákat is összeligálhat, ami kromoszóma átrendeződések megjelenését

eredményezheti [13,14]. A HRR hibajavítási útvonal bonyolultabb, de nagyságrendekkel pontosabb. A HRR első lépésében a törött duplaszú DNS 5' végeit a Sae2 endonukleáz és az Mre11-Rad50-Xrs2 exonukleáz aktivitású fehérje komplex visszaemészt [15–17], majd a szabad 3' végeket a Rad51 megköti és a Rad52 aktiválja a szálinváziót a homológ szekvenciához [18–20]. Ezután a homológ szálat templátként használva DNS szintézis indul. Végül a Holliday-junction szerkezetek feloldódnak és helyreáll az ép duplaszálú DNS [21–24].

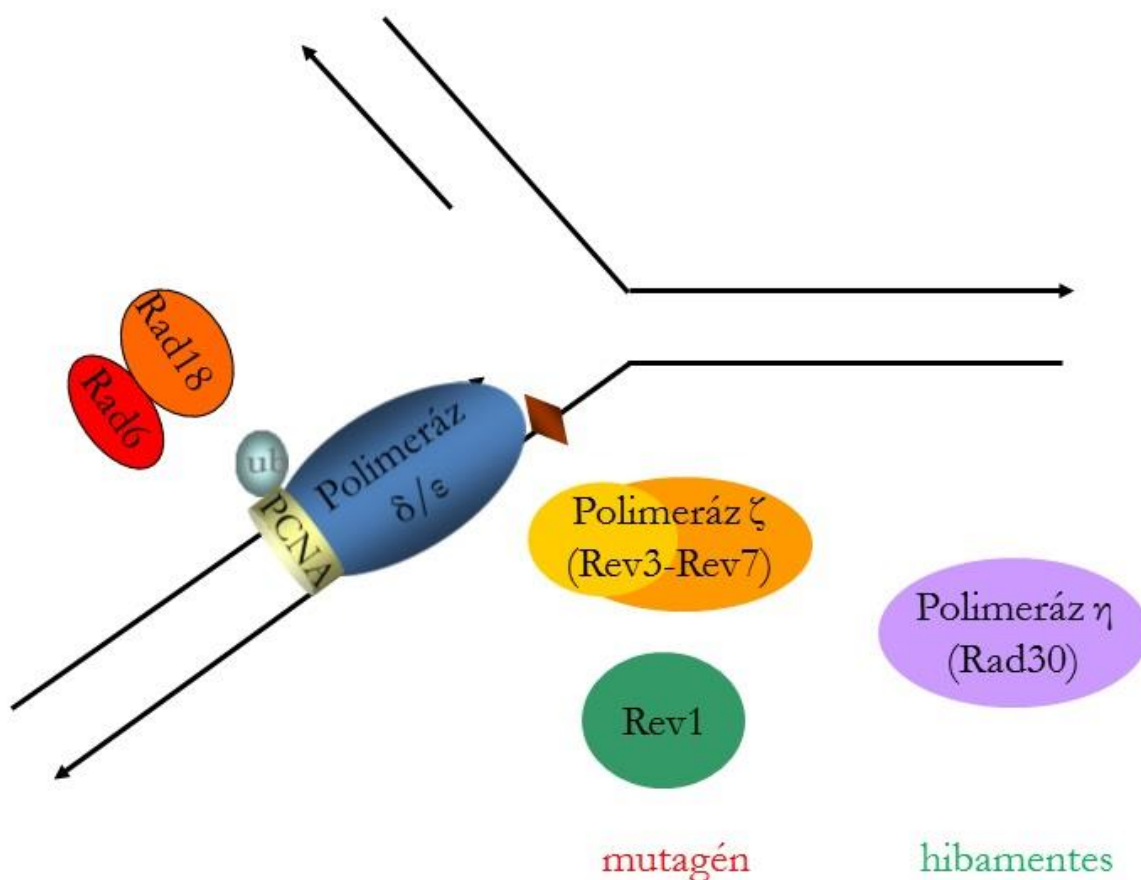
2.3. A DNS-hibatolerancia útvonal

A sejt nyugalmi állapotában keletkező DNS-károsodások javítására a fentebb tárgyalt hibajavítási folyamatok valamennyien alkalmasak, így általuk elkerülhető, hogy a keletkezett mutációk fennmaradjanak. Az S fázis során keletkező DNS-károsodás az adott sejt szempontjából sokkal veszélyesebb következménnyel is járhat, mint a mutációk keletkezése. A DNS szintézise során ugyanis a DNS hibák a replikáció leállításához és végső soron a sejt azonnali halálához vezethetnek. A DNS-hibatolerancia útvonal (DNA Damage Tolerance - DDT), elsődleges feladata a replikáció folytonosságának fenntartása, ebben a folyamatban nem történik meg a károsodások eltávolítása. Ezt a sejt később, más hibajavító folyamatokkal (NER, BER) végzi el.



2. ábra: A DNS-hibatolerancia útvonalának két folyamatában - a transzléziós DNS-szintézisben és a posztreplikációs hibajavításban - szerepet játszó ismert fehérjék.

A DNS-hibatolerancia útvonal akkor aktiválódik, amikor egy hibához érve a DNS szintézise leáll, mert a károsodott szakaszt a replikációs polimeráz nem képes átírni. A DDT első lépésében a replikációs polimerázok processzivitási faktora, a PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) fehérje 164. lizinje ubikvitinálódik. A folyamatot a Rad6 E2 ubikvitin konjugáz [25] és a Rad18 E3 ubikvitin ligáz [26] fehérjék komplexe katalizálja [27,28]. Ezután két útvonal is aktiválódhat, vagy a transzléziós DNS-szintézis (trans lesion synthesis - TLS) vagy a posztreplikációs hibajavítás (postreplication repair - PRR) folyamata folytathatja a replikáció menekítését (**2. ábra**).



3. ábra: A TLS folyamata. Amikor a Polimeráz δ/ϵ egy hibához érve elakad, a Rad6-Rad18 fehérjék komplexe ubikvitinálja a PCNA fehérjét, majd egy TLS polimeráz (Pol ζ , Rev1, Pol η) leváltja a Polimeráz δ/ϵ -t és folytatja a DNS szintézisét a hibán keresztül is. Ebben az esetben az átírás mutagén vagy hibamentes módon egyaránt történhet. ub: ubikvitin, barna rombusz: DNS-károsodás

2.4. A transzléziós DNS-szintézis

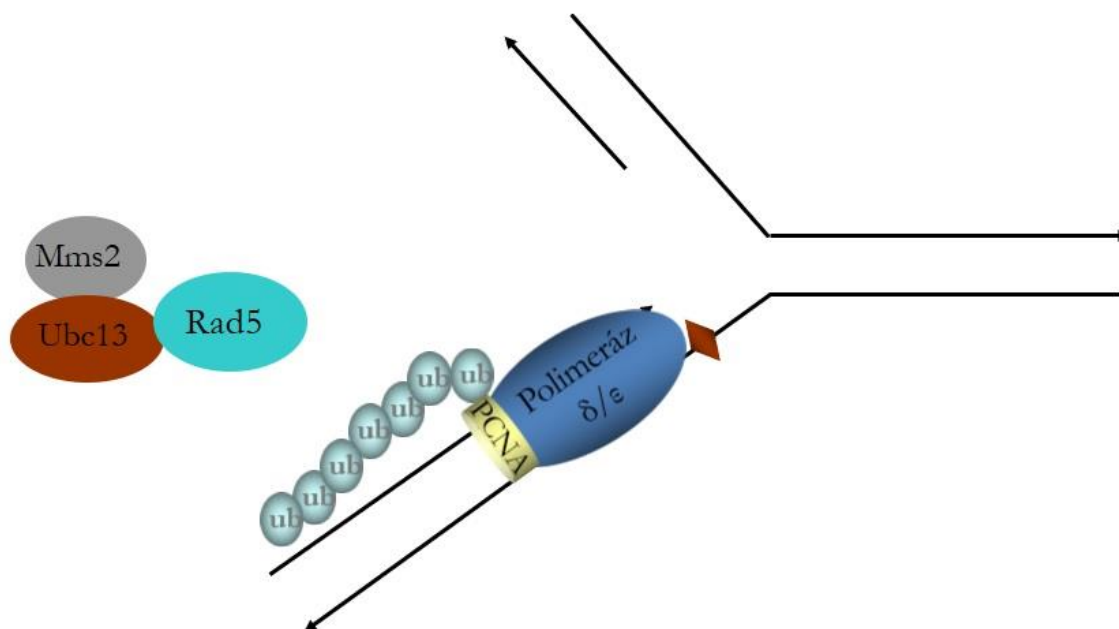
Élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) a TLS folyamatának két útvonalát ismerjük. Az egyik egy mutagén - mutációkat létrehozó - TLS, amit a Pol ζ és a Rev1 végez (**3. ábra**)

[29]. A másik egy hibamentes útvonal, amely a Pol η -hoz köthető és a timin dimerekkel szemben képes adenint beépíteni.

A mutagén TLS útvonal egyik polimeráza a Pol ζ . A Pol ζ két alegységből áll: a Rev3 fehérjéből, ami katalitikus aktivitással rendelkezik és a Rev7 fehérjéből, ami egy járulékos alegység [30]. A Pol ζ alacsonyabb pontossággal működik, mint a Pol δ , a Pol ϵ , vagy a Pol η [30]. A Pol ζ egy olyan speciális DNS polimeráz, amely nagy hatékonysággal folytatja a DNS szintézist a hibával szemben is, de random nukleotidot épít be, vagyis mutagén DNS-szintézist visz véghez, emiatt a *rev3* mutáns élesztőben alacsonyabb a spontán mutagenézis, mint a vad típusú törzsben [31].

A Rev1 egy dezoxicitidil transzferáz [32], mely csak citozinok beépítésére képes a DNS szintézise során, ezért aktivitása szintén erősen mutagén [33], a TLS folyamatában azonban inkább az a szerepe, hogy elősegíti más TLS polimerázok működését [34]. Egerekben megfigyelték, hogy a *Rev1*^{-/-} mutáns vonalakban a C>G mutációk aránya jelentősen lecsökkent, ugyanis a Rev1 fehérjének szerepe van ezen mutációk kialakításában [35].

A hibamentes TLS útvonal polimeráza a Pol η – amit a *RAD30* gén kódol – egy olyan TLS polimeráz, amely specifikusan az UV sugárzás által kialakított timin-dimerekkel szemben képes beépíteni két adenint, vagyis a TLS Pol η függő útvonala hibamentes [36].



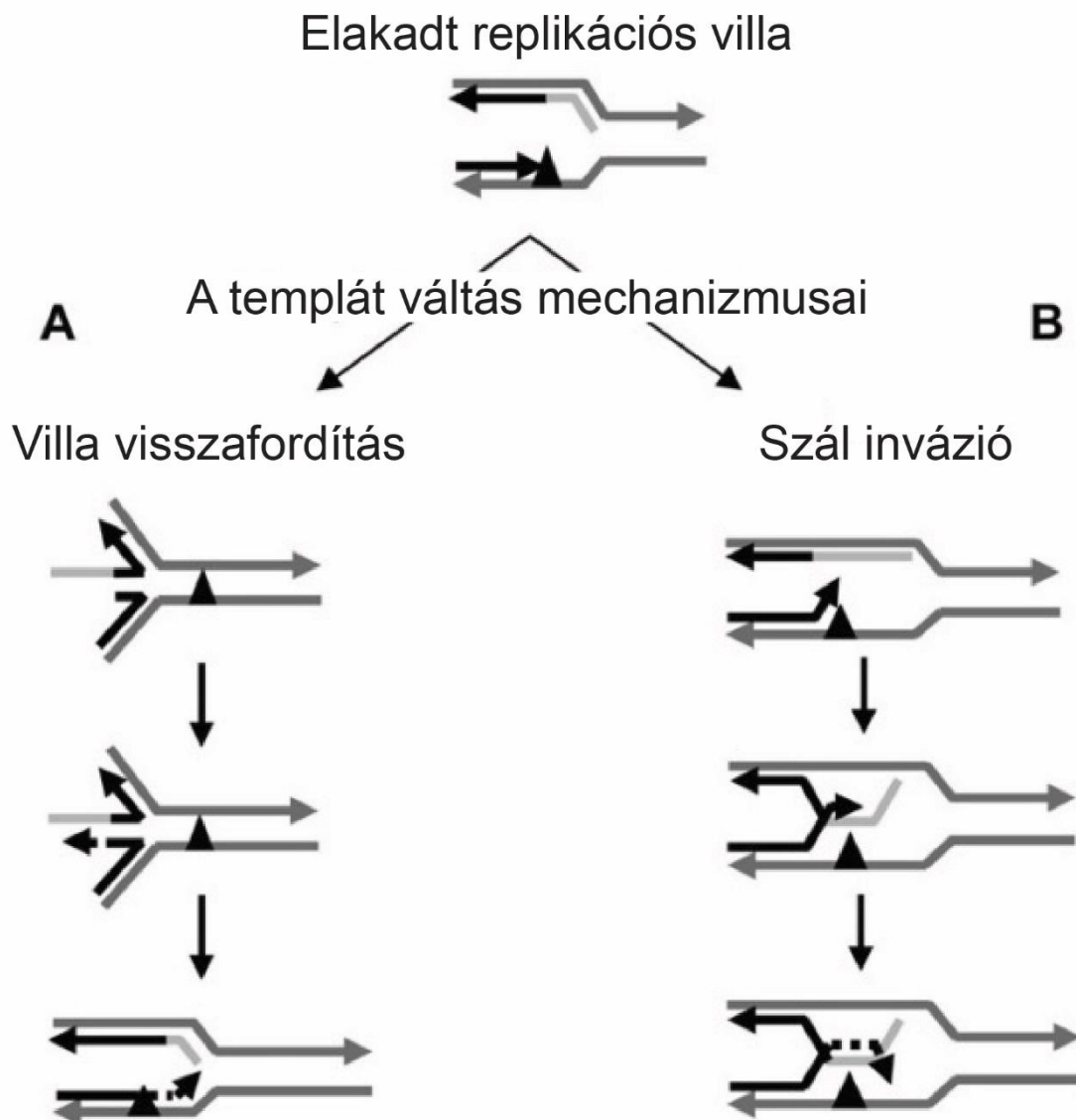
4. ábra: Az Mms2-Ubc13 ubikvitin konjugáz és a Rad5 ubikvitin ligáz fehérjék komplexe képes poliubikvitinálni a monoubikvitin-PCNA fehérjét. ub: ubikvitin, barna rombusz: DNS-károsodás

2.5. A Rad5 és a posztreplikációs hibajavítás

Doktori értekezésemben a Rad5 fehérje DNS hibajavításban betöltött szerepét vizsgálom. Ez a faktor a posztreplikációs hibajavítás (PRR) útvonal egyik kulcsszereplője, ezt az útvonalat részletesebben tárgyalom. A PRR folyamatának első lépése, hogy az Ubc13 E2 ubikvitin konjugáz és az Mms2 fehérjék komplexe [37] a Rad5 E3 ubikvitin ligázzal poliubikvitinálja a már 164. lizin aminosav pozícióban monoubikvitinált-PCNA fehérjét az ubikvitin 63. lizinjein keresztül [38,39] (**4. ábra**). Bár PCNA poliubikvitinációjának pontos funkciója még nem ismert, lehetséges, hogy a poliubikvitin-PCNA a TLS aktiválásában játszik szerepet. A poliubikvitin lánc egy erős jel az olyan ubikvitin kötő fehérjék számára, mint amilyen a Rev1 és a Pol η , melyek ubikvitin-kötő motívum (ubiquitin-binding motif - UBM) [40] és ubikvitin-kötő cink-ujj (ubiquitin-binding zinc finger - UBZ) [41] doménekkel rendelkeznek. Az *mms2* és az *ubc13* mutáns törzsek kevésbé érzékenyek UV besugárzásra, mint a *rad5*, és egyik sem érzékenyíti a *rad5* mutációját UV kezelésre; az *mms2/rad5* és az *ubc13/rad5* kettős mutánsok ugyanolyan érzékenységet mutatnak, mint a *rad5* [42]. Ez azt jelenti, hogy az Mms2-Ubc13 minden esetben együttműködik a Rad5 fehérjével az UV indukálta károsodások javításában, viszont a Rad5 az ubikvitin ligáz aktivitása mellett más funkcióval is rendelkezik. Az ubikvitin ligáz aktivitásért a Rad5 RING (Really Interesting New Gene) finger doménje felelős [42–44]. A RING domént tartalmazó fehérjékre jellemző, hogy ubikvitin ligáz aktivitással rendelkeznek [45,46]. A RING doménen belül pedig a C₃HC₄ motívum szükséges a Rad5 és az Ubc13 kölcsönhatásához [42].

A Rad5 másik aktivitása az SWI/SNF (SWItching/Sucrose Non Fermenting) doménjéhez köthető [38]. Az ilyen doménnel rendelkező fehérjékre az jellemző, hogy ATPáz és DNS transzlokáz aktivitásuk van [47,48]. A Rad5 SWI/SNF doménje is rendelkezik mind ATPáz [49], mind DNS transzlokáz aktivitással [50]. Ha a replikáció a vezető szálon elakad, akkor a Rad5 képes megfordítani a replikációs villát, és így az elakadt, újonnan szintetizált vezető szál a lemaradó szálról, mint templárról képes folytatni a DNS szintézisét (**5A. ábra**). Ilyen villavisszafordító-aktivitással, a Rad5 fehérjén kívül, élesztőben az Mph1 is rendelkezik [51,52]. Mivel a *rad5* mutáns törzs nagyobb UV érzékenységet mutat, mint az *mms2* vagy az *ubc13* [42], lehetséges, hogy a Rad5 helikáz/ATPáz aktivitása az ubikvitin ligáz aktivitásától függetlenül működik. A *rad5* mutáns törzsek nagyobb érzékenységét azonban az is okozhatja, hogy a Rad5 más aktivitással is rendelkezik. Ismert, hogy a templátváltásnak a villavisszafordítás csak az egyik lehetséges módja, ismert, hogy a Rad5 fehérje a másik lehetséges módon, szálinvázióval is képes ezt a folyamatot véghezvinni (**5B. ábra**) [53]. A szálinvázión alapuló villa visszafordítás folyamata független a Rad5 ATPáz aktivitásától és a

Rad51 fehérjétől [54]. Habár a szál inváziót követő DNS-szintézis polimeráza élesztőben még nem ismert, a humán Pol η szerepet játszik a D-loop extenzióban a HRR során [55], ezért lehetséges, hogy a villa visszafordítás során a Pol η működik együtt a Rad5 fehérjével.



5. ábra: A templátváltás lehetséges mechanizmusai a Rad5 fehérje közreműködésével. (A) A replikációs villa-visszafordítás. (B) A szálinvázió [56]. Fekete háromszög: DNS-károsodás

A Rad5 fehérje HIRAN (HIP116, Rad5p N-terminal) doménnel is rendelkezik, melyet eredetileg DNS-kötő doménként ismertek [57], de az utóbbi években bebizonyosodott, hogy valójában a replikációs villaszerű speciális DNS-szerkezetek szubsztrátként való felismerésében van szerepe [58–60].



6. ábra: A HLTF HIRAN domén működésének a modellje [59]. A HIRAN domén a vezető szál 3' végéhez kötődik, és elválasztja azt a másik DNS száltól.

2.6. A HIRAN domén

Munkánk során a Rad5 HIRAN doménjét is vizsgáltuk, olyan mutánst próbáltunk előállítani, ami specifikusan ennek a doménnek a funkcióját rontja el. A HIRAN domén konzervált, több fehérjében, különböző fajokban azonosított, DNS-kötő aktivitással rendelkező fehérje alegység [57]. Az élesztő Rad5 HIRAN doménje nélkül nem képes genom fókuszokat formálni MMS kezelést követően [61]. A Rad5 HIRAN domén a replikációs villaszerű DNS szubsztráton a vezető szál 3' végéhez kötődik és a villa-visszaforrázásban van szerepe [62]. Ezt a DNS-kötő aktivitást igazolták a Rad5 humán homológjának, a helikázszerű transzkripció faktor (helicase-like transcription factor - HLTF) fehérjének az esetében is, úgy, hogy megvizsgálták a DNS és a HIRAN domén együttes komplexének a kristályszerkezetét [59,60,63]. Kimutatták, hogy a HIRAN domén legjobban a DNS 3' végéhez kötődik [59,60,63,64], emiatt *in vitro* helikáz kísérletben a replikációs villát modellező DNS szubsztrát vezető szálának 3' módosítása képes megakadályozni a HLTF villa-visszaforrázó aktivitását (**6. ábra**) [59,64]. Az NN90,91AA HIRAN domén mutáns HLTF nem rendelkezik helikáz aktivitással, azonban ubikvitin ligáz aktivitásával képes poliubikvitinálni a monoubikvitin-PCNA fehérjét *in vitro* biokémiai kísérletekben [58]. Hasonló fenotípust mutat *in vitro* kísérletekben az R71E HIRAN domén mutáns HLTF fehérje is, ATPáz és ubikvitin ligáz aktivitása olyan mint a vad típusé, azonban helikáz aktivitása jelentősen csökkent [65]. Más kísérletekben viszont a HIRAN domén nélküli HLTF nem tudott poliubikvitin-PCNA-t létrehozni [66]. A HLTF fehérjével ellentétben az AtRad5a, ami a Rad5 lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) homológja, a helikáz aktivitásához nem szükséges a DNS 3' hidroxilcsoportja (-OH) [59,67]. Az AtRad5a HIRAN doménje az elágazó DNS struktúrákhoz kötődik és ehhez sincs szükség a DNS 3' hidroxilcsoportjára [67].

In vivo kísérletekben az NN90,91AA HIRAN domén mutáns HLTF fehérje expressziója képes részlegesen menekíteni a HLTF csendesített humán sejtvonal UV érzékenységét és a sejtmagi lokalizációja olyan, mint a vad típusú és a HIRAN domén nélküli HLTF fehérjéé [58]. Azonban a R71E HIRAN domén mutáns HLTF fehérjét termelő sejtek

hidroxiurea érzékenysége olyan, mint a HLTf deléziós mutáns sejté [65]. A Rad5 *Schizosaccharomyces pombe* homológja, a Rad8 esetén, a HIRAN domén deléciója ugyanolyan UV és MMS érzékenységet okoz, mint a RAD8 teljes deléciója, valamint HIRAN domén nélkül nem képes a Rad8 a sejtmagba lokalizálódni [68]. Ehhez hasonlóan a HIRAN domén nélküli AtRad5a fehérjének az expressziója sem képes menekíteni az *Atrad5a* mutáns lúdfü ciszplatin érzékenységét [67].

A *Saccharomyces cerevisiae* Rad5 HIRAN doménjének pontos szerepéről jelenleg kevés információnk van, annak ellenére, hogy az utóbbi évtizedekben a DDT és a Rad5 funkcióinak a megismeréséhez a leggyakrabban ezt a modellt szervezetet használták.

2.7. A *Saccharomyces cerevisiae*

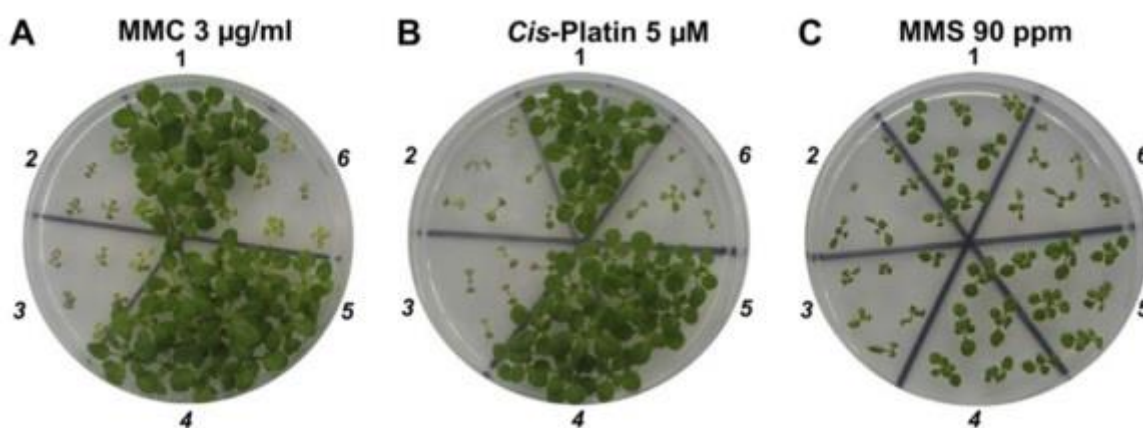
Az előző fejezetekben tárgyalt DNS-hibajavító mechanizmusok rendkívül konzerváltak. A humán DNS hibajavító fehérjék nagy részének a homológja megtalálható péklesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*). A péklesztő, vagy bimbózó élesztő emiatt rendkívül alkalmas modell szervezet a DNS-hibajavítási folyamatok vizsgálatára. További előnye még, hogy kisméretű, olcsó fenntartani és rövid az élettartama (90-120 perc). A *Saccharomyces cerevisiae* genetikailag rendkívül könnyen manipulálható. A genetikai kísérletek szempontjából különösen hasznos, hogy az élesztő keresztezhető, transzformálható és könnyen létrehozhatók benne tetszőleges méretű deléciók. Az élesztő mutánsok egyszerűen menekíthetők az érintett gént plazmidról expresszáva. Előnyt jelent továbbá, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* teljes genomját megszekvenálták, és egy törzsgyűjtemény is rendelkezésünkre áll, ahol minden egyes nem esszenciális gén delécióját tartalmazó mutáns törzs megtalálható haploid formában [69]. Előnyös tulajdonságai miatt az élesztőt számos DNS-hibajavítási folyamat tanulmányozására használták sikerrel és használjuk ma is. Az élesztő mellett azonban más modell szervezeteken is végeztek kísérleteket a Rad5 homológjainak a vizsgálatára.

2.8. Az élesztő Rad5 homológjai

A RAD5 gént először 1970-ben azonosították *Saccharomyces cerevisiae*-ben. A RAD5 gént érintő *rev2* mutáns élesztő törzs a vad típusú törzsnél kisebb mértékben tudta revertálni UV hatására az *arg4-17* mutációt, emellett UV és Röntgen sugárzásra egyaránt érzékenységet mutatott [70]. Később kimutatták, hogy a *lys2-1*, az *ade2-1* és a *lys1-1* mutációk UV reverziójára is alacsonyabb mértékben képes, mint a vad típusú törzs, ezért nevezték el *rev2* mutánsnak [38]. Végül azonban a *rad5* név terjedt el az irodalomban a mutáns törzs UV és Röntgen sugárzásra mutatott érzékenysége miatt. A Rad5 kis ismétlődő szekvenciák

instabilitásához is hozzájárul, ugyanis a poli(GT) szekvenciák hosszváltozásának a gyakorisága 10^{-4} értékről 10^{-5} értékre csökken *rad5* mutáns háttéren [38].

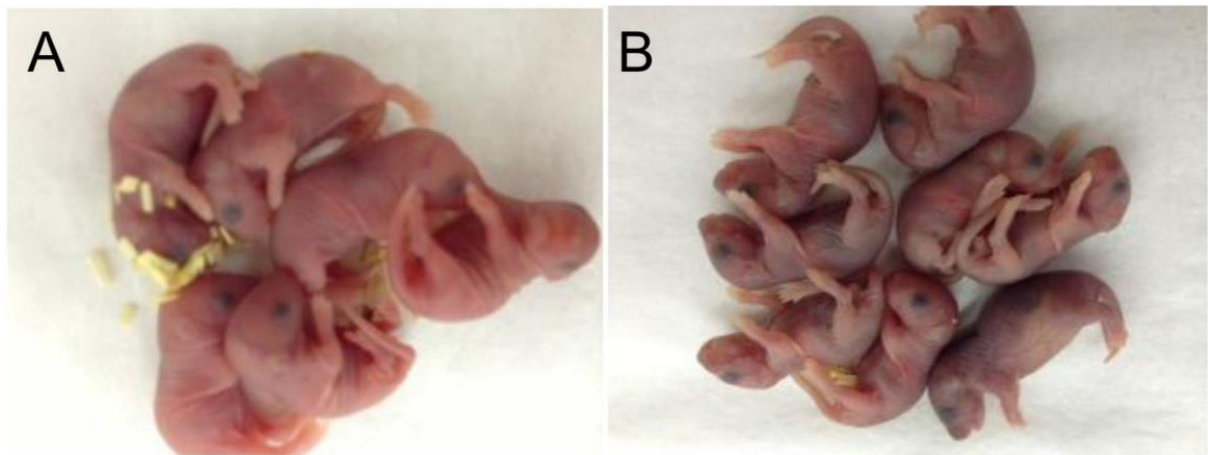
Schizosaccharomyces pombe hasadó élesztőben *RAD5* gént *RAD8* néven azonosították 1993-ban [71]. Kimutatták, hogy a *rad8* mutáns is életképes hasonlóan a *rad5* mutáns élesztő törzshöz és ugyanúgy érzékeny UV és γ sugárzásra is [71]. A Rad8 fehérjében azonosítottak egy nukleáris lokalizációs szignált, egy HIRAN domént, egy RING domént és egy SNF2-típusú helikáz domént, ami ATP-kötő helyet tartalmaz [68,71]. A *Schizosaccharomyces pombe rad8* mutáns törzs a sejtciklus G1/S fázisában a legérzékenyebb az ionizáló sugárzásokra [71]. A Rad8 – a Rad5 fehérjéhez hasonlóan – az Mms2-Ubc13 fehérjék komplexével együtt részt vesz a monoubikvitin-PCNA ionizáló sugárzás hatására történő poliubikvitinálásában [72].



7. ábra: Az élesztő *RAD5* *Arabidopsis thaliana* homológjainak az *AtRAD5a* és az *AtRAD5b* gének mutánsainak az érzékenysége MMC (mitomycin-C) (A), ciszplatin (B) és MMS (C) kezelésekre. 1: vad típusú, 2-3: *Atrad5a*, 4-5: *Atrad5b*, 6: *Atrad5a/Atrad5b* mutáns növények [73].

Lúdfüben (*Arabidopsis thaliana*) a Rad5 fehérjének két homológiát azonosították 2008-ban, az *AtRad5a*-t és az *AtRad5b*-t [73]. Mindkét homológ fehérjében megtalálható a HIRAN, a RING és az SNF2 típusú DNS transzlokáz domén, akárcsak a Rad5 fehérjében [73]. Az *Atrad5a* mutáns lúdfű rendkívül érzékeny DNS-DNS keresztkötő ágensekre (ciszplatin, mitomycin-C), míg MMS kezelésre kisebb érzékenységet mutat (7. ábra) [73]. Az *Atrad5b* mutáns lúdfű nem mutat érzékenységet ezek közül egyik DNS károsító ágensre sem [73]. Bleomycin kezelés hatására létrejövő DNS kettős törések csak az *Atrad5a* mutáns lúdfűben csökkentik a HRR aktivitását, az *Atrad5b* mutánsban nem [73]. Így inkább az *AtRAD5a* gén tekinthető az élesztő *RAD5* lúdfű homológjának. Kimutatták, hogy az *AtRad5a* az *AtRev3* fehérjétől független folyamatokban vesz részt az MMS, az UV, a 4-NQO (4-

nitroquinolin N-oxid), a MMC (mitomycin-C) és a CDDP (ciszplatin) indukálta DNS károsodások javításában [74]. Az AtRad5a - a Rad5 fehérjéhez hasonlóan - szintén szerepet játszik a monoubikvitin-PCNA poliubikvitinálásában [75]. Emellett az AtRad5a RING és ATPáz doménjeinek az aktivitásai esszenciálisak ahhoz, hogy a fehérje el tudja látni *in vivo* funkcióját az MMS, a CDDP és a MMC okozta DNS károsodások javításában [76]. Az AtRad5a dsDNS-függő ATPáz aktivitással rendelkezik. Replikációs-villa visszafordító funkciója is van, amely leginkább olyan DNS-szubsztráton mutat aktivitást, ami a vezető szál 3' vége és az elágazás között egy gap-et tartalmaz [67]. Ez a DNS szubsztrát jó modellje a DNS-károsodás miatt elakadt vezető szálnak. Az AtRad5a helikáz aktivitása fehérjéhez kötött DNS szubsztráton is működik [67].



8. ábra: Vad típusú (A) és *Hltf*^{-/-} (B) egerek 12-24 órával a születésük után. [77]

Emlősökben is két homológja ismert az élesztő *RAD5* génnek: a *HLTF* és az SNF2 hiszton kapcsoló PHD RING helikáz (SNF2 Histone linker PHD RING Helicase - *SHPRH*) [78–81]. Egérben először a *HLTF* gént azonosították *P113* és *ZBU1* néven 1997-ben [82,83]. Az *SHPRH* gént egérben és emberben egyaránt 2003-ban azonosították [84]. Meglepő módon a *Hltf*^{-/-}/*Shprh*^{-/-} kettős mutáns egér embrionális fibroblaszt (mouse embryonic fibroblast - MEF) sejtek a vad típusúhoz hasonlóan képesek *in vivo* poliubikvitinálni a monoubikvitin-PCNA fehérjét UV kezelést követően. Feltehetően egy még ismeretlen harmadik ubikvitin ligáz fehérje is képes véghez vinni ezt folyamatot [85]. Valószínűleg hasonló okokból a *Hltf*^{-/-}/*Shprh*^{-/-} kettős mutáns B sejtek sem mutatnak érzékenységet MMS, UV vagy ciszplatin kezelésekre [85]. A *Hltf*^{-/-} egerek nem mutattak semmilyen fejlődési rendellenességet [86], ám a mutáns egerek 64%-a elpusztul, zömmel (48%), a születés utáni 12-24 órában [87]. A *Hltf*^{-/-} mutáns egerekben ezen kívül magasabb apoptózis, csökkent életképesség és agylágyulás (encephalomalacia) figyelhető meg [87]. Az újszülött *Hltf*^{-/-} egerek agyának transzkriptom

analízisét is elvégezték. Azt az eredményt kapták, hogy a vizsgált 20.000 gén közül, 95 esetben emelkedett, míg 246 esetén csökkent az mRNS koncentráció a vad típushoz képest [87]. A HLTF hiányában olyan géneknek változott meg a transzkripciója, amelyek a sejtciklus szabályozásában játszanak szerepet [87]. Ugyanezen szerzők egy független közleményben azt találták, hogy a *Hltf*^{-/-} egerek 74%-a elpusztul, ebből 75% a születés utáni 12-24 órában [77]. A *Hltf*^{-/-} mutáns egerekre újszülött korban (6-8 óra) jellemző az alacsony vércukor szint (hipoglikémia), a 12-24 órás korú homozigóták pedig a cianózis, a zihálás és a haldoklás tüneteit mutatják (**8. ábra**) [77]. Újszülött egerekben a HLTF fehérje nem csak az agyban akkumulálódik, hanem a szívben és a vázizmokban is [83]. Az újszülött egerek szívének a transzkriptom vizsgálatával kimutatták, hogy a *Hltf*^{-/-} egerekben 10 gén esetében emelkedett és 1526 gén esetében csökkent a transzkripció mértéke a vad típushoz képest [77]. A HLTF olyan gének transzkripcióját is szabályozza, amelyek a sejtciklus G2/M tranzíciójában, illetve a kollagén biogenezisben játszanak szerepet [77].



9. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* Rad5 fehérjének és humán homológjainak (HLTF és SHPRH) domén szerkezete nagy hasonlóságot mutat [81]. I, Ia, II, III, IV, V, VI: SNF2-típusú helikáz domén részei. HIRAN, RING, H15, PHD: domének. DEGH, DEAQ, C₃HC₄, 3L: fehérje motívumok.

Az élesztő Rad5 egyik humán homológ fehérjéjét, HIP116 néven, DNS-kötő fehérjeként írták le 1995-ben [88]. Később ugyanez a fehérje transzkripciós faktorként vált ismertté, már a ma is használt HLTF elnevezéssel [89,90]. A HLTF fehérjének szerepe van a β -globin transzkripciójában [91], valamint transzkripciós faktorként szabályozza a kék és barna szemszín kialakulását is [92,93]. Megfigyelték, hogy a vastagbélrákok 43%-ára jellemző, hogy a HLTF expressziója megszűnik a gén promóterének a metilációja miatt, míg hasonló HLTF promóter metilációt tüdő és mell rákos minták esetében nem tudtak kimutatni [94]. A gyomorrákos sejtek 17%-ában már a tumor kialakulásának korai fázisaiban is megfigyelhető a HLTF promóterének a metilációja [95]. Egy másik kísérletben pedig kimutatták, hogy a gyomorrákos sejtek 28%-ában megszűnt a HLTF expressziója

promóterének a metilációja miatt [96]. A HLTF promóterének a metilációja méhnyakrákos sejtekre is jellemző [97]. A HLTF amellett, hogy tumor szuppresszor és transzkripció faktor, a Rad5 fehérjéhez hasonló domén szerkezettel és aktivitásokkal is rendelkezik [53]. A HLTF fehérjében is megtalálható a HIRAN domén és az I.-VI. alegységekből álló SNF2 típusú helikáz/ATPáz domén, melynek közepén egy RING domén helyezkedik el (**9. ábra**) [53]. A HLTF ugyanúgy képes poliubikvitinálni a monoubikvitin-PCNA fehérjét ubikvitin ligáz aktivitásával, mint az élesztő Rad5 [81], valamint replikációs villavisszafordító aktivitása is ugyanúgy működik [98]. Az élesztő Rad5 másik humán homológja az SHPRH, mely szintén rendelkezik ubikvitin ligáz aktivitással és szerepe van a monoubikvitin-PCNA fehérje poliubikvitinálásában [78–80,99]. Az SHPRH a helikáz/ATPáz doménben elhelyezkedő RING doméneken kívül egy hiszton kapcsoló H1 és H5 típusú domén (linker histone H1 and H5 family domain - H15) és egy PHD-ujj (PHD) doménnel is rendelkezik (**9. ábra**) [53]. Az SHPRH fehérje konkrét funkciójáról kevés ismeret áll rendelkezésünkre, de azt leírták, hogy míg a HLTF az UV sugárzás által létrehozott DNS-károsodások tolerálásában játszik szerepet, addig az SHPRH az MMS indukálta DNS-hibákért felel [100,101]. Az SHPRH ATPáz aktivitását a duplaszálú DNS nem képes aktiválni, csak a nukleoszómák [102]. 2018-ban felfedezték, hogy az SHPRH gén egy részéről átíródó cirkuláris RNS-ről termelődő fehérje tumor szuppresszor aktivitással rendelkezik [103]. Számos független közleményben megerősítették ennek a fehérjének a tumor szuppresszor funkcióját [104–107].

2.9. A *RAD5* genetikai kapcsolatai

Élesztő genetikai adatok alapján tudjuk, hogy a *RAD5* gén a *RAD6-RAD18*, azaz a DDT útvonalba tartozik. A *rad5Δ/rad6Δ* kettős mutáns törzs ugyanolyan érzékeny UV kezelésre, mint a *rad6Δ* egyszeres mutáns [38]. Ugyanez jellemző a *rad5Δ* és a *rad18Δ* mutációkra is [38], valamint a Rad5 kölcsönhat a Rad18 fehérjével élesztő-két-hibrid kísérletek alapján [108]. UV érzékenyséjük alapján a TLS polimerázok génjei közül egyik sem mutat genetikai kapcsolatot a *rad5* mutációjával [38,109], ami azt jelenti, hogy a Rad5 és a TLS polimerázok egymástól független folyamatokban vesznek részt. E genetikai eredmények alapján azonban nem tudjuk kizárni az együttműködésük lehetőségét. Ko-immunprecipitációs kísérletekben sikerült kimutatni a Rad5 és a Rev1 fizikai kölcsönhatását [110]. Ezt a kölcsönhatást később megerősítették élesztő két-hibrid és glutation-S-transzferáz (GST) pull-down kísérletekben is, sőt azonosították a Rev1 kötésért felelős aminosavat is a Rad5 fehérjében. A Rev1 kötésre képtelen pontmutáns *rad5* azonban nem mutatott genetikai kapcsolatot az ubikvitin ligáz mutációval sem MMS érzékenységben sem UV mutagenézisben, tehát ez a két aktivitás - a Rad5-Rev1 és a Rad5-Ubc13 kölcsönhatás -

egymástól független folyamatokban vesz részt [111]. A Rad5-Rev1 kölcsönhatást kromatin-immunprecipitációs kísérletekben is igazolták [112]. Egy plazmid alapú kísérleti rendszerben, melyben a TLS folyamatát tanulmányozták a különböző DNS-károsodásokkal szemben, a *rad5Δ* mutáns törzs hasonló eredményt mutatott, mint a *rev3Δ*, amiből arra következtettek, hogy a Rad5 szükséges a Pol ζ függő TLS folyamathoz [113]. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a Rad5 valamilyen módon együttműködik a TLS polimerázokkal. Továbbá lehetséges, hogy a Pol ζ és a Pol η sem teljesen függetlenül működik egymástól, ugyanis GST pull-down kísérletekben már kimutatták fizikai kapcsolatukat [114]. Így elképzelhető, hogy a DDT három folyamata nem teljesen független egymástól, és a Rad5 fehérje együttműködhet a TLS polimerázokkal.

Ismereteink a Rad5 villavisszafordító-aktivitásának és ubikvitin ligáz aktivitásának kapcsolatáról még ellentmondásosak. Korábbi irodalmi adatok alapján e két aktivitás egymástól független szereppel bír, amint azt kimutatták UV túlélési kísérletekben [115] és adozelesin kezelés esetén is [116]. Újabb cikkek alapján azonban a két aktivitás között genetikai kapcsolat van: a helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz kettős mutáns ugyanolyan fenotípust mutat, mint az egyszeres helikáz/ATPáz mutáns törzs [117,118]. Ez azt jelenti, hogy az ubikvitin ligáz aktivitás minden esetben együttműködik a helikáz/ATPáz aktivitással, és a helikáz/ATPáz aktivitásnak önmagában is van valamilyen funkciója a DNS károsodások javításában [118]. Az egyik cikk szerzői szerint a helikáz/ATPáz funkció nélkülözhető, és a DDT folyamatában a Rad5 csak az ubikvitin ligáz aktivitásával vesz részt [117]. Azonban egy későbbi közleményben ismét azt az eredményt kapták, hogy a Rad5 ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz aktivitása egymástól független folyamatokban vesz részt [119]. Az idézett független közleményekben különböző mutánsokat használtak a Rad5 aktivitásainak elrontására. Munkánk során az eddig ismert Rad5 mutáns fehérjéket ellenőriztük, majd kiválasztottuk a legmegfelelőbbeket és megvizsgáltuk a Rad5 helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz aktivitásai közötti genetikai kapcsolatot. Mivel korábbi adatok arra utalnak, hogy a Rad5 részt vesz a TLS folyamatában [113], azt is megvizsgáltuk, hogy a Rad5 melyik aktivitása működhet együtt a TLS polimerázokkal. Ezen kívül azt is megvizsgáltuk, hogy a HIRAN doménre a Rad5 mely aktivitásaihoz van szükség. A humán Rad5 fehérje vonatkozásában a fenti összefüggéseket már vizsgálták, de az élesztő Rad5 fehérje pontos működése még nem ismert.

3. Célkitűzések

A Rad5 a replikációs villa visszafordítására képes DNS helikáz, amely a mutációk hibamentes javítását teszi lehetővé a posztreplikációs hibajavítás során templátváltással. A fehérje szükséges az UV és MMS asszociált testvér kromatid kicserélődéshez és a PCNA poliubikvitinációjához. A Rad5 fehérjének helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz aktivitása is van. A Rad5-höz hasonló multifunkciós fehérjék aktivitásai általában egyetlen összetett folyamatban vesznek részt, azonban ez alól vannak kivételek. Előfordulhat, hogy az egyik aktivitás a többitől függetlenül is működik, ezt a kérdést szeretnénk volna megvizsgálni. Munkám fő célja volt az élesztő Rad5 fehérje DNS-hibatoleranciában betöltött szerepének átfogó jellemzése.

Munkám specifikus céljai a következők voltak:

- a Rad5 helikáz/ATPáz aktivitása és ubikvitin ligáz aktivitása egymástól független funkció-e vagy a két aktivitás minden esetben együtt működik.
- a Rad5 a fenti két aktivitáson kívül rendelkezik-e további szereppel a DNS-hibatolerancia folyamatában.
- a Rad5 aktivitásainak elvesztése hogyan befolyásolja a spontán mutációk kialakulását és az egyes funkciók hiánya milyen arányban módosítja az UV kezelés hatására létrejött mutációk összetételét.
- a Rad5 fenti két aktivitása együttműködik-e a TLS polimerázok (Rev1, Pol ζ , Pol η) bármelyikével.
- a Rad5 HIRAN doménje szerepet játszik-e a fehérje aktivitásának meghatározásában.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Élesztő törzsek

A dolgozatban BY4741 (*MATa*, *his3Δ1*, *met15Δ0*, *leu2Δ0*, *ura3Δ0*) és BY4742 (*MATa*, *his3Δ1*, *lys2Δ0*, *leu2Δ0*, *ura3Δ0*) deléciós mutáns élesztő törzseket használtunk. A BY4741 élesztő törzsekben az egyes gének helyére egy KanMX4 kazettát építettek be, mely a geneticin (G418) rezisztenciáért felelős. Ezeket a vonalakat az Euroscarf cégtől rendeltük. A dolgozatban szereplő minden delécio meglétét és méretét PCR-ral ellenőriztük (Polymerase Chain Reaction- Polimeráz láncreakció). A kétszeres deléciós mutánsokat a BY4741 (*met15Δ*, A mating típusú) deléciós mutánsok és a BY4742 *rad5Δ* (*rad5Δ::URA3*, *can1*, *lys2Δ*, a mating típusú) törzsek keresztezésével hoztuk létre.

A *rad5Δ* delécio mutagén kezelésre mutatott érzékenységének a menekítésére Rad5 fehérjét expresszáló, -LEU szelekciós marker gént hordozó YCplac111 plazmidokat transzformáltunk a sejtekbe. Ezért minden egyes kísérlethez -LEU tápoldatot és táptalajt használtunk, hogy a menekítő plazmidra szelektáljunk. A transzformáns törzsek leírása a **10. ábrán** látható.

A mutáns Rad5 fehérjék túltermeltetésére pBJ842 alapú plazmidokat használtunk, amelyekkel minden fehérje tisztítás előtt újra transzformáltuk a BJ5464 (*MATa*, *ura3-52*, *trp1*, *leu2Δ1*, *his3Δ200*, *pep4::HIS3*, *prb1-Δ1.6R*, *can1*, *GAL*) élesztő törzset.

A spontán mutagenézis kísérletekhez és a mutáns Rad5 fehérjék expressziós szintjének az ellenőrzéséhez EMY74.7 (*MatA*, *his3-D1*, *leu2-3 leu2-112*, *trp1::hisG*, *ura3-52*) élesztő törzset használtunk.

Az *in vivo* PCNA ubikvitinálás vizsgálatához DF5a (*MatA*, *trp1-1(am)*, *his3-D200*, *ura3-52*, *lys2-801*, *leu2-3 leu2-112*, *bar1::HIS3*, *pol30::hisG*, *rad5::hisG*) élesztő törzset használtunk.

Név	Sorszám	Plazmid	Élesztő törzs
WT	YHU1414	üres	BY4741
<i>RAD5/rad5Δ</i>	YHU1329	<i>RAD5</i>	BY4742
<i>rad5-KA/rad5Δ</i>	YHU1536	<i>K538A</i>	
<i>rad5-CCAA/rad5Δ</i>	YHU1330	<i>CC914,917AA</i>	
<i>rad5-IA/rad5Δ</i>	YHU1527	<i>I916A</i>	
<i>rad5-DEAA/rad5Δ</i>	YHU1331	<i>DE681,682AA</i>	
<i>rad5-IA/DEAA/rad5Δ</i>	YHU1528	<i>I916A,DE681,682AA</i>	
<i>rad5Δ</i>	YHU1328	üres	
<i>RAD5/rad5Δ/mms2Δ</i>	YHU1304	<i>RAD5</i>	BY4741/BY4742
<i>rad5-IA/rad5Δ/mms2Δ</i>	YHU1532	<i>I916A</i>	
<i>rad5-DEAA/rad5Δ/mms2Δ</i>	YHU1306	<i>DE681,682AA</i>	
<i>rad5Δ/mms2Δ</i>	YHU1303	üres	
<i>RAD5/rad5Δ/ubc13Δ</i>	YHU1314	<i>RAD5</i>	
<i>rad5-IA/rad5Δ/ubc13Δ</i>	YHU1534	<i>I916A</i>	
<i>rad5-DEAA/rad5Δ/ubc13Δ</i>	YHU1316	<i>DE681,682AA</i>	
<i>rad5Δ/ubc13Δ</i>	YHU1313	üres	
<i>RAD5/rad5Δ/rev1Δ</i>	YHU1564	<i>RAD5</i>	
<i>rad5-IA/rad5Δ/rev1Δ</i>	YHU1565	<i>I916A</i>	
<i>rad5-DEAA/rad5Δ/rev1Δ</i>	YHU1566	<i>DE681,682AA</i>	
<i>rad5-IA/DEAA/rad5Δ/rev1Δ</i>	YHU1567	<i>I916A,DE681,682AA</i>	
<i>rad5Δ/rev1Δ</i>	YHU1568	üres	
<i>RAD5/rad5Δ/rev3Δ</i>	YHU1569	<i>RAD5</i>	
<i>rad5-IA/rad5Δ/rev3Δ</i>	YHU1570	<i>I916A</i>	
<i>rad5-DEAA/rad5Δ/rev3Δ</i>	YHU1571	<i>DE681,682AA</i>	
<i>rad5-IA/DEAA/rad5Δ/rev3Δ</i>	YHU1572	<i>I916A,DE681,682AA</i>	
<i>rad5Δ/rev3Δ</i>	YHU1573	üres	
<i>RAD5/rad5Δ/rev7Δ</i>	YHU1574	<i>RAD5</i>	
<i>rad5-IA/rad5Δ/rev7Δ</i>	YHU1575	<i>I916A</i>	
<i>rad5-DEAA/rad5Δ/rev7Δ</i>	YHU1576	<i>DE681,682AA</i>	
<i>rad5-IA/DEAA/rad5Δ/rev7Δ</i>	YHU1577	<i>I916A,DE681,682AA</i>	
<i>rad5Δ/rev7Δ</i>	YHU1578	üres	

10. ábra: A dolgozatban felhasznált élesztő törzsek.

Név	Sorszám	Plazmid	Élesztő törzs
<i>rad5-GARR/rad5Δ</i>	YHU1399	<i>GAI77,178RR</i>	BY4742
<i>rad5-GR/rad5Δ</i>	YHU1400	<i>G183R</i>	
<i>rad5-RA/rad5Δ</i>	YHU1390	<i>R187A</i>	
<i>rad5-LKRA/rad5Δ</i>	YHU1391	<i>LK193,194RA</i>	
<i>rad5-KRAA/rad5Δ</i>	YHU1392	<i>KR202,203AA</i>	
<i>rad5-EEAA/rad5Δ</i>	YHU1498	<i>EE206,207AA</i>	
<i>rad5-FA/rad5Δ</i>	YHU1373	<i>F231A</i>	
<i>rad5-IR/rad5Δ</i>	YHU1393	<i>I233R</i>	
<i>rad5-REAA/rad5Δ</i>	YHU1394	<i>RE237,238AA</i>	
<i>rad5-IA*/rad5Δ</i>	YHU1370	<i>I239A</i>	
<i>rad5-GA/rad5Δ</i>	YHU1371	<i>G240A</i>	
<i>rad5-RA*/rad5Δ</i>	YHU1337	<i>R241A</i>	
<i>rad5-EDAA/rad5Δ</i>	YHU1395	<i>ED244,245AA</i>	
<i>rad5-LA/rad5Δ</i>	YHU1372	<i>L253A</i>	
<i>rad5-LIRR/rad5Δ</i>	YHU1401	<i>LI265,266RR</i>	
<i>rad5-LQRA/rad5Δ</i>	YHU1403	<i>LQ281,282RA</i>	
<i>RAD5-HA/rad5Δ</i>	YUS1786	<i>RAD5-HA</i>	EMY74.7
<i>rad5-IA-HA/rad5Δ</i>	YUS1787	<i>I916A-HA</i>	
<i>rad5-DEAA-HA/rad5Δ</i>	YUS1788	<i>DE681,682AA-HA</i>	
<i>rad5-IA/DEAA-HA/rad5Δ</i>	YUS1789	<i>I916A,DE681,682AA-HA</i>	
<i>no tag</i>	YUS443 + PID269	<i>üres</i>	
<i>gRAD5-HA</i>	YUS1792		
<i>RAD5/rad5Δ</i>	YUS472 + PID178	<i>RAD5</i>	
<i>rad5-IA/rad5Δ</i>	YUS472 + PID745	<i>I916A</i>	
<i>rad5-DEAA/rad5Δ</i>	YUS472 + PID180	<i>DE681,682AA</i>	
<i>rad5-IA/DEAA/rad5Δ</i>	YUS472 + PID1180	<i>I916A,DE681,682AA</i>	
<i>rad5Δ</i>	YUS472 + PID565	<i>üres</i>	DF5a
<i>RAD5/rad5Δ</i>	YUS1905 + PID178	<i>RAD5</i>	
<i>rad5-DEAA/rad5Δ</i>	YUS1905 + PID180	<i>DE681,682AA</i>	
<i>rad5-IA/rad5Δ</i>	YUS1905 + PID745	<i>I916A</i>	
<i>rad5Δ</i>	YUS1905 + PID565	<i>üres</i>	

10. ábra: A dolgozatban felhasznált élesztő törzsek.

Plazmid	RAD5	Markerek	Sorszám
YCPlac111	<i>üres</i>	LEU2, Amp	PIL1133/PID565
YCPlac111	<i>RAD5</i>	LEU2, Amp	PIL576/PID178
YCPlac111	<i>GA177,178RR</i>	LEU2, Amp	PIL2399
YCPlac111	<i>G183R</i>	LEU2, Amp	PIL2400
YCPlac111	<i>R187A</i>	LEU2, Amp	PIL2373
YCPlac111	<i>LK193,194RA</i>	LEU2, Amp	PIL2374
YCPlac111	<i>KR202,203AA</i>	LEU2, Amp	PIL2375
YCPlac111	<i>EE206,207AA</i>	LEU2, Amp	PIL2566
YCPlac111	<i>F231A</i>	LEU2, Amp	PIL2320
YCPlac111	<i>I233R</i>	LEU2, Amp	PIL2377
YCPlac111	<i>RE237,238AA</i>	LEU2, Amp	PIL2378
YCPlac111	<i>I239A</i>	LEU2, Amp	PIL2221
YCPlac111	<i>G240A</i>	LEU2, Amp	PIL2222
YCPlac111	<i>R241A</i>	LEU2, Amp	PIL2155
YCPlac111	<i>ED244,245AA</i>	LEU2, Amp	PIL2379
YCPlac111	<i>L253A</i>	LEU2, Amp	PIL2223
YCPlac111	<i>LI265,266RR</i>	LEU2, Amp	PIL2401
YCPlac111	<i>LQ281,282RA</i>	LEU2, Amp	PIL2403
YCPlac111	<i>K538A</i>	LEU2, Amp	PIL577
YCPlac111	<i>CC914,917AA</i>	LEU2, Amp	PIL2100
YCPlac111	<i>I916A</i>	LEU2, Amp	PIL2778/PID745
YCPlac111	<i>DE681,682AA</i>	LEU2, Amp	PIL578/PID180
YCPlac111	<i>I916A,DE681,682AA</i>	LEU2, Amp	PIL2757/PID1180
pBJ842	<i>RAD5</i>	LEU2, Amp	PIL101
pBJ842	<i>GA177,178RR</i>	LEU2, Amp	PIL2472
pBJ842	<i>G183R</i>	LEU2, Amp	PIL2473
pBJ842	<i>LI265,266RR</i>	LEU2, Amp	PIL2474
pBJ842	<i>LQ281,282RA</i>	LEU2, Amp	PIL2476
pBJ842	<i>CC914,917AA</i>	LEU2, Amp	PIL681
pBJ842	<i>I916A</i>	LEU2, Amp	PIL2780
pBJ842	<i>DE681,682AA</i>	LEU2, Amp	PIL668
Plazmid	Gén vagy szekvencia	Markerek	Sorszám
YCPlac33	<i>7His-PCNA</i>	URA3, Amp	PID1243
p414GPD	<i>üres</i>	TRP1, Amp	PID269
pYM3	<i>6xHA</i>	klTRP1, Amp	PID351

11. ábra: A dolgozatban felhasznált plazmidok.

4.2. Plazmidok

A munkánk során használt plazmidokat és részletes leírásukat a **11. ábrán** foglaltuk össze. A *rad5* deléció fenotípusának a menekítésére a *RAD5* PstI-SalI genomikus DNS fragmentjét klónoztuk a centromerikus, alacsony kópiaszámú YCplac111 plazmidba. Ez a fragment a *RAD5* mellett 339 bp promóter és 623 bp terminátor szekvenciát is tartalmazott, ezért a fehérje expresszió szintje folyamatos és fiziológias volt. A pontmutációkat ezen a plazmidon hoztuk létre helyspecifikus PCR mutagenézissel, majd a pontmutációkat visszaklónoztuk a vad típusú *RAD5* tartalmú YCplac111 plazmidba. A mutáns Rad5 fehérjék

tisztításához szükséges túltermelő plazmidokat a Gateway® Cloning Technology (Thermo Fisher Scientific Inc.) rendszer segítségével készítettük el. A vad típusú *RAD5* gént PCR-ral amplifikáltuk és klónoztuk az üres plazmidba (pENTR™). A klónozott *RAD5* szekvenciát tartalmazó plazmidokat szekvenálással ellenőriztük, majd a hibátlan *RAD5* szekvenciát tartalmazó plazmidba (pENTR™) klónoztuk a pontmutációkat az YCplac111 plazmidból, majd LR rekombinááz reakcióval bevittük a mutáns *rad5* géneket a pENTR™ vektorból a célvektorba (pBJ842). Ezekben a túltermelő plazmidokban (pBJ842) egy N-terminális GST tag mögé rekombináltuk be a mutáns *rad5* szekvenciát. Az expressziót ebben a rendszerben egy galaktózzal indukálható foszfoglicerát kináz (phosphoglycerate kinase - PGK) promóter szabályozza. Minden egyes PCR mutagenézis és klónozás után a teljes kódoló szekvenciát megszekvenáltuk és a mutációk meglétét ellenőriztük.

Az *in vivo* PCNA poliubikvitinálási kísérletekhez az N-terminális 7-His taggalt PCNA fehérjét egy alacsony kópiaszámú centromerikus plazmidról (YCplac33) termeltettük.

4.3. Antibiotikumok

Geneticin (G418): (Biochrom kat.sz.: A 291-25) 300 mg/l

Ampicillin: (Sigma-Aldrich kat.sz.: A9518-25G) 100 mg/l

4.4. Ellenanyagok

Anti-PCNA (V001): nyúlban készült elsődleges ellenanyag (a laborunkban állítottuk elő), 5.000x hígítottuk, az *in vitro* PCNA poliubikvitinálási kísérletekhez használtuk.

Anti-nyúl (V087): kecskében készült másodlagos ellenanyag (Millipore kat.sz.: AP132P), HRP (Horseradish Peroxidase - Torma peroxidáz) konjugált, 10.000x hígítottuk, az *in vitro* PCNA poliubikvitinálási kísérletekhez használtuk.

Anti-HA (19): nyúlban készült elsődleges ellenanyag (Abcam, kat.sz.: ab9110), 10.000x hígítottuk, a mutáns Rad5 fehérjék expressziós szintjének az ellenőrzésére használtuk.

Anti-nyúl (3): másodlagos ellenanyag (Thermo Scientific, kat.sz.: 31460), HRP konjugált, 10.000x hígítottuk, a mutáns Rad5 fehérjék expressziós szintjének az ellenőrzésére és az *in vivo* PCNA poliubikvitinálási kísérletekhez használtuk.

Anti-PGK (7): egérben készült elsődleges ellenanyag (Molecular Probes, kat.sz.: A6457), 20.000x hígítottuk, a mutáns Rad5 fehérjék expressziós szintjének az ellenőrzésénél használtuk.

Anti-egér (2): másodlagos ellenanyag (Thermo Scientific, kat.sz.: 31430), HRP konjugált, 20.000x hígítottuk, a mutáns Rad5 fehérjék expressziós szintjének az ellenőrzésénél és az *in vivo* PCNA poliubikvitinálási kísérletekhez használtuk.

Anti-PCNA (20): egérben készült elsődleges ellenanyag (Abcam, kat.sz.: 5E6/2), 1000x hígítottuk, az *in vivo* PCNA poliubikvitinálási kísérletekhez használtuk.

Anti-ubikvitin-PCNA (23): nyúlban készült elsődleges ellenanyag (Cell Signaling Technology, kat.sz.: P4D1), 2000x hígítottuk, az *in vivo* PCNA poliubikvitinálási kísérletekhez használtuk.

4.5. Tápoldatok

Expressziós –LEU tápoldat (1 liter): 36 g -LEU minimál tápoldat keverék, 100 ml nátrium-DL-laktát (60%-os oldat) (VWR Chemicals kat.sz.: 27925.292), 150 ml glicerol (Molar Chemicals kat.sz.: 16730-203-340)

Minimál tápoldat, (táptalaj): 7,2 g/l minimál tápoldat keverék, 20 g/l D-glükóz (Molar Chemicals k.sz.: 02141-203-190), (20 g/l agar (Molar Chemicals kat.sz.: 00670-702-190))

Minimál tápoldat keverék (-LEU, -LYS/-MET, -LEU/-ARG):

425,5 g porkeverékhez: 100 g élesztő nitrogén bázis (BD™ Difco™ kat.sz.: BD 233520), 300 g (NH₄)₂SO₄ (Molar Chemicals kat.sz.: 01050-101-190), 0,3 g adenin (Sigma-Aldrich kat.sz.: A8626-25G), 1,2 g arginin (Sigma-Aldrich kat.sz.: A5006-100G) (vagy 3,6 g kanavanin (Sigma-Aldrich kat.sz.: C9758-250MG)), 1,2 g hisztidin (Sigma-Aldrich kat.sz.: H8125-25G), 1,8 g izoleucin (Sigma-Aldrich kat.sz.: I2752-25G), 1,8 g leucin (Sigma-Aldrich kat.sz.: L8000-50G), 1,8 g lizin (Sigma-Aldrich kat.sz.: L5501-25G), 1,2 g metionin (Sigma-Aldrich kat.sz.: M9625-25G), 3 g fenilalanin (Sigma-Aldrich kat.sz.: P2126-100G), 1,2 g triptofán (Sigma-Aldrich kat.sz.: T0254-25G), 1,8 g tirozin (Sigma-Aldrich kat.sz.: T3754-50G), 1,2 g uracil (Sigma-Aldrich kat.sz.: U0750-25G), 9 g valin (Sigma-Aldrich kat.sz.: V0500-100G).

1 liter tápoldathoz: 1,67 g élesztő nitrogén bázis, 5 g (NH₄)₂SO₄, 5 mg adenin, 20 mg arginin (vagy 60 mg kanavanin), 20 mg hisztidin, 30 mg izoleucin, 30 mg leucin, 30 mg lizin, 20 mg metionin, 50 mg fenilalanin, 20 mg triptofán, 30 mg tirozin, 20 mg uracil, 150 mg valin.

Sporulációs tápoldat: 1% K-acetát (Merck kat.sz.: 1.04820.1000), 0,005% ZnSO₄ (Merck kat.sz.: 1.08883.0100)

YPD tápoldat, (táptalaj): 10 g/l élesztő (yeast) kivonat (Molar Chemicals Kft. kat.sz.: 20020-702-180), 20 g/l pepton (Reanal Labor kat.sz.: 25772-0-99-33), 20 g/l D-glükóz (D-dextrose), (20 g/l agar)

4.6. Oldatok

A puffer: 10 mM Tris-HCl pH: 8,0, 100 mM nátrium-foszfát (Na_2HPO_4 , Sigma-Aldrich, kat.sz.: S3264-1KG) puffer pH: 8,0, 6 M guanidium-hidroklorid (Duchefa, kat.sz.: 014215.01)

B puffer: 10 mM Tris-HCl pH: 8,0, 100 mM nátrium-foszfát puffer pH: 8,0, és 8 M urea (Lach-Ner, kat.sz.: 40096-AP0)

Denaturáló oldat: 6 M guanidium-hidroklorid, 20 mM Tris-HCl pH: 7,5, 5 mM β -merkaptoetanol (Sigma-Aldrich kat.sz.: M3148-100ML)

Fenol-kloroform-izoamil alkohol: 25:24:1, fenol (Sigma-Aldrich kat.sz.: P4557-400ML): kloroform (Molar Chemicals kat.sz.: 04730-101-340): izoamil alkohol (Molar Chemicals kat.sz.: 03880-203-340) keveréke

Helikáz assay puffer (5x tömény): 100 mM TRIS-HCl (pH: 7,0), 25 mM MgCl_2 (Merck kat.sz.: 1.05833.0250), 500 $\mu\text{g/ml}$ BSA (Bovine Serum Albumin - Szarvasmarha szérum albumin) (Thermo Fisher Scientific kat.sz.: 15561020), 5 mM DTT (ditiotreitól) (Thermo Fisher Scientific kat.sz.: R0862), 50% glicerol, 25 mM ATP (Thermo Fisher Scientific kat.sz.: R0441)

Helikáz stop puffer (2x tömény): 4 mg/ml Proteináz K (Sigma, kat.sz.: P6556), 40 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid - Etilén-diámin-tetraecetsav) (Sigma-Aldrich kat.sz.: E5134-500G), 20% glicerol, 2% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate - Nátrium-dodecil-szulfát) (10 m/V% oldatból) (Sigma-Aldrich kat.sz.: L5750-1KG), 0,04 V/V% brómfenolkék (Sigma-Aldrich, kat.sz.: B0126-25G)

HU puffer: 8 M urea, 200 mM Tris-HCl, pH: 6,8, 1 mM EDTA, 5% SDS, 0,1% brómfenolkék, 1,5% DTT

Lízis oldat: 0,24 M NaOH (Chem-Lab NV, kat.sz.: CL00.1404.1000), 1% β -merkaptoetanol

Natív PAGE (Poliakrilamid gélelektroforézis) gél (15 ml): 0,375 ml glicerol, 0,75 ml TB, 4 ml akrilamid (Sigma-Aldrich kat.sz.: A8887-1KG) (30%) - biszakrilamid (Sigma-Aldrich kat.sz.: M7256-250G) (0,8%) oldat, 3,75 ml TRIS-HCl (1,5 M, pH: 8,8), 6,125 ml MQ (Milli-Q rendszerrel desztillált víz), 0,1 ml APS (Ammonium Persulfate - Ammónium-perszulfát) oldat (10%) (Sigma-Aldrich kat.sz.: A3678-100G), 0,02 ml TEMED (Tetrametil-etiléndiamin) (Sigma-Aldrich kat.sz.: T2,250-0).

PEG-Li-acetát: 40 m/m% PEG-4000 (Polietilén-glikol) (Merck kat.sz.: 8.17063.1000), 100 mM Li-acetát (Sigma-Aldrich kat.sz.: L4158-250G), 10 mM TRIS-HCl (pH: 7,5), 1 mM EDTA

SORB: 1 M szorbitol (Sigma-Aldrich kat.sz.: S7547-1KG), 10 mM Li-acetát, 10 mM TRIS-HCl (pH: 8,0), 1 mM EDTA

Strippelő oldat: 0,2 M glicin (Molar Chemicals, kat.sz.: 03520-203-190), 0,1% SDS, 1% Tween-20 (Sigma-Aldrich, kat.sz.: SLBZ8563)

TB: 10,8 g/l TRIS-HCl (0,09 M), 5,5 g/l bórsav (0,09 M) (Molar Chemicals kat.sz.: 01670-101-190)

TE: 10 mM TRIS-HCl (pH: 7,5), 1 mM EDTA

Törő puffer: 2 V/V% Triton X-100 (Sigma-Aldrich kat.sz.: T8787-250ML), 1 m/V% SDS, 100 mM NaCl (Molar Chemicals k.sz.: 07220-101-190), 10 mM TRIS-HCl (pH: 8,0), 1 mM EDTA (pH: 8,0)

TRIS-HCl: TRIS (Trisz(hidroximetil)-aminometán) (Fisher Bioreagents k.sz.: BP152-1) oldat, HCl (Merck k.sz.: 1.00317.1000) oldattal (5 M) pufferelve, 0,09 M vagy 1,5 M koncentrációjú, pH: 7,0; 7,5; 8,0 vagy 8,8

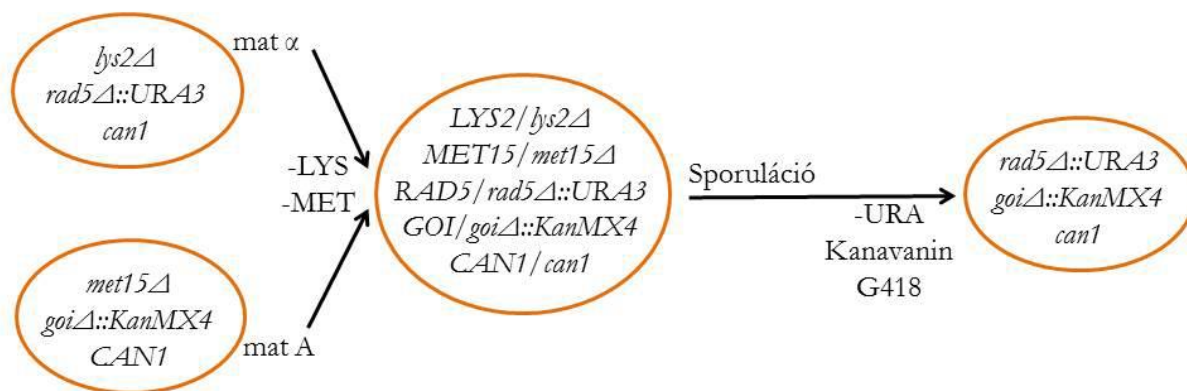
T100: 100 mM NaCl, 40 mM TRIS-HCl (pH: 7,5), 10% glicerol, 1 mM DTT, 0,01 % NP40 (detergens vegyület) (Sigma-Aldrich k.sz.: I3021-500ML), 10 µM ATP

T150: 150 mM NaCl, 40 mM TRIS-HCl (pH: 7,5), 10% glicerol, 1 mM DTT, 0,01 % NP40, 10 µM ATP

T1000: 1000 mM NaCl, 40 mM TRIS-HCl (pH: 7,5), 10% glicerol, 1 mM DTT, 0,01 % NP40, 10 µM ATP

Ubikvitin ligáz assay puffer: 30 mM TRIS-HCl (pH: 7,5), 5,5 mM MgCl₂, 7 µg/ml BSA, 7% glicerol, 0,5 mM ATP

YBB (Yeast Breaking Buffer - Élesztő törő puffer) puffer: 50 mM TRIS-HCl (pH: 7,5), 50 mM KCl (Merck kat.sz.: 1.04936.1000), 100 mM NaCl, 10% szukróz (Sigma-Aldrich kat.sz.: S0389-1KG), 1,5 mM EDTA, 8,5 mM β-merkaptotanol, 2 mM PMSF (fenilmetilszulfonil-fluorid) (PanReac AppliChem kat.sz.: A0999,0025)



12. ábra: Kettős mutánsok előállítása *rad5Δ* delécióval. A keresztezés után a diploid sejtekre $-LYS/-MET$ táptalajon szelektáltunk, majd a sporuláció után a sejteket kanavanin és G418 tartalmú $-URA$ táptalajra szélesztettük, hogy csak a *rad5Δ/goiΔ* haploid kettős mutánsok képezzenek kolóniákat. GOI: azok a gének, amelyeknek delécióival a kettős mutánsokat terveztük elkészíteni.

4.7. Élesztő kettős mutánsok készítése

A kettős deléciós mutánsokat a BY4741 (*met15Δ*, A mating típusú) deléciós mutánsok és a BY4742 *rad5Δ* (*rad5Δ::URA3*, *can1*, *lys2Δ*, α mating típusú) törzsek keresztezésével hoztuk létre (12. ábra). Az egyszeres mutánsokat leoltottuk +12 tápoldatba, másnap összekevertük a felnőtt kultúrákat a *rad5Δ* törzzsel, majd 4 óra inkubáció után ebből a kultúrából szélesztettünk ki sejteket $-LYS/-MET$ minimál táptalajra, hogy a keletkezett diploidokra szelektáljunk. 2 nappal később a kolóniákat leoltottuk +12 tápoldatba, majd másnap a felnőtt kultúrát kihígítottuk YPD tápoldat hozzáadásával és 3 óra inkubáció után a sejteket centrifugáltuk és felszuszpendáltuk Sporulációs tápoldatba. 4 nap sporuláció után a tetradokat 3u/ml Zymoliázzal (Amsbio (Seikagaku Biobusiness) k.sz.: 120491-1) emésztettük 30°C hőmérsékleten SORB oldatban egy órán át, majd a haploid sejteket kanavanin és G418 tartalmú $-URA$ táptalajra szélesztettük. A kanavanin szelekció miatt elméletileg csak a haploid *can1* mutáns sejtek képezhettek kolóniákat, míg a vad típusú *CAN1* gént hordozó haploidok és a heterozigóta diploidok (*CAN1/can1*) elpusztultak. 4 nap után a kolóniákat először átoltottuk YPD táptalajra, majd 2 nappal később arról a felnőtt vonalakat átoltottuk $-LYS/-MET$ táptalajra, azért, hogy az utóbbi táptalajon 2 nap után felnövő diploid vonalakat kizárjuk a további tesztekben. Ugyanis előfordul, hogy a *CAN1* génben keletkező mutáció, vagy mitotikus rekombináció miatt a *can1/can1* diploidok is felnőnek a $-URA/G418$ /kanavanin táptalajon. Ezután a $-LYS/-MET$ táptalajon életképtelen vonalakat leoltottuk a YPD táptalajról YPD tápoldatba, másnap genomot izoláltunk belőlük és PCR-rel ellenőriztük a genotípusukat.

4.8. Genomi DNS izolálása élesztő sejtekből

Élesztő kultúrát oltottunk le YPD táptalajról 5 ml YPD tápoldatba. Másnap centrifugáltuk a sejteket 3000 RPM (Round Per Minute - Percenkénti fordulatszám) sebességgel 5 percig, majd a felülúszó eltávolítása után felszuszpendáltuk 500 µl MQ-ban. Ismét centrifugáltuk a sejteket (13000 RPM, 1 perc), a felülúszó eltávolítása után szuszpendáltuk 200 µl törő pufferben, adtunk hozzá 0,3 g üveggyöngyöt és 400 µl fenol-kloroform-izoamil alkohol elegyet. Parafilmmel becsomagoltuk a cső tetejét, és Bead beater géppel, közepes sebességen, 2 percig törtük a sejteket. Ezután 200 µl MQ hozzáadása után óvatosan kevergettük, majd centrifugáltuk a mintákat (13000 RPM, 15 perc). A felülúszót átvittük új Eppendorf csőbe és 1 ml -20°C-os 96%-os etanolt (Molar Chemicals k.sz.: 02911-101-340) adtunk hozzá, majd centrifugáltuk (13000 RPM, 5 perc). A felülúszó eltávolítása után a csapadékhoz 500 µl -20°C-os 70%-os etanolt adtunk, majd centrifugáltuk (13000 RPM, 2 perc). A felülúszó eltávolítása után a csapadékot szárítottuk min. 30 percig, majd felvettük 50 µl MQ-ba.

4.9. PCR

A reakció összetétele: 80 ng/µl genomi DNS templát, 0,4 µM oligonukleotidok (IDT vagy Thermo Fisher Scientific), 2,4 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP (dezoxinukleotid-trifoszfát keverék) (Thermo Fisher Scientific k.sz.: R72501), Taq puffer (Thermo Fisher Scientific k.sz.: B33) és Taq polimeráz (0,1 u/µl) (a laborunkból).

A PCR program:

Elődenaturálás:	95°C, 2 perc
35x:	Denaturálás: 95°C, 30 másodperc
	Hibridizálás: 50°C, 30 másodperc
	Extenzió: 72°C, 1-2 perc
Végső extenzió:	72°C, 1 perc
	4°C

A keletkezett termékeket agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk.

4.10. Mutagenézis PCR

A reakció összetétele: 4 ng/µl plazmid DNS templát, 0,4 µM oligonukleotidok (IDT vagy Thermo Fisher Scientific), 2,5 mM MgSO₄ (Thermo Fisher Scientific kat.sz.: EP0501), 0,1 mM dNTP (Thermo Fisher Scientific kat.sz.: R72501), Pfu puffer (Thermo Fisher Scientific kat.sz.: EP0501) és Pfu polimeráz (0,05 u/µl) (Thermo Fisher Scientific kat.sz.: EP0501).

A PCR program:

Elődenaturálás:	95°C, 2 perc
20x:	Denaturálás: 95°C, 30 másodperc
	Hibridizálás: 50°C, 30 másodperc
	Extenzió: 72°C, 22 perc
Végső extenzió:	72°C, 1 perc
	4°C

A templát plazmid eltávolítása érdekében DpnI (Thermo Fisher Scientific kat.sz.: ER1701) enzimet tettünk a reakcióba 0,2 u/μl koncentrációban, majd 6 órányi 37°C hőmérsékletű inkubáció után a mintát transzformáltuk kompetens DH5α *Escherichia coli* baktériumba, amit ampicillin tartalmú LB táptalajra szélesztettünk. A felnőtt telepekből plazmidot tisztítottunk és a plazmidokat megszekvenáltattuk.

4.11. Élesztő kompetens sejtek készítése

Élesztő kultúrát oltottunk le YPD táptalajról 2 ml YPD tápoldatba. Másnap átoltottuk ezt a 2 ml kultúrát 50 ml YPD tápoldatba és OD_{600nm} = 0,7 értékig növesztettük. A sejteket centrifugáltuk (8000 RPM, 8 perc, 4°C), és a csapadékot 10 ml jéghideg MQ-ban felkevertük. A sejteket centrifugáltuk (8000 RPM, 10 perc, 4°C), és a csapadékot 10 ml SORB oldatban felkevertük. A sejteket centrifugáltuk (8000 RPM, 10 perc, 4°C), a csapadékot 360 μl SORB oldatban felfuszpendáltuk, 40 μl carrier DNS-t (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich k.sz.: D1626-1G) adtunk hozzá, majd 50 μl térfogatú adagokra szétosztottuk. A kimaradó adagokat papírszalvétába becsomagoltuk és -80°C-ra tettük.

4.12. Élesztő kompetens sejtek transzformálása

50 μl kompetens sejthez adtunk DNS-t (10-100 ng/μl), majd 300 μl PEG-Li-acetát oldatot. Min. 30 percig inkubáltuk a sejteket 30°C hőmérsékleten. Adtunk hozzájuk 38,5 μl DMSO (dimetil-szulfoxid) (Merck kat.sz.: 1.02952.1000) folyadékot és 42°C hőmérsékleten 15 percig inkubáltuk a mintákat. Centrifugáltuk 2000 RPM-mel 2 percig, majd a felülúszó eltávolítása után a sejteket 100 μl tápoldatban szuszpendáltuk, és kiszélesztettük ugyanolyan táptalajra. A táptalajokat 30°C-on inkubáltuk 2-4 napig. Ezután az egyedi kolóniákat fogpiszkálóval átoltottuk egy másik táptalajra, majd egy nap 30°C-os inkubáció után leoltottunk ezekből a felnőtt átoltásokból glicerolos cső készítéséhez vagy genom izoláláshoz.

4.13. Élesztő sejtek tárolása glicerolban

Élesztő kultúrát oltottunk le YPD táptalajról 5 ml YPD tápoldatba. Másnap lecentrifugáltuk (4000 RPM, 10 perc) és felszuszpendáltuk a sejteket 15%-os glicerolban, majd a csövet -80°C-ra tettük.

4.14. Spot assay

Az élesztő kultúrákat felnövesztettük $OD_{600nm} = 0,6$ értékre, a sejteket Bürker kamrában megszámoltuk, és kihígítottuk $5 \cdot 10^6$; $1,67 \cdot 10^6$; $5 \cdot 10^5$; $1,67 \cdot 10^5$; és $5 \cdot 10^4$ db sejt/ml koncentrációra, ami egy kb. háromszoros hígítási sorozat. Ezekből a hígításokból 4-4 μ l térfogatokat (tehát $2 \cdot 10^4$, $6,32 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^3$, $6,32 \cdot 10^2$ és $2 \cdot 10^2$ db sejtet) cseppentettünk ki MMS (metil-metánszulfonát) (Sigma-Aldrich kat.sz.: 129925-25G) tartalmú táptalajokra. Vagy pedig a táptalajra kicseppentett élesztő hígításokat UV sugárzással kezeltük. Minden egyes lemezből két párhuzamost használtunk. 2 napig 30°C hőmérsékleten inkubáltuk, majd beszkeneltük a lemezeket.

4.15. Túlélési görbe

Az élesztő kultúrákat $OD_{600nm} = 0,8$ értékre felnövesztettük, majd Bürker kamrában megszámoltuk a sejteket, és kihígítottuk az eredményeknek megfelelően 10^7 db/ml koncentrációra, MMS tartalmú -LEU tápoldatokba, mikrotiter plate-be. Egy órán keresztül 30°C hőmérsékleten 180 RPM fordulatszámmal kezeltük a mintákat, majd mostuk háromszor -LEU tápoldattal. Kihígítottuk a kultúrákat -LEU tápoldattal, majd ezekből $2 \cdot 10^2$, $2 \cdot 10^3$ vagy $2 \cdot 10^4$ sejtet kiszélesztettünk YPD táptalajra, annak megfelelően, hogy milyen arányú túlélésre számítunk. A táptalajokat 2 napig inkubáltuk 30°C hőmérsékleten, majd megszámoltuk a felnőtt kolóniákat, melyek mennyisége várhatóan 10 és 200 között volt. Minden kísérletben két táptalajra is szélesztettünk ugyanabból a mintából, és a grafikon adatainak a számításához három független kísérlet eredményeit használtuk.

4.16. Növekedési görbék

Az élesztő törzseket 16 óráig 30°C-on növesztettük, majd szétmértük 96 lyukú mikrotiter lemezbe. Ebből a 96 lyukú lemezből oltottuk át az élesztőket 384 lyukú mikrotiter lemezbe, MMS tartalmú tápoldatba. A 384 lyukú lemezt 30°C-on rázattuk egy Synergy 2 Multi-Mode Reader (BioTek®) géppel, amely 4 percenként megmérte az OD_{600nm} értékeket mind a 384 lyukban 48 órán át. A növekedési görbéket az OD_{600nm} adatokból készítettük Microsoft® Excell 2010 programmal.

4.17. Kanavanin rezisztens spontán mutagenézis kísérlet

Az élesztő törzseket 16 órás 30°C-os inkubációt követően kihígítottuk úgy, hogy 50 sejt kerüljön 180 µl -LEU tápoldatba a 96 lyukú mikrotiter lemezbe, mindegyik törzsből 7-7 párhuzamos mintával dolgoztunk. 2 nap növesztés után (30°C, 180 RPM) a kultúrákat kiszélesztettük kanavanint tartalmazó -LEU/-ARG táptalajra. Mindegyik törzsből szélesztettünk 50.000x hígított kultúrát is -LEU táptalajra. A kanavanin rezisztens telepeket az OpenCFU program [120] segítségével számoltuk meg, majd a telepek számainak a mediánjából a Lea-Coulson fluktuációs modellel [121] kiszámoltuk a mutációs rátát 10^7 sejtre. Ezután 5 kísérlet adataiból készítettünk grafikont és statisztikát Microsoft® Excell 2010 programmal.

4.18. Teljes genom szekvenálás

Mindegyik vizsgált törzsből egy 36 órás élesztő telepet feloldottunk PBS oldatban, majd ezt kiszélesztettük két -LEU lemezre, amiből az egyiket UV sugárzással kezeltük. A különböző törzsekhez annyi UV dózist használtunk, amennyi a sejtek 10%-nyi túlélését eredményezi. (*RAD5/rad5Δ*: 100 J/m², *rad5-IA/rad5Δ*: 60 J/m², *rad5-DEAA/rad5Δ*: 40 J/m², *rad5-IA/DEAA/rad5Δ*: 30 J/m², *rad5Δ*: 13 J/m².) A lemezekről a sejteket 9 óra 30°C-os sötét inkubáció után lemostuk PBS oldattal, majd újra kiszélesztettük -LEU táptalajra. 3 nap 30°C inkubáció után mindegyik lemezről felvettünk 3-3 egyedi telepet, genomi DNS-t izoláltunk belőlük, majd a 3 egyforma mintát azonos mennyiségben összekevertük. A *rad5Δ* törzsszel az UV sugárzást ötször ismételtük meg 3 kezelt és 3 kezeletlen egyedi kolóniával. A teljes genom szekvenáláshoz a könyvtárat a Nextera XT Library Preparation Kit-tel készítettük el (Cat.no. FC-131–1024, Illumina). Illumina NextSeq 500 szekvenátort használtunk a 2*150 bp páros végű szekvencia leolvasások előállításához. Az átlagos lefedettség 100 volt. A leolvasásokat a GCA_000146045.2 referencia genomhoz illesztettük a BWA mem program segítségével [122]. A SAM fájlokat BAM fájlkká alakítottuk és indexeltük a SAMtools program segítségével [123]. A szekvenálási duplikátumokat a GATK MarkDuplicates programmal távolítottuk el [124]. A variánsokat freebayes-szel azonosítottuk -min-base-quality 28 paranccsal és Vcfliib programmal szűrtük vcfliib eszközzel és -f 'QUAL > 100' beállítással [125]. Az UV-kezelt és kezeletlen minta párokat úgy hasonlítottuk össze, hogy csak azokat az eredményeket tekintettük valódi mutációknak, amelyek a kezeletlen mintákban nem voltak jelen, vagy a gyakoriságuk 10% alatt volt, illetve az UV-kezelt mintákban 20% feletti volt a gyakoriságuk a kevert mintákban (illetve 60% felett a nem kevert mintákban). A teljes genom szekvenálás adatai elérhetőek a NCBI Genome Data Viewer oldalon.

<https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA726574?reviewer=3ak2c50vp52g91hon6gi7dps78>

4.19. A Rad5 expressziójának a vizsgálata

A mutáns Rad5 fehérjék expressziós szintjének az ellenőrzéséhez C-terminális 6xHA tag-et használtunk. Ehhez PCR reakcióban felszorzoztuk a 6xHA tag-et és egy TRP1 marker gént a pID351 plazmidról a
AGAAGAAAAAGGAGAATTGAAGAAATCCAGATGCTGTTTGAACGTACGCTGCAG
GTCGAC és a
TAATAATAAATAAAGTCTTTATATATGAGTATGTGGTATGAATCGATGAATTCTGA
GCTCG oligonukleotidokkal. A reakcióban 67°C hibridizációs hőmérsékletet, 2,5 perc extenziós időt és Pfu polimerázt használtunk. A PCR terméket DpnI emésztés után (37°C, 16 óra) transzformáltuk a *rad5* mutáns törzsekbe (EMY74.7 háttéren) amiket -LEU/-TRP táptalajra kiszélesztettünk. A felnőtt telepeket áthúztuk -LEU/-TRP táptalajra, majd genomi DNS-t izoláltunk belőlük és PCR-ral ellenőriztük, hogy jó helyre épült-e be a 6xHA-tag. Ezután a megfelelő törzseket leoltottuk, majd 16 órányi 30°C-os növesztés után OD_{600nm}= 0,8 értéknél centrifugáltuk, mostuk vízzel, és 10 percig szobahőn kezeltük 0,1 M NaOH oldattal. Újabb centrifugálást követően a sejteket felvettük 50 µl 2xSDS oldatban és 100°C hőmérsékleten forraltuk 10 percig. Centrifugálás után a felülúszót SDS-PAGE gélen megfuttattuk és Western blottal előhívtuk anti-HA és anti-PGK elsődleges ellenanyagokkal.

4.20. *In vivo* PCNA poliubikvitinálás vizsgálata

Az élesztő törzseket felnövesztettük 200 ml -LEU tápoldatban, OD_{600nm}= 0,8 értéknél a sejteket szinkronizáltuk α -faktorral (Sigma-Aldrich, kat.sz.: T6901) a sejtciklus G1 fázisában 3,5 óráig, ezután a kultúra felét kezeltük 2,4 mM (0,02%) MMS-sel 1,5 óráig. A sejteket lízis oldattal kezeltük 15 percig jégen. Ezután 6% térfogatnyi triklór-ecetsavval (TCA) (Sigma-Aldrich, kat.sz.: T4885-500G) kicsaptuk a fehérjét, 10 percig jégen inkubáltuk a mintákat. Centrifugálás után a fehérjét feloldottuk A pufferben és egy órán át inkubáltuk szobahőn. A lizátumot pH: 8,0 értékre állítottuk be, majd 10 mM imidazol (Serva, kat.sz.: 26081.01) és 0,05% térfogatnyi Tween-20 oldatok hozzáadását követően 30 µl Ni-NTA (Protino, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, kat.sz.: 1703/001) gyöngyöt adtunk hozzájuk. A mintákat 16 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten egy forgó állványon. Másnap kétszer mostuk a gyöngyöket A pufferrel, és háromszor B pufferrel. A felkötődött fehérjét 60°C hőmérsékleten 10 percig eluáltuk 20 µl HU pufferrel. A mintákat 10%-os SDS-PAGE gélen megfuttattuk, majd blottoltuk PVDF membránra (Immobilon-P, Merck Millipore Ltd.,

kat.sz.: ISEQ00010). Az anti-ubikvitin-PCNA jelölés előtt a membránt 30 percig 4°C hőmérsékleten kezeltük denaturáló oldatban. Az anti-PCNA jelölés előtt a membránt 30 percig szobahőmérsékleten kezeltük strippelő oldattal. A kísérletet egy korábbi protokoll szerint végeztük [126].

4.21. Fehérjetisztítás

A mutáns Rad5 fehérjék túltermeltetéséhez BJ5464 élesztő törzset és pBJ842 plazmidot használtunk. A túltermeltetést 0,2% galaktózzal (Sigma-Aldrich kat.sz.: G0625-1KG) indukáltuk 8 órán át, 30°C-on, rázóban, 4 l expressziós –LEU tápoldatban, amihez 400 ml –LEU tápoldatban felnőtt kultúrát használtunk. Centrifugálás után az élesztőket -80°C-on tároltuk, majd szuszpendáltuk 4°C-on YBB pufferben. Ezután folyékony nitrogénbe csepegtetve a sejteket lefagyasztottuk, mielőtt feltártuk volna turmixszal. A feltárt lizátumot centrifugáltuk, a kapott felülúszót ultracentrifugáltuk, és a középső frakciót Sephadex G-50 gyöngyön (Sigma-Aldrich (GE Healthcare) kat.sz.: GE17-0043-01) tisztítottuk. Az átfolyó frakciót glutation-szefaróz gyöngyökre (Sigma-Aldrich (GE Healthcare) kat.sz.: GE17-0756-01) kötöttük, mosáshoz T1000 és T100 oldatokat használtunk. Az elúciót 25 mM redukált glutationt (Merck kat.sz.: 1.04090.0005) tartalmazó T150 oldatban végeztük. Az elúciók egy részét SDS-PAGE gélen megfuttattuk, Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich kat.sz.: B0149-25G) tartalmú oldattal megfestettük és 10% ecetsavval (Molar Chemicals kat.sz.: 02790-101-340) előhívtuk. A festés eredménye alapján az elúciókat azonos fehérjekoncentrációra hígítottuk a megmaradt eluáló oldattal minden egyes biokémiai kísérlet előtt.

4.22. *In vitro* ubikvitin ligáz assay

A reakcióhoz tisztított ubikvitin, PCNA, RFC (Replikációs faktor C), UBA1 (Ubikvitin aktiváló E1 enzim), Rad6/Rad18, Mms2/Ubc13 és Rad5 élesztő fehérjét használtunk, 10 ng/μl BstNBI enzimmal nikkelt pUC19 DNS-szubsztrát plazmiddal [81]. A reakciókat kétféleképpen mértük össze: a mintákat az összes fehérjével 60 percig inkubáltuk 30°C-on (**18. ábra**), vagy pedig 30 perces 30°C hőmérsékletű előinkubálást követően a Rad5 fehérje hozzáadása után még további 60 percig inkubáltuk a mintákat 30°C hőmérsékleten (**35-36. ábra**). Majd SDS-PAGE gélen megfuttattuk és Western blot után előhívtuk anti-PCNA (V001) elsődleges és anti-nyúl (V087) másodlagos ellenanyaggal. A kísérleteinkhez 10-200 kDa molekulásúlyú fehérje létrát használtunk (Lonza kat.sz.: 00193839).

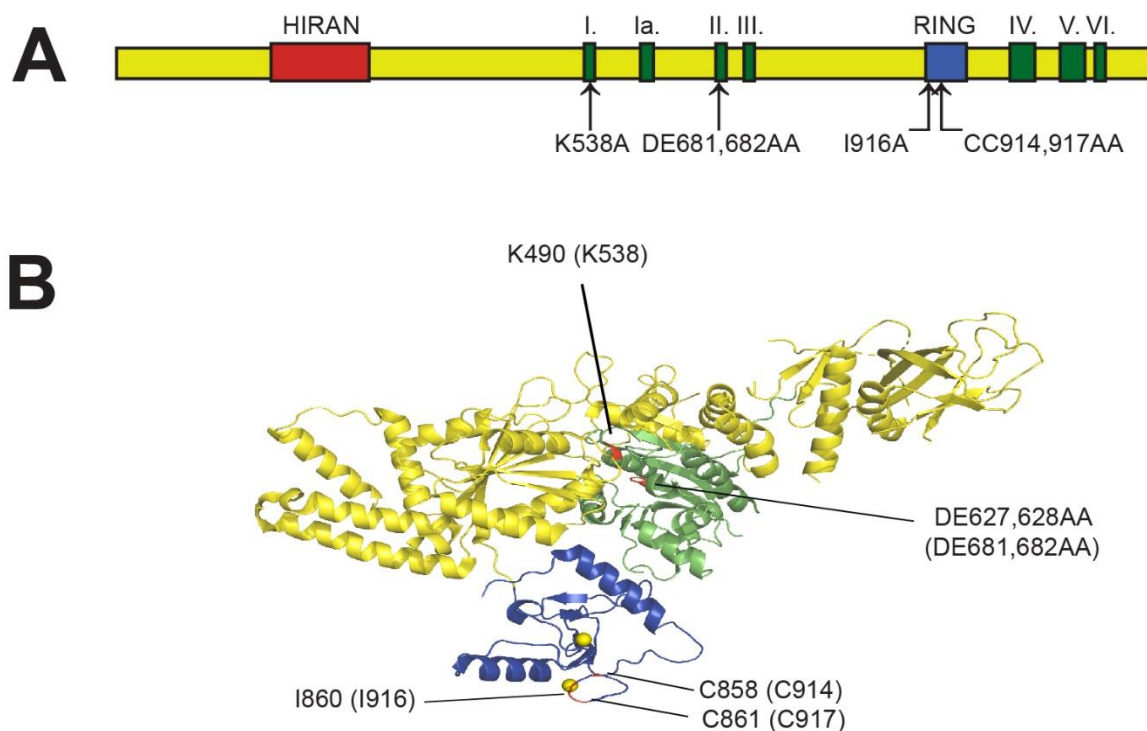
Faj	Név	UniProtKB/Swiss-Prot azonosító szám	GI azonosító szám
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Rad5	P32849.1	417587
<i>Homo sapiens</i>	HLTF	Q14527.2	60390864
<i>Homo sapiens</i>	SHPRH	Q149N8.2	146325723
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Rad8	P36607.1	548669
<i>Mus musculus</i>	HLTF	Q6PCN7.1	60390920

14. ábra Az általunk felhasznált fehérje szekvenciák azonosító számai.

5. Eredmények

5.1. A *rad5* mutánsok *in vivo* érzékenységeinek vizsgálata mutagén ágensekre túlélési tesztekben

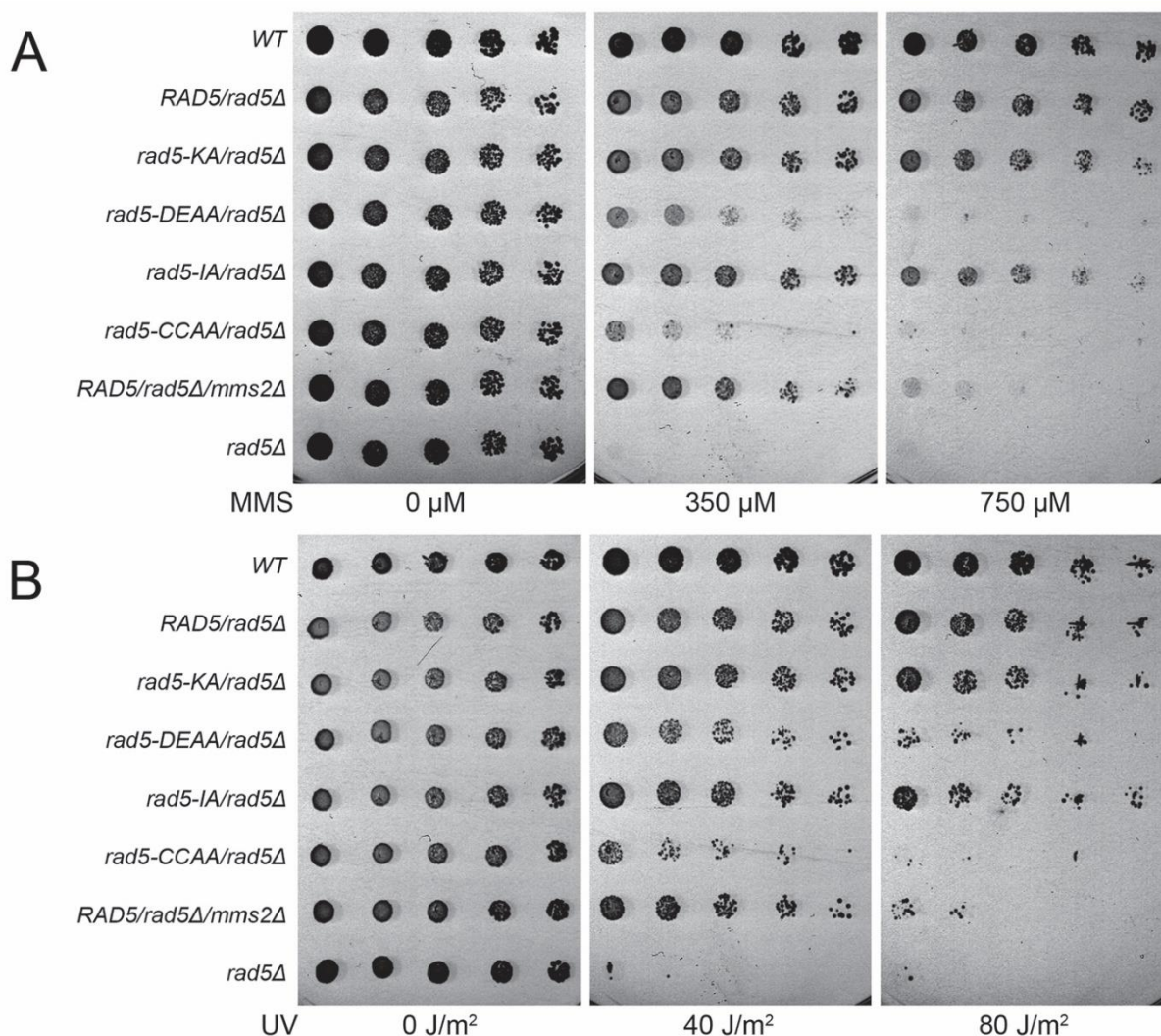
Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a Rad5 ismert aktivitásai közötti kapcsolatot, először megfelelő mutánsokat kellett keresnünk, amelyek specifikusan csak a helikáz/ATPáz vagy csak az ubikvitin ligáz aktivitást rontják el (**15. ábra**).



15. ábra A, A dolgozatban felhasznált Rad5 mutánsok. A K538A és a DE681,682AA mutációk a helikáz/ATPáz aktivitást rontják el, míg az I916A és a CC914,917AA mutációk az ubikvitin ligáz aktivitás elvesztéséért felelősek. HIRAN: HIRAN domén, I., Ia., II., III., IV., V., VI.: Helikáz/ATPáz domén alegységei, RING: RING domén. **B,** A *Kluyveromyces lactis* Rad5 3 dimenziós szerkezete [127] és a lecserélt aminosavak helyzete, zárójelben a *Saccharomyces cerevisiae* megfelelő aminosava.

Bebizonyosodott, hogy a Rad5 fehérjéhez hasonló fehérjék ATP kötő aktivitásáért a GxGKS/T aminosav szekvencia felelős, míg az ATP hidrolizáló képességük a DExx motívumhoz köthető [47,128,129]. Kísérleteinkben két helikáz/ATPáz mutánst használtunk fel. A Rad5 KT538,539AA mutáció a helikáz/ATPáz domén I.-es alegységében található GxGKS/T motívumot érinti és a helikáz/ATPáz aktivitást rontja el [115,116,118]. Kísérleteinkben a K538A mutánst (*rad5-KA*) használtuk, amely a leírt KT538,539AA mutánshoz hasonló tulajdonságokkal rendelkezik [130]. A DE681,682AA (*rad5-DEAA*)

mutáció a helikáz/ATPáz domén II.-es alegységében található ATP hidrolizáló motívumot (DExx) érinti. Ez a mutáció elrontja az ATP hidrolizáló aktivitást [49] és a helikáz aktivitást is [50].



16. ábra: A *rad5* mutáns törzsek túlélésének vizsgálata spot assay-vel, (A) MMS tartalmú táptalajokon, (B) és UV sugárzást követően (B). A 350 és a 750 µM MMS koncentrációk 0,003 és 0,0064 V/V% értékeknek felelnek meg. A vizsgált törzsek azonos sejtkoncentrációjú kultúráinak háromszoros hígítási sorozatát táptalajokra csepegtettük ki, majd 2 nap 30°C hőmérsékletű inkubáció után a táptalajokat beszkeneltük. A dolgozatban használt törzsek: *WT* (üres vektorral transzformált vad típusú törzs), *RAD5/rad5Δ* (vad típusú Rad5 fehérjét expresszáló vektorral transzformált *rad5Δ* törzs), és mutánsok, amelyeknél *rad5Δ* törzsbe transzformáltunk mutáns Rad5 fehérjét expresszáló vektort, *rad5-KA/rad5Δ* (K538A), *rad5-DEAA/rad5Δ* (DE681,682AA), *rad5-IA/rad5Δ* (I916A) és *rad5-CCAA/rad5Δ* (CC914,917AA). Egy *RAD5/rad5Δ/mms2Δ* törzset is használtunk kontrollként, ami egy vad típusú Rad5 fehérjét expresszáló vektorral transzformált *rad5Δ/mms2Δ* törzs.

Az ubikvitin ligáz aktivitás vizsgálatára szintén két független mutánst használtunk. A használt C914A és a C917A mutáció egyaránt a Rad5-Ubc13 kölcsönhatást rontja el [131].

Az egyetlen aminosav cserét tartalmazó mutánsok és a C914A,C917A (*rad5-CCAA*) kettős mutáns törzsek egyaránt jelentős UV érzékenységet mutatnak [49,131] (**16. ábra**). A fenti két mutáltatott aminosav között elhelyezkedő I916A mutáció (*rad5-IA*) szintén képes elrontani a Rad5-Ubc13 kölcsönhatást. Az I916A mutáns törzset szintén használták korábban ubikvitin ligáz mutánsként, és kimutatták, hogy érzékeny az UV kezelésre [115–118,131].

Először azt vizsgáltuk, hogy a fenti *RAD5* mutációkat hordozó élesztő törzsek milyen érzékenységet mutatnak *in vivo* mutagén tesztekben. Kísérleti rendszerünkben a fenti *rad5* mutációkat hordozó és a vad típusú *RAD5* gént expresszáló plazmidokkal menekítettük a *rad5Δ* által okozott mutagén érzékenységet. A menekített törzsekben a fehérjét a *RAD5* saját promóterével fiziológias szinten expresszáltuk alacsony kópiaszámú, centromerikus YCPlac111 plazmidokban. Az expressziós szint ellenőrzése érdekében egy olyan vad típusú élesztő törzsnek is megvizsgáltuk az érzékenységét, amelybe csak üres - *RAD5* nélküli - vektort transzformáltunk (*WT*). Ez a törzs ugyanolyan érzékenységet mutat MMS és UV kezelésre, mint a vad típusú *RAD5* gént expresszáló plazmiddal menekített *rad5Δ* törzs (*RAD5/rad5Δ*) (**16. ábra**). Mivel a menekített törzs esetében a Rad5 expressziós szintje elegendő volt ahhoz, hogy el tudja látni a fehérje *in vivo* funkcióját, így megállapítható, hogy az általunk használt plazmiddal történő menekítés alkalmas rendszert jelent a különböző mutánsok érzékenységének pontos összehasonlítására.

Kísérleteinkben először a *rad5Δ* élesztő törzset transzformáltuk a különböző mutáns Rad5 fehérjét expresszáló plazmiddal, majd a transzformált törzsek érzékenységét vizsgáltuk a túlélési kísérletekben. A kísérletekben a különböző törzsek hígítási sorozataiból cseppentünk azonos térfogatokat a táptalajokra. A túlélés a kialakult telepek számát befolyásolja, ezért azok a törzsek, amelyek érzékenyebbek az adott mutagénkezelésre, kevésbé képesek benőni a cseppentés területét.

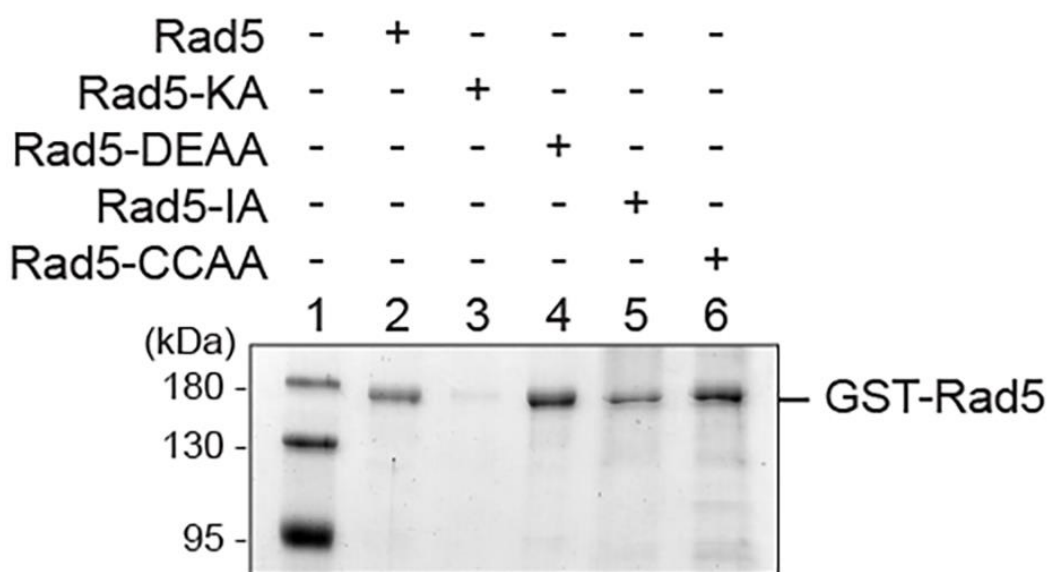
A *rad5-KA/rad5Δ* (K538A) ATP-kötő mutáns törzs csak minimális érzékenységet mutatott az MMS és UV kezelésre (**16. ábra**). Elképzelhető, hogy a K538A mutáció önmagában csak részlegesen rontja el a Rad5 ATP-kötő aktivitását, mert a *rad5-DEAA/rad5Δ* (DE681,682AA) ATP-hidrolizáló mutáns törzs lényegesen nagyobb érzékenységet mutatott kísérleteinkben (**16. ábra**). Ezt a két mutánst korábban még senki sem hasonlította össze egymással egy kísérleten belül. Eredményeink alapján a K538A mutáció részlegesen, míg a DE681,682AA mutáció teljesen elronthatja a Rad5 helikáz aktivitását.

A *rad5-IA/rad5Δ* (I916A) ubikvitin ligáz mutáns törzs kísérleteinkben kevésbé volt érzékeny, mint a *RAD5/rad5Δ/mms2Δ*. Az I916A feltehetően hipomorf mutáció, vagyis a pontmutáns Rad5-IA fehérje bizonyos mértékig még képes lehet kölcsönhatni az Ubc13-mal

(**16. ábra**). A másik ubikvitin ligáz mutáns törzsünk, a *rad5-CCAA/rad5Δ* (CC914,917AA) már nagyobb mutagén érzékenységet mutatott, a *rad5-IA/rad5Δ*-nál, sőt meglepő módon, érzékenysége még a *RAD5/rad5Δ/mms2Δ* törzsénél is nagyobb volt (**16. ábra**). Feltételezhető, hogy a CC914,917AA mutáció nemcsak a Rad5-Ubc13 kölcsönhatást rontja el, hanem a Rad5 egyéb aktivitásait is károsan befolyásolja. Ahhoz, hogy ezt bebizonyítsuk, *in vitro* helikáz és ubikvitin ligáz kísérleteket végeztünk a tisztított mutáns fehérjékkel.

5.2. A Rad5 mutánsok vizsgálata *in vitro* ubikvitin ligáz és helikáz kísérletekben

Az *in vivo* kísérleteinkben mutatott érzékenységek alapján mind a négy specifikus mutációkat hordozó Rad5 mutáns fehérjét érdemesnek találtuk *in vitro* biokémiai kísérletekben is megvizsgálni. Ennek érdekében a két helikáz/ATPáz mutánssal: az ATP kötésben mutáns Rad5-KA fehérjével és az ATP-hidrolizáló mutáns Rad5-DEAA fehérjével, illetve a két RING domén mutánssal: a hipomorf Rad5-IA fehérjével, valamint az *MMS2* deléciójánál is nagyobb mutagén érzékenységet okozó Rad5-CCAA fehérjével egyaránt ubikvitin ligáz és helikáz kísérleteket végeztünk.

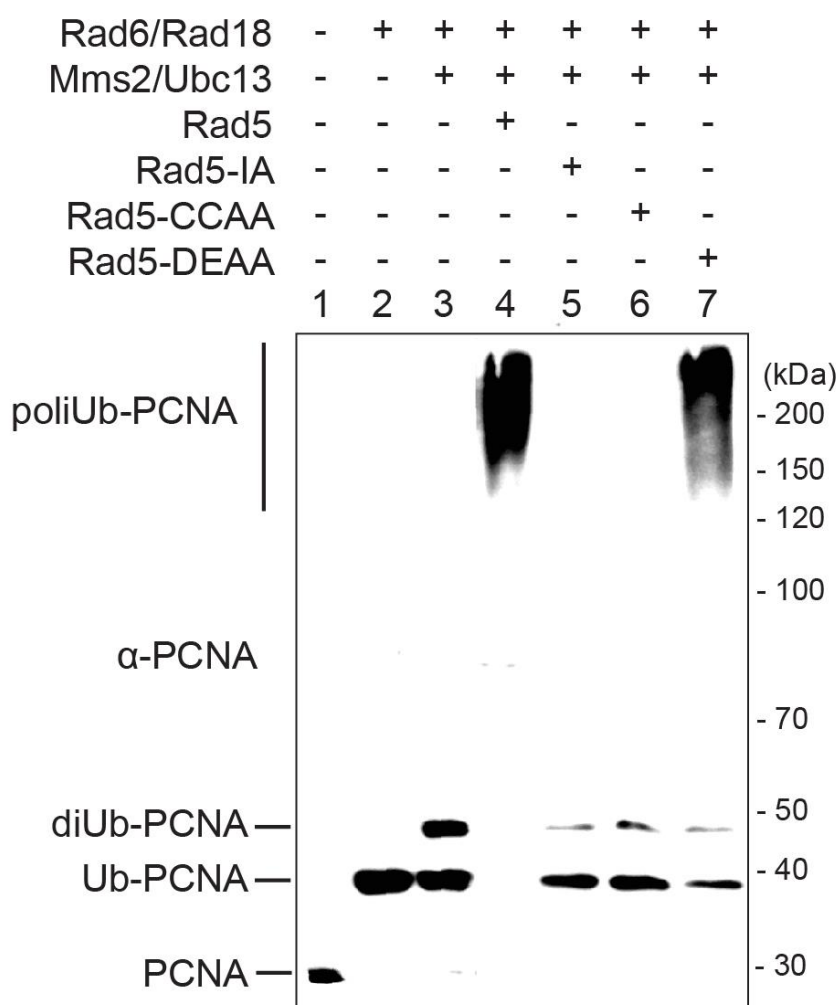


17. ábra: A tisztított mutáns és vad típusú Rad5 fehérjék N-terminális GST taggel (Rad5, Rad5-KA, Rad5-DEAA, Rad5-IA, Rad5-CCAA) SDS-PAGE futtatás és Coomassie festés után. Bal oldalon a fehérje marker alapján várható méreteket (kDa) ábrázoltuk.

Az ubikvitin ligáz kísérletben tisztított fehérjékkel modellezzük a PCNA poliubikvitinálásának folyamatát. Ehhez először RFC fehérjével összeállítjuk a PCNA homotrimert egy nikkelt plazmid DNS-szubsztráton, melyet Uba1, Rad6 és Rad18 fehérjékkel monoubikvitinálunk. Ebben a kísérletben azt vizsgáljuk, hogy a Rad5 mutáns fehérjék

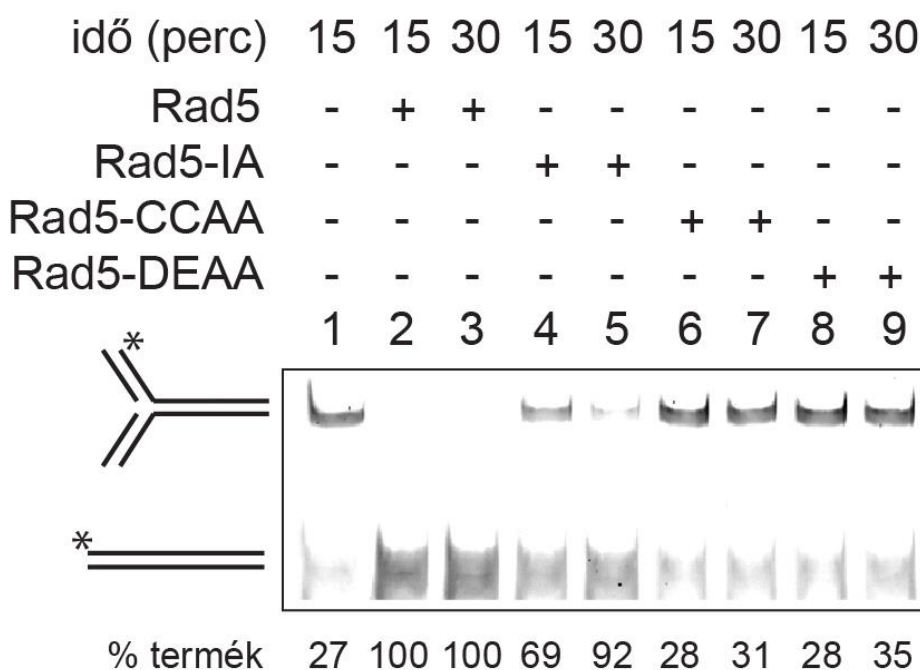
kölcsönhatnak-e az Ubc13 fehérjével és képesek-e poliubikvitinálni a monoubikvitin-PCNA fehérjét ubikvitin ligáz aktivitásukkal az Uba1, Mms2-Ubc13 fehérjékkel együttműködve.

Kísérleteinkben az N-terminális GST-tagget Rad5 mutáns fehérjéket egy galaktózzal indukálható PGK promóterről túltermeltettük, glutation gyöngyön tisztítottuk és redukált glutationnal eluáltuk (**17. ábra**). Mivel a Rad5-KA helikáz/ATPáz mutáns fehérjét nem tudtuk olyan mennyiségben kitisztítani, mint a többi Rad5 mutáns fehérjét és a *rad5-KA/rad5Δ* mutáns törzs *in vivo* kisebb érzékenységet mutatott UV és MMS kezelésre, mint a másik helikáz/ATPáz mutáns törzs – a *rad5-DEAA/rad5Δ* - ezért a további kísérletekből a Rad5-KA mutáns fehérjét kihagytuk.



18. ábra: A Rad5-IA, a Rad5-CCAA és a Rad5-DEAA mutáns fehérjék aktivitásának a vizsgálata *in vitro* ubikvitin ligáz kísérletben. Az ábrán felsorolt fehérjéket összemértük PCNA, RFC, Uba1 és ubikvitin fehérjékkel, valamint nickelt plazmid DNS szubszttráttal. Egy óra 30°C hőmérsékletű inkubáció után a mintákat megfuttattuk SDS-PAGE gélen, majd Western blot után előhívtuk anti-PCNA ellenanyaggal. Ub-PCNA: monoubikvitin-PCNA, diUb-PCNA: diubikvitin-PCNA, PoliUb-PCNA: poliubikvitin-PCNA. Jobb oldalon a fehérje marker alapján várható méreteket (kDa) ábrázoltuk.

Az ubikvitin ligáz kísérletben a Rad5-DEAA helikáz mutáns fehérje aktivitásának mértéke a vad típusú fehérjéhez hasonló volt, míg a RING domén mutáns fehérjék - a Rad5-IA és a Rad5-CCAA – egyáltalán nem voltak képesek poliubikvitin-PCNA előállítására (18. ábra). A két RING domén mutáns fehérje korábbi élesztő két-hibrid kísérletekben sem volt képes kölcsönhatni az Ubc13 fehérjével [131]. A kísérletünkben megfigyelhető diubikvitin-PCNA termék kialakításáért az Mms2-Ubc13 komplex felelős. Ez a funkció evolúciósan konzervált és korábbi független közlemények támasztják alá a *in vitro* ubikvitin ligáz kísérleteiben élesztő [44] és humán [80] homológok esetén egyaránt.



19. ábra: *In vitro* helikáz kísérlet a Rad5-IA, Rad5-CCAA és a Rad5-DEAA mutáns fehérjékkel. A mintákat 15 és 30 percig inkubáltuk 30°C hőmérsékleten. A felsorolt tisztított Rad5 fehérjék helikáz aktivitását vizsgáltuk egy oligonukleotidokból összeállított replikációs villaszerű DNS szubsztráton, amely egy fluoreszcein (*) jelölést hordoz [58]. Majd natív PAGE gélen megfuttattuk a mintákat és a gél beszkeneltük. A helikáz aktivitás számítását a Rad5 30 perces mintához (100%) viszonyítottuk.

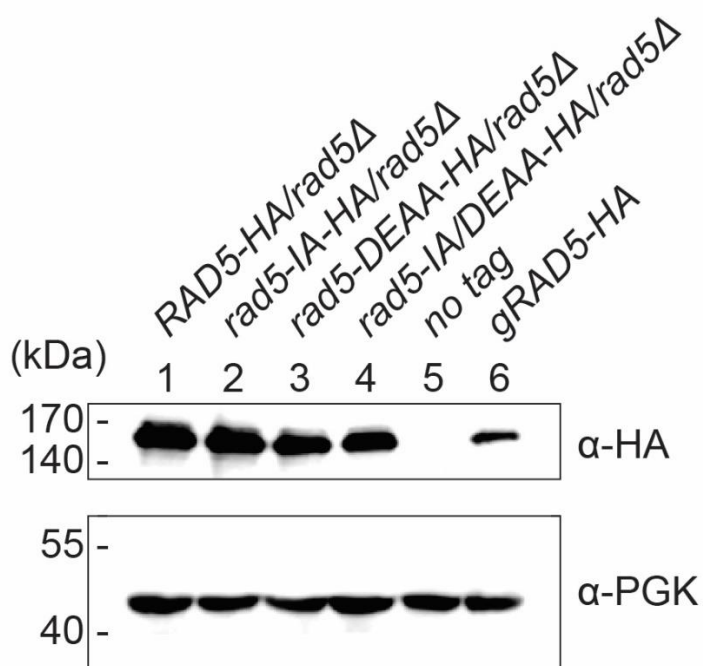
A helikáz-aktivitást vizsgáló kísérlethez oligonukleotidokból előzetesen elkészítettünk egy replikációsvilla-szerű, Y alakú, duplaszálú DNS-szubsztrátot, amelyben az egyik hosszú oligonukleotid fluoreszcens jelölést hordozott [58]. Ebben a kísérletben azt vizsgáltuk, hogy a tisztított mutáns Rad5 fehérjék a helikáz aktivitásukkal képesek-e átalakítani ezt a szubsztrátot - egy csirkelábszerű szerkezeten keresztül - egy hosszabb és egy rövidebb duplaszálú DNS-termékké. A helikáz kísérletben a kevésbé érzékeny ubikvitin ligáz mutáns fehérje (Rad5-IA) alacsonyabb aktivitást mutatott, mint a vad típusú fehérje, míg az érzékenyebb ubikvitin ligáz

mutáns (Rad5-CCAA) és a Rad5-DEAA helikáz mutáns fehérje nem mutatott semmilyen mérhető aktivitást (**19. ábra**). Ezen eredmény alapján megállapítható, hogy a *rad5-CCAA/rad5Δ* mutáns törzs azért mutat nagyobb érzékenységet, mint az *mms2Δ*, mind MMS mind UV kezelésre, mert se helikáz, se ubikvitin ligáz aktivitással nem rendelkezik. Vagyis a CC914,917AA mutáció nemcsak a Rad5-Ubc13 kölcsönhatást rontja el, hanem a Rad5 teljes szerkezetét is tönkreteszi. Így a továbbiakban ezt a mutánst kizártuk a kísérleteinkből.

Mivel a Rad5 mutáns fehérjét a továbbiakban *in vivo* kísérletekben terveztük vizsgálni, fontos volt tisztázni, hogy a vad típusú fehérjéhez képest milyen szinten termelődnek a *RAD5* saját promóteréről az általunk felállított kísérleti rendszerben.

5.3. A mutáns Rad5 fehérjék expressziójának a vizsgálata

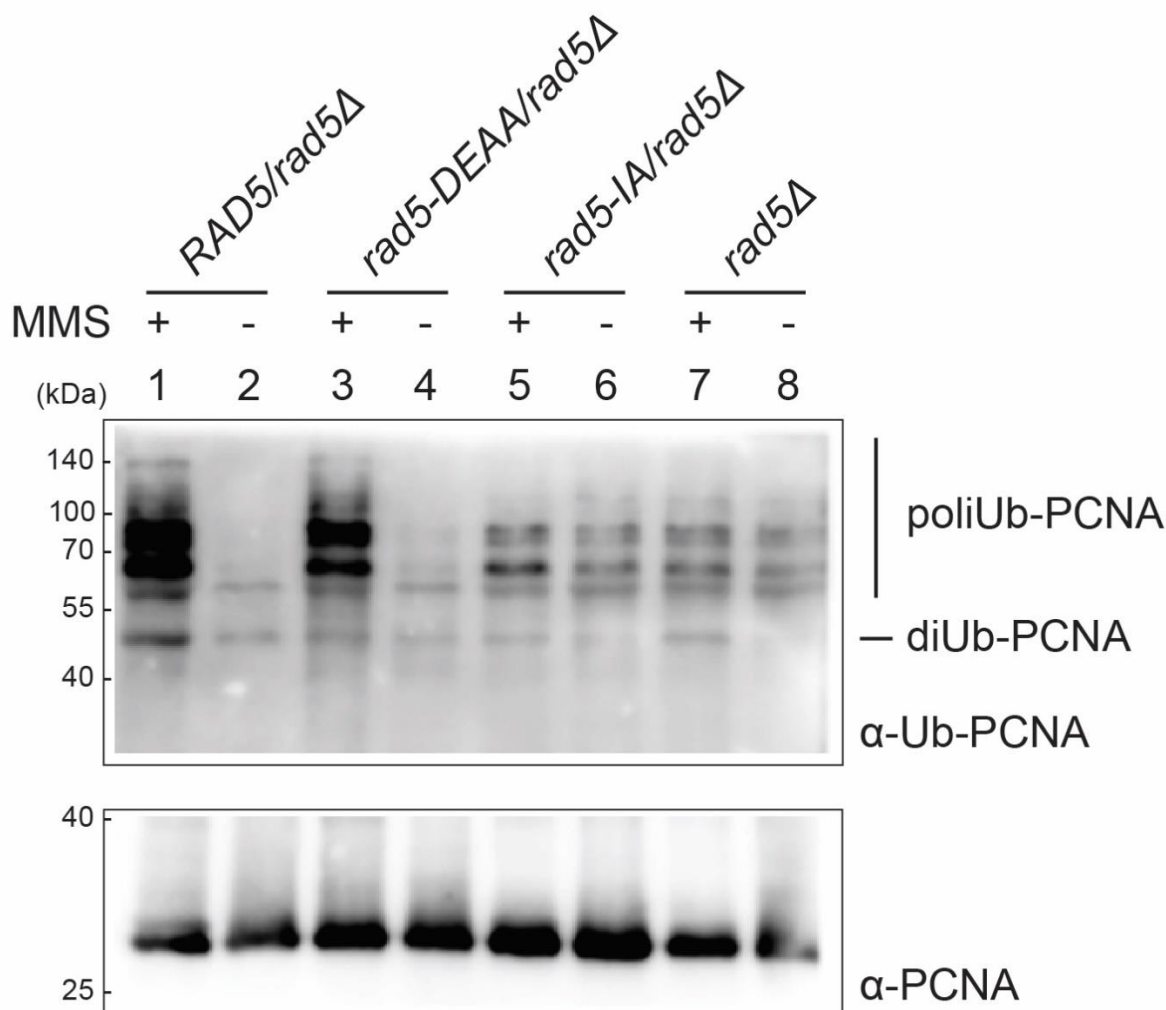
A *rad5* mutáns törzsek *in vivo* vizsgálatához igazolnunk kellett, hogy a mutációk jelenléte nincs hatással a fehérjék expressziós szintjére. Ezért C-terminális HA-taggel egészítettük ki a *rad5* gént az alacsony kópiaszámú, centromerikus YCPlac111 plazmidokban, amelyekről a mutáns Rad5 fehérjét a saját promóteréről *rad5Δ* deléciós mutáns törzsben már korábbi kísérleteinkben is termeltettük.



20. ábra: A mutáns és vad típusú Rad5 fehérjék expressziójának a vizsgálata *RAD5* promóterről alacsony kópiaszámú centromerikus plazmidról. A *gRAD5-HA* vad típusú törzsben a Rad5 fehérje C-terminális HA taggelését *in situ* a genomban készítettük el, míg a *RAD5-HA/rad5Δ*, *rad5-IA-HA/rad5Δ*, *rad5-DEAA-HA/rad5Δ*, *rad5-IA/DEAA-HA/rad5Δ* törzsek esetében a taggelés a plazmidon történt. A *no tag* vad típusú törzsben nincs HA tag. Az SDS-PAGE gélre felvitt sejt lizátumok mennyiségének az ellenőrzésére anti-PGK ellenanyagot használtunk. Bal oldalon a fehérje marker alapján várható méreteket (kDa) ábrázoltuk.

Western blot alapján a mutáns Rad5 fehérjék a transzformált sejtek lizátumaiban ugyanolyan koncentrációban vannak jelen, mint a vad típusú fehérje (**20. ábra**). A plazmidról termeltetett Rad5 fehérjék expressziós szintje nem alacsonyabb, mint a genomról termelődő vad típusú fehérjéé.

Ezek alapján ezt a kísérleti rendszert alkalmasnak találtuk a *rad5* mutáns törzsek további *in vivo* vizsgálatához. Először az *in vivo* ubikvitin ligáz aktivitásukat terveztük letesztelni.



21. ábra: A Rad5 *in vivo* PCNA-poliubikvitin ligáz aktivitásának a vizsgálata *RAD5/rad5Δ* vad típusú, *rad5-DEAA/rad5Δ* helikáz/ATPáz mutáns, *rad5-IA/rad5Δ* ubikvitin ligáz mutáns és *rad5Δ* deléciós mutáns élesztő törzsekben 1,5 órás 2,4 mM (0,02 V/V%) MMS kezelést követően. Az SDS-PAGE és a Western blot után a membránokat anti-Ub-PCNA és anti-PCNA ellenanyagokkal hívtuk elő. diUb-PCNA: diubikvitin-PCNA, PoliUb-PCNA: poliubikvitin-PCNA. Bal oldalon a fehérje marker alapján várható méreteket (kDa) ábrázoltuk.

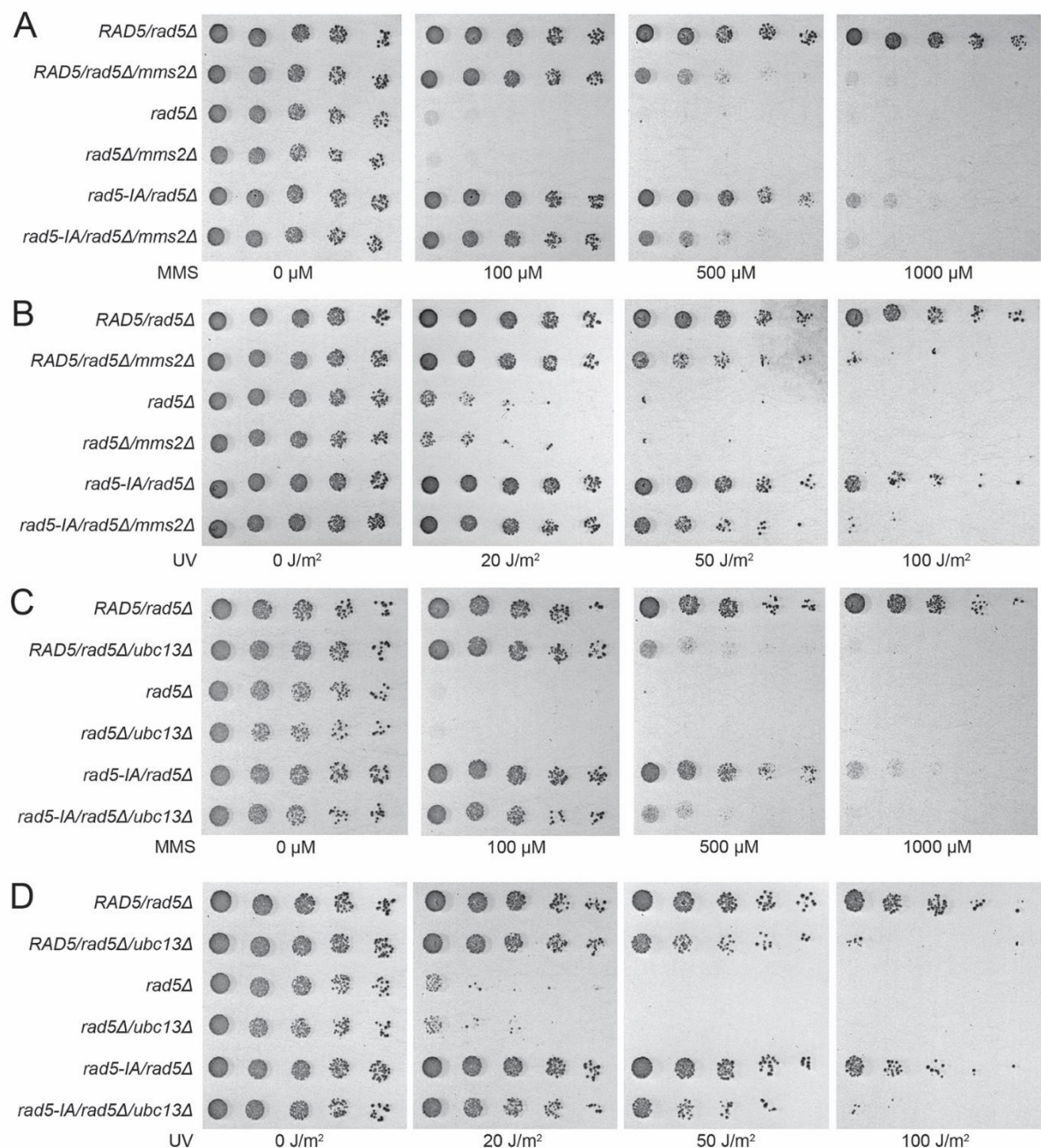
5.4. A PCNA *in vivo* poliubikvitinálása *rad5* mutáns törzsekben

A korábbi *in vitro* kísérleteinkben kiválasztottuk a legmegfelelőbb ubikvitin ligáz - *rad5-IA* - és helikáz/ATPáz - *rad5-DEAA* - mutációkat, amiket alacsony kópiaszámú, centromerikus YCPlac111 plazmidokról termeltetünk *rad5Δ* mutáns törzsekben. Utóbbi rendszert UV és MMS túlélési fenotípusa és fehérje expressziós szintje alapján is alkalmasnak találtuk *in vivo* kísérletekhez.

A PCNA *in vivo* ubikvitinálásának a vizsgálatát MMS kezelést követően végeztük, a poliubikvitinált His-PCNA fehérjét nikkel gyöngyön kitisztítottuk, majd Western blott után azonosítottuk. A *rad5-DEAA/rad5Δ* mutáns törzsből MMS kezelést követően tisztított mintában a PCNA poliubikvitinálásának a mértéke hasonló volt, mint a vad típusú törzs esetén (**21. ábra**). A *rad5-IA/rad5Δ* és a *rad5Δ* mutáns törzsekből viszont csak minimális mennyiségű poliubikvitin-PCNA jelet kaptunk, ami megerősíti a korábbi Rad5-IA fehérjével kapcsolatos *in vitro* eredményünket, hogy a *rad5-IA* fehérjének nincs ubikvitin ligáz aktivitása. Bár a Rad5-IA ubikvitin ligáz mutáns fehérje *in vitro* helikáz aktivitása is alacsonyabb volt, mint a vad típusú fehérje aktivitása, ennek ellenére lehetséges, hogy még ez az alacsonyabb aktivitás is elegendő ahhoz, hogy a fehérje el tudja végezni *in vivo* funkcióját. Ahhoz, hogy ezt megállapítsuk, megvizsgáltuk a *rad5-IA/rad5Δ* érzékenységet *mms2Δ* háttéren.

5.5. A *rad5-IA* mutáns és az *MMS2/UBC13* genetikai kapcsolata

A *rad5-IA/rad5Δ/mms2Δ* kettős mutáns elkészítéséhez a *rad5Δ/mms2Δ* törzset transzformáltuk Rad5-IA fehérjét expresszáló plazmiddal, menekítve a *RAD5* deléció fenotípusát. E mutánsok kapcsolatát különböző mutagenézis kísérletekben vizsgáltuk. A *rad5-IA/rad5Δ/mms2Δ* kettős mutáns ugyanolyan érzékenységet mutatott, mint az *RAD5/rad5Δ/mms2Δ* egyszeres mutáns törzs MMS és UV kezelésre, ugyanis a Rad5-IA mutáns fehérjének csak az Ubc13 fehérjével történő kölcsönhatása sérült (**22. ábra A, B**). Ugyanezt az eredményt kaptuk a *rad5-IA/rad5Δ/ubc13Δ* mutáns törzs esetében is (**22. ábra C, D**). Ezek az eredmények megfelelnek az irodalmi adatoknak [117]. Ennek alapján egyértelműen megállapítható, hogy a Rad5-IA helikáz aktivitása el tudja látni a fehérje *in vivo* funkcióját, különben a kettős *rad5-IA/rad5Δ/mms2Δ* mutáns érzékenyebb lenne, mint az egyszeres mutánsok külön-külön. A *RAD5/rad5Δ/mms2Δ* és az *RAD5/rad5Δ/ubc13Δ* kettős mutáns törzsek is nagyobb érzékenységet mutattak, mint a *rad5-IA/rad5Δ*, mivel e mutáció csak részlegesen rontja el a Rad5-Ubc13 kölcsönhatást, ahogy azt a keletkező diubikvitin-PCNA is jelezte az ubikvitin ligáz kísérletünkben.

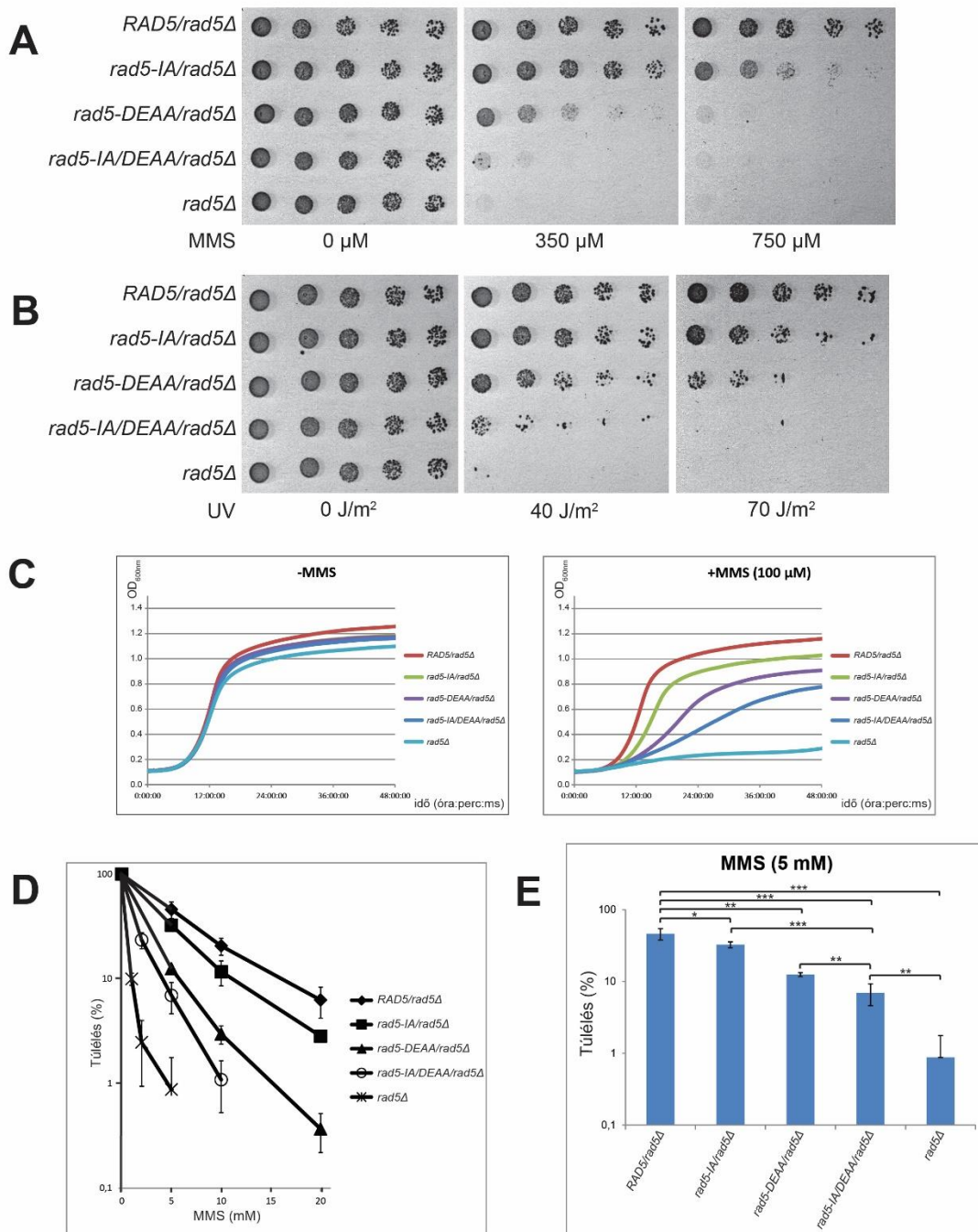


22. ábra: A *rad5-IA/rad5Δ/mms2Δ* (A, B) és a *rad5-IA/rad5Δ/ubc13Δ* (C, D) mutáns törzsek érzékenységének a vizsgálata spot assay-vel, (A, C) MMS tartalmú táptalajokon, (B, D) és UV sugárzást követően. A 100, 500 és 1000 μ M MMS koncentrációk 0,00085; 0,0043 és 0,0085V/V% értékeknek felelnek meg. A vizsgált törzsek azonos sejtkoncentrációjú kultúráinak háromszoros hígítási sorozatait táptalajokra cseppentettük ki, majd 2 nap 30°C hőmérsékletű inkubáció után a táptalajokat beszkenneltük.

5.6. A *rad5* helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz mutánsok genetikai kapcsolata

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a Rad5 helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz aktivitásai közötti kapcsolatot, kettős mutáns törzset hoztunk létre (*rad5-IA/DEAA/rad5Δ*), úgy, hogy *rad5Δ* törzset transzformáltunk kettős mutáns Rad5 fehérjét expresszáló plazmiddal

(PIL2757). E kettős mutáns túlélési érzékenységét MMS és UV kezelést követően vizsgáltuk, és a sejtek növekedését is teszteltük MMS jelenlétében. A kettős mutáns törzs érzékenysége minden esetben nagyobb volt, mint az egyszeres mutánsoké, ami azt bizonyítja, hogy egymástól független szereppel rendelkeznek a DNS-hibitolerancia folyamatában (**23. ábra**). A *rad5-IA/DEAA/rad5Δ* érzékenysége azonban nem érte el a *rad5Δ* érzékenységét, mivel feltehetően a Rad5 e két ismert aktivitása mellett más funkcióval is rendelkezik a DNS-hibajavítás folyamatában. Emellett az is lehetséges, hogy az *I916A* ubikvitin ligáz mutáció hipomorf jellege miatt a Rad5-IA/DEAA fehérje részlegesen képes menekíteni a *rad5Δ* törzs érzékenységi fenotípusát.

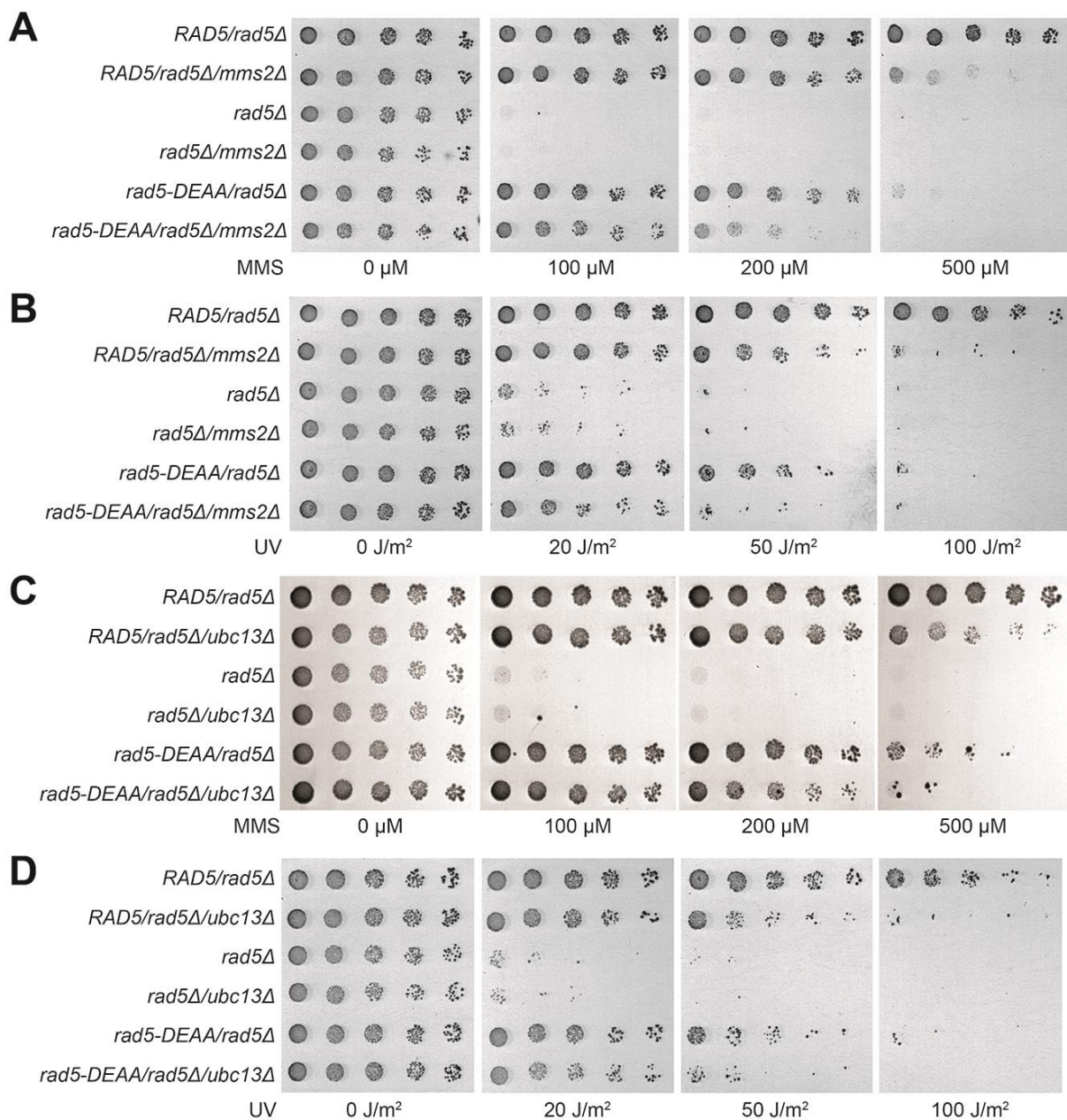


23. ábra: A *rad5-IA/DEAA/rad5Δ* ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz mutáns törzs érzékenységének a vizsgálata spot assay-vel, (A) MMS tartalmú táptalajokon, (B) és UV sugárzást követően. A 350 és a 750 μM MMS koncentrációk 0,003 és 0,0064 V/V% értékeknek felelnek meg. (C) A mutáns törzsek növekedési görbéi MMS tartalmú tápoldatokban. A 100 μM MMS koncentráció 0,00085 V/V% értéknek felel meg. A grafikonon a különböző törzsek 4 percenként mért $\text{OD}_{600\text{nm}}$ értékeit ábrázoltuk. (D) A mutáns törzsek túlélési görbéje 1 órányi MMS kezelést követően. A 2, 5, 10, 20 mM MMS koncentrációk 0,017; 0,043; 0,085 és 0,17 V/V% értékeknek felelnek meg. Ezek az adatok három párhuzamos kísérlet eredményeiből számolt átlagok és standard hibák. (E) A mutáns törzsek túlélési rátája 1 órányi 5 mM MMS kezelést követően. Itt a D ábra 5 mM koncentráción számolt értékeit ábrázoltuk. A szignifikancia számításához t-tesztet használtunk. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Ahhoz, hogy bebizonyítsuk, hogy a Rad5 egy eddig ismeretlen harmadik aktivitással is rendelkezik, előállítottunk *rad5-DEAA/rad5Δ/mms2Δ* és *rad5-DEAA/rad5Δ/ubc13Δ* kettős mutáns törzseket, melyek elkészítéséhez *rad5Δ/mms2Δ* és *rad5Δ/ubc13Δ* törzseket transzformáltunk Rad5-DEAA fehérjét expresszáló plazmiddal. E törzsek érzékenységét szintén megvizsgáltuk MMS és UV kezelést követően. A *rad5-DEAA/rad5Δ/mms2Δ* törzs kisebb érzékenységet mutatott, mint a *rad5Δ/mms2Δ* (**24. ábra A, B**), ami megerősíti azt a korábbi következtetésünket, hogy a Rad5 helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz aktivitása mellett egy harmadik aktivitással is rendelkezik. Ugyanezt az eredményt kaptuk a *rad5-DEAA/rad5Δ/ubc13Δ* és a *rad5Δ/ubc13Δ* törzsek esetén is (**24. ábra C, D**).

Mivel a *rad5-DEAA/rad5Δ/mms2Δ* törzs nagyobb érzékenységet mutat, mint az egyszeres mutánsok, megerősítettük azt a korábbi eredményünket, hogy a Rad5 helikáz/ATPáz aktivitása az ubikvitin ligáz aktivitásától független szereppel bír (**24. ábra A, B**). A *rad5-DEAA/rad5Δ/ubc13Δ* törzs esetében hasonló eredményt kaptunk (**24. ábra C, D**). Ezen eredményeink ellentmondanak azon irodalmi adatoknak, melyek szerint a Rad5-DEAA mutáns fehérjében nemcsak a helikáz/ATPáz, hanem az *in vivo* ubikvitin ligáz aktivitás is elromlott [119], ugyanis ha ez valóban így lenne, akkor a *rad5-DEAA/rad5Δ* törzsünk ugyanolyan érzékeny lett volna, mint a *rad5-DEAA/rad5Δ/mms2Δ*.

Eredményeink alapján a Rad5 három független aktivitással rendelkezik: helikáz/ATPáz aktivitással, mely a replikációs villa visszafordításához szükséges, ubikvitin ligáz aktivitással, mely a PCNA poliubikvitinálását végzi, és egy harmadik funkcióval, melynek működésében nem vesz részt sem a helikáz/ATPáz, sem pedig az ubikvitin ligáz aktivitás. Ezután ennek az általunk azonosított új funkciónak a mutagenézisben betöltött szerepét vizsgáltuk.



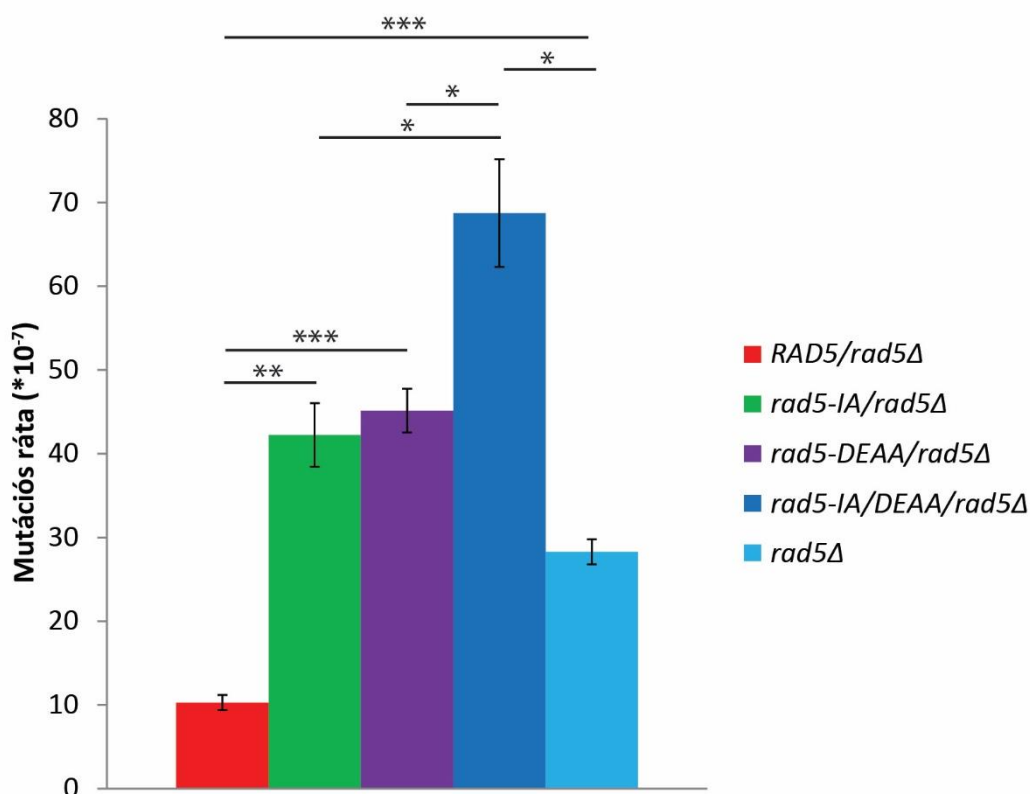
24. ábra: A *rad5-DEAA/rad5Δ/mms2Δ* (A, B) és a *rad5-DEAA/rad5Δ/ubc13Δ* (C, D) mutáns törzsek érzékenységének a vizsgálata spot assay-vel, (A, C) MMS tartalmú táptalajokon, (B, D) és UV sugárzást követően. A 100, 200 és 500 μ M MMS koncentrációk 0,00085; 0,0017 és 0,0043 V/V% értékeknek felelnek meg. A vizsgált törzsek azonos sejtkoncentrációjú kultúráinak háromszoros hígítási sorozatait táptalajokra cseppentettük ki, majd 2 (A, B, D) vagy 4 nap (C) 30°C hőmérsékletű inkubáció után a táptalajokat beszkeneltük.

5.7. A spontán mutációk gyakorisága a *rad5* mutáns törzsekben

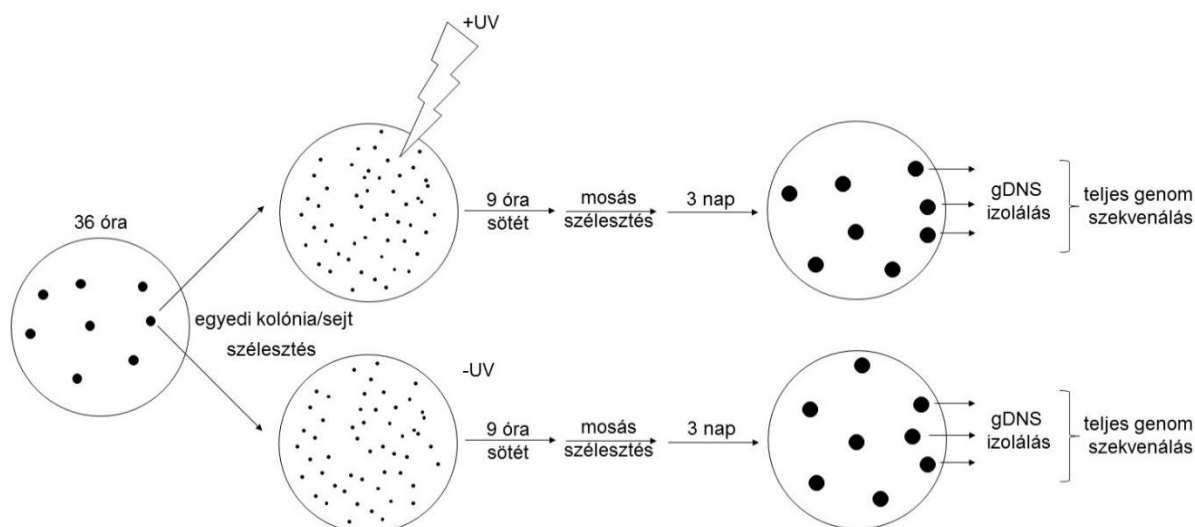
Spontán mutagenézis kísérletekben teszteltük a helikáz/ATPáz és az ubikvitin ligáz egyszeres és kettős mutáns *rad5* törzseket és a *rad5Δ* deléciós mutáns törzset. Az egyszeres mutáns törzsekben, mind a *rad5-DEAA/rad5Δ*, mind a *rad5-IA/rad5Δ* esetén a vad típusnál

magasabb gyakorisággal keletkeznek spontán mutációk. A *rad5-IA/DEAA/rad5Δ* kettős mutáns törzsben ez a gyakoriság még az egyszeres mutánsokban tapasztalt szintnél is magasabb (25. ábra). Ez utóbbi eredmény erősíti azt a korábbi megállapításunkat, hogy a Rad5 ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz aktivitása egymástól független funkcióval rendelkezik. A *rad5Δ* deléciós mutáns törzs esetében a spontán mutációs ráta alacsonyabb volt, mint a *rad5-IA/DEAA/rad5Δ* kettős mutánsnál, aminek az lehet az oka, hogy a Rad5 harmadik aktivitása olyan folyamatban játszhat szerepet, ami a spontán mutációk kialakulásához vezet.

A továbbiakban a keletkező mutációk típusainak az arányát vizsgáltuk a *rad5* mutáns törzsekben teljes genom szekvenálással.



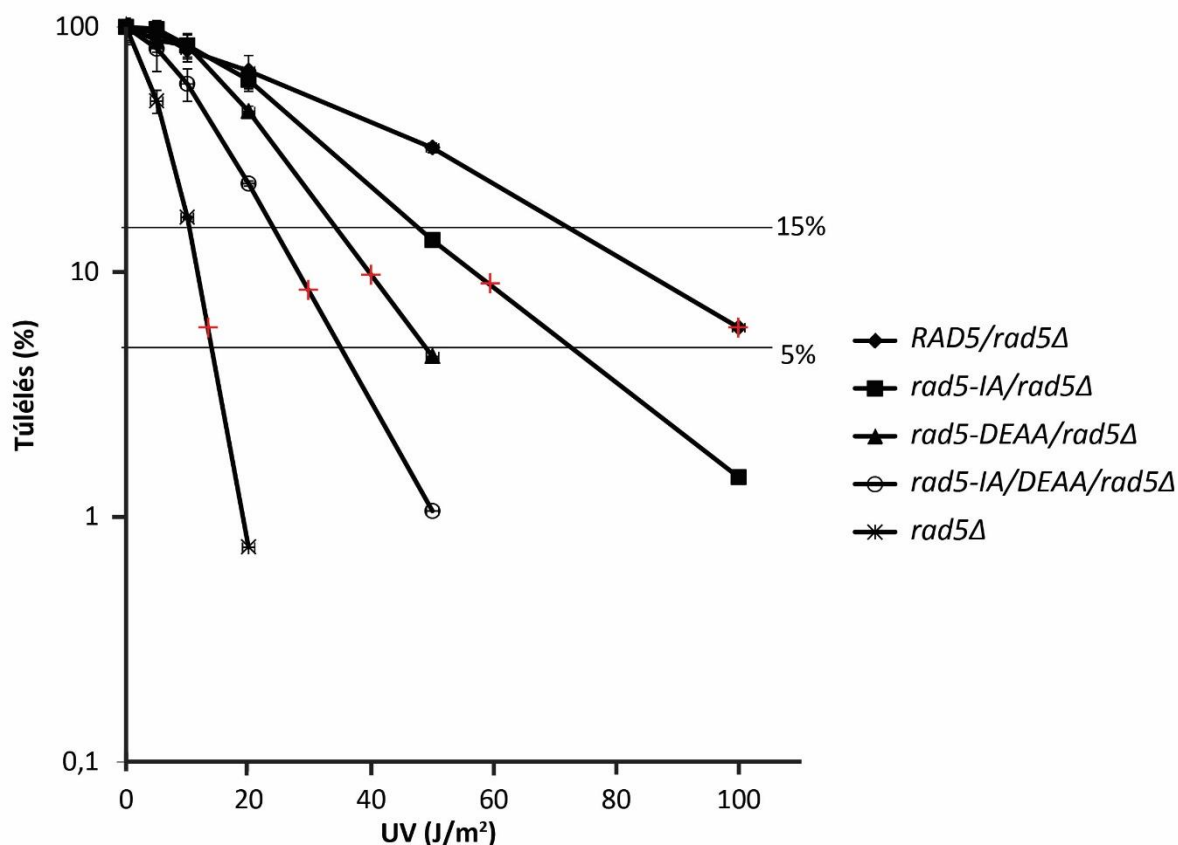
25. ábra: A *rad5-IA/DEAA/rad5Δ* ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz kettős mutáns törzs spontán mutagenézis rátájának a vizsgálata. A kanavanin rezisztens kolóniák mennyiségéből számoltuk ki a mutációs események számát 10^7 sejtre vonatkoztatva. Az adatok öt párhuzamos kísérlet eredményeiből számolt átlagok és standard hibák. A szignifikancia számításához t-tesztet használtunk. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.



26. ábra: A teljes genom szekvenálás előtti UV-kezelés kísérleti elrendezése. Egy 36 órás egyedi telepet kiszélesztettünk két lemezre, amiből az egyiket UV sugárzással kezeltük. 9 órányi 30°C hőmérsékletű sötét inkubációt követően a sejteket lemostuk a lemezekről, majd újra kiszélesztettük és 3 nap növesztés után ezekről a lemezekről választottunk ki 3-3 egyedi telepet genomi DNS izoláláshoz és teljes genom szekvenáláshoz.
gDNS: genomi DNS, fekete körök: élesztő kolóniák

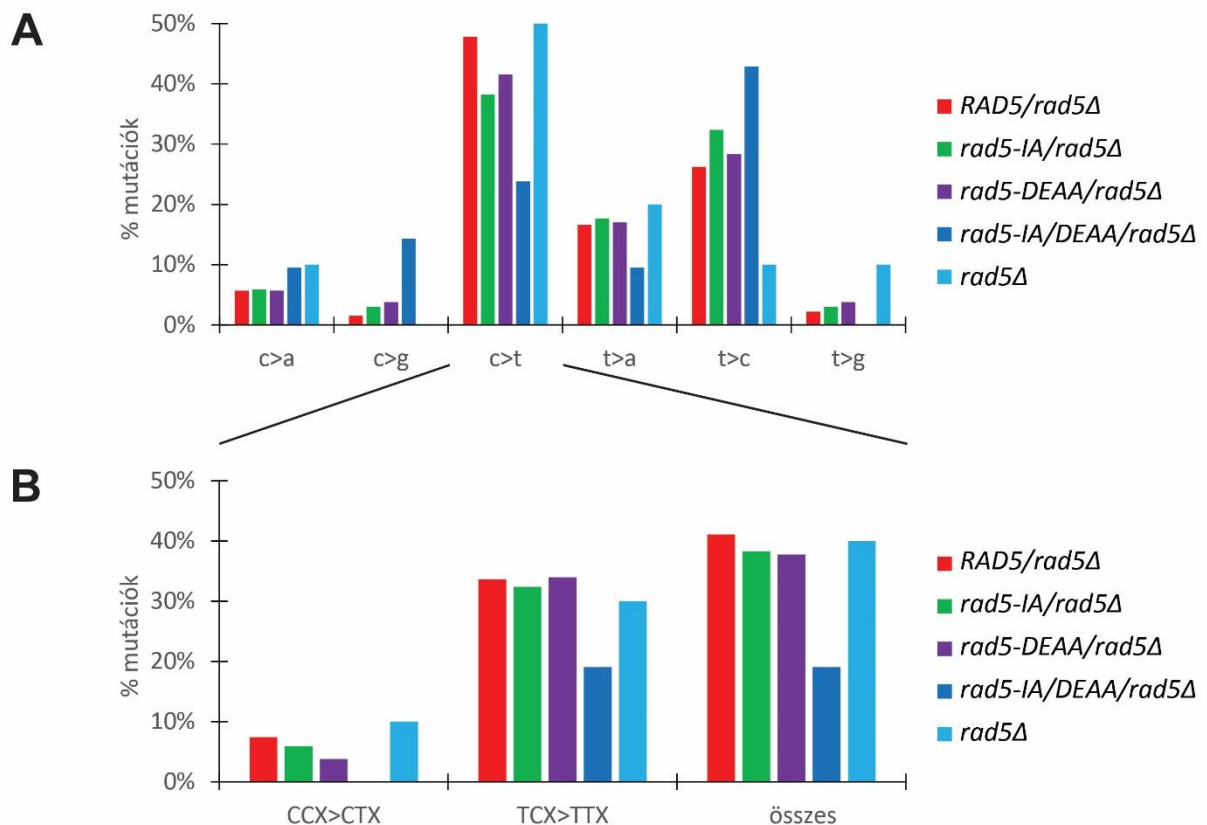
5.8. Az UV-indukált mutációk típusainak az aránya a *rad5* mutáns törzsekben

A *rad5* mutáns törzsekben keletkező UV-indukált mutációkat teljes genom szekvenálással vizsgáltuk meg (**26. ábra**). Az UV kezelést követően a táptalajra szélesztett sejteket 9 órán át inkubáltuk azért, hogy a sejtciklusok S-fázisában az UV sugárzás által létrejött DNS-károsodásokból mutációk alakulhassanak ki. Majd a sejteket lemostuk és újra kiszélesztettük, hogy a mutációt tartalmazó egyedi sejtekből felnövő kolóniákat tudjunk vizsgálni a teljes genom szekvenálásban. A kísérletben olyan UV dózisokat választottunk a különböző törzsekhez, amelyeknél a sejtek túlélése körülbelül 10%-os (**27. ábra**), ugyanis ha túl alacsony lenne a sejtek túlélési aránya, akkor nagyobb lenne az esélye annak, hogy a szekvenáláshoz kiválasztott túlélő sejtek alapból valamilyen háttér mutációval rendelkeznek, ami UV rezisztens fenotípust okoz.



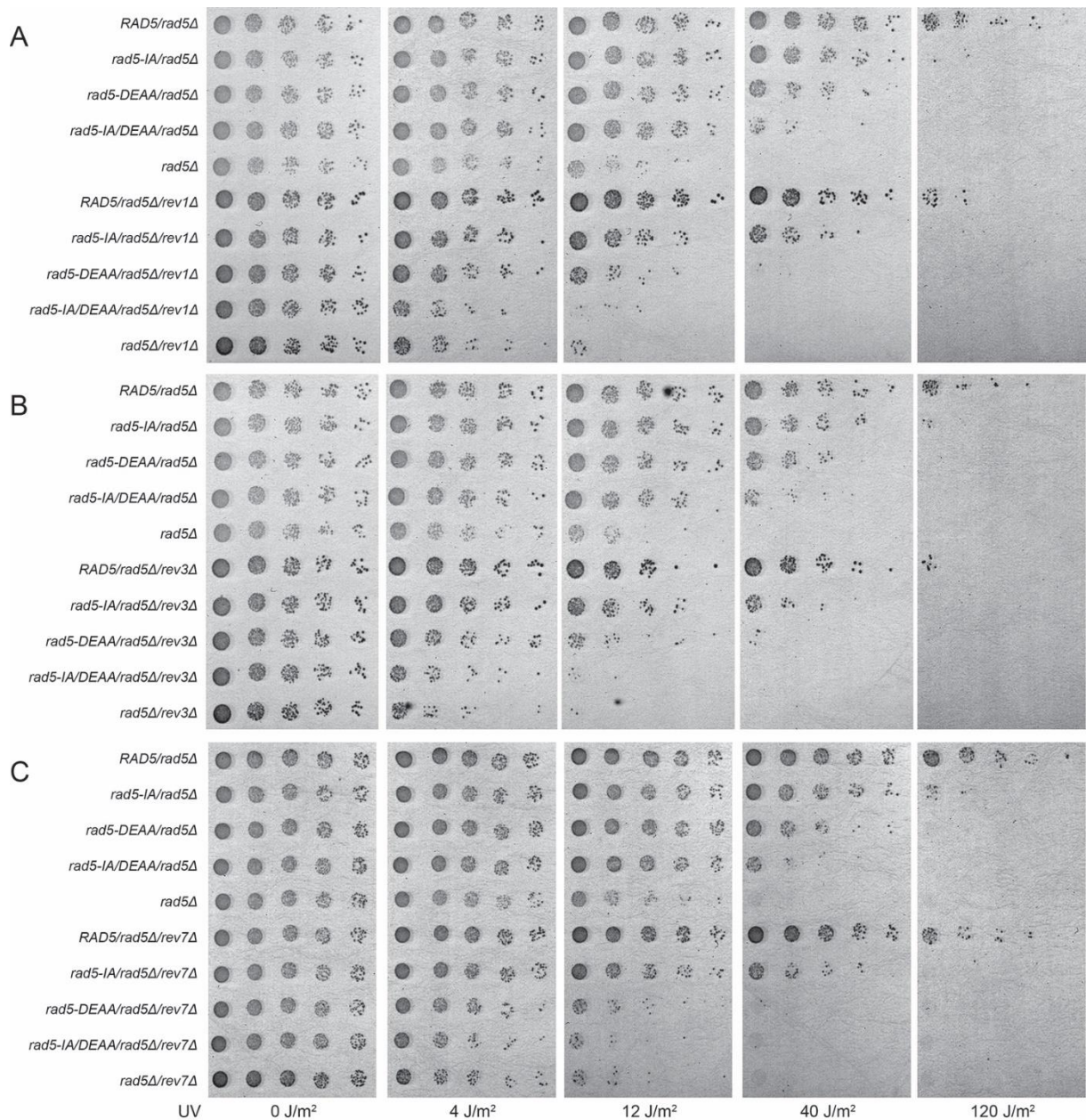
27. ábra: A *rad5* mutáns élesztő törzsek UV érzékenysége. A teljes genom szekvenálás előtti mutagén kezeléshez olyan UV dózisokat választottunk ki, amelyeknél a sejtek túlélési aránya 10% körül várható. Az élesztő sejteket kiszélesztettük táptalajra, majd UV sugárzás után 4 nap 30°C hőmérsékletű sötét inkubációt követően megszámoltuk a felnőtt telepeket. Az adatok négy párhuzamos kísérlet eredményeiből számolt átlagok és standard hibák. Piros + jel: a törzsek várható túlélési aránya a használt UV dózison.

Az UV sugárzás jellegzetesen C>T mutációk kialakulásához vezet, ami főleg TC vagy CC helyek 3' citozin nukleotidját érinti, ez a mi eredményeinkben is megfigyelhető (28. ábra) [132–134]. A *rad5-IA/rad5Δ* és *rad5-DEAA/rad5Δ* egyszeres mutáns törzsek esetén a mutációk arányában nem tapasztaltunk különbséget a vad típushoz képest. Viszont a helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz kettős mutáns törzs - *rad5-IA/DEAA/rad5Δ* - esetén megemelkedett a T>C és a C>G mutációk aránya, ami megerősíti azt a korábbi eredményünket, hogy a Rad5 ezen két aktivitása egymástól független. Eredményeink alapján a Rad5 helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz aktivitása redundáns lehet. A *rad5-IA/DEAA/rad5Δ* kettős mutáns törzshöz képest a *rad5Δ* törzsben csökkent a T>C és a C>G mutációk aránya, ami azt sejteti, hogy a Rad5 harmadik - mutációkat generáló - aktivitásának ezen mutációk kialakításában lehet szerepe.



28. ábra: (A) Az UV-indukált mutációk aránya a szubsztitúciók hatféle típusa szerint a *rad5* mutáns törzsekben a teljes genom szekvenálás alapján. (B) A C>T mutációk előfordulásának a gyakorisága CCX és TCX helyeken az összes mutációhoz képest.

Mivel ismert, hogy a Rev1 és a Pol ζ TLS polimerázok felelősek a T>C és a C>G mutációk kialakításáért [35,113], arra voltunk kíváncsiak, hogy a TLS polimerázok együttműködnek-e a Rad5 harmadik aktivitásával. Ha a Rad5 aktivitásai közül valamelyik egy TLS polimerázzal együtt funkcionál, akkor a kettős mutánsuk érzékenységéből ez kimutatható.

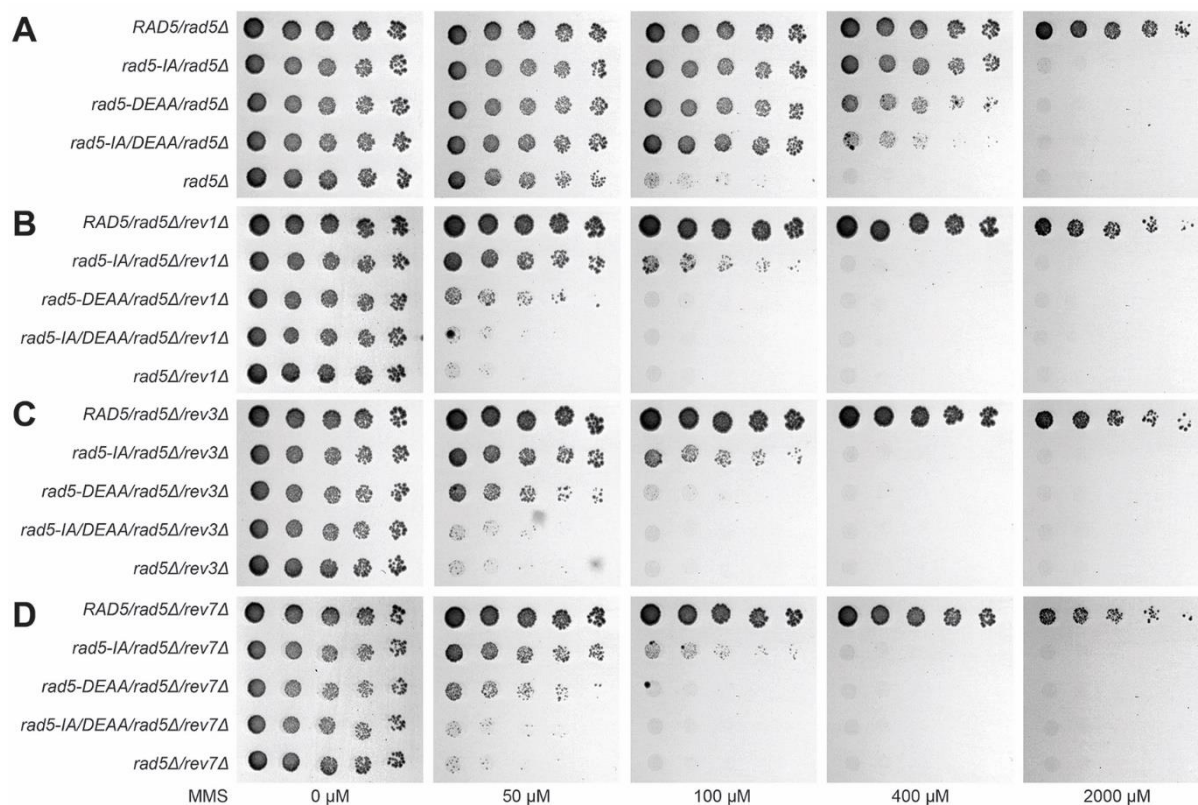


29. ábra: A *rad5* mutánsok érzékenységének a vizsgálata (A) *rev1Δ*, (B) *rev3Δ* és (C) *rev7Δ* háttéren spot assay-vel UV sugárzást követően. A vizsgált törzsek azonos sejtkoncentrációjú kultúráinak háromszoros hígítási sorozatait táptalajokra cseppentettük ki, majd 2 nap 30°C hőmérsékletű inkubáció után a táptalajokat beszkeneltük.

5.9. A *rad5* mutánsok és a TLS polimerázok genetikai kapcsolata

A *rad5* mutánsok és a TLS mutánsok kapcsolatát túlélési kísérletekben vizsgáltuk meg MMS és UV kezelésre. A kettős mutánsok elkészítéséhez, amelyek az egyik *rad5* mutációt (*rad5-IA*, *rad5-DEAA*, *rad5-IA/DEAA* vagy *rad5Δ*) és az egyik TLS polimeráz génjének a delécióját (*rev1Δ*, *rev3Δ* vagy *rev7Δ*) tartalmazzák, kettős deléciós mutáns törzsekbe (*rad5Δ/rev1Δ*, *rad5Δ/rev3Δ* vagy *rad5Δ/rev7Δ*) transzformáltunk különböző Rad5 mutánsokat

expresszáló plazmidokat (Rad5-IA, Rad5-DEAA, Rad5-IA/DEAA vagy üres). A *rad5-IA/DEAA/rad5Δ/rev3Δ* törzs ugyanolyan érzékeny volt UV (29B. ábra) és MMS (30C., 31. ábra) kezelésre, mint a *rad5Δ/rev3Δ*. Ugyanezt az eredményt kaptuk UV kezelésre a *rev1Δ* és a *rev7Δ* mutációk esetén is (29-30. ábra).

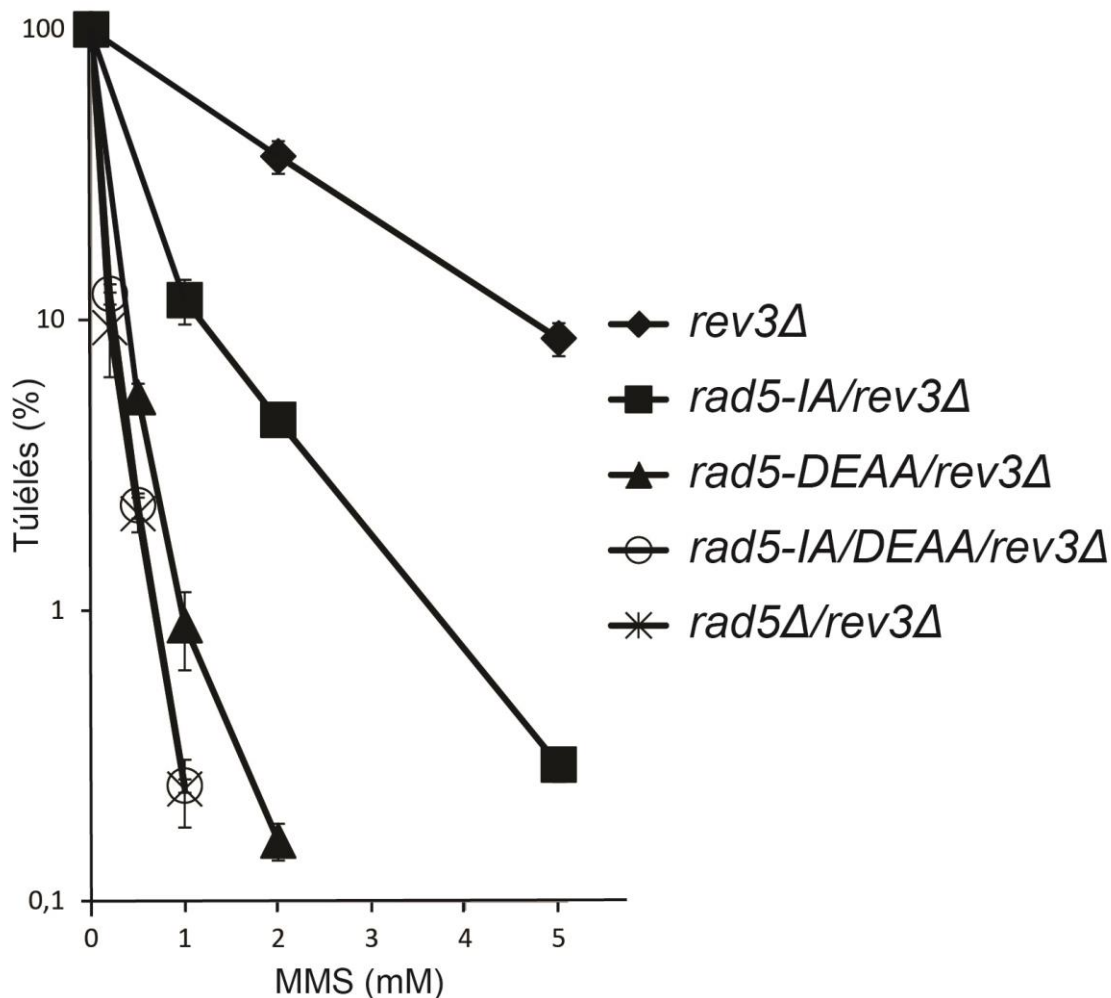


30. ábra: (A) A *rad5* mutánsok érzékenységének a vizsgálata (B) *rev1Δ*, (C) *rev3Δ* és (D) *rev7Δ* háttérén spot assay-vel MMS tartalmú táptalajokon. A 50, 100, 400 és 2000 μM MMS koncentrációk 0,000425, 0,00085, 0,0034, 0,017 V/V% értékeknek felelnek meg. A vizsgált törzsek azonos sejtkoncentrációjú kultúráinak háromszoros hígítási sorozatait táptalajokra cseppentettük ki, majd 4 nap 30°C hőmérsékletű inkubáció után a táptalajokat beszkeneltük.

Hasonló eredményeket kaptunk MMS tartalmú táptalajokon (30-31. ábra). Ezen eredmények alapján a Rad5 eddig ismeretlen aktivitása - mely a helikáz/ATPáz és az ubikvitin ligáz aktivitásoktól függetlenül működik - minden esetben a Rev1 és a Pol ζ (Rev3-Rev7) polimerázokkal együtt vesz részt a DNS-hibatolerancia folyamatában, és ezen kívül a Rad5 nem rendelkezik más funkcióval az UV és az MMS okozta DNS-károsodások tolerálásában. Ez a harmadik aktivitás mutagén hibajavítást visz véghez, mivel a mutagén TLS polimerázokkal működik együtt. Ezt az állításunkat megerősíti egy korábbi eredmény, mely szerint a spontán mutagenézis ráta a *rad5Δ* törzsben alacsonyabb volt, mint a *rad5-IA*,

rad5-DEAA, *rad5-IA/DEAA* törzsekben [117]. Tehát a Rad5 fehérje hibamentes és mutagén hibajavítási folyamatokban egyaránt részt vesz.

Ezek után azt terveztük megvizsgálni, hogy a Rad5 HIRAN doménje mely funkciók működéséhez szükséges az azonosított három független aktivitás közül.



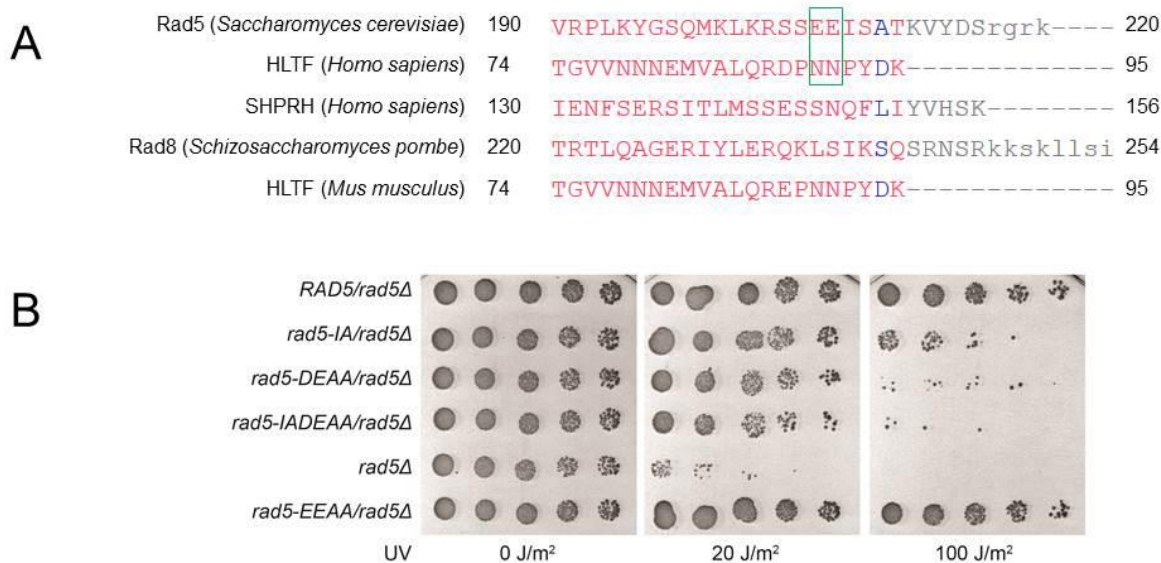
31. ábra: A *rad5* mutánsok túlélésének a vizsgálata *rev3Δ* háttéren 1 órányi MMS kezelést követően. Az 0,2; 0,5; 1; 2 és 5 mM MMS koncentrációk 0,0017; 0,0043; 0,0085; 0,017 és 0,043 V/V% értékeknek felelnek meg.

Ezek az adatok három párhuzamos kísérlet eredményeiből számolt átlagok és standard hibák.

5.10. A HIRAN domén mutáns törzsek *in vivo* vizsgálata

Kimutattuk, hogy a Rad5 három független aktivitással rendelkezik: a helikáz/ATPáz aktivitással, az ubikvitin ligáz aktivitással és a Rev1-Pol ζ polimerázokkal is együtt működik. Ezután azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy ezen három aktivitás közül melyekkel működhet együtt a Rad5 HIRAN doménje. Ahhoz, hogy ezt megállapítsuk, olyan mutációt kellett létrehoznunk a HIRAN doménben, amely csak specifikusan ennek a doménnek rontja el a funkcióját. A Rad5 humán homológjában - a HLTF fehérjében - már azonosították a

HIRAN domén funkcióját inaktíváló mutációt (NN90,91AA), ami *in vivo* UV érzékenységet okoz [58]. Többszörös illesztés alapján elkészítettük az EE206,207AA (*rad5-EEAA*) mutációt, ami a HLTF NN90,91AA mutációnak megfelelő konzervált helyen található a Rad5 HIRAN doménjében (**32A. ábra**). Majd ezt a mutáns Rad5 fehérjét termelő plazmidot transzformáltuk *rad5Δ* élesztő törzsbe, hogy menekítsük a *rad5Δ* UV kezelésre mutatott érzékenységet. Azt az eredményt kaptuk, hogy a *rad5-EEAA/rad5Δ* mutáns törzs nem mutat érzékenységet UV kezelésre (**32B. ábra**).



32. ábra: (A) Többszörös illesztés a *Saccharomyces cerevisiae* Rad5 homológjai: a humán HLTF és SHPRH, az egér HLTF és a hasadó élesztő Rad8 között. Piros betű: magas szintű konzerváltság, kék betű: alacsony szintű konzerváltság, szürke betű: nincs konzerváltság. (B) A *rad5-EEAA/rad5Δ* mutáns törzs UV kezelésre mutatott érzékenységének vizsgálata. A vizsgált törzsek azonos sejtkoncentrációjú kultúráinak háromszoros hígítási sorozatait táptalajokra cseppentettük ki, majd 2 nap 30°C hőmérsékletű inkubáció után a táptalajokat beszkeneltük.

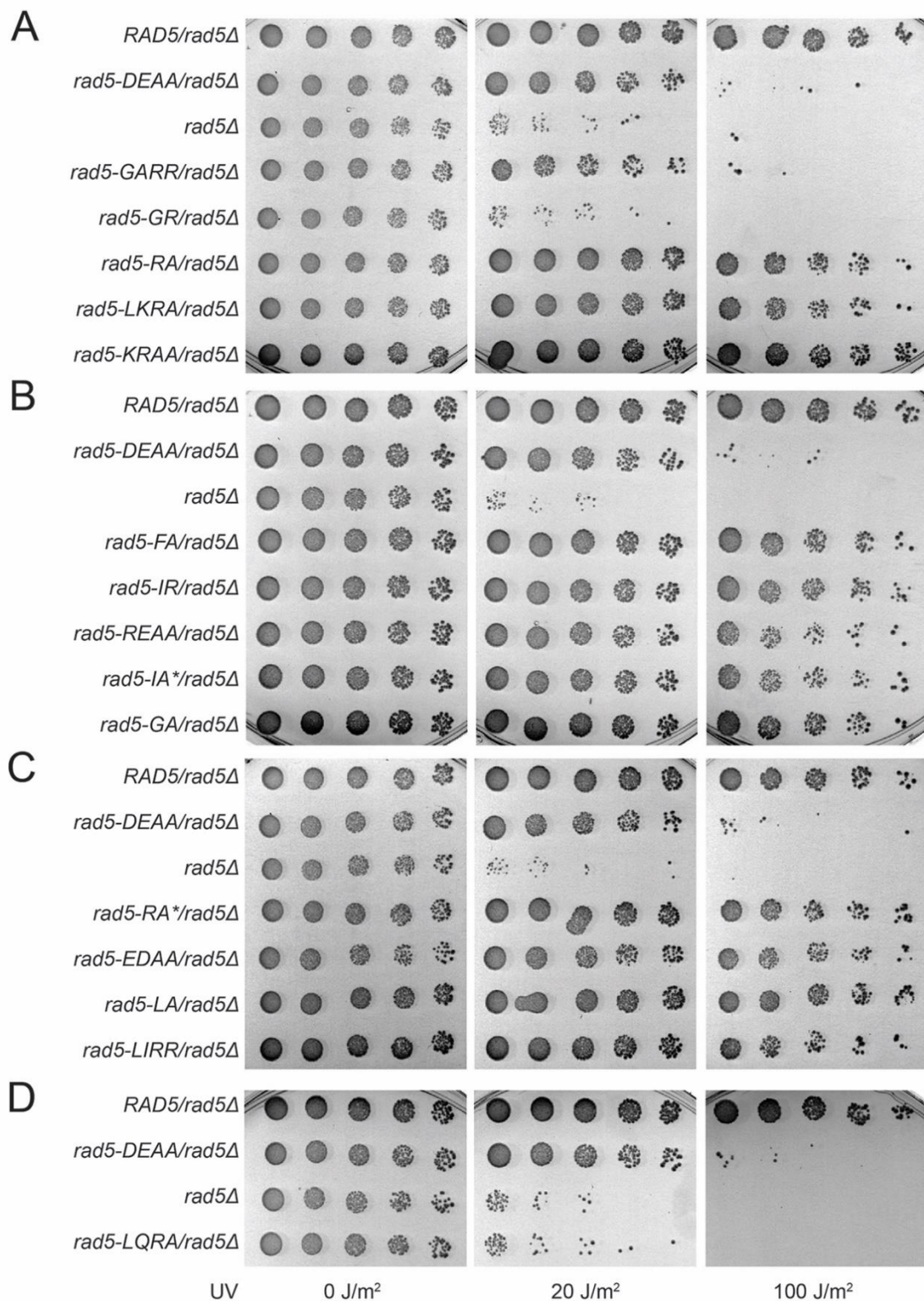
Mivel a humán HLTF HIRAN domén mutánsának megfelelő Rad5 mutáns élesztő törzs nem mutatott UV érzékenységet, úgy döntöttünk, hogy további HIRAN domén mutánsokat hozunk létre, a többszörös illesztés alapján konzervált és nem konzervált helyeken is az EE206,207AA mutációtól N- és C-terminális irányban egyaránt (**33. ábra**).

ScRad5	141	-----SNSTLSPSSFhPKRRRIYGFRNQTRLEDKVTWK-----RRR R A	189
hHLTF	1	-----MSWMFKRDPVWKYLQTVQYGVHGNFPRLSY-PTFFPRFEFQDVIPPDDFLTSDEEVdSVLFGSLRGHVVGLRYY	73
hSHPRH	62	keevahRDKKRCSKVVSFSKPIEKEETVGIFSPLSV-----KLNIVISPYHFDNSWK-----AFLGELTLQLLPAQSL	129
SpRad8	141	svkdlsINRNTNKKALNAVSPSLNLSNSSVQDVSI dKEEMMKQSRNALTPLDFIMKKNEL-MKYIGCFGVEAYSTASG	219
mHLTF	1	-----MSYTFTRGPVWKYSQSVQYGSHENIPRLSY-STFLPHFEFQDIIPPDDFLTSDEEQdLVLFGTMRGQVVGLRYY	73
ScRad5	190	VRPLKYGSQMKLKRSSEEISATKVYDSrgrk---KASMASLVRIfdiqyDREIGRVSEDIQILYPLLSSHEISFEVTL	265
hHLTF	74	TGVVNNEMVALQRDPNNPYDK-----NAIKVNNVNG-----NQVGHLLKELAGALAYIMDNKLAQIEGVV	134
hSHPRH	130	IENFSERSITLMSSESSNQFLIYVHSEK-----GEDVEKQKKEPMSICD-----KGIL	176
SpRad8	220	TRTLQAGERIYLERQKLSIKSQSRNSRkkskllsiNSSCYSNIVRfcnsdHHEIGKLPTEVASVISTLMEQGFWSEFAIC	299
mHLTF	74	TGVVNNEMVALQREPNNPYDK-----NAIKVNNVNG-----NQVGHIKREIAAAVAYIMDNKLAQIEGVV	134
ScRad5	266	-RIFCDNKRLSIGDSFILQLDCF-LTSLIFEERNDGESLMKRRRTEGGNkrekdnqnfgrltltetdeeLES---rSKRLALL	341
hHLTF	135	PFGANNAFTMPLHMTFWGKEENRKAQVSDQLKKGFKLGPAPKTLGFN-----LESGW-----	186
hSHPRH	177	VESSF-----SGEMLEDLGWLQKKRRIKLYQKPE---GNhiikvgiyl-----LEAGL---AKLDFLS	228
SpRad8	300	IYSDN-IIRFGSNVTLQVYCF-INV-----NHPSLNRSPTLATN-----smqeeehLKASFaQNKRDHLL	359
mHLTF	135	PFGASNTFTMPLYMTFWGKEENRNVVLEQLKKGFKLGPTPKTLGSS-----LENAW-----	186

33. ábra: Többszörös illesztés a *Saccharomyces cerevisiae* Rad5 homológjai: a humán HLTF és SHPRH, az eger HLTF és a hasadó élesztő Rad8 között. Piros betű: nagy mértékű konzerváltság, kék betű: kis mértékű konzerváltság, szürke betű: nincs konzerváltság. Zöld és sárga betűk: az aminosavak, amikre lecseréltük a Rad5 aminosavait, sárga betű: az először elkészített EE206,207AA mutáció, zöld betűk: a később elkészített további mutációk.

Az új HIRAN domén mutáns Rad5 fehérjéket termelő plazmidokat az előző kísérletekhez hasonlóan transzformáltuk a *rad5Δ* mutáns törzsbe, hogy menekítsük annak UV érzékenységi fenotípusát. UV kezelést követően a *rad5-GR/rad5Δ* és a *rad5-LQRA/rad5Δ* törzsek ugyanolyan érzékenyek voltak, mint a *rad5Δ* (34. ábra). Mivel a HLTF HIRAN domén mutáns sejtvonal hasonló mértékű UV érzékenységet mutatott, mint a HLTF csendesített sejtek [58], azt feltételeztük, hogy ez a két élesztő mutáció specifikus HIRAN domén mutációk. Ezek mellett a *rad5-GARR/rad5Δ* törzs mutatott még érzékenységet, mely kis mértékben érzékenyebb volt UV kezelésre, mint a helikáz/ATPáz mutáns *rad5-DEAA/rad5Δ*. Ismert, hogy a HLTF HIRAN domén mutáns fehérje *in vitro* helikáz aktivitással nem rendelkezik, azonban ubikvitin ligáz kísérletben ugyanolyan aktív, mint a vad típusú fehérje [58,65]. Az R187A mutációval rendelkező törzsünkben - *rad5-RA/rad5Δ* - a HLTF R71 aminosavának az élesztő homológját rontottuk el, ami egy jellemzett speciális HIRAN domén mutáció [65]. A mi kísérletünkben a *rad5-RA/rad5Δ* mutáns törzs csak kis mértékű UV érzékenységet mutatott, ezért nem vizsgáltuk tovább. Egy korábbi közleményben a *rad5-R187E* mutációval ugyanolyan érzékenységi fenotípust kaptak ciszplatinra, mint a *rad5-DEAA* helikáz/ATPáz mutáció esetén [135]. Lehetségesnek tartjuk, hogy ha alanin helyett mi is glutaminsavra cseréltük volna a 187-es arginint, hasonló eredményt kaphattunk volna UV kezelésre.

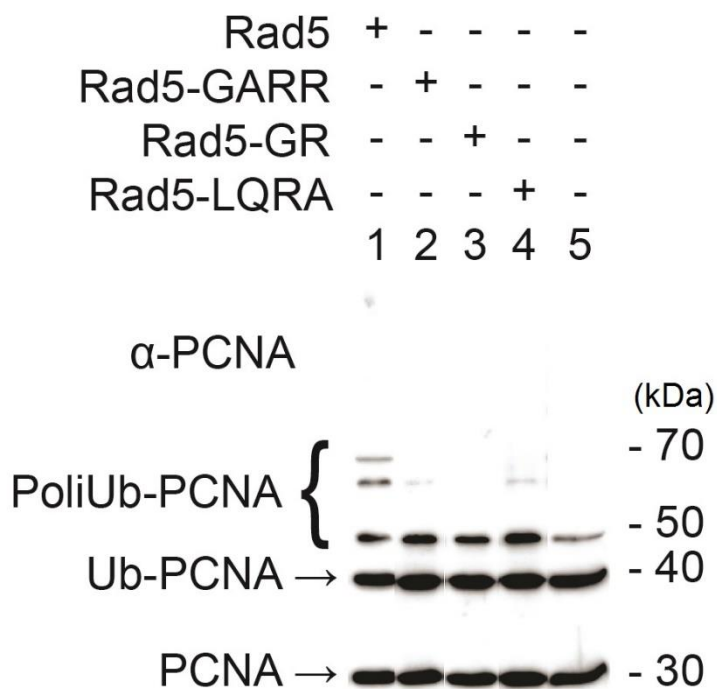
Ezek után az előbbi három mutáns Rad5 fehérjét - Rad5-GR, Rad5-LQRA és Rad5-GARR - kitisztítottuk és megvizsgáltuk az aktivitásukat *in vitro* ubikvitin ligáz kísérletben.



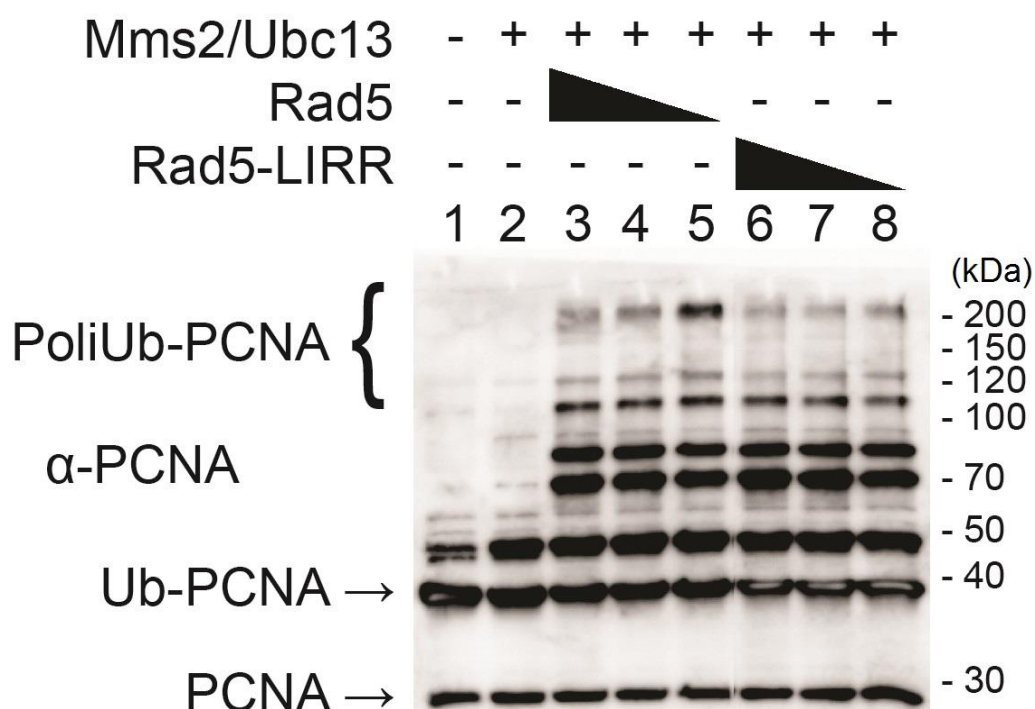
34. ábra: A HIRAN domén mutáns *rad5* törzsek UV kezelésre mutatott érzékenységének a vizsgálata. A vizsgált törzsek azonos sejtkoncentrációjú kultúráinak háromszoros hígítási sorozatait táptalajokra cseppentettük ki, kezeltük azokat UV sugárzással, majd 2 nap 30°C hőmérsékletű inkubáció után a táptalajokat beszkeneltük.

5.11. A HIRAN domén mutáns fehérjék *in vitro* biokémiai vizsgálata

In vivo túlélési kísérletekben sikerült azonosítanunk három olyan HIRAN domén mutáns törzset, amelyek érzékenységet mutatnak UV kezelésre. Ezután azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy ezek a mutáns fehérjék rendelkeznek-e *in vitro* a humán HLT F HIRAN domén mutáns fehérjéhez hasonló ubikvitin ligáz aktivitással. Ezért kitisztítottuk a három mutáns fehérjét és megvizsgáltuk az ubikvitin ligáz aktivitásukat. Azt az eredményt kaptuk, hogy a három mutáns fehérje közül egyik sem mutat olyan mértékű aktivitást, mint a vad típusú Rad5 (35. ábra). Ezért feltételezzük, hogy ez a három mutáció nem kizárólag a HIRAN domén funkcióját rontja el, hanem torzíja a Rad5 fehérje egész szerkezetét és így a többi aktivitás működését befolyásolja. Ezen feltételezésünket alátámasztja, hogy a *rad5-GR/rad5Δ* és a *rad5-LQRA/rad5Δ* törzsek ugyanolyan érzékenyek UV kezelésre, mint a *rad5Δ*.



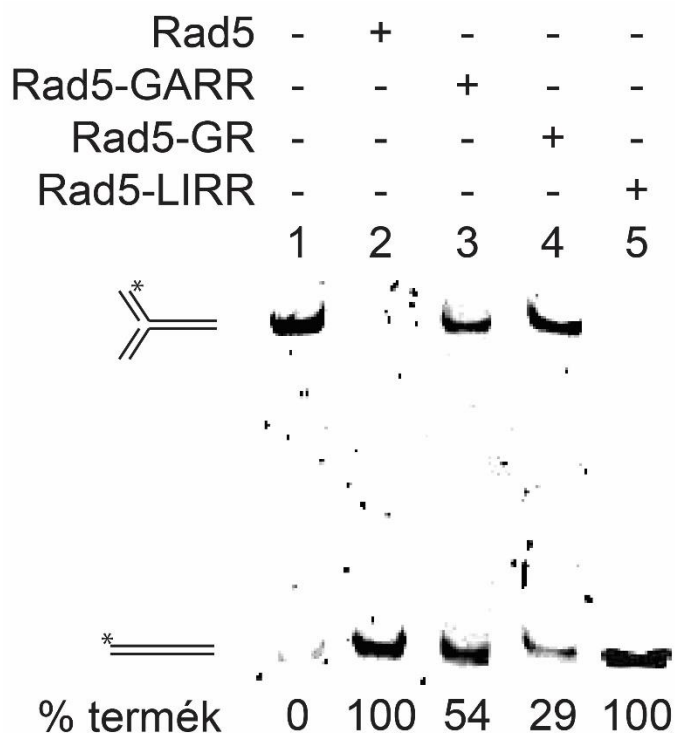
35. ábra: A Rad5-GARR, Rad5-GR és a Rad5-LQRA mutáns fehérjék aktivitásának a vizsgálata *in vitro* ubikvitin ligáz kísérletben. Összemértünk PCNA, RFC, Uba1, Rad6/Rad18, Mms2/Ubc13 és ubikvitin fehérjéket, valamint nickelt plazmid DNS szubsztátot, majd 30 perc 30°C hőmérsékletű inkubáció után hozzájuk mértük a felsorolt Rad5 mutáns fehérjéket és további 60 perc 30°C hőmérsékletű inkubáció után, a mintákat megfuttattuk SDS-PAGE gélen, majd Western blot után előhívtuk anti-PCNA ellenanyaggal. Ebben a kísérletben 10x hígabb Rad5 fehérjéssel dolgoztunk, mint a többi *in vitro* ubikvitin ligáz assayben. Ub-PCNA: monoubikvitin-PCNA, PoliUb-PCNA: poliubikvitin-PCNA. Jobb oldalon a fehérje marker alapján várható méreteket (kDa) ábrázoltuk.



36. ábra: A Rad5-LIRR aktivitásának a vizsgálata *in vitro* ubikvitin ligáz kísérletben. Összemértünk PCNA, RFC, Uba1, Rad6/Rad18, Mms2/Ubc13 és ubikvitin fehérjét, valamint nickelt plazmid DNS szubsztrátot, majd 30 perc 30°C hőmérsékletű inkubáció után hozzájuk mértük a Rad5-LIRR mutáns fehérjét és további 60 perc 30°C hőmérsékletű inkubáció után a mintákat megfuttattuk SDS-PAGE gélen, majd Western blot után előhívtuk anti-PCNA ellenanyaggal. Ub-PCNA: monoubikvitin-PCNA, PoliUb-PCNA: poliubikvitin-PCNA.

Jobb oldalon a fehérje marker alapján várható méreteket (kDa) ábrázoltuk.

Azt feltételeztük, hogy élesztőben a HIRAN domén funkciójának az elvesztése csak kis mértékű UV érzékenységet okoz, ezért úgy döntöttünk, hogy a kisebb UV érzékenységet okozó mutációk közül a Rad5-LIRR mutáns fehérjét is kitisztítjuk és megvizsgáljuk az *in vitro* ubikvitin ligáz aktivitását. Ez a mutáns fehérje a vad típusú fehérjéhez hasonló mértékű aktivitással rendelkezik (**36. ábra**), ami megegyezik a HLTF HIRAN domén mutáns fenotípusával. *In vitro* helikáz kísérletben a Rad5-LIRR a vad típusú fehérjével összemérhető aktivitást mutatott (**37. ábra**), ami azt jelenti, hogy a *rad5-LIRR* mutáció sem az ubikvitin ligáz, sem pedig a helikáz/ATPáz aktivitást nem befolyásolja. Az enyhe UV érzékenység, amit a mutáció okoz feltehetően csak a Rev1-Pol ζ kölcsönhatás gyengítése miatt lép fel. A HLTF HIRAN domén eddig ismert tulajdonságai alapján ez a mutáció nem HIRAN domén specifikus. Ebben a kísérletben a korábbi mutánsok közül a Rad5-GARR és a Rad5-GR fehérjéket is megvizsgáltuk és egyik sem rendelkezik helikáz aktivitással.



37. ábra: A Rad5-LIRR, a Rad5-GARR és a Rad5-GR mutáns fehérjék aktivitásainak vizsgálata *in vitro* helikáz kísérletben. A mintákat 60 percig inkubáltuk 30°C hőmérsékleten egy oligonukleotidokból összeállított replikációs villaszerű DNS szubsztráttal, amely egy fluoreszcein (*) jelölést hordozott. Majd natív PAGE gélen megfuttattuk a mintákat és a gélét beszkenneltük. A helikáz aktivitás számítását a Rad5 60 perces mintához (100%) és a fehérjementes mintához (0%) viszonyítottuk.

Ezen eredmények alapján lehetségesnek tartjuk, hogy élesztőben a Rad5 HIRAN domén a helikáz/ATPáz és az ubikvitin ligáz aktivitáshoz egyaránt szükséges, ellentétben a humán HLTF fehérjével. Mivel a Rad5-GARR HIRAN domén mutáns fehérje ugyan sem a helikáz, sem pedig az ubikvitin ligáz *in vitro* kísérletünkben nem mutatott aktivitást, feltételezhető azonban, hogy a Rev1-Pol ζ fehérjékkel képes kölcsönhatásra emiatt menekíti részlegesen *in vivo* a *rad5 Δ* UV érzékenységét.

6. Értékelés

A multifunkciós fehérjék több specifikus aktív centrummal rendelkeznek, de a különböző aktivitások általában szorosan együttműködnek egymással. Ahhoz, hogy ezt az együttműködést vizsgálni tudjuk, olyan mutánsokra van szükségünk, amelyek az adott fehérjének csak egy aktivitását rontják el, míg a többi funkciót sértetlenül hagyják. A disszertációm első felében specifikus helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz Rad5 mutánsok kiválasztásán dolgoztunk.

Irodalmi adatok alapján a Rad5-IA [116–118] és a Rad5-CCAA [49] mutáns fehérjék nem rendelkeznek ubikvitin ligáz aktivitással. *In vitro* kísérleteink alapján a Rad5-CCAA fehérjének helikáz aktivitása sincs, amit az *in vivo* túlélési eredményeink is alátámasztanak. Ezért a Rad5-IA mutánst választottuk ki specifikus ubikvitin ligáz mutánsnak a későbbi kísérleteinkhez. Bár a Rad5-IA mutáns fehérje *in vitro* kísérletekben a vad típusúnál gyengébb helikáz aktivitást mutatott, túlélési kísérleteinkben a *rad5-IA/rad5Δ/mms2Δ* kettős mutáns nem volt érzékenyebb a mutagén kezelésre a *RAD5/rad5Δ/mms2Δ* törzshöz képest. Ugyanezt az eredményt kaptuk *ubc13Δ* esetén is, ami azt jelenti, hogy a Rad5-IA maradék gyenge helikáz aktivitása elegendő ahhoz, hogy a fehérje kielégítően el tudja látni *in vivo* funkcióját. Megállapítható, hogy a *rad5-IA* hipomorf mutáció, mivel a *rad5-IA/rad5Δ* mutáns törzs gyengébb érzékenységet mutat, mint az *RAD5/rad5Δ/mms2Δ* vagy a *RAD5/rad5Δ/ubc13Δ*, ami megfelel azon irodalmi adatoknak [117], melyeket a Rad5-IA fehérjét a saját, teljes hosszúságú promóteréről *in situ* a genomból expresszáva nyertek. Bár más irodalmi adatok alapján a *rad5-IA* ugyanolyan érzékenységet mutat, mint az *ubc13Δ* [118,131], a mi kísérleteinkben a *rad5-IA/rad5Δ* kevésbé volt érzékeny, mint az *RAD5/rad5Δ/ubc13Δ* mutáns törzs. Ezt a különbségeket az okozhatja, hogy mi a kísérleteinkben a Rad5-IA fehérjét a saját 339 bp hosszú promóteréről expresszáltuk, míg az említett korábbi kísérletekben [118,131] csak 245 bp hosszúságú Rad5 promótert használtak egy plazmidon, melyet beugrattak a genomba, az *ura3* génbe. Az élesztő promóterek hosszának mediánja 455 bp [136]. Feltételezzük, hogy a rövidebb promóterek miatt az említett kísérletekben felhasznált élesztő törzsekben a Rad5 gyengébben expresszáldott, mint a mi kísérletünkben, és ez az alacsonyabb expresszió csökkentette le a törzs túlélését az *ubc13Δ* szintjére.

A helikáz/ATPáz mutánsok közül a *rad5-DEAA* [49,117,119] törzset választottuk ki, ugyanis a tisztított Rad5-DEAA fehérje képes volt poliubikvitinálni a monoubikvitinált-PCNA fehérjét, míg a Rad5-KA fehérjét még tisztítanunk sem sikerült nagyobb mennyiségben. Jelenlegi ismereteink szerint a PCNA poliubikvitinálása nem mehetne végbe a

Rad5-Ubc13 kölcsönhatás nélkül, bár egy korábbi élesztő két-hibrid kísérletben, nem tudtak kimutatni kölcsönhatást a Rad5-DEAA és az Ubc13 fehérjék között [117]. Ugyanebben a közleményben viszont igazolták, hogy a Rad5-DEAA és az Ubc13 fúziója képes menekíteni a *rad5-DEAA* mutáns törzs érzékenységét [117]. Egy későbbi élesztő két-hibrid kísérletben az Ubc13 magasabb expressziós szintje esetén viszont mégis sikerült kimutatni a Rad5-DEAA és az Ubc13 kölcsönhatását [119]. A mi *in vitro* ubikvitin ligáz kísérletünkben hasonló eredményt kaptunk a Rad5-DEAA fehérjével, mint ez utóbbi közlemény azon kísérletében, ahol szabad ubikvitin láncokat készítettek PCNA nélkül [119]. A kísérleteinkben a Rad5-DEAA képes volt hatékonyan poliubikvitinálni a monoubikvitin-PCNA fehérjét, bár ez az aktivitás nem érte el a vad típusú Rad5 szintjét. Ugyanezt az eredményt kaptuk a PCNA *in vivo* poliubikvitinálásának a vizsgálata során MMS kezelést követően. Úgy tűnik, hogy a Rad5-DEAA mutáció kismértékben csökkenti a Rad5 ubikvitin ligáz aktivitását, de nem rontja el teljesen. Ezt megerősíti az az eredményünk, hogy a *rad5-IA* hipomorf mutáció képes növelni a *rad5-DEAA/rad5Δ* mutáns törzs érzékenységét, ugyanis a *rad5-IA/DEAA/rad5Δ* nagyobb érzékenységet mutat UV és MMS kezelésre, mint a *rad5-DEAA/rad5Δ*. Ezért eredményeink alapján, az eddig megjelent közleményekkel [117,119] ellentétben, úgy gondoljuk, hogy a Rad5-DEAA helikáz/ATPáz mutáns alkalmas a további kísérleteinkhez.

A fentiekben részletezett eredményeink alapján a *rad5-DEAA/rad5Δ* helikáz/ATPáz és a *rad5-IA/rad5Δ* ubikvitin ligáz mutáns törzseket választottuk ki további kísérleteinkhez. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a helikáz/ATPáz és az ubikvitin ligáz aktivitás kapcsolatát a Rad5 fehérjében, kettős mutáns törzset készítettünk, melynek az érzékenységét túlélési kísérletekben vizsgáltuk, az egyszeres mutánsokkal párhuzamosan. Eredményeink alapján a helikáz/ATPáz és az ubikvitin ligáz aktivitás egymástól független szereppel rendelkezik. Ugyanezt az eredményt kaptuk *rad5-DEAA/rad5Δ/mms2Δ* és a *rad5-DEAA/rad5Δ/ubc13Δ* törzsekkel is. Bár eredményeink azt bizonyítják, hogy a Rad5 két aktivitása egymástól független folyamatokban vesz részt, nem zárhatjuk ki a két funkció együttműködésének a lehetőségét. Hasonló következtetésre jutottak egy korábbi cikkben is, ahol a *rad5-QD* helikáz/ATPáz és *mms2Δ* kettős mutáns nagyobb érzékenységet mutatott MMS kezelésre, mint az egyszeres mutáns törzsek [119]. Ugyanezt az eredményt kapták korábban mások is UV [115] és adozelezin kezelésre is [116].

	BY4741/W303	BY4741 törzs aminosavával meg egyező aminosavat tartalmazó törzsek száma	W303 törzs aminosavával meg egyező aminosavat tartalmazó törzsek száma	Az adott helyen deléciót tartalmazó törzsek száma
Rad2	A352T	20	17	4
	D366E	34	3	4
Pso2/Snm1	S23G	27	10	5
Msh6	I549S	33	7	2
	M895I	30	10	1
Msh3	N188S	34	3	3
	Q574R	36	3	1
Ubp11	L9I	33	9	2
	S152T	38	4	2
	S252F	38	4	1
	S419T	33	10	1
	A424T	41	2	1
Tel2	Q14R	38	2	2
	S158N	21	19	2
	F199S	23	18	1
	S335G	36	5	0
	T508A	25	16	0
	N519S	10	32	0
	S684P	31	9	1

38. ábra: Azon DNS-hibajavításban részt vevő fehérjék, amelyeknek a szekvenciája eltér a BY4741 és a W303 törzsekben. Ezeket a fehérje szekvencia különbségeket vizsgáltuk meg más élesztő törzsekben is.

Az az eredményünk, hogy a Rad5 helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz aktivitásai egymástól független folyamatokban vesznek részt az MMS és az UV indukálta DNS-károsodások javításában ellentmond két korábbi közlemény megállapításainak [117,118]. Ezen cikkekben a helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz kettős mutáns törzs minden esetben ugyanolyan érzékenységet mutatott, mint a helikáz/ATPáz egyszeres mutáns MMS [117,118] és UV kezelésre is [117]. A korábbi cikkben arra a következtetésre jutottak, hogy a Rad5 helikáz/ATPáz mutációját hordozó törzs érzékenységét az okozza, hogy ez a mutáció elrontja a fehérje szerkezetét, így az nem képes kölcsönhatni az Ubc13 fehérjével [117]. Ezért a helikáz/ATPáz aktivitás gyakorlatilag elhanyagolható a DNS-hibajavítás folyamatában [117]. A későbbi cikkben pedig arra a következtetésre jutnak, hogy az ubikvitin ligáz aktivitás minden esetben együttműködik a helikáz/ATPáz aktivitással [118]. Úgy gondoljuk, hogy az eredményeink közötti ellentmondás oka az lehet, hogy különböző élesztő törzseket

használtunk a kísérleteinkhez. Ebben a két cikkben W303 törzset használtak [117,118], míg mi BY4741 élesztőt használtunk. Azon két korábbi cikk egyikében, ahol a miénkhez hasonló eredményeket kaptak szintén BY4741 törzset használtak [116], a másik cikkben pedig DF5 törzset [115]. A BY4741 és a W303 törzsek között jelentős a genetikai háttérbeli különbség, számos a DNS-hibajavításban szerepet játszó fehérje szekvenciája tartalmaz néhány aminosavnyi különbséget [137]. Ezeket az eltérő szekvenciájú DNS-hibajavító fehérjéket összegyűjtöttük, és a különbségeket megvizsgáltuk más *Saccharomyces cerevisiae* élesztő törzsekben is (**38. ábra**) [138,139]. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy ezen szekvencia eltérések miatt az érintett fehérjék egy részében módosul az adott fehérjék aktivitása. Feltételezzük, hogy hasonló különbségek lehetnek a BY4741 és a W303 törzsek génjeinek promótereinek DNS szekvenciájában is, ami hatással lehet a fehérjék transzkripciójára és így a fehérjék expressziójának a mértékére is. Tehát lehetséges, hogy a BY4741 és a W303 törzsek fehérjéi, így a DNS-hibajavításban résztvevő fehérjéi jelentősen eltérnek egymástól aktivitásukban és koncentrációjukban egyaránt, ami többek között hatással lehet a Rad5 helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz aktivitásainak kapcsolatára is. Elméletileg ha W303 törzsben ezen okokból kifolyólag a Rad5 ubikvitin ligáz aktivitásának nincs olyan szerepe, amit a helikáz/ATPáz funkciótól függetlenül végez, csak olyan folyamatokban van szerepe, amikben a helikáz/ATPáz aktivitással együtt vesz részt, az megmagyarázná azokat az eredményeket, amik ellentmondásosak a mi eredményeinkkel [117,118].

Miután bebizonyítottuk, hogy a Rad5 helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz aktivitásai egymástól független szereppel rendelkeznek, a Rad5 további funkcióit terveztük megvizsgálni. A *rad5-IA/DEAA/rad5Δ* kettős mutáns törzs ugyanis kevésbé volt érzékeny, mint a *rad5Δ*, ami azzal magyarázható, hogy a Rad5 más aktivitással is rendelkezik. Ugyanakkor ez a harmadik aktivitás is a RAD6 hibajavítási útvonalban vesz részt, ahogy a Rad5 minden aktivitása, mivel a *rad5* nem növeli a *rad6* mutáns törzs érzékenységét [38]. Ezért feltételeztük, hogy a Rad5 új aktivitása valamelyik TLS polimerázzal működhet együtt, ahogy ez korábbi adatok alapján sejthető [110–113]. Ezért megvizsgáltuk a *rad5* mutáns törzsek fenotípusát mutagenézis kísérletekben is.

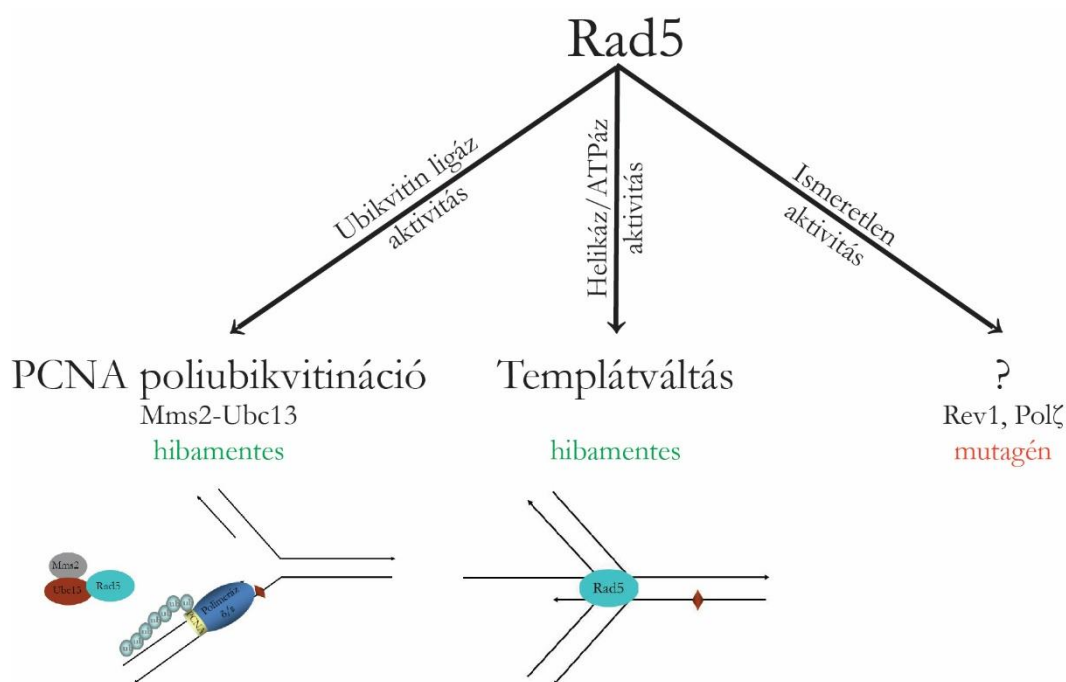
Spontán mutagenézis kísérletben vizsgáltuk a *rad5* mutáns törzseket, hogy milyen gyakorisággal keletkezik bennük egy kanavanin rezisztenciát okozó mutáció a *CAN1* génben. A *rad5-IA* ubikvitin ligáz [111,117] és az *mms2* [140,141] mutáns törzsekről ismert, hogy bennük magasabb a *trp1-289* mutáció reverzióját eredményező spontán mutációk gyakorisága, mint a vad típusú törzsben, mivel a PCNA poliubikvitinálása olyan folyamatban játszik szerepet, ami nem vezet mutációk kialakulásához. A *rad5-DEAA* helikáz/ATPáz

mutáció szintén emeli a *trp1-289* mutáció reverziójának a gyakoriságát a vad típusú törzshöz képest spontán mutagenesis kísérletekben [117], ugyanis a villavisszafordítás folyamata sem eredményez mutációkat. A *rad5-IA/rad5Δ* és a *rad5-DEAA/rad5Δ* egyszeres mutáns törzsekkel mi is hasonló eredményt kaptunk. Kísérleteinkben a *CAN1* spontán mutációinak a gyakorisága nagyobb volt ezekben a törzsekben, mint a vad típusúban. A *rad5-IA/DEAA/rad5Δ* kettős mutáns esetén magasabb spontán mutációs rátát kaptunk, mint az egyszeres mutáns törzsekkel, ami megerősíti azt a korábbi eredményünket, hogy a Rad5 ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz aktivitása egymástól függetlenül működik. Ez az eredményünk látszólag ellentmond egy korábbi közleménynek, ahol a kettős mutáns spontán mutagenesis rátája hasonló volt, mint az egyszeres mutánsoké [117]. Ez az ellentmondás abból a különbségből eredhet, hogy ők *trp1-289* alapú reverz mutagenesis kísérletet használtak, ahol csak egy adott T>C mutációt tesztelnek [142], a mi kanavanin rezisztencián alapuló kísérleteinkben pedig minden típusú mutációt vizsgáltunk, ami képes inaktiválni a Can1 fehérjét. A *rad5Δ* törzs esetén kísérleteinkben a spontán mutációs ráta magasabb volt, mint a vad típusú törzsben, ami megfelel az irodalomban leírt kanavanin rezisztencia alapú vizsgálatoknak [31,143] és a reverz mutagenesis módszerét alkalmazva is hasonló eredményekre jutottak [111,117]. A *rad5Δ* törzs esetében alacsonyabb spontán mutagenesis rátát kaptunk, mint a *rad5-IA/DEAA/rad5Δ* ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz kettős mutáns törzsszel. Feltételezésünk szerint , ennek az az oka, hogy a Rad5 egy harmadik, eddig ismeretlen aktivitása valamilyen mutációkat generáló folyamatban vesz részt. Ismert, hogy a *rev3* mutáns törzsnek alacsonyabb a reverz mutagenesis rátája, mint a vad típusúnak [140,141]. Ezek miatt azt feltételeztük, hogy a Rad5 harmadik aktivitása a mutációkat generáló TLS polimerázokkal való együttműködést érinti. Hipotézisünk igazolása érdekében megvizsgáltuk az UV-indukált mutációk típusainak az arányait is a *rad5* mutáns törzsekben teljes genom szekvenálással.

A teljes genom szekvenálással azt az eredményt kaptuk, hogy a *rad5-IA/DEAA/rad5Δ* ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz kettős mutáns törzsben UV sugárzás hatására megemelkedett a C>G és a T>C mutációk gyakorisága a vad típusúhoz képest. Ezeket a mutációkat jellemzően a Rev1 és a Polζ TLS polimerázok állítják elő [35,113]. A *rad5Δ* törzsben viszont ennek a kétféle mutációnak kisebb az aránya, mint a *rad5-IA/DEAA/rad5Δ* kettős mutánsban vagy a vad típusú törzsekben, aminek az lehet az oka, hogy a Rad5 harmadik aktivitása a Rev1 és a Polζ TLS polimerázokkal közös funkcióban vesz részt. Túlélési kísérleteink alapján a Rad5 harmadik aktivitása minden esetben a Rev1 és a Polζ TLS polimerázokkal működik együtt.

Miután azonosítottuk a Rad5 három független aktivitását, azt vizsgáltuk, hogy a Rad5 HIRAN doménje mely aktivitásokhoz szükséges. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy Rad5 humán homológjának, a HLTF fehérjének a HIRAN doménje elengedhetetlen a hatékony helikáz aktivitáshoz [58,65], ugyanis a DNS 3' végéhez kötődik a vezető szálon [59], így aktiválja a replikációs villa visszafordítását. Azonban HIRAN domén DNS kötő aktivitása nem szükséges a monoubikvitin-PCNA poliubikvitinálásához [58,65]. Humán szövetkultúrákkal végzett *in vivo* túlélési kísérletek alapján a HIRAN domén mutáns sejtek ugyanolyan érzékenyek UV kezelésre, mint a HLTF csendesített sejtek, azonban *in vitro* ubikvitin ligáz aktivitással rendelkezik ez a mutáns fehérje, míg helikáz aktivitása nincs [58].

Többszörös illesztés alapján elkészítettük az EE206,207AA mutációt az élesztő Rad5 HIRAN doménjében, ami az NN90,91AA HLTF HIRAN domén mutációnak megfelelő helyen található. Azonban kísérleteinkben a *rad5-EEAA/rad5Δ* törzs nem mutatott UV érzékenységet. Ezért új HIRAN domén mutációkat hoztunk létre az EE206,207AA mutációtól N- és C-terminális irányban egyaránt. Ezek közül az új mutánsok közül a Rad5-GR és a Rad5-LQRA nem mutatott sem helikáz, sem ubikvitin ligáz aktivitást és ezek a mutáns fehérjék nem is voltak képesek menekíteni a *rad5Δ* mutáns törzs UV érzékenységét. Feltehetően ez a két független mutáció tönkretesz a Rad5 teljes szerkezetét, így az elveszíti minden aktivitását. A Rad5-GARR fehérje ugyan képes menekíteni a *rad5Δ* mutáns törzs UV érzékenységi fenotípusát, azonban ennek a fehérjének sincs se *in vitro* helikáz, se pedig ubikvitin ligáz aktivitása. Ezért feltételezzük, hogy élesztőben a HIRAN domén nem csak a helikáz aktivitáshoz szükséges, hanem az ubikvitin ligáz aktivitáshoz is, viszont a Rad5 és a Rev1-Pol ζ fehérjék kölcsönhatása a HIRAN doméntől független. Hasonló következtetésre jutottak egy 2021-es közleményben, ahol R187E, R229E, R241E (*rad5-3RE*) hármas szubsztitúciót hoztak létre a HIRAN doménben [127]. Ez a hármas mutáns fehérje nem rendelkezik *in vitro* helikáz aktivitással, nem képes MMS kezelést követően *in vivo* poliubikvitinálni a PCNA-t, valamint élesztő-két-hibrid kísérletben nem tud kölcsönhatni a PCNA-vel. Viszont az élesztő-két-hibrid kísérletek alapján a Rad5-3RE kölcsönhat a Rev1 fehérjével, és a *rad5-3RE* HIRAN domén mutáns MMS kezelésre érzékenyebb volt, mint a *rad5-DEAA*, de érzékenysége nem érte el a *rad5Δ* törzsét [127]. Ez utóbbi MMS érzékenységi fenotípus hasonló ahhoz, amit mi kaptunk a *rad5-IA/DEAA/rad5Δ* ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz kettős mutáns törzzsel.



39. ábra: A Rad5 funkcióinak modellje. A Rad5 három független aktivitással rendelkezik: az ubikvitin ligáz aktivitása a monoubikvitin-PCNA poliubikvitinálásáért felelős, a helikáz/ATPáz aktivitása pedig a replikációs villa visszafordítására képes. A Rad5 eddig ismeretlen, harmadik aktivitása minden esetben együttműködik a Rev1 és a Polζ TLS polimerázokkal, emiatt ez egy mutagén folyamat.

Modellünkben a Rad5 három független funkcióval rendelkezik (**39. ábra**) [144]. Az egyik ezek közül a villavisszafordítás, melyben a Rad5 helikáz/ATPáz aktivitása vesz részt. Ez a folyamat hibamentes, akárcsak a Rad5 másik funkciója, a monoubikvitin-PCNA poliubikvitinálása, ugyanis az *mms2* mutáns törzsben a spontán és az UV-indukált mutagenesis értéke nagyobb, mint a vad típusú törzsben [37]. A poliubikvitin-PCNA pontos szerepe ma még ismeretlen, lehetséges, hogy kölcsönható felszínként funkcionál az ubikvitin- és PCNA-kötő TLS polimerázok számára, mint amilyen a Rev1 vagy a Polη [145]. A poliubikvitin láncot az Slx4 fehérje is kötheti, ugyanis kimutatták, hogy az *slx4Δ* nem növeli az *mms2Δ* érzékenységét az *slx4Δ/mms2Δ* kettős mutáns törzsben, ami azt jelenti, hogy az Slx4 minden esetben együttműködik az Mms2 fehérjével [146]. Ko-immunprecipitációs kísérletek alapján az Slx4 olyan nukleázokkal képes fizikailag kölcsönhatásba lépni, mint az Slx1 [147], a Rad1-Rad10 [146] és a Mus81-Eme1 (emberben) [148]. Továbbá sem az *slx1* [149], sem a *rad1* [146] nem növeli az *slx4* érzékenységét MMS túlélési kísérletekben, ami azt jelenti, hogy az Slx1 és a Rad1 közös funkciót lát el az Slx4 fehérjével ebben a hibajavítási folyamatban. Ezek alapján feltételezhető, hogy a poliubikvitin-PCNA aktiválhatja az elakadt replikációs villa endonukleolitikus hasítását, ami a törés indukálta replikáció

(Break-Induced Replication - BIR) folyamatával áll helyre. Így elképzelhető, hogy a Rad5 ubikvitin ligáz aktivitása egy rekombinációs folyamatot indít el, ahogy azt korábban már állították [119]. A Rad5 harmadik aktivitása a másik két aktivitásától függetlenül működik, és minden esetben együttműködik a Rev1 és Pol ζ TLS polimerázokkal, ezért ez a funkció mutagén. Bár a Rad5 kölcsönhatása a Rev1 és Pol ζ fehérjékkel eddig is ismert volt [110,111,113], a mi kísérleteink azt bizonyítják, hogy a Rad5 fehérje ezen kívül csak a helikáz/ATPáz és az ubikvitin ligáz aktivitásokkal rendelkezik, más funkciója nincs.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Haracska Lajosnak**, hogy a doktori fokozat megszerzéséhez szükséges munkát a kutatócsoportjában elvégezhettem, illetve azt, hogy hasznos tanácsaival segítette a munkámat.

Köszönöm a segítséget **Dr. Unk Ildikónak, Pintér Lajosnak, Dr. Bajusz Izabellának, Dr. Balogh Dávidnak, Dr. Györfy Zsuzsannának, Dr. Bálint Évának, Dr. Burkovics Péternek, Dr. Mórocz Mónika Krisztinának és Dr. Kiss Ernőnek** a kísérletekben nyújtott segítségéért és tanácsaiért.

Köszönöm a segítséget **Kovács Katalin, Minorits Szilvia, Bozó-Tóth Anikó, Nótári Péterné Icu, Németh Anita és Fekete Ildikó** jelenlegi és korábbi szakasszisztenseinknek.

Szeretnék köszönetet mondani **Ádámné Tick Gabriellának**, aki az angol nyelvű közlemények lektorálásában és a disszertációm írásában nyújtott segítséget.

Köszönettel tartozom a **Mutagenesis és Karcinogenesis Csoport** azon jelenlegi és korábbi tagjainak, akik segítették a munkámat.

Köszönöm a segítséget **Dr. Pál Csabának** és a Kísérleti Evolúcióbiológiai Csoport tagjainak, hogy használhattam a műszereiket az élesztő növekedési görbék elkészítéséhez.

Valamint köszönetet szeretnék mondani **Dr. Erdélyi Miklósnak**, az SZBK Genetikai Intézetének igazgatójának és **Prof. Dr. Raskó István** korábbi intézet igazgatónak, hogy intézetük tagja lehettem.

Köszönettel tartozom **Dr. Sinka Ritának** és **Dr. Pirty Melindának**, hogy elvállalták a disszertációm házivédés soráni bírálatát.

Szeretnék köszönetet mondani egyetemi tanárainknak, különösen **Prof. Dr. Boros Imre Miklósnak** és **Prof. Dr. Maróy Péternek**, hogy előadásaik során megismertettek a molekuláris biológia és a genetika világával.

Köszönöm középiskolai biológia tanáromnak, **Bán Sándornak**, hogy segített a biológus szakma választásában.

Valamint köszönöm **családomnak** és **barátaimnak**, hogy támogattak és segítettek az utóbbi években.

8. Irodalomjegyzék

- [1] J. Cadet, E. Sage, T. Douki, Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 571 (2005) 3–17. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.09.012.
- [2] D.T. Beranek, Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 231 (1990) 11–30. doi:10.1016/0027-5107(90)90173-2.
- [3] C. Lundin, M. North, K. Erixon, K. Walters, D. Jenssen, A.S.H. Goldman, T. Helleday, Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks., *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 3799–811. doi:10.1093/nar/gki681.
- [4] K. Kubo, H. Ide, S.S. Wallace, Y.W. Kow, A novel sensitive and specific assay for abasic sites, the most commonly produced DNA lesion, *Biochemistry.* 31 (1992) 3703–3708. doi:10.1021/bi00129a020.
- [5] H.E. Krokan, R. Standal, G. Slupphaug, DNA glycosylases in the base excision repair of DNA, *Biochem. J.* 325 (1997) 1–16. <http://www.biochemj.org/content/325/1/1.full-text.pdf> (accessed April 12, 2017).
- [6] D.K. Srivastava, B.J. Berg, R. Prasad, J.T. Molina, W.A. Beard, A.E. Tomkinson, S.H. Wilson, Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 21203–9. doi:10.1074/JBC.273.33.21203.
- [7] D. Córdoba-Cañero, T. Morales-Ruiz, T. Roldán-Arjona, R.R. Ariza, Single-nucleotide and long-patch base excision repair of DNA damage in plants., *Plant J.* 60 (2009) 716–28. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03994.x.
- [8] J.T. Reardon, T. Bessho, H. Chuan Kung, P.H. Bolton, A. Sancar, In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: Possible explanation for neurodegeneration in Xeroderma pigmentosum patients, *Neurobiology.* 94 (1997) 9463–9468. <http://www.pnas.org/content/94/17/9463.full.pdf> (accessed April 13, 2017).
- [9] T.A. Kunkel, D.A. Erie, DNA MISMATCH REPAIR, *Annu. Rev. Biochem.* 74 (2005) 681–710. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133243.
- [10] S. Boiteux, S. Jinks-Robertson, DNA repair mechanisms and the bypass of DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*., *Genetics.* 193 (2013) 1025–64. doi:10.1534/genetics.112.145219.
- [11] P. Pfeiffer, W. Goedecke, G. Obe, Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations, *Mutagenesis.* 15 (2000) 289–302. doi:10.1093/mutage/15.4.289.
- [12] J.E. Haber, Partners and pathways: repairing a double-strand break, *Trends Genet.* 16 (2000) 259–264. doi:10.1016/S0168-9525(00)02022-9.

- [13] S. Burma, B.P.C. Chen, D.J. Chen, Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity, *DNA Repair (Amst)*. 5 (2006) 1042–1048. doi:10.1016/j.dnarep.2006.05.026.
- [14] A.J. Davis, D.J. Chen, DNA double strand break repair via non-homologous end-joining., *Transl. Cancer Res.* 2 (2013) 130–143. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02.
- [15] M. Clerici, D. Mantiero, G. Lucchini, M.P. Longhese, The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein promotes resection and bridging of double strand break ends., *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 38631–8. doi:10.1074/jbc.M508339200.
- [16] M.L. Nicolette, K. Lee, Z. Guo, M. Rani, J.M. Chow, S.E. Lee, T.T. Paull, Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 promote 5' strand resection of DNA double-strand breaks., *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17 (2010) 1478–85. doi:10.1038/nsmb.1957.
- [17] E. Cannavo, P. Cejka, Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks, *Nature*. 514 (2014) 122–125. doi:10.1038/nature13771.
- [18] A. Shinohara, H. Ogawa, T. Ogawa, Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein, *Cell*. 69 (1992) 457–470. doi:10.1016/0092-8674(92)90447-K.
- [19] P. Baumann, F.E. Benson, S.C. West, Human Rad51 Protein Promotes ATP-Dependent Homologous Pairing and Strand Transfer Reactions In Vitro, *Cell*. 87 (1996) 757–766. doi:10.1016/S0092-8674(00)81394-X.
- [20] J.H. New, T. Sugiyama, E. Zaitseva, S.C. Kowalczykowski, J.H. New, T. Sugiyama, E. Zaitseva, Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A, *Nature*. 391 (1998) 407–410. doi:10.1038/34950.
- [21] S.C. Kowalczykowski, D.A. Dixon, A.K. Eggleston, S.D. Lauder, W.M. Rehrauer, Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*., *Microbiol. Rev.* 58 (1994) 401–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7968921> (accessed April 28, 2017).
- [22] L.S. Symington, Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair, *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 66 (2002) 630–670, table of contents. doi:10.1128/mmbr.66.4.630-670.2002.
- [23] X. Li, W.-D. Heyer, Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance, *Cell Res.* 18 (2008) 99–113. doi:10.1038/cr.2008.1.
- [24] J. San Filippo, P. Sung, H. Klein, Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination, *Annu. Rev. Biochem.* 77 (2008) 229–257. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255.
- [25] S. Jentsch, J.P. McGrath, A. Varshavsky, The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, *Nature*. 329 (1987) 131–134. doi:10.1038/329131a0.

- [26] V. Bailly, S. Lauder, S. Prakash, L. Prakash, Yeast DNA Repair Proteins Rad6 and Rad18 Form a Heterodimer That Has Ubiquitin Conjugating, DNA Binding, and ATP Hydrolytic Activities, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 23360–23365. doi:10.1074/jbc.272.37.23360.
- [27] C. Hoege, B. Pfander, G.-L. Moldovan, G. Pyrowolakis, S. Jentsch, RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO, *Nature*. 419 (2002) 135–141. doi:10.1038/nature00991.
- [28] P. Stelter, H.D. Ulrich, Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation., *Nature*. 425 (2003) 188–91. doi:10.1038/nature01965.
- [29] C.W. Lawrence, R. Christensen, Uv Mutagenesis in Radiation-Sensitive Strains of Yeast, *Genetics*. 82 (1976) 207–232. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1213453/> (accessed November 25, 2014).
- [30] J.R. Nelson, C.W. Lawrence, D.C. Hinkle, Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta, *Science*. 272 (1996) 1646–1649. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8658138> (accessed October 26, 2010).
- [31] B. Liefshitz, R. Steinlauf, A. Friedl, F. Eckardt-Schupp, M. Kupiec, Genetic interactions between mutants of the “error-prone” repair group of *Saccharomyces cerevisiae* and their effect on recombination and mutagenesis, *Mutat. Res. - DNA Repair*. 407 (1998) 135–145. doi:10.1016/S0921-8777(97)00070-0.
- [32] J.R. Nelson, C.W. Lawrence, D.C. Hinkle, Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein, *Nature*. 382 (1996) 729–731. doi:10.1038/382729a0.
- [33] S. Prakash, R.E. Johnson, L. Prakash, Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function, *Annu. Rev. Biochem.* 74 (2005) 317–353. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133250.
- [34] L. Haracska, I. Unk, R.E. Johnson, E. Johansson, P.M.J. Burgers, S. Prakash, L. Prakash, Roles of yeast DNA polymerases δ and ζ and of Rev1 in the bypass of abasic sites, *Genes Dev.* 15 (2001) 945–954. doi:10.1101/gad.882301.
- [35] J.G. Jansen, P. Langerak, A. Tsaalbi-Shtylik, P. van den Berk, H. Jacobs, N. De Wind, Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice., *J. Exp. Med.* 203 (2006) 319–23. doi:10.1084/jem.20052227.
- [36] R.E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, *Poleta, Science*. 283 (1999) 1001–1004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9974380> (accessed October 26, 2010).
- [37] S. Broomfield, B.L. Chow, W. Xiao, MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 5678–5683. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC20438/> (accessed February 25, 2015).

- [38] R.E. Johnson, S.T. Henderson, T.D. Petes, S. Prakash, M. Bankmann, L. Prakash, *Saccharomyces cerevisiae* RAD5-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome, *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 3807–3818. doi:10.1128/MCB.12.9.3807.
- [39] R.M. Hofmann, C.M. Pickart, Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair, *Cell*. 96 (1999) 645–653. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10089880> (accessed October 26, 2010).
- [40] M.G. Bomar, S. D'Souza, M. Bienko, I. Dikic, G.C. Walker, P. Zhou, Unconventional Ubiquitin Recognition by the Ubiquitin-Binding Motif within the Y-Family DNA Polymerases ψ and Rev1, *Mol. Cell.* 37 (2010) 408–417. doi:10.1016/j.molcel.2009.12.038.
- [41] M. Bienko, C.M. Green, N. Crosetto, F. Rudolf, G. Zapart, B. Coull, P. Kannouche, G. Wider, M. Peter, A.R. Lehmann, K. Hofmann, I. Dikic, Ubiquitin-Binding Domains in Y-Family Polymerases Regulate Translesion Synthesis, *Science* (80-.). 310 (2005) 1821–1824. doi:10.1126/science.1120615.
- [42] H.D. Ulrich, S. Jentsch, Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair, *EMBO J.* 19 (2000) 3388–3397. doi:10.1093/emboj/19.13.3388.
- [43] C.M. Carlile, C.M. Pickart, M.J. Matunis, R.E. Cohen, Synthesis of Free and Proliferating Cell Nuclear Antigen-bound Polyubiquitin Chains by the RING E3 Ubiquitin Ligase Rad5, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 29326–29334. doi:10.1074/jbc.M109.043885.
- [44] J.L. Parker, H.D. Ulrich, Mechanistic analysis of PCNA poly-ubiquitylation by the ubiquitin protein ligases Rad18 and Rad5, *EMBO J.* 28 (2009) 3657–3666. doi:10.1038/emboj.2009.303.
- [45] K.L. Borden, P.S. Freemont, The RING finger domain: a recent example of a sequence—structure family, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6 (1996) 395–401. doi:10.1016/S0959-440X(96)80060-1.
- [46] C.A.. Joazeiro, A.M. Weissman, RING Finger Proteins: Mediators of Ubiquitin Ligase Activity, *Cell*. 102 (2000) 549–552. doi:10.1016/S0092-8674(00)00077-5.
- [47] E. Richmond, C.L. Peterson, Functional Analysis of the DNA-Stimulated ATPase Domain of Yeast SWI2/SNF2, *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 3685–3692. doi:10.1093/nar/24.19.3685.
- [48] M.J. Pazin, J.T. Kadonaga, A.. Imbalzano, G.. Schnitzler, R.. Kingston, R.. Young, J. Du, B. Laurent, R.. Kornberg, SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions?, *Cell*. 88 (1997) 737–40. doi:10.1016/S0092-8674(00)81918-2.

- [49] V. Gangavarapu, L. Haracska, I. Unk, R.E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, Mms2-Ubc13-dependent and -independent roles of Rad5 ubiquitin ligase in postreplication repair and translesion DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 7783–7790. doi:10.1128/MCB.01260-06.
- [50] A. Blastyák, L. Pintér, I. Unk, L. Prakash, S. Prakash, L. Haracska, Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression, *Mol. Cell.* 28 (2007) 167–175. doi:10.1016/j.molcel.2007.07.030.
- [51] X.-F. Zheng, R. Prakash, D. Saro, S. Longerich, H. Niu, P. Sung, Processing of DNA structures via DNA unwinding and branch migration by the *S. cerevisiae* Mph1 protein, *DNA Repair (Amst)*. 10 (2011) 1034–1043. doi:10.1016/j.dnarep.2011.08.002.
- [52] D.L. Dae, E. Ferrari, S. Longerich, X. Zheng, X. Xue, D. Branzei, P. Sung, K. Myung, Rad5-dependent DNA repair functions of the *Saccharomyces cerevisiae* FANCM protein homolog Mph1., *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 26563–75. doi:10.1074/jbc.M112.369918.
- [53] I. Unk, I. Hajdú, A. Blastyák, L. Haracska, Role of yeast Rad5 and its human orthologs, HLTF and SHPRH in DNA damage tolerance, *DNA Repair (Amst)*. 9 (2010) 257–267. doi:10.1016/j.dnarep.2009.12.013.
- [54] P. Burkovics, M. Sebesta, D. Balogh, L. Haracska, L. Krejci, Strand invasion by HLTF as a mechanism for template switch in fork rescue, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 1711–1720. doi:10.1093/nar/gkt1040.
- [55] M. Sebesta, P. Burkovics, S. Juhasz, S. Zhang, J.E. Szabo, M.Y.W.T. Lee, L. Haracska, L. Krejci, Role of PCNA and TLS polymerases in D-loop extension during homologous recombination in humans, *DNA Repair (Amst)*. 12 (2013) 691–698. doi:10.1016/j.dnarep.2013.05.001.
- [56] A. Mannuss, S. Dukowic-Schulze, S. Suer, F. Hartung, M. Pacher, H. Puchta, RAD5A, RECQ4A, and MUS81 have specific functions in homologous recombination and define different pathways of DNA repair in *Arabidopsis thaliana*., *Plant Cell.* 22 (2010) 3318–30. doi:10.1105/tpc.110.078568.
- [57] L.M. Iyer, M. Babu, L. Aravind, The HIRAN Domain and Recruitment of Chromatin Remodeling and Repair activities to Damaged DNA, *Cell Cycle.* 5 (2006) 775–782. doi:10.4161/cc.5.7.2629.
- [58] Y.J. Achar, D. Balogh, D. Neculai, S. Juhasz, M. Morocz, H. Gali, S. Dhe-Paganon, Č. Venclovas, L. Haracska, Human HLTF mediates postreplication repair by its HIRAN domain-dependent replication fork remodelling., *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 10277–91. doi:10.1093/nar/gkv896.
- [59] A.C. Kile, D.A. Chavez, J. Bacal, S. Eldirany, D.M. Korzhnev, I. Bezsonova, B.F. Eichman, K.A. Cimprich, HLTF's Ancient HIRAN Domain Binds 3' DNA Ends to Drive Replication Fork Reversal., *Mol. Cell.* 58 (2015) 1090–100. doi:10.1016/j.molcel.2015.05.013.

- [60] A. Hishiki, K. Hara, Y. Ikegaya, H. Yokoyama, T. Shimizu, M. Sato, H. Hashimoto, Structure of a Novel DNA-binding Domain of Helicase-like Transcription Factor (HLTF) and Its Functional Implication in DNA Damage Tolerance., *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 13215–23. doi:10.1074/jbc.M115.643643.
- [61] Q. Fan, X. Xu, X. Zhao, Q. Wang, W. Xiao, Y. Guo, Y. V. Fu, Rad5 coordinates translesion DNA synthesis pathway by recognizing specific DNA structures in *saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* (2018) 1–11. doi:10.1007/s00294-018-0807-y.
- [62] S. Shin, K. Hyun, J. Kim, S. Hohng, ATP Binding to Rad5 Initiates Replication Fork Reversal by Inducing the Unwinding of the Leading Arm and the Formation of the Holliday Junction., *Cell Rep.* 23 (2018) 1831–1839. doi:10.1016/j.celrep.2018.04.029.
- [63] A. Hishiki, M. Sato, H. Hashimoto, Structure of the HLTF HIRAN domain and its functional implications in regression of a stalled replication fork, *Acta Crystallogr. Sect. D, Struct. Biol.* 76 (2020) 729–735. doi:10.1107/S2059798320008074.
- [64] D.A. Chavez, B.H. Greer, B.F. Eichman, The HIRAN domain of helicase-like transcription factor positions the DNA translocase motor to drive efficient DNA fork regression., *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 8484–8494. doi:10.1074/jbc.RA118.002905.
- [65] G. Bai, C. Kermi, H. Stoy, C.J. Schiltz, J. Bacal, A.M. Zaino, M.K. Hadden, B.F. Eichman, M. Lopes, K.A. Cimprich, HLTF Promotes Fork Reversal, Limiting Replication Stress Resistance and Preventing Multiple Mechanisms of Unrestrained DNA Synthesis, *Mol. Cell.* 78 (2020) 1237–1251.e7. doi:10.1016/j.molcel.2020.04.031.
- [66] Y. Masuda, S. Mitsuyuki, R. Kanao, A. Hishiki, H. Hashimoto, C. Masutani, Regulation of HLTF-mediated PCNA polyubiquitination by RFC and PCNA monoubiquitination levels determines choice of damage tolerance pathway, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 11340–11356. doi:10.1093/nar/gky943.
- [67] D. Kobbe, A. Kahles, M. Walter, T. Klemm, A. Mannuss, A. Knoll, M. Focke, H. Puchta, AtRAD5A is a DNA translocase harboring a HIRAN domain which confers binding to branched DNA structures and is required for DNA repair in vivo, *Plant J.* 88 (2016) 521–530. doi:10.1111/tpj.13283.
- [68] L. Ding, S.L. Forsburg, Essential domains of *Schizosaccharomyces pombe* Rad8 required for DNA damage response., *G3 (Bethesda).* 4 (2014) 1373–84. doi:10.1534/g3.114.011346.
- [69] E.A. Winzeler, D.D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J.D. Boeke, H. Bussey, A.M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S.W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S.H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J.H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, N. Liebundguth, D.J. Lockhart, A. Lucau-Danila, M. Lussier, N. M'Rabet, P. Menard, M. Mittmann, C. Pai, C. Rebischung, J.L. Revuelta, L. Riles, C.J. Roberts, P. Ross-MacDonald, B. Scherens, M. Snyder, S. Sookhai-Mahadeo, R.K. Storms, S. Véronneau, M. Voet, G. Volckaert, T.R. Ward, R. Wysocki, G.S. Yen, K. Yu, K. Zimmermann, P. Philippsen, M. Johnston, R.W. Davis, Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis., *Science.* 285 (1999) 901–6. doi:10.1126/SCIENCE.285.5429.901.

- [70] J.F. Lemontt, Mutants of Yeast Defective in Mutation Induced by Ultraviolet Light, *Genetics*. 68 (1971) 21–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1212581/> (accessed November 25, 2014).
- [71] C.L. Doe, J.M. Murray, M. Shayeghi, M. Hoskins, A.R. Lehmann, A.M. Carr, F.Z. Watts, Cloning and characterisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rad8 gene, a member of the SNF2 helicase family, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 5964–5971. doi:10.1093/nar/21.25.5964.
- [72] J. Frampton, A. Irmisch, C.M. Green, A. Neiss, M. Trickey, H.D. Ulrich, K. Furuya, F.Z. Watts, A.M. Carr, A.R. Lehmann, Postreplication repair and PCNA modification in *Schizosaccharomyces pombe*., *Mol. Biol. Cell.* 17 (2006) 2976–85. doi:10.1091/mbc.E05-11-1008.
- [73] I.-P. Chen, A. Mannuss, N. Orel, F. Heitzeberg, H. Puchta, A homolog of ScRAD5 is involved in DNA repair and homologous recombination in *Arabidopsis*., *Plant Physiol.* 146 (2008) 1786–96. doi:10.1104/pp.108.116806.
- [74] S. Wang, R. Wen, X. Shi, A. Lambrecht, H. Wang, W. Xiao, RAD5a and REV3 function in two alternative pathways of DNA-damage tolerance in *Arabidopsis*, *DNA Repair (Amst)*. 10 (2011) 620–628. doi:10.1016/J.DNAREP.2011.04.009.
- [75] W. Strzalka, F. Bartnicki, K. Pels, A. Jakubowska, T. Tsurimoto, K. Tanaka, RAD5a ubiquitin ligase is involved in ubiquitination of *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen, *J. Exp. Bot.* 64 (2013) 859–869. doi:10.1093/jxb/ers368.
- [76] T. Klemm, A. Mannuß, D. Kobbe, A. Knoll, O. Trapp, A. Dorn, H. Puchta, The DNA translocase RAD5A acts independently of the other main DNA repair pathways, and requires both its ATPase and RING domain for activity in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 91 (2017) 725–740. doi:10.1111/tpj.13602.
- [77] R.A. Helmer, R. Martínez-Zaguilán, J.S. Dertien, C. Fulford, O. Foreman, V. Peiris, B.S. Chilton, Helicase-Like Transcription Factor (Hltf) Regulates G2/M Transition, Wt1/Gata4/Hif-1a Cardiac Transcription Networks, and Collagen Biogenesis, *PLoS One*. 8 (2013) e80461. doi:10.1371/journal.pone.0080461.
- [78] A. Motegi, R. Sood, H. Moinova, S.D. Markowitz, P.P. Liu, K. Myung, Human SHPRH suppresses genomic instability through proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination, *J. Cell Biol.* 175 (2006). <http://jcb.rupress.org/content/175/5/703/tab-figures-data> (accessed May 17, 2017).
- [79] A. Motegi, H.-J. Liaw, K.-Y. Lee, H.P. Roest, A. Maas, X. Wu, H. Moinova, S.D. Markowitz, H. Ding, J.H.J. Hoeijmakers, K. Myung, R.D. Kolodner, Polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTF and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 12411–6. doi:10.1073/pnas.0805685105.
- [80] I. Unk, I. Hajdú, K. Fátyol, B. Szakál, A. Blastyák, V. Bermudez, J. Hurwitz, L. Prakash, S. Prakash, L. Haracska, Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 18107–12. doi:10.1073/pnas.0608595103.

- [81] I. Unk, I. Hajdú, K. Fátýol, J. Hurwitz, J.-H. Yoon, L. Prakash, S. Prakash, L. Haracska, Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 3768–73. doi:10.1073/pnas.0800563105.
- [82] Q. Zhang, D. Ekhterae, K.-H. Kim, Molecular cloning and characterization of P113, a mouse SNF2/SWI2-related transcription factor, *Gene*. 202 (1997) 31–37. doi:10.1016/S0378-1119(97)00446-0.
- [83] X. Gong, S. Kaushal, E. Ceccarelli, N. Bogdanova, C. Neville, T. Nguyen, H. Clark, Z.A. Khatib, M. Valentine, A.T. Look, N. Rosenthal, Developmental Regulation of Zbu1, a DNA-Binding Member of the SWI2/SNF2 Family, *Dev. Biol.* 183 (1997) 166–182. doi:10.1006/DBIO.1996.8486.
- [84] R. Sood, I. Makalowska, M. Galdzicki, P. Hu, E. Eddings, C.M. Robbins, T. Moses, J. Namkoong, S. Chen, J.M. Trent, Cloning and characterization of a novel gene, SHPRH, encoding a conserved putative protein with SNF2/helicase and PHD-finger domains from the 6q24 region☆, *Genomics*. 82 (2003) 153–161. doi:10.1016/S0888-7543(03)00121-6.
- [85] P.H.L. Krijger, K.-Y. Lee, N. Wit, P.C.M. van den Berk, X. Wu, H.P. Roest, A. Maas, H. Ding, J.H.J. Hoeijmakers, K. Myung, H. Jacobs, HLTF and SHPRH are not essential for PCNA polyubiquitination, survival and somatic hypermutation: Existence of an alternative E3 ligase, Elsevier, 2011. doi:10.1016/j.dnarep.2010.12.008.
- [86] S. Sandhu, X. Wu, Z. Nabi, M. Rastegar, S. Kung, S. Mai, H. Ding, Loss of HLTF function promotes intestinal carcinogenesis., *Mol. Cancer*. 11 (2012) 18. doi:10.1186/1476-4598-11-18.
- [87] R.A. Helmer, O. Foreman, J.S. Dertien, M. Panchoo, S.M. Bhakta, B.S. Chilton, Role of Helicase-Like Transcription Factor (Hltf) in the G2/M Transition and Apoptosis in Brain, *PLoS One*. 8 (2013) e66799. doi:10.1371/journal.pone.0066799.
- [88] P.L. Sheridan, M. Schorpp, M.L. Voz, K.A. Jones, Cloning of an SNF2/SWI2-related protein that binds specifically to the SPH motifs of the SV40 enhancer and to the HIV-1 promoter., *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 4575–87. doi:10.1074/JBC.270.9.4575.
- [89] H. DING, K. DESCHEEMAER, P. MARYNEN, L. NELLES, T. CARVALHO, M. CARMO-FONSECA, D. COLLEN, A. BELAYEW, Characterization of a Helicase-Like Transcription Factor Involved in the Expression of the Human Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene, *DNA Cell Biol.* 15 (1996) 429–442. doi:10.1089/dna.1996.15.429.
- [90] H. Ding, A.M. Benotmane, G. Suske, D. Collen, A. Belayew, Functional interactions between Sp1 or Sp3 and the helicase-like transcription factor mediate basal expression from the human plasminogen activator inhibitor-1 gene., *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 19573–80. doi:10.1074/JBC.274.28.19573.
- [91] M.C. Mahajan, S.M. Weissman, DNA-dependent adenosine triphosphatase (helicase-like transcription factor) activates beta-globin transcription in K562 cells., *Blood*. 99 (2002) 348–56. doi:10.1182/BLOOD.V99.1.348.

- [92] R.A. Sturm, D.L. Duffy, Z.Z. Zhao, F.P.N. Leite, M.S. Stark, N.K. Hayward, N.G. Martin, G.W. Montgomery, A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the HERC2 gene determines human blue-brown eye color., *Am. J. Hum. Genet.* 82 (2008) 424–31. doi:10.1016/j.ajhg.2007.11.005.
- [93] M. Visser, M. Kayser, R.-J. Palstra, HERC2 rs12913832 modulates human pigmentation by attenuating chromatin-loop formation between a long-range enhancer and the OCA2 promoter., *Genome Res.* 22 (2012) 446–55. doi:10.1101/gr.128652.111.
- [94] H.R. Moinova, W.-D. Chen, L. Shen, D. Smiraglia, J. Olechnowicz, L. Ravi, L. Kasturi, L. Myeroff, C. Plass, R. Parsons, J. Minna, J.K. V Willson, S.B. Green, J.-P. Issa, S.D. Markowitz, HLTF gene silencing in human colon cancer., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 4562–7. doi:10.1073/pnas.062459899.
- [95] K. Hibi, H. Nakayama, Y. Kanyama, Y. Kodera, K. Ito, S. Akiyama, A. Nakao, Methylation pattern of HLTF gene in digestive tract cancers, *Int. J. Cancer.* 104 (2003) 433–436. doi:10.1002/ijc.10985.
- [96] W.K. Leung, J. Yu, A.H.C. Bai, M.W.Y. Chan, K.-K. Chan, K.-F. To, F.K.L. Chan, E.K.W. Ng, S.C.S. Chung, J.J.Y. Sung, Inactivation of helicase-like transcription factor by promoter hypermethylation in human gastric cancer, *Mol. Carcinog.* 37 (2003) 91–97. doi:10.1002/mc.10124.
- [97] S. Kang, J.W. Kim, G.H. Kang, S. Lee, N.H. Park, Y.S. Song, S.Y. Park, S.B. Kang, H.P. Lee, Comparison of DNA hypermethylation patterns in different types of uterine cancer: Cervical squamous cell carcinoma, cervical adenocarcinoma and endometrial adenocarcinoma, *Int. J. Cancer.* 118 (2006) 2168–2171. doi:10.1002/ijc.21609.
- [98] A. Blastyák, I. Hajdú, I. Unk, L. Haracska, Role of double-stranded DNA translocase activity of human HLTF in replication of damaged DNA., *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 684–93. doi:10.1128/MCB.00863-09.
- [99] G.-L. Moldovan, A.D. D’Andrea, DNA damage discrimination at stalled replication forks by the Rad5 homologs HLTF and SHPRH., *Mol. Cell.* 42 (2011) 141–3. doi:10.1016/j.molcel.2011.03.018.
- [100] J.-R. Lin, M.K. Zeman, J.-Y. Chen, M.-C. Yee, K.A. Cimprich, SHPRH and HLTF Act in a Damage-Specific Manner to Coordinate Different Forms of Postreplication Repair and Prevent Mutagenesis, *Mol. Cell.* 42 (2011) 237–249. doi:10.1016/J.MOLCEL.2011.02.026.
- [101] M. Seelinger, C.K. Sogaard, M. Otterlei, The human RAD5 homologs, HLTF and SHPRH, have separate functions in DNA damage tolerance dependent on the DNA lesion type, *Biomolecules.* 10 (2020). doi:10.3390/biom10030463.
- [102] J. Brühl, J. Trautwein, A. Schäfer, U. Linne, K. Bouazoune, The DNA repair protein SHPRH is a nucleosome-stimulated ATPase and a nucleosome-E3 ubiquitin ligase, *Epigenetics Chromatin.* 12 (2019) 52. doi:10.1186/s13072-019-0294-5.
- [103] M. Zhang, N. Huang, X. Yang, J. Luo, S. Yan, F. Xiao, W. Chen, X. Gao, K. Zhao, H. Zhou, Z. Li, L. Ming, B. Xie, N. Zhang, A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis, *Oncogene.* 37 (2018) 1805–1814. doi:10.1038/s41388-017-0019-9.

- [104] S. Begum, A. Yiu, J. Stebbing, L. Castellano, Novel tumour suppressive protein encoded by circular RNA, circ-SHPRH, in glioblastomas, *Oncogene*. 37 (2018) 4055–4057. doi:10.1038/s41388-018-0230-3.
- [105] M. Zhang, N. Huang, X. Yang, J. Luo, S. Yan, F. Xiao, W. Chen, X. Gao, K. Zhao, H. Zhou, Z. Li, L. Ming, B. Xie, N. Zhang, A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis, *Oncogene*. 37 (2018) 1805–1814. doi:10.1038/s41388-017-0019-9.
- [106] A. Chen, L. Zhong, K. Ju, T. Lu, J. Lv, H. Cao, Plasmatic circrna predicting the occurrence of human glioblastoma, *Cancer Manag. Res.* 12 (2020) 2917–2923. doi:10.2147/CMAR.S248621.
- [107] A. Biswas, N. Chowdhury, A. Bagchi, Structural Characterization of the Hidden Peptide SHPRH-146aa Encoded by Non-Coding circ-SHPRH to Act as Tumor Suppressor, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 193 (2021) 2076–2086. doi:10.1007/s12010-021-03520-0.
- [108] O. Frittmann, V.K. Gali, M. Halmai, R. Toth, Z. Gyorfy, E. Balint, I. Unk, The Zn-finger of *Saccharomyces cerevisiae* Rad18 and its adjacent region mediate interaction with Rad5, *G3 Genes|Genomes|Genetics*. 11 (2021). doi:10.1093/g3journal/jkab041.
- [109] J.P. McDonald, A.S. Levine, R. Woodgate, The *Saccharomyces Cerevisiae* Rad30 Gene, a Homologue of *Escherichia Coli* Dinb and Umuc, Is DNA Damage Inducible and Functions in a Novel Error-Free Postreplication Repair Mechanism, *Genetics*. 147 (1997) 1557–1568. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1208331/> (accessed February 12, 2015).
- [110] L. Kuang, H. Kou, Z. Xie, Y. Zhou, X. Feng, L. Wang, Z. Wang, A non-catalytic function of Rev1 in translesion DNA synthesis and mutagenesis is mediated by its stable interaction with Rad5, *DNA Repair (Amst)*. 12 (2013) 27–37. doi:10.1016/j.dnarep.2012.10.003.
- [111] X. Xu, A. Lin, C. Zhou, S.R. Blackwell, Y. Zhang, Z. Wang, Q. Feng, R. Guan, M.D. Hanna, Z. Chen, W. Xiao, Involvement of budding yeast Rad5 in translesion DNA synthesis through physical interaction with Rev1., *Nucleic Acids Res.* (2016) gkw183-. doi:10.1093/nar/gkw183.
- [112] D. Gallo, T. Kim, B. Szakal, X. Saayman, A. Narula, Y. Park, D. Branzei, Z. Zhang, G.W. Brown, Rad5 Recruits Error-Prone DNA Polymerases for Mutagenic Repair of ssDNA Gaps on Undamaged Templates, *Mol. Cell.* (2019). doi:10.1016/j.molcel.2019.01.001.
- [113] V. Pagès, A. Bresson, N. Acharya, S. Prakash, R.P. Fuchs, L. Prakash, Requirement of Rad5 for DNA Polymerase ζ -Dependent Translesion Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*. 180 (2008) 73–82. doi:10.1534/genetics.108.091066.
- [114] N. Acharya, L. Haracska, S. Prakash, L. Prakash, Complex Formation of Yeast Rev1 with DNA Polymerase η , *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 8401–8408. doi:10.1128/MCB.01478-07.

- [115] S. Chen, A.A. Davies, D. Sagan, H.D. Ulrich, The RING finger ATPase Rad5p of *Saccharomyces cerevisiae* contributes to DNA double-strand break repair in a ubiquitin-independent manner, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 5878–5886. doi:10.1093/nar/gki902.
- [116] E.C. Minca, D. Kowalski, Multiple Rad5 activities mediate sister chromatid recombination to bypass DNA damage at stalled replication forks, *Mol. Cell.* 38 (2010) 649–661. doi:10.1016/j.molcel.2010.03.020.
- [117] L.G. Ball, X. Xu, S. Blackwell, M.D. Hanna, A.D. Lambrecht, W. Xiao, The Rad5 helicase activity is dispensable for error-free DNA post-replication repair, *DNA Repair (Amst).* 16 (2014) 74–83. doi:10.1016/j.dnarep.2014.02.016.
- [118] M.Á. Ortiz-Bazán, M. Gallo-Fernández, I. Saugar, A. Jiménez-Martín, M.V. Vázquez, J.A. Tercero, Rad5 Plays a Major Role in the Cellular Response to DNA Damage during Chromosome Replication, *Cell Rep.* 9 (2014) 460–468. doi:10.1016/j.celrep.2014.09.005.
- [119] K. Choi, S. Batke, B. Szakal, J. Lowther, F. Hao, P. Sarangi, D. Brnzei, H.D. Ulrich, X. Zhao, Concerted and differential actions of two enzymatic domains underlie Rad5 contributions to DNA damage tolerance, *Nucleic Acids Res.* (2015) gkv004. doi:10.1093/nar/gkv004.
- [120] Q. Geissmann, OpenCFU, a New Free and Open-Source Software to Count Cell Colonies and Other Circular Objects, *PLoS One.* 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0054072.
- [121] D.E. Lea, C.A. Coulson, The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations, *J. Genet.* 49 (1949) 264–285. doi:10.1007/BF02986080.
- [122] H. Li, R. Durbin, Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform., *Bioinformatics.* 26 (2010) 589–95. doi:10.1093/bioinformatics/btp698.
- [123] H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, The Sequence Alignment/Map format and SAMtools., *Bioinformatics.* 25 (2009) 2078–9. doi:10.1093/bioinformatics/btp352.
- [124] A. McKenna, M. Hanna, E. Banks, A. Sivachenko, K. Cibulskis, A. Kernysky, K. Garimella, D. Altshuler, S. Gabriel, M. Daly, M.A. DePristo, The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data., *Genome Res.* 20 (2010) 1297–303. doi:10.1101/gr.107524.110.
- [125] E. Garrison, Z.N. Kronenberg, E.T. Dawson, B.S. Pedersen, P. Prins, Vcfli and tools for processing the VCF variant call format, *BioRxiv.* (2021) 2021.05.21.445151. doi:10.1101/2021.05.21.445151.
- [126] H.D. Ulrich, A.A. Davies, In vivo detection and characterization of sumoylation targets in *Saccharomyces cerevisiae*, *Methods Mol. Biol.* 497 (2009) 81–103. doi:10.1007/978-1-59745-566-4_6.

- [127] M. Shen, N. Dhingra, Q. Wang, C. Cheng, S. Zhu, X. Tian, J. Yu, X. Gong, X. Li, H. Zhang, X. Xu, L. Zhai, M. Xie, Y. Gao, H. Deng, Y. He, H. Niu, X. Zhao, S. Xiang, Structural basis for the multi-activity factor Rad5 in replication stress tolerance, *Nat. Commun.* 12 (2021). doi:10.1038/s41467-020-20538-w.
- [128] A. Pause, N. Sonenberg, Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A, *EMBO J.* 11 (1992) 2643–2654. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378397>.
- [129] G.P. Davies, L.M. Powell, J.L. Webb, L.P. Cooper, N.E. Murray, EcoKI with an amino acid substitution in any one of seven DEAD-box motifs has impaired ATPase and endonuclease activities, *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 4828–4836. doi:10.1093/nar/26.21.4828.
- [130] T. Hishida, Y. Kubota, A.M. Carr, H. Iwasaki, RAD6–RAD18–RAD5-pathway-dependent tolerance to chronic low-dose ultraviolet light, *Nature.* 457 (2009) 612–615. doi:10.1038/nature07580.
- [131] H.D. Ulrich, Protein-protein interactions within an E2-RING finger complex. Implications for ubiquitin-dependent DNA damage repair, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7051–7058. doi:10.1074/jbc.M212195200.
- [132] J.H. Miller, Mutagenic specificity of ultraviolet light, *J. Mol. Biol.* 182 (1985) 45–65. doi:10.1016/0022-2836(85)90026-9.
- [133] E.A. Drobetsky, A.J. Grosovsky, B.W. Glickman, The specificity of UV-induced mutations at an endogenous locus in mammalian cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 9103–7. doi:10.1073/pnas.84.24.9103.
- [134] D.E. Brash, J.A. Rudolph, J.A. Simon, A. Lin, G.J. McKenna, H.P. Baden, A.J. Halperin, J. Pontén, A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 10124–10128. doi:10.1073/pnas.88.22.10124.
- [135] E.E. Bryant, I. Šunjevarić, L. Berchowitz, R. Rothstein, R.J.D. Reid, Rad5 dysregulation drives hyperactive recombination at replication forks resulting in cisplatin sensitivity and genome instability., *Nucleic Acids Res.* (2019). doi:10.1093/nar/gkz631.
- [136] E. Kristiansson, M. Thorsen, M.J. Tamás, O. Nerman, Evolutionary Forces Act on Promoter Length: Identification of Enriched Cis-Regulatory Elements, *Mol. Biol. Evol.* 26 (2009) 1299–1307. doi:10.1093/molbev/msp040.
- [137] M. Ralser, H. Kuhl, M. Ralser, M. Werber, H. Lehrach, M. Breitenbach, B. Timmermann, The *Saccharomyces cerevisiae* W303-K6001 cross-platform genome sequence: insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt, *Open Biol.* 2 (2012). <http://rsob.royalsocietypublishing.org/content/2/8/120093> (accessed June 29, 2017).
- [138] P.F. Cliften, L.W. Hillier, L. Fulton, T. Graves, T. Miner, W.R. Gish, R.H. Waterston, M. Johnston, Surveying *Saccharomyces* genomes to identify functional elements by comparative DNA sequence analysis., *Genome Res.* 11 (2001) 1175–86. doi:10.1101/gr.182901.

- [139] M. Kellis, N. Patterson, M. Endrizzi, B. Birren, E.S. Lander, Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements, *Nature*. 423 (2003) 241–254. doi:10.1038/nature01644.
- [140] L. Barbour, L.G. Ball, K. Zhang, W. Xiao, DNA damage checkpoints are involved in postreplication repair, *Genetics*. 174 (2006) 1789–1800. doi:10.1534/genetics.106.056283.
- [141] X. Xu, L. Ball, W. Chen, X. Tian, A. Lambrecht, M. Hanna, W. Xiao, The yeast Shu complex utilizes homologous recombination machinery for error-free lesion bypass via physical interaction with a Rad51 paralogue, *PLoS One*. 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0081371.
- [142] P.B. Drozdova, O. V. Tarasov, A.G. Matveenko, E.A. Radchenko, J. V. Sopova, D.E. Poley, S.G. Inge-Vechtomov, P. V. Dobrynin, Genome sequencing and comparative analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strains of the Peterhof genetic collection, *PLoS One*. 11 (2016). doi:10.1371/journal.pone.0154722.
- [143] P.A. Van der kemp, M. De Padula, G. Burguiere-Slezak, H.D. Ulrich, S. Boiteux, PCNA monoubiquitylation and DNA polymerase ϵ ubiquitin-binding domain are required to prevent 8-oxoguanine-induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 2549–2559. doi:10.1093/nar/gkp105.
- [144] R. Toth, D. Balogh, L. Pinter, G. Jaksa, B. Szeplaki, A. Graf, Z. Gyorfy, M. Zs. Enyedi, E. Kiss, L. Haracska, I. Unk, The Rad5 helicase and RING domains contribute to genome stability through their independent catalytic activities, *J. Mol. Biol.* (2022) 167437. doi:10.1016/j.jmb.2021.167437.
- [145] S. Coulon, S. Ramasubramanyan, C. Alies, G. Philippin, A. Lehmann, R.P. Fuchs, Rad8Rad5/Mms2–Ubc13 ubiquitin ligase complex controls translesion synthesis in fission yeast, *EMBO J.* 29 (2010) 2048–2058. doi:10.1038/emboj.2010.87.
- [146] S. Flott, C. Alabert, G.W. Toh, R. Toth, N. Sugawara, D.G. Campbell, J.E. Haber, P. Pasero, J. Rouse, Phosphorylation of Slx4 by Mec1 and Tel1 Regulates the Single-Strand Annealing Mode of DNA Repair in Budding Yeast, *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 6433–6445. doi:10.1128/MCB.00135-07.
- [147] J.R. Mullen, V. Kaliraman, S.S. Ibrahim, S.J. Brill, Requirement for three novel protein complexes in the absence of the Sgs1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*. 157 (2001) 103–118. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1461486/> (accessed October 25, 2010).
- [148] S. Fekairi, S. Scaglione, C. Chahwan, E.R. Taylor, A. Tissier, S. Coulon, M.-Q. Dong, C. Ruse, J.R. Yates, P. Russell, R.P. Fuchs, C.H. McGowan, P.-H.L. Gaillard, Human SLX4 is a Holliday Junction Resolvase Subunit that Binds Multiple DNA Repair/Recombination Endonucleases, *Cell*. 138 (2009) 78–89. doi:10.1016/j.cell.2009.06.029.
- [149] W.M. Fricke, S.J. Brill, Slx1—Slx4 is a second structure-specific endonuclease functionally redundant with Sgs1—Top3, *Genes Dev.* 17 (2003) 1768–1778. doi:10.1101/gad.1105203.

9. Összefoglaló

Korunk rettegett betegsége a rák. Ennek, a sok esetben gyógyíthatatlan betegségnek a kialakulása szoros kapcsolatban áll a DNS károsodásával és a megváltozott örökítő anyag miatti elszabadult sejtosztódással. Daganatok kialakulásához köztudottan a sejtek korlátlan osztódása vezet, amiért általában az érintett sejtekben szomatikusan indukálódott mutációk a felelősek. A környezetben lévő és a táplálékkal felvett mutagén vegyületek és a DNS károsító sugárzások hatására gyakran sejtmagi DNS-károsodás lép fel. Amennyiben az örökítő anyag károsodása nem javítódik ki időben, az osztódások során fixálódó mutációk felhalmozódása idővel daganatképződéshez vezet. Ezért létfontosságú a többsejtű élőlények számára, hogy valamilyen módon el tudják távolítani ezeket a károsodásokat. Erre több hibajavító mechanizmus és fehérje is kialakult a sejtekben, melyek rendkívül konzerváltak, a legtöbbjük élesztőben és emberben egyaránt megtalálható. Soksejtű élőlényekben a DNS károsodása és a klonálisan megjelenő mutációk csak nehezen vizsgálhatók. A DNS hibajavítási folyamatok tanulmányozására és az egyes szereplők és protein-komplexek feladatának és aktivitásának megismerésére a kis mérettel, rövid életsiklussal, jó keresztezhetőséggel és könnyű transzformálhatósággal rendelkező pékélesztő, *Saccharomyces cerevisiae*, remek modell-organizmusnak bizonyult.

A DNS-hibajavító folyamatok egy része - például a NER, a BER vagy a MMR - a károsodások eltávolítását végzi. A *RAD6* DNS-hibatolerancia útvonalba tartozó fehérjék azonban a károsodásokat nem távolítják el, hanem csak az elakadt replikációt menekítik, mert a replikáció végleges leállása a sejt halálához vezet. A *RAD6* DNS-hibatolerancia útvonal nyomán menekített replikáció után megmaradó DNS-károsodásokat a fentebb említett folyamatok (NER, BER) tudják később eltávolítani. Ha a DNS szintézise leáll, akkor a Rad6 E2 ubikvitin konjugáz és a Rad18 E3 ubikvitin ligáz fehérjék komplexe ubikvitinálja a replikatív polimeráz processzivitási faktorát, a PCNA-t a 164-es lizinen. A keletkező monoubikvitin-PCNA aktiválja a polimeráz-váltás folyamatát, a replikatív polimeráz helyett egy transzléziós polimeráz folytatja a DNS szintézisét a hibával szemben. Élesztőben három TLS polimeráz ismert: a Pol η (Rad30), a Pol ζ (Rev3-Rev7) és a Rev1. A Pol η specifikusan az UV sugárzás által kialakított ciklobután pirimidin (TT) dimerek hibamentes átírásában játszik szerepet. A Pol ζ azonban többféle károsodással szemben is képes folytatni a DNS szintézisét, nagy valószínűséggel hibás nukleotidot építve be a hibákkal szembe a DNS-láncba, ezért hibajavítási folyamata gyakran mutagén. Ebben a mutagén útvonalban vesz részt a Rev1 polimeráz is, amely csak citozint képes beépíteni a DNS szintézise során, de jelenlegi

ismereteink szerint aktivitása rendkívül alacsony, valószínűleg csak szabályozó szereppel rendelkezik a folyamatban.

A transzléziós DNS-szintézis azonban nem képes átírni minden károsodott DNS-szakaszt. Néhány esetben teljesen eltérő mechanizmusra van szükség. A DNS-hibatolerancia útvonalba tartozó Rad5 - amely a humán HLTf és SHPRH fehérjék élesztő homológja - templátváltás útján menekítheti az elakadt replikációs villát. A templátváltás során az elakadt, újonnan szintetizálódott DNS-szál a másik új szálát használja templátként, így a hibával szemben mindig a helyes nukleotid épül be. Ennek a folyamatnak az egyik ismert modellje a villavisszafordítás, amikor is a *SWI/SNF* típusú helikáz/ATPáz doménnel rendelkező Rad5 visszafordítja a replikációs villát, és így átmenetileg egy csirkelábszerű DNS-szerkezetet hoz létre. A károsodással szembeni DNS-szakasz szintézise után pedig a villaszerkezet helyreáll és folytatódik a replikáció.

A Rad5 fehérjében a helikáz/ATPáz doménen kívül egy HIRAN és egy RING domén is található. A HIRAN domén a szubsztrát felismerésben játszik szerepet, míg a RING domén E3 ubikvitin ligáz aktivitással rendelkezik. Ez az aktivitás az Mms2-Ubc13 E2 ubikvitin konjugáz fehérjék komplexével képes poliubikvitinálni a monoubikvitin-PCNA-t az ubikvitin fehérjék 63-as lizinjein keresztül. A poliubikvitin-PCNA pontos szerepe ma még ismeretlen.

Ezekén az aktivitásokon kívül, a Rad5 más funkciókkal is rendelkezik, például kölcsönhat a Rev1 fehérjével, illetve szerepe van a Pol ζ függő TLS folyamatában. Még nem ismert, hogy a Rad5 ubikvitin ligáz vagy helikáz/ATPáz aktivitása vesz-e részt ezekben a folyamatokban. Az irodalmi adatok ellentmondásosak azzal kapcsolatban is, hogy a Rad5 ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz aktivitása milyen módon működik együtt a hibajavítás folyamatában.

Célul tűztük ki, hogy eldöntsük, vajon a Rad5 ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz aktivitása együtt vagy egymástól függetlenül működik. Ehhez ki kellett választanunk olyan mutánsokat, melyek csak az egyik adott aktivitást rontják el. Azt is meg kívántuk állapítani, hogy a Rad5 fenti aktivitásai függenek-e a TLS polimerázok bármelyikétől.

Ahhoz, hogy a Rad5 aktivitásainak egymáshoz való viszonyát behatóan vizsgálni tudjuk, olyan mutánsokra volt szükségünk, amelyek a fehérjének csak egy meghatározott funkcióját rontják el, míg más aktivitások érintetlenek maradnak. Ezért az irodalomban ismert *rad5* mutáns törzsek mutagénkezelésre (UV, MMS) adott érzékenységének igazolása után ezeket a mutáns fehérjéket túltermeltük, tisztítottuk és biokémiai vizsgálatokat - *in vitro* helikáz és ubikvitin ligáz kísérleteket - végeztünk velük. A nagyobb érzékenységet mutató helikáz/ATPáz mutáns (DE681,682AA) törzsben expresszált Rad5-DEAA fehérje képes volt

in vitro és *in vivo* poliubikvitinálni a monoubikvitin-PCNA fehérjét, míg az alacsonyabb érzékenységgű mutáns (K538A) törzsben expresszált Rad5-KA fehérjét nem sikerült túltermelnünk és nagyobb mennyiségben tisztítanunk, így az előbbi mutánst választottuk ki további kísérleteinkhez.

Az ubikvitin ligáz mutánsok közül a nagyobb érzékenységet mutató mutáns (CC914,917AA) törzsben expresszált Rad5-CCAA fehérje tisztítva sem ubikvitin ligáz, sem pedig helikáz aktivitás detektálására alkalmas kísérleti rendszerben nem mutatott aktivitást. A CC914,917AA mutációt hordozó élesztő törzs viszont nagyobb érzékenységet mutatott UV és MMS kezelésre, mint az *mms2Δ*. Ez az ubikvitin ligáz mutáció tehát nem specifikus, valószínűleg a Rad5 fehérje teljes térszerkezetét elrontja. Az alacsonyabb érzékenységet mutató ubikvitin ligáz mutáns (I916A) törzsben expresszált Rad5-IA fehérje alacsonyabb helikáz aktivitást mutatott, mint a vad típusú, de ez a csökkent aktivitás *in vivo* elegendőnek bizonyult, ugyanis ez az ubikvitin ligáz mutáció nem növelte az *mms2Δ* törzs érzékenységét UV és MMS kezelésre. Ezért ezt az alacsonyabb érzékenységet mutató ubikvitin ligáz mutánst választottuk további kísérleteinkhez.

Miután a biokémiai jellemzés után kiválasztottuk a legalkalmasabb mutánsokat, ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz kettős mutáns élesztő vonalat hoztunk létre, hogy megvizsgáljuk az *in vivo* érzékenységét mutagénkezelésre (UV, MMS). Az ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz kettős mutáns törzs nagyobb érzékenységet mutatott, mint az egyszeres mutánsok bármelyike is, mivel ez a két aktivitás egymástól független szereppel rendelkezik a DNS-hibatolerancia folyamatában. Eredményünket megerősítette, hogy a helikáz/ATPáz és *mms2Δ* kettős mutáns törzs is nagyobb érzékenységet mutatott, mint az egyszeres mutánsok MMS és UV kezelésre. Mivel kísérleteinkben az ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz kettős mutáns törzs kevésbé volt érzékeny, mint a *rad5Δ* MMS és UV kezelésre, kimutattuk, hogy a Rad5 fehérje az említett két aktivitáson kívül még más aktivitással is rendelkezik.

A következő lépésben a Rad5 harmadik aktivitásának a mutagenézisben betöltött szerepét vizsgáltuk. Mivel a helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz kettős mutánsokhoz képest a *rad5Δ* mutáns törzsben jelentősen lecsökkent a spontán mutációs események gyakorisága feltételeztük, hogy a Rad5 harmadik aktivitása a mutációkat generáló TLS polimerázokkal - a Rev1 és Pol ζ fehérjékkel - működhet együtt. Teljes genom szekvenálás alapján az UV-indukált mutációs spektrum jelentős különbséget mutatott a helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz kettős mutáns és a *rad5Δ* törzs között a C>G és a T>C mutációk szempontjából. Ezeknek a mutációknak az aránya a kettős mutánsban nagyobb, míg a *rad5Δ* törzsben kisebb, mint a vad típusban. A C>G és a T>C mutációk kialakítása a Rev1 és Pol ζ TLS polimerázokhoz köthető,

emiatt feltételeztük, hogy a Rad5 harmadik funkciója a Rev1 és Pol ζ fehérjékkel együtt vesz részt a DNS-hibatolerancia folyamatában.

Ezután azt vizsgáltuk, hogy a Rad5 harmadik aktivitása együttműködik-e a mutagén TLS polimerázokkal, ezért kettős mutánsokat hoztunk létre a TLS polimeráz gének delécióival (*rev1 Δ* , *rev3 Δ* , *rev7 Δ*) és a *rad5* mutánsokkal. Kísérleteinkben *rev3 Δ* háttéren az ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz kettős mutáns törzs ugyanolyan érzékenységet mutatott, mint a *rad5 Δ* MMS és UV kezelésre egyaránt. Ugyanezt az eredményt kaptuk *rev1 Δ* és *rev7 Δ* háttéren is. Ez utóbbi eredményünk azzal magyarázható, hogy a Rad5 harmadik aktivitása – ami független az ubikvitin ligáz és helikáz/ATPáz aktivitásaitól – minden esetben együttműködik a Rev1 és Pol ζ TLS polimerázokkal, és a Rad5 ezen a három aktivitásán kívül nem rendelkezik más funkcióval.

Kísérleteinkben a HIRAN domént szerepére is kíváncsiak voltunk. Meg szeretnénk volna állapítani, hogy a HIRAN domén a Rad5 három aktivitása közül melyekkel működhet együtt. *In vitro* és *in vivo* kísérleteink alapján a Rad5 HIRAN doménje nem csak a helikáz aktivitáshoz szükséges, hanem az ubikvitin ligáz aktivitáshoz is, ellentétben a humán homológban, a HLTf fehérjében tapasztaltakkal. A HLTf HIRAN domén mutáns sejtvonala UV érzékenysége kisebb, mint a HLTf csendesített sejtvonala. Ehhez hasonlóan a Rad5-GARR HIRAN domén mutáns fehérje is képes részlegesen menekíteni a *rad5 Δ* UV érzékenységet. Ezért feltételezzük, hogy a Rad5-GARR a Rev1-Pol ζ fehérjékkel továbbra is képes lehet kölcsönhatásba lépni.

A több specifikus aktivitással rendelkező fehérjék, mint amilyen a Rad5 is, különböző katalitikus aktivitásaikat gyakran ugyanabban a folyamatban használják fel. Kísérleteinkben megvizsgáltuk azt is, hogy vajon a Rad5 helikáz/ATPáz és ubikvitin ligáz aktivitása együttműködik, vagy egymástól független folyamatokban vesznek részt. Ehhez olyan *rad5* mutánsokra volt szükségünk, amelyek csak az egyik aktivitást rontják el, míg a fehérje többi aktivitása sértetlen marad. Ezért először megvizsgáltuk az irodalomban már ismert *rad5* mutáns törzsek *in vivo* érzékenységet MMS és UV mutagénekre, majd ezeket a mutáns fehérjéket túltermeltettük, kitisztítottuk és megvizsgáltuk az *in vitro* biokémiai aktivitásukat helikáz és ubikvitin ligáz kísérletekben. A legmegfelelőbb mutánsok kiválasztása után kettős mutáns törzset hoztunk létre, és megvizsgáltuk érzékenységet MMS és UV kezelésre. Kimutattuk, hogy a kettős mutáns törzs érzékenyebb, mint az egyszeres mutánsok, ugyanis a helikáz/ATPáz és az ubikvitin ligáz aktivitás egymástól függetlenül működik. Ezenkívül a Rad5 más funkcióval is rendelkezik, ugyanis a *rad5 Δ* érzékenyebbnek bizonyult a kettős mutáns törzsnél. Azt is bebizonyítottuk, hogy ez a harmadik aktivitás mutációkat generáló

folyamatban vesz részt és minden esetben együttműködik a Rev1 és Pol ζ TLS polimerázokkal az MMS és az UV indukálta károsodások eltávolításában. Kísérleteinkben ugyan bebizonyítottuk, hogy a Rad5 aktivitásai egymástól független funkciókkal rendelkeznek, eredményeink alapján azonban nem tudjuk egyértelműen kizárni annak a lehetőségét, hogy ezek az aktivitások egymással együttműködve vesznek részt bizonyos folyamatokban.

10. Summary

Currently, cancer is still a dreaded disease. The formation of this, in many occasions still incurable, illness is closely connected to unregulated cell division caused by DNA damage. Tumour formation is a consequence of uncontrolled cell division resulting from somatic mutations. Different environmental factors and molecules are potentially mutagenic and if the caused DNA damage is not repaired, the mutations are fixed by consecutive cell divisions, which leads to tumor formation. Therefore the elimination of the DNA damage is a basic and important process for the viability of all multicellular organisms. Several repair pathways have evolved for the elimination of DNA damage. Both the DNA repair pathways and the proteins contributing to the repair mechanisms are highly conserved; most of them exist in human and yeast as well. In multicellular organisms it is very hard to study the DNA damage processes and the clonally appearing mutations. Thus, yeast become a very feasible model organism for the examination of DNA repair processes, and identification of the exact role and catalytic activity of major players and interacting protein complexes. *Saccharomyces cerevisiae* has several advantages over other model systems, such as small size, short lifecycle, and easy crossability and transformability.

Some DNA repair pathways eliminate the damage directly, for example the NER, the BER, and the MMR. However, members of the *RAD6* DNA damage tolerance pathway do not eliminate the damage; they just ensure the continuity of the process of replication as stalled replication would lead to cell death. After replication, the remaining DNA damage is eliminated by other DNA repair pathways (NER, BER). When replication stalls, the complex of Rad6 E2 ubiquitin conjugase and Rad18 E3 ubiquitin ligase monoubiquitinates PCNA, the processivity factor of replication polymerases, on its 164th lysine residue. The monoubiquitination of PCNA activates the changing of the replication polymerase to a translesion polymerases, which can continue the synthesis of DNA opposite the damage. There are three known TLS polymerases in yeast: Pol η (Rad30), Pol ζ (Rev3-Rev7), and Rev1. Pol η has a specific error-free activity; it can continue the synthesis of DNA opposite cyclobutane pyrimidine dimers (TT) formed by UV radiation. Pol ζ can synthesize DNA opposite different kinds of damage by incorporating a random nucleotide, in most cases not correctly; therefore, Pol ζ is a mutagenic TLS polymerase. Another member of this mutagenic pathway is Rev1; which can incorporate cytosines into the DNA, but as its activity is really weak, most probably it has mainly a regulatory role in this process.

TLS polymerases are not able to synthesize DNA opposite every kind of damage. Sometimes alternative solutions are needed. Other members of the DNA damage tolerance pathway, the Rad5 yeast homolog of human HLTf and SHPRH, can rescue the stalled replication fork in most kinds of damage by template switching. In template switching, the stalled newly synthesized DNA strand uses the other newly synthesized strand as a template; thus, always correct nucleotides are incorporated opposite the damage. One model of explaining the mechanism of template switching is fork reversal: Rad5 with its *SWI/SNF* helicase domain reverses the replication fork, which will be temporarily transformed into a chicken-foot-like structure. Following DNA synthesis opposite the damage, the process of replication is continued in the original fork structure.

Besides its helicase/ATPase domain, Rad5 has two other domains: a HIRAN domain and a RING domain. The HIRAN domain has a role in the recognition of substrates, and the RING domain has an E3 ubiquitin ligase activity. This ubiquitin ligase activity interacts with the protein complex of Mms2-Ubc13 E2 ubiquitin conjugase, and they can polyubiquitinate the monoubiquitin-PCNA on the 63rd lysine residue of ubiquitin. The exact role of polyubiquitin-PCNA is not known.

Besides these activities, Rad5 has other functions as well: it interacts with Rev1 and has a role in Pol ζ -dependent TLS as well. However, the question whether the helicase/ATPase or the ubiquitin ligase activity of Rad5 act in these TLS processes has not been answered yet. Studies examining the relationship between the helicase/ATPase and the ubiquitin ligase activities of Rad5 came to contradictory results.

In our experiments, we planned to examine whether the helicase/ATPase and the ubiquitin ligase activities of Rad5 always act together or they have independent roles. First, we selected the most appropriate Rad5 mutants, which specifically disrupt one of the functions. Later, we examined the collaboration of Rad5 activities with TLS polymerases.

For the examination of the relationship between the helicase/ATPase and the ubiquitin ligase activities of Rad5, we needed specific mutants that ruin only one function of the protein and leave other functions intact. Therefore, after the verification of the sensitivity of *rad5* mutants known in literature to mutagenic treatment (UV, MMS), these mutant proteins were over-expressed, purified, and tested in biochemical reactions – in *in vitro* helicase and ubiquitin ligase assays. The mutant protein (DE681,682AA), which was expressed in the more sensitive helicase/ATPase mutant strain, is able to polyubiquitinate monoubiquitinated PCNA both in *in vitro* and *in vivo* experiments. However, we could not purify the other

helicase/ATPase mutant protein (K538A), which was expressed in the less sensitive mutant strain; thus, we chose to use the previous one in our further experiments.

Among the ubiquitin ligase mutants, the Rad5-CCAA mutant protein expressed in the more sensitive strain did not display activity in either the helicase or the ubiquitin ligase assays, and this mutant strain showed a higher sensitivity than *mms2Δ* to UV and MMS treatment. Since this mutation (CC914,917AA) is not specific, it disrupts the whole structure of Rad5, and the protein loses not only its ubiquitin ligase activity. The other mutant protein (I916A), which was expressed in the less sensitive ubiquitin ligase mutant strain, displayed lower *in vitro* helicase activity than the wild-type protein, but this level of activity was sufficient for the *in vivo* helicase function of Rad5 since this mutation did not increase the sensitivity of the *mms2Δ* strain to UV and MMS treatment. Therefore, we chose this less sensitive ubiquitin ligase mutant for further experiments.

Having chosen the most appropriate mutants for the helicase/ATPase and the ubiquitin ligase activities of Rad5, we generated a double mutant strain to examine whether these functions have independent roles or act together in DDT. We tested the *in vivo* sensitivity of this double mutant strain to UV and MMS treatment. The double mutant showed higher sensitivity than the single mutants indicating that the helicase/ATPase and the ubiquitin ligase activities have independent roles. To confirm our results, we generated a helicase/ATPase *rad5* and *mms2Δ* double mutant strain and tested its sensitivity to UV and MMS treatment; as earlier, this double mutant displayed higher sensitivity than the single mutants. Thus, we proved that the helicase/ATPase and the ubiquitin ligase activities of Rad5 have independent roles in DDT. In our experiments, the *rad5Δ* strain showed higher sensitivity than the helicase/ATPase and ubiquitin ligase double mutant to MMS and UV treatment; thus, Rad5 has other functions besides these two canonical activities.

We planned to investigate the role of the third activity of Rad5 in mutagenesis. Since the ratio of spontaneous mutagenesis in *rad5Δ* was lower than in the helicase/ATPase and ubiquitin ligase double mutant strain we assumed that the third activity of Rad5 may act with those TLS polymerases (Rev1 and Polζ) which generates mutations. Data from whole genome sequencing of the helicase/ATPase and ubiquitin ligase double mutant and *rad5Δ* strains after UV treatment showed that these two strains are extremely different in the percentage of C>G and T>C mutations. The percentage of these two types of mutations are higher in the double mutant, and lower in the *rad5Δ* than in the wild-type strain. The C>G and T>C mutations are the characteristic product of Rev1 and Polζ mutagenic TLS polymerases. Therefore, we hypothesized that the third activity of Rad5 may act with these mutagenic TLS polymerases.

Next, to test the collaboration between the third activity of Rad5 and the TLS polymerases, we generated double mutant strains with TLS polymerase genes carrying deletions (*rev1Δ*, *rev3Δ*, *rev7Δ*) and *rad5* mutants. In the sensitivity assays performed with MMS and UV, *rad5Δ* showed the same sensitivity on *rev3Δ* background as the helicase/ATPase and ubiquitin ligase double mutant strain. We obtained the same result on *rev1Δ* and *rev7Δ* background to MMS and UV treatment. Therefore, we concluded that the third structural non-canonical activity of Rad5 – which is independent from the helicase/ATPase and the ubiquitin ligase activities – always acts with the Rev1 and Polζ TLS polymerases, and Rad5 does not have another activity.

We also tested the HIRAN domain of Rad5 to examine which activities act together with this domain. In our experiments the HIRAN domain is indispensable for the helicase activity, and for the ubiquitin ligase activity as well. This result contradicts with the HLTF, the human homologue of Rad5; because, its HIRAN domain mutant protein is able to polyubiquitinate the monoubiquitin-PCNA. The HLTF HIRAN domain mutant cell line is sensitive to UV treatment, but its sensitivity is lower than the HLTF silenced cell line. Our Rad5-GARR HIRAN mutant partially rescues the UV sensitivity of *rad5Δ* strain; therefore, we presume that it is able to interact with Rev1-Polζ TLS polymerases.

It is common, that different activities of a multifunctional protein such as Rad5 act together in the same process. In our experiments, we tested the collaboration of the helicase/ATPase and the ubiquitin ligase activities of Rad5. First, we chose the most appropriate mutants, in which only one activity of Rad5 is disrupted, and the other activities are left intact. We tested the *in vivo* sensitivity of different *rad5* mutants to MMS and UV treatment and also over-expressed, purified, and tested the *in vitro* biochemical activities of these mutants in helicase and ubiquitin ligase assays. Based on these results, we chose the most appropriate helicase/ATPase and ubiquitin ligase mutants and generated a double mutant strain to test its sensitivity to MMS and UV treatment. The helicase/ATPase and ubiquitin ligase double mutant showed higher sensitivity than the single mutants indicating that these activities have independent roles in DDT. In our experiments, the *rad5Δ* strain showed higher sensitivity than the helicase/ATPase and ubiquitin ligase double mutant to MMS and UV treatment demonstrating that Rad5 has another activity as well. We tested the relationship between the activities of Rad5 and TLS polymerases and proved that the third non-canonical activity of Rad5 always acts with the Rev1 and Polζ TLS polymerases, and Rad5 does not have any further functions. Though the activities of Rad5, based on our results, have independent roles in DDT, although we cannot exclude the possibility of their collaboration.

12. Saját közlemények jegyzéke

12.1. A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény

Tóth Róbert, Balogh Dávid, Pintér Lajos, Jaksa Gábor, Széplaki Bence, Gráf Alexandra, Györfy Zsuzsanna, Enyedi Márton Zsolt, Kiss Ernő, Haracska Lajos, Unk Ildikó The Rad5 Helicase and RING Domains Contribute to Genome Stability through their Independent Catalytic Activities. J Mol Biol. 2022 Jan 3; 434(5):167437. doi:10.1016/j.jmb.2021.167437. **IF(2020): 5.469** MTMT: 32606165

Mórocz Mónika, Zsigmond Eszter, Tóth Róbert, Enyedi Márton Zsolt, Pintér Lajos, Haracska Lajos DNA-dependent protease activity of human Spartan facilitates replication of DNA–protein crosslink-containing DNA. Nucleic Acids Res. 2017;11:gkw1315. doi:10.1093/nar/gkw1315. **IF: 11.561** MTMT: 3166555

12.2. Referált folyóiratban megjelent közlemények

12.2.1. A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

Tóth Róbert, Balogh Dávid, Pintér Lajos, Jaksa Gábor, Széplaki Bence, Gráf Alexandra, Györfy Zsuzsanna, Enyedi Márton Zsolt, Kiss Ernő, Haracska Lajos, Unk Ildikó The Rad5 Helicase and RING Domains Contribute to Genome Stability through their Independent Catalytic Activities. J Mol Biol. 2022 Jan 3; 434(5):167437. doi:10.1016/j.jmb.2021.167437. **IF(2020): 5.469** MTMT: 32606165

12.2.2. Egyéb közlemények

Mórocz Mónika, Zsigmond Eszter, Tóth Róbert, Enyedi Márton Zsolt, Pintér Lajos, Haracska Lajos DNA-dependent protease activity of human Spartan facilitates replication of DNA–protein crosslink-containing DNA. Nucleic Acids Res. 2017;11:gkw1315. doi:10.1093/nar/gkw1315. **IF: 11.561** MTMT: 3166555

Frittmann Orsolya, Gali K Vamsi, Halmai Miklós, Tóth Róbert, Györfy Zsuzsanna, Bálint Éva, Unk Ildikó The Zn-finger of *Saccharomyces cerevisiae* Rad18 and its adjacent region mediate interaction with Rad5. G3 (Bethesda). 2021 Apr 15;11(4):jkab041. doi:10.1093/g3journal/jkab041. **IF(2020): 3,154** MTMT: 32037907

Tóth Róbert, Halmai Miklós, Györfy Zsuzsanna, Bálint Éva, Unk Ildikó The inner side of yeast PCNA contributes to genome stability by mediating interactions with Rad18 and the replicative DNA polymerase δ . Sci Rep. 2022 Mar 25;12(1):5163. doi: 10.1038/s41598-022-09208-7. **IF(2020): 4,379** MTMT: 32762710

MTMT azonosító: 10081960

Összesített impakt faktor: **24,563**