

A humán Spartan szerepe a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában

Ph.D. értekezés

Sági-Zsigmond Eszter

Témavezető: Dr. Haracska Lajos

Az Európai Unió Kiválósági Központja

ELKH-Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

2021. Szeged

Tartalomjegyzék

1 Rövidítések jegyzéke.....	4
2 Bevezető.....	6
2.1 DNS-károsodások típusai	6
2.2 DNS hibajavító mechanizmusok	6
2.2.1 Bázis- és nukleotidkivágó hibajavítás	6
2.2.2 Kettősszálú DNS-száltöréseket javító útvonalak	10
2.2.3 DNS szálak közötti keresztkötéseket eltávolító mechanizmusok.....	13
2.2.4 DNS–fehérje keresztkötések javítását végző mechanizmusok.....	13
2.2.5 DNS-hibatolerancia útvonal	15
2.3 Humán Spartan fehérje	19
3 Célkitűzések.....	22
4 Anyagok és módszerek.....	24
4.1 Humán sejt kultúrák és transzfektálás.....	24
4.2 Western blot	24
4.3 Stabílan csendesített sejt vonalak létrehozása.....	25
4.4 SDS/KCl precipitációs assay a DPC eltávolítás in vivo követésére.....	25
4.5 BrdU comet technika Proteináz K alkalmazásával	26
4.6 DNS fiber módszer	27
4.7 Áramlási citométer alapú sejt érzékenységi teszt.....	28
4.8 Resazurin alapú sejt érzékenységi teszt	28
4.9 Áramlási citométer alapú sejt ciklus vizsgálat	29
4.10 Spartan mutánsok létrehozása	29
4.11 Fehérjék tisztítása.....	30
4.12 Spartan enzimátikus hasadásának vizsgálata	31
5 Erdemények	32
5.1 A Spartan rendelkezik DNS-függő proteáz aktivitással	32
5.2 A Spartanak szerepe van a DNS–fehérje keresztkötéseket eltávolításában....	38
5.3 DNS–Fehérje keresztkötések kimutatására alkalmas BrdU comet technika jellemzése	39

5.4	A vad típusú Spartan jelenlétében Spartan stabilan csendesített HEK293 sejtvonalakban felhalmozódó DNS–fehérje keresztkötések mennyiségi változása ...	46
5.5	Az UBZ és PIP doméneknek szerepe van a DNS–fehérje keresztkötések eltávolításában.....	47
5.6	SprT és a DNS kötő domének szükségesek a DNS–fehérje keresztkötések eltávolításához	48
5.7	A Spartanak szerepe van az azonnali DNS–fehérje keresztkötések hiba javításában.....	52
5.8	A formaldehid kezelésnek hatása van a Spartan stabilan csendesített sejtvonalak sejtciklusára	56
5.9	A Spartan és a RAD18 együttműködésének jellemzése a genomi DNS–fehérje keresztkötések eltávolításában	58
6	Eredmények megvitatása.....	66
7	Magyar nyelvű összefoglaló	72
8	Summary of the PhD thesis	76
9	Köszönetnyilvánítás	81
10	Saját közlemények jegyzéke.....	82
11	Referenciák	83

1 Rövidítések jegyzéke

APS	Ammónium-perszulfát (Ammonium persulfate)
ATP	Adenozin-5'-trifoszfát (Adenosine triphosphate)
BER	Báziskivágó hibajavítás (Base excision repair)
BrDU	Brómdezoxiuridin (Bromodeoxyuridin)
BSA	Marha szérumalbumin (Bovine Serum Albumin)
DAPI	4',6–diamidino–2–fenilindol (4',6-diamidino-2-phenylindole)
DPC	DNS-Fehérje keresztkötések (DNA–Protein Crosslinks)
DDT	DNS-hibitolerancia (DNA damage tolerance)
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle-médium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimetil-szulfoxid (Dimethyl sulfoxide)
DNS	Dezoxiribonukleinsav (Deoxyribonucleic acid)
E1	Ubikvitin aktiváló enzim (Ubiquitin-activating enzyme)
E2	Ubikvitin konjugáló enzim (Ubiquitin-conjugating enzyme)
E3	Ubikvitin ligáz enzim (Ubiquitin-ligase enzyme)
FA	Formaldehid (Formaldehyde)
FACS	Fluoreszcencia által aktivált sejtválogatás (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
FCS	Magzati borjú szérumalbumin (Fetal Calf Serum)
FLAG	8 aminosavból álló jelölőpeptid (FLAG octapeptide, DYKDDDDK)
GFP	Zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein)
GGR	Teljes genomot érintő nukleotidkivágó hibajavítást (Global Genomic Repair)
GST	Glutation S-transzferáz (Glutathione S-transferase)
HEK293	Humán embrionális vesesejtek (Human embryonic kidney 293 cells)
HR	Homológ rekombináció (Homologous Recombination)
HRP	Torma peroxidáz enzim (Horseradish Peroxidase)
IdU	Jód-dezoxiuridin (Iododeoxyuridine)
MMR	Mismatch hibajavítás (Mismatch repair)
NER	Nukleotidkivágó hibajavítás (Nucleotide excision repair)
NHEJ	Nem-homológ végek összekapcsolása (Non-Homologous End-Joining)

PBS	Foszfát-pufferolt sóoldat (Phosphate buffered saline)
PCNA	Polimerázok processzivitási faktora (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
PEG	Polietilén-glikol (Polyethylene glycol)
PFA	Paraformaldehid (Paraformaldehyde)
PIP	PCNA fehérjével kölcsönható motívum (PCNA-Interacting Protein motif)
PMSF	Fenilmetánszulfonil-fluorid (Phenylmethylsulfonyl fluoride)
RFC	Replikációs faktor C (Replication factor C)
RING	Ubikvitin ligáz domén (Really Interesting New Gene)
RNS	Ribonukleinsav (Ribonucleic acid)
RPA	DNS-kötő fehérje (Replication Protein A)
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát (Sodium dodecyl sulfate)
SDSA	Szintézisfüggő Szál Összekapcsolódás (Synthesis Dependent Strand Annealing)
shRNS	Rövid hajtű RNS (Small hairpin RNA)
SSA	Egyszálú szálösszekapcsolódás, (Single Strand Annealing)
ssDNA	Egyszálú DNS (Single-stranded DNA)
SUMO	Kis módosító fehérje (Small Ubiquitin-like Modifier)
TCR	Transzkripcióval kapcsolt hibajavítás (Transcription-Coupled Repair)
TEMED	Tetrametil-etilén-diamin (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine)
TLS	Transzléziós szintézis (Translesion synthesis)
UBZ	Ubikvitinkötő cink-ujj domén (Ubiquitin-Binding Zinc finger)
UV	Ultraibolya sugárzás (Ultraviolet light)
XP-V	Xeroderma pigmentosum variáns (Xeroderma Pigmentosum Variant)

2 Bevezető

2.1 DNS-károsodások típusai

A DNS-hibák kialakulásuk szerint többfélék lehetnek, melyeket különböző exogén vagy endogén hatások hoznak létre. Az egyik leggyakrabban előforduló DNS-módosító tényező a reaktív oxigén gyökök jelenléte (szuperoxid, peroxid, hidroxil gyökök), amelyek a sejtekben száltöréseket és bázismódosulásokat okoznak. A reaktív oxigén gyökök, különböző mechanizmusok eredményeként keletkezhetnek, mint például a sejtek metabolizmusa, fertőzések vagy külső behatások (UV sugárzás, ionizáló sugárzás, dohányfüst). Ezek mutációkat és száltöréseket okozhatnak, például egy emlőssejtben naponta több ezerszer előfordul a bázisok és a dezoxiribóz közötti glikozidos kötések sérülése következtében kialakuló purin vagy pirimidin bázisok elvesztése, melynek következtében abázikus régiók jönnek létre.

Továbbá DNS-károsodást indukálhatnak intenzív mutagén hatással rendelkező exogén ágensek, amelyek képesek alkilálni, deaminálni, oxidálni, keresztkötni vagy interkalálni a DNS szálakat. Például az adenin hipoxantinná, a guanin xantinná, és az 5-metil-citozin timinné való átalakulása során deamináció megy végbe, amely révén keto csoporttá alakul a bázisok instabil amino csoportja. A leggyakoribb külső DNS-károsító tényező, a napból származó UV sugárzás. Az így kialakult DNS-károsodások legnagyobb mértékben ciklobután-pirimidin és pirimidin-pirimidin dimerek kialakulásához vezetnek. Ezek különböző kovalens kapcsolódásokat jelentenek a két szomszédos bázis 6-os illetve 4-es pozíciójában elhelyezkedő szénatomjai között, általában T-T, kisebb gyakorisággal C-C vagy T-C¹. Emellett UV sugárzás hatására kisebb mennyiségben kialakulhatnak még a DNS szálak közötti keresztkötések és DNS-fehérje keresztkötések is.

2.2 DNS-hibajavító mechanizmusok

2.2.1 Bázis- és nukleotidkivágó hibajavítás

A báziskivágó hibajavító útvonal (Basis Excision Repair, BER), felismeri és kijavítja az olyan bázishibákat, amelyek nem okoznak nagyobb DNS-hélix torzulást, mint például az oxidáció, deamináció, metiláció és alkiláció. A folyamat hatékonyságát behatárolja, hogy minden különböző DNS-károsodás felismeréséhez szükség van egy külön arra a hibára

specifikus glikozidáz enzimre. A glikozidázok a DNS-hélixen haladva, annak kis árka mentén keresik a lehetséges hibákat. E hibajavító útvonalnak az évek során számos altípusát azonosították, viszont minden formájára jellemző a négylépéses javító mechanizmus, amely a hiba feltérképezésével és kivágásával kezdődik, melyet a fentebb említett specifikus glikozidázok hajtanak végre az N-glikozidos kötést hidrolizálva a glükóz és a módosult bázis között. A folyamat révén abázikus helyek jönnek létre, amelyeket, egy AP endonukleáz hasít, ennek eredményeképpen 3' OH és 5' dezoxiribóz-foszfát végek keletkeznek. Ezt követően, az így keletkező rést a templátszálnak megfelelően egy DNS polimeráz tölti fel, majd a kijavított szálát DNS ligáz kapcsolja össze². A báziskivágó hibajavító mechanizmus körülbelül 30.000 hiba/nap mennyiségű hibát távolít el minden humán sejtben³.

A károsodások sokfélesége miatt szükségesé vált egy másik rendszer kifejlődése is, a **nukleotidkivágó hibajavító rendszeré**, amely a hibákat a kialakult rendellenes struktúrákon, az a DNS-hélix torzulásán keresztül ismeri fel.

Két típusát különböztetjük meg, a transzkripcióval kapcsolt (Transcription-Coupled Repair, TCR) és a teljes genomot érintő (Global Genomic Repair, GGR) nukleotidkivágó hibajavítást. A TCR eltávolítja a hibákat a transzkripciósan aktív gének átírandó szakaszairól, míg a GGR a genomban lévő hibák eltávolításáért felelős. TCR hibajavítás folyamán, először az RNS polimeráz elongációs komplex (RNA polymerase elongation complex (EC)) találkozik a hibával, az átírandó szakaszokon. Az elakadt RNS polimerázt a TRCF (Transcription Repair Coupling Factor) komplex eltávolítja, és elősegíti az UvrA és UvrB fehérjék hibához való toborzását, így elősegítve a hibajavítást.

A GGR jelentős szerepet tölt be az UV sugárzás által okozott DNS-károsodások eltávolításában. A GGR fontosságát jelzi, hogy ez az útvonal az evolúció során erősen konzervált, és minden organizmusban hasonlóképpen működik. A hiba felismerését egy fehérjekomplex, az XPE komplementációs csoport végzi, majd a komplexhez kötődnek az XPD és XPB helikázok, amelyek szétcsavarják a DNS két szálát a károsodás két oldalán. Ezt követően történik a bemetszés az XPF-ERCC endonukleáz által a károsodástól 5' irányba, az XPG endonukleáz által a károsodástól 3' irányba. A hasítás után elkezdődik a DNS szintézis, majd a DNS folytonosságát egy 5' ligáz állítja helyre.

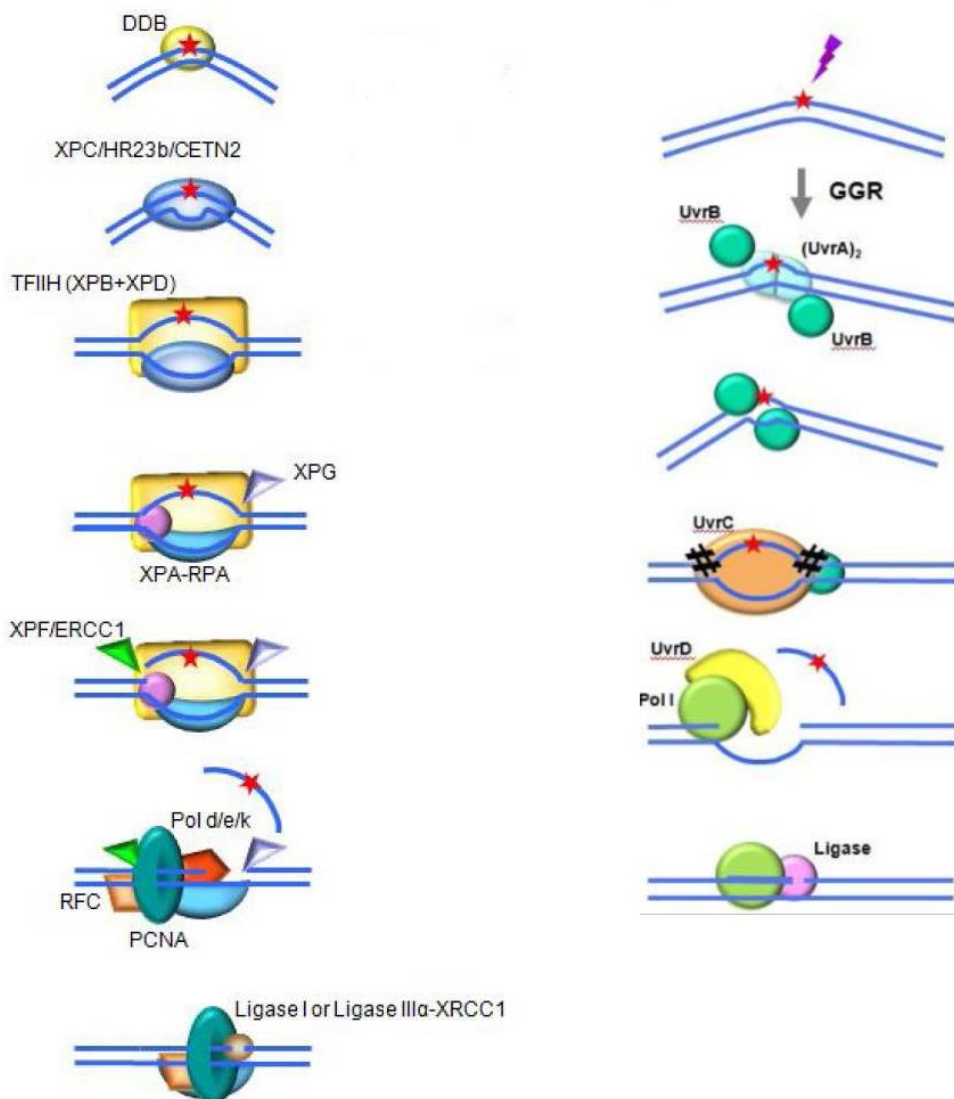
Ily módon a NER folyamán a hiba eltávolításra kerül, prokariotákban egy 12-13 nukleotid hosszú szakasszal együtt, míg eukariotákban 24-32 nukleotid hosszú oligomer formájában. Ez a mechanizmus felelős a ciklobután pirimidin dimérek, a 6-4 fotoproduktok, a benzo[a]pyreneguanine adduktok, a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításáért.

E. coli-ban a nukleotid hibajavítást az UvrABC endonukleáz enzim komplex végzi, amely az UvrA, UvrB, UvrC és UvrD fehérjékből épül fel (1. ábra). A hiba felismeréséhez két UvrA és egy UvrB kapcsolódik össze, amely a kettős DNS szálon képes elmozdulni a hibás szakaszig. A DNS szakaszon az UvrA fehérje ismeri fel a hiba által okozott torziót. A hiba lokalizálása után, az UvrA dimer elválik a komplextől, a UvrB monomerhez az UvrC fehérje kötődik, létrehozva az UvrBC komplexet, mely feladata a DNS szálak mindkét irányban (upstream, downstream) való bemetszése. Az UvrD fehérje egy helikáz, amely eltávolítja az UvrBC komplex által kivágott szakaszt. A helikáz által létre hozott rést a polimeráz I illetve a polimeráz II tölti fel, majd egy DNS ligáz kapcsolja össze a szálakat. Eukariótákban sokkal nagyobbak a fehérjekomplexek és ez által több fehérje vesz részt a hibajavítási mechanizmusban, az UvrA dimer helyett a XPC/HR23B ismeri fel a DNS szálon bekövetkezett torziókat, majd a 9 fehérje alegységből álló TFIIH kapcsolódik be, amelyet az XPG stabilizál. A fehérjekomplex részét képezik az XPB és XPD fehérjék, amelyek DNS-függő ATP-áz és helikáz tulajdonságaiknak köszönhetően, ATP felhasználása mellett (XPB $3' \rightarrow 5'$, míg az XPD $5' \rightarrow 3'$ irányban) a hiba körül képesek letekerni a DNS-t 20-30 nukleotid hosszan. Az XPG és az XPF-ERCC1 fehérjék kivágják a hibás régiót. A DNS szál feltöltését a DNS polimerázok végzik^{4,5}.

A nukleotid hibajavító útvonal szerepének fontosságát jelzi az is, hogy meghibásodása esetén számos betegség alakul ki. A NER hibás működése esetén kialakuló betegségek közül a legismertebb az autoszomális recesszív Xeroderma pigmentosum, amelyet az XP fehérjék hibás működése idéz elő. 8, úgynevezett XP komplementációs csoport van, (XPA-XPG és XPV) bármely mutációja előidézheti a betegség kialakulását. A Xeroderma pigmentosumban szenvedő betegek bőre száraz és rendkívül érzékeny UV sugárzásra, a bőrüket nem érheti napsütés, és 10 000-szer nagyobb valószínűséggel alakul ki náluk bőrrák⁶, valamint sok esetben fejlődési és szellemi rendellenességek is kialakulnak.

A Cockayne-szindrómát az ERCC6 és ERCC8 fehérjék funkcióvesztése idézi elő, a betegekre jellemző a fizikális és a mentális retardáció⁷, és annak ellenére hogy a betegekre nem jellemző a bőrrák kialakulása, mégis érzékenyek a napfényre.

Az XPB és XPD gének mutációja okozta betegség az úgynevezett trichothiodystrophia (TTD). A kéntartalmú fehérjék előállításában bekövetkező változások következményeként a betegekre jellemző a pikkelyes, halszerű bőr, a törékeny haj és körmök. Ezek mellett még megjelennek a Cockayne-szindrómára is jellemző tünetek, a fejlődési és neurológiai elváltozások is.



1. ábra: Nukleotidkivágóhibajavítás főbb lépési *H. sapiensben* (bal oldalt) és *E. coliban* (jobb oldalt) ⁹⁵ Forrás: Nucleotide excision repair in humans, Graciela Spivak

2.2.2 Kettősszálú DNS-száltöréseket javító útvonalak

A sejtek számára a kettősszálú DNS-száltörések jelentik a legnagyobb veszélyforrást. Ezért az evolúció folyamán javításukra két mechanizmus alakult ki, az úgynevezett homológ rekombináció (HR, Homologous Recombination), amely során a hibák a törés környezetével homológ szekvenciájú szakaszok bevonásával, azaz a testvérkromatidák segítségével javítódnak ki. A második lehetőség a nem homológ végek véletlenszerű összekapcsolódása (NHEJ, Non Homologous End Joining) révén történhet, melynek következtében deléciók, inszerciók és transzlokációk jöhetnek létre. A sejt túlélése szempontjából fontos a homológ rekombináció és a nem homológ végek véletlenszerű összekapcsolódása közötti útvonal választásának szabályozása, ugyanis a NHEJ túlsúlya nagyobb hibákat is előidézhet, amelyek súlyos betegségek kialakulásával járhatnak^{8,9}.

A homológ rekombináció, amely egy hibamentes DNS kettősszálú törést javító mechanizmus, feltételezi egy ép homológ templát-szál jelenlétét. Első lépéseként az MRN komplexben található Mre11 nukleáz 5' → 3' irányba visszaemésztí a DNS szálat, az így keletkezett túlnyúló 3' egyesszálú DNS szakaszt az RPA fehérje stabilizálja és védi, majd BRCA1, BRCA2 fehérjék kötődnek be (2. ábra). Az egyesszálú DNS-t erősen kötő RPA helyét, a Rad52 segítségével a Rad51 fehérje veszik át, a Rad51 képes egyesszálú és kettősszálú DNS szakaszok megkötésére is. Ezt követi a Rad51-DNS komplex kialakulása, a komplementer régió megtalálása és kihurkolódása. A szálinvázió során a Rad51 fehérjékből és DNS szakaszból létrejött nukleoprotein filamentum beköt a templát kromatida megegyező szakaszába, ennek eredményeként létrejön egy úgynevezett rekombinációs „buborék” vagy D-hurok (Holliday-hurok, Holliday junction). Majd egy polimeráz feltölti a hiányzó nukleotidokat⁹.

A D-hurok feloldására két különböző modell ismert, a kettős Holliday-hurok modell szerint a szintézis után, a termékeket a DNS ligáz I ligája össze, létrehozva egy heteroduplex DNS-t és egy kettős Holliday-hurkot. A létrejött struktúra feloldásához és a rekombináns vagy szülői kromatidák kialakulásához szükség van egy exonukleázra, amely képes a DNS szálak bemetszésére⁹.

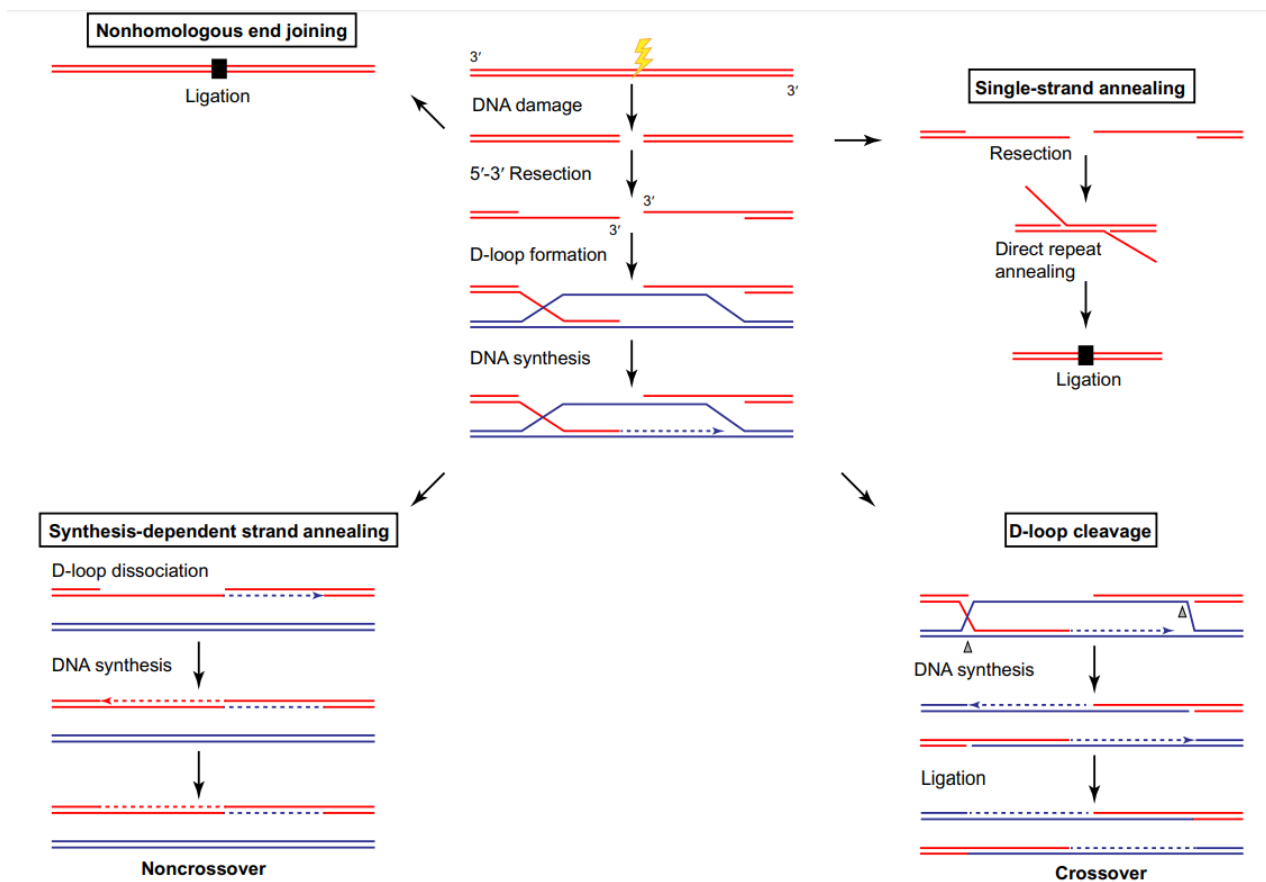
A szintézisfüggő szál összekapcsolódás (Synthesis Dependent Strand Annealing, SDSA) modell szerint nem keletkeznek rekombináns kromatidák. A Holliday-hurkot helikázok

oldják fel, mivel megszakad a bekötő szál 3' végén elkezdődött DNS szintézis. A polimerázok által meghosszabbított bekötő szál visszacsatolódik a saját kromatidáján elhelyezkedő komplementeréhez.

Egyesszálú DNS szálösszekapcsolódás, (Single Strand Annealing, SSA) akkor jön létre amikor a kettősszálú DNS törés repetitív DNS szekvenciákon alakul ki. Többnyire eukariotákra jellemző hibajavítási mechanizmus. A DNS szálak nukleázok által itt is visszaemésztődnek, majd a túlnyúló 30 nukleotid hosszú szálakat az RPA és Rad52 fehérje borítja be. Szálinvázio és szálkicserélődési folyamatok itt nem játszódnak le, ezért a túlnyúló DNS szálakat ligázok kötik össze.

A második lehetőség a nem homológ végek összekapcsolódása, ez a folyamat a legkockázatosabb a sejtek számára. A folyamat során véletlenszerűen kapcsolódnak össze a DNS szálak, de ennek ellenére sokszor a megfelelő végeket köti össze. A NHEJ során a homológ rekombinációhoz hasonlóan itt is először az MRN komplex kötődik a végekhez. Ezt követi a Ku70 és Ku80 által létrehozott heterodimer bekötődése, amely védelmet biztosít a nukleázokkal szemben és elősegíti a DNS-függő protein-kináz katalitikus alegységének, a DNAPKcs-nak bekötődését. A DNAPKcs foszforilálja az ott lévő fehérjéket, mint például az Artemist, a WRN-t és az RPA-t. Utolsó lépésként a DNS ligáz IV és partnerei (XRCC4 és XLF) összekapcsolják a szálakat^{10,11}.

A NHEJ útvonalban található fehérjék az eukarióta sejtekben nagy fokú homológiát mutatnak, viszont az XRCC7 és az Artemis csak gerincesekben találhatóak meg. Ez a két fehérje rendkívül fontos szerepet tölt be az immunoglobulinok érési folyamataiban is, az úgy nevezett V(D)J rekombinációban, ami szintén csak a gerincesekben játszódik le¹². A NHEJ-ban betöltött szerepük fontosságát jelzi, hogy hiányukban vagy funkcióvesztesük esetén a sejtek fokozott érzékenységet mutatnak ionizáló sugárzásra^{13,14}.



2. ábra: A HR és a NHEJ sematikus ábrázolása

Kettősszálú DNS-száltöréseket javító alternatív mechanizmusok. Nem homolog végek (NHEJ) összekapcsolódása hibákat generáló javító mechanizmus, történhet a DNS szálak közvetlen vagy minimális módosítások utáni ligálásával. A repetitív szekvenciákban bekövetkező törések javíthatódnak egyesszálú DNS szál összekapcsolódással (Single-Strand Annealing, SSA), amely a repetitív szekvenciák elvesztéséhez vezethet a közvetlen reszekció, összekapcsolódás és ligálás következtében. SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing, SDSA) következtében nem rekombináns kromatidák keletkeznek. A D-hurok létrejötte és a DNS szintézis után a D-hurok hasításának helye szerint eredményezhet rekombináns vagy nem rekombináns kromatidákat ⁹⁶. Forrás: Homologous Recombination in Eukaryotes Ravindra Amunugama,

Richard Fishel

2.2.3 DNS szálak közötti keresztkötéseket eltávolító mechanizmusok

A DNS szálak közötti kovalens kötések (ICLs, Interstrand Crosslinks) kialakulása emlőssejtekben a replikációs villa elakadását, szétesését, és ezáltal kettősszájú DNS-törést okozhat. Több hibajavító mechanizmus együttműködésére van szükség az ilyen típusú hibák javításához. Fontos szerepet töltenek be az úgynevezett Fanconi (FA) útvonal fehérjéi. A hiba felismerését a FANCM fehérje végzi, majd az FA központi komplex (core complex) kialakításában további fehérjék vesznek részt: FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, FANCT, FAAP100, MHF1, MHF2, FAAP20 és FAAP24¹⁵. A DNS-hiba helyére toborzott Fanconi központi komplex fehérjéi a sejtciklus S és G2 fázisaiban sejtmagi fókuszokat képeznek a FANCM-FAAP24, ATR és BRCA1 (FANCS) fehérjék jelenlétében¹⁶. A FA komplex ezek után aktiválja a FANCD2 és FANCI monoubikvitilációját, amelyet a FANCL ubikvitin ligáz és az UBE2T (FANCT) E2-ubikvitin konjugáló enzimek katalizálnak. Az Ub-FANCD2-hez kötődik UBZ4 doménjén (Ubiquitin-Binding Zinc-finger 4) keresztül a nukleáz platformként működő SLX4 (FANCP) fehérje^{17,18}. Ezt követi az ERCC4 (XPF vagy FANCO) -ERCC1 heterodimer, MUS81-EME1 és az SLX1 szerkezetspecifikus endonukleázok kötődése és aktiválódása. Egy másik nukleáz, a FAN1 (Fanconi-Associated Nuclease 1), UBZ doménjének köszönhetően képes direkt a monoubikvitinált FANCD2-hez kapcsolódni^{19,20}. A hiányzó DNS szekvenciák kiegészíthetnek a NHEJ, a Rad51 függő HR vagy a TLS (Transzléziós DNS szintézis) útvonalak aktiválódásával ^{21,22}.

2.2.4 DNS-fehérje keresztkötések javítását végző mechanizmusok

A DNS-hez kovalensen és irreverzibilisen kapcsolódó fehérjéket DNS-fehérje keresztkötéseknek (DNA-Protein Crosslinks, DPC) nevezzük, ezek egy specifikus csoportját képezik a DNS-hibáknak. Ezek fizikai akadályt képeznek a replikáció során. A replikációval egyidőben való jelenlétük, a genom integritására nézve legnagyobb veszélyt jelentő kettősszájú DNS-törések kialakulásához vezethetnek. Különböző endogén vagy exogén DNS-károsító ágensek hatására bármelyik, a DNS közelében lévő fehérje részt vehet a DPC-ket létrehozó kovalens kötés kialakításában. Tömegspektrométeres vizsgálatokkal azonosítottak számos DNS-fehérje keresztkötésekben előforduló DNS-kötő fehérjét (mint például a hisztonok, transzkripciós faktorok, DNS-hibajavító és replikációs fehérjék), illetve DNS-hez nem kötődő fehérjéket is ²³⁻²⁵.

A leggyakoribb DPC-ket indukáló endogén tényezők közé tartoznak az aldehidek, ROS, és a reaktív nitrogén gyökök. Aldehidek keletkeznek a sejtek normál metabolizmusa során is, például a hisztonok demetilációja, aminosavak metabolizmusa, és a lipidek peroxidációja során^{26–29}. Becslések szerint a humán plazma endogén formaldehid koncentrációja 100 μ M, de egyes szövetekben elérheti akár a 400 μ M értéket is^{30,31}. Exogén DPC-indukáló tényező a sejteket érő ionizáló sugárzás, és a tumorellenes szerek (mitomycin C, platina-származékok, DNS metiltranszferáz inhibitorok, topoizomeráz mérgek stb.)^{32–36}. Egy emlősgenomban naponta körülbelül 6000 endogén tényező által okozott DPC keletkezik, ezzel ez az egyik leggyakrabban előforduló DNS károsodás³⁷. Ennek ellenére a javító mechanizmusairól keveset tudunk és rengeteg ellentmondást tartalmaz a szakirodalom.

Genetikai és biokémiai kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a DPC-k eltávolításában két kanonikus hibajavító mechanizmusnak van kulcsszerepe. Baktériumokban kimutatták, hogy a NER a 16 kDa-nál kisebb keresztkötött fehérjét, míg a HR a nagyobb szférikus gátat képező akadályokat távolítja el és javítja ki^{38–41}. Élesztőben végzett kísérletek azt bizonyítják, hogy magas formaldehid koncentráció és rövid időtartamú kezelés esetén a NER, míg alacsonyabb formaldehid dózis és hosszan tartó kezelés esetén a HR felelős a genomstabilitás fenntartásáért⁴². Emlőssejtekben viszont *in vitro* és *in vivo* a NER képes eltávolítani a 16 kDa-nál kisebb keresztkötött fehérjét^{39,40,43,44}. A DPC-k eltávolításában a HR pontos szerepét nehéz meghatározni, Δ recA és Δ recB *Escherichia coli* sejtek megnövekedett érzékenységet mutatnak formaldehid és azacitidin kezelésre^{40,45}, hasonlóan viselkedtek a HR fehérjékben hiányos élesztő sejtek is (Δ sgs1, Δ xrs2, Δ mre11, Δ rad50, Δ rad52)^{42,46}. Formaldehid-kezelés hatására a sejtekben megnövekedett számú kettősszálú DNS-törést, Rad51 fókusz és testvérkromatidák közötti kereszteződést figyeltek meg⁴⁷. Ezért a HR-nek valószínűleg a DPC-k által okozott nagyszámú kettősszálú DNS-törések eltávolításában van szerepe, nem közvetlenül az elsődleges léziók javításában^{48,49}.

A DPC-k eltávolításában felmerült a fehérjék lebontását végző proteaszómák esetleges szerepe is. A baktériumok ATP-függő proteázának gátlása nem befolyásolta a sejtek túlélését DPC indukció után⁴⁰. Néhány kutatás eredménye azt mutatja, hogy humán sejtek esetében a proteaszóma inhibitorok meggátolják a hisztonok, Top1- és Top2-ccs

(Topoisomerase 1 and 2 Cleavage Complexes) által képzett DPC eltávolítását, és a sejtek érzékenyek alacsony koncentrációjú formaldehid-kezelésre^{50–52}. Később *Xenopus* peték extrakciójából kimutatták, hogy valójában nem a proteoszómák gátlása befolyásolja negatívan a DPC-k eltávolítását a replikáció folyamán, hanem a használt proteoszóma inhibitorok párhuzamosan gátolják a sejtekben lévő szabad ubikvitin molekulákat is, és ez az ubikvitin-hiány okozza a DPC-k felhalmozódását, nem pedig a proteoszómák gátlására adott válasz⁵³. Tehát a DPC-k eltávolításához a sejteknek szükségük van ubikvitinre, de a proteoszómák pontos szerepének tisztázása még további kísérleteket igényel.

Stingle és mtsai. 2014-ben *Saccharomyces cerevisiae*-ben azonosítottak egy eddig ismeretlen DPC-eltávolító mechanizmust, amelyben az úgynevezett *wss1* (weak suppressor of *smt3* protein 1) metalloproteáz fehérjének van kulcsszerepe. Szintetikus letalitást előidézve azt találták, hogy a $\Delta wss1 \Delta tdp1$ kettős mutáns élesztő sejtek nagyon lassú növekedést mutatnak. Ismert, hogy a *tdp1* legfontosabb szerepe a Top1ccs-ek (topo-I cleavable complex) eltávolítása, ezért felmerült, hogy a *wss1*-nek is szerepe lehet a folyamatban. Kamptotecin-kezelés után a $\Delta wss1 \Delta tdp1$ kettős csendesített sejtek magas érzékenységet mutattak a vad típushoz képest, ezt a negatív hatást kompenzálta a $\Delta top1$ egyidejű csendesítése ($\Delta wss1 \Delta tdp1 \Delta top1$), ezen eredményekből arra következtettek, hogy a felgyülemllett Top1ccs-ek felelősek az észlelt fenotípusért. A csoport további kísérletekben bizonyította, hogy a *wss1* metalloproteáz doménjének DNS-függő proteáz aktivitása révén valóban fontos szerepet játszik a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában. Nem csak a Top1ccs-ek hasításában tölt be rendkívül fontos szerepet, hanem képes enzimatikusan bontani a DNS-hez kovalensen kapcsolt *H1* hisztont és a *Hmg1*-t (High mobility protein) is. Viszont a DNS-hez nem kötött fehérjéket, mint például a GST, BSA még DNS jelenlétében sem bontja⁴⁶.

2.2.5 DNS-hibatolerancia útvonal

A DNS-hibajavító mechanizmusok folyamatosan javítják a kialakult DNS-hibákat, viszont ezek a rendszerek is meghibásodhatnak, vagy intenzívebb károsodások esetében telítődhetnek, aminek következtében nem képesek minden DNS károsodást eltávolítani a sejtciklus S fázisáig. A replikatív polimerázok nagyon szűk aktív centrummal rendelkeznek, ezért csak a hibátlan DNS-szálat képesek befogadni, és ezzel szemben

megfelelő nukleotidot beépíteni. Amennyiben a replikatív polimerázok károsodott DNS szakasszal találkoznak, a replikáció leáll, aminek eredményeként kettősszalú DNS-törések, nagyobb kromoszómális átrendeződések keletkezhetnek és végső esetben a sejtek halálát is okozhatják. Ezen folyamatok elkerülésére alakultak ki az úgy nevezett DNS-hibatolerancia (DDT, DNA Damage Tolerance) útvonalak, amelyek képesek az elakadt replikációs villák mentésére. A hiba ugyan megmarad, de a replikáció tovább folytatódik, a sejt tovább él és osztódik. Ez a mechanizmus különösen fontos az egysejtű élőlényeknek, így már az egysejtű eukariótákban is megtalálható. Először a pékélesztőben tanulmányozták, de emberben is nagyon hasonlóan működik a folyamat, a magasfokú konzerváltságnak köszönhetően.

A hibatolerancia útvonalakban fontos szerep jut az ubikvitin molekulának. Az ubikvitin egy kizárólag eukariótákban jelenlévő, 76 aminosavból felépülő rendkívül konzervált fehérje. Egy enzimaszkád segítségével kapcsolódik más fehérjékhez, és szabályozza például a proteolízist vagy a DDT-t. Az E1-aktiváló enzim ATP jelenlétében aktiválja az ubikvitin molekulát, az E2 az ubikvitin konjugáló enzim, az E3 pedig az ubikvitin ligáz, amely párhuzamosan tudja kötni a cél fehérjét és az E2-t ezzel is növelve a folyamat specificitását⁶⁰.

Ebben az útvonalban az úgynevezett Rad6-Rad18 episztázis csoportba tartozó fehérjék vesznek részt. A Rad6, eukariótákban erősen konzervált E2 Ubc, és különböző E3 ligázokkal alkothat komplexeket, specifikusan kötődik a DNS-károsodás következtében létrejövő RPA-val borított egyesszalú DNS-hez^{54,55}. A homodimer Rad18 egy E3 ubikvitin ligáz, mely dimerizációja az N-terminális RING doménjén keresztül valósul meg. A C-terminális végén helyezkedik el a Rad6-tal interakciót létesítő régió, ez a RING doménnel együttesen hoz létre egy stabil Rad6-Rad18 komplexet. A Rad18 aszimmetrikus homodimerizációjának köszönhetően, a homodimer csak egy aktív Rad6 kötő felülettel rendelkezik, azaz két Rad18 fehérje köt egyetlen egy Rad6 molekulát. A Rad18 továbbá SAP doménje által köti a DNS-t, N-terminális régiója által kölcsönhatásba lép a PCNA-val, és az RPA-val is^{56–59}.

A DDT során kulcsfontosságú lépés a PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) molekula ubikvitinálódása. A PCNA egy erősen konzervált molekula, amely három egyforma alegységből épül fel, és minden alegység két különböző doménből és egy domének

közötti (IDCL - Interdomain Connecting Loop) részből áll. A PCNA C-terminális részéhez és az IDCL felszínéhez kötődnek a replikatív polimerázok (Pol δ , Pol ϵ). Miután a CMG helikáz kitekerte a dupla hélixet, az így keletkezett egyesszájú DNS RPA fehérjével borítódik be. Ezt követően az RFC enzim (Replication Factor C), ATP jelenlétében a primer 3' végére felhelyezi a PCNA molekulát úgy, hogy a C-terminális oldala a primer 3' vége felé nézzen, majd a replikatív polimerázok 5'→3' irányba elkezdik az elongációt. A PCNA a replikáció során a polimerázok processzívítási faktoraként szolgál, mivel megnöveli a polimerázok és a DNS közötti kölcsönhatás stabilitását.

A PCNA monoubikvitinálását a Rad6-Rad18 fehérjecsoport tagjai végzik, élesztő kísérletek eredményei rámutattak a folyamat fontos szabályozó szerepére. A PCNA 164-es lizinének monoubikvitinálásához az ubikvitin aktiválását az Uba1 enzim végzi, a konjugáló enzim a Rad6, míg a reakcióban résztvevő ubikvitin ligáz a Rad18. S fázisban a jelenlévő DNS-károsodások által kiváltott K164 monoubikvitinálódása aktiválja a transzléziós szintézist, melynek során a szűk aktív centrummal rendelkező replikatív polimerázok lecserélődnek flexibilisebb aktív centrummal rendelkező transzléziós polimerázokra, amelyek képesek befogadni a hibás, torzult DNS szálat is. A folyamatban résztvevő transzléziós polimeráztól függően a hibás nukleotid átírása két módon mehet végbe: hiba mentesen (error-free) vagy hibásan (error-prone). A transzléziós polimerázok aktivitása csak a hibát tartalmazó DNS szakaszra korlátozódik, mivel pont a flexibilis aktív centrumnak köszönhetően nagyon magas hibaszázalékkal rendelkeznek. A replikatív polimerázokkal ellentétben a transzléziós polimerázokra jellemző az alacsony processzívítás, alacsony pontosság, és a 3'→5' exonukleáz aktivitás hiánya. Emlősökben megtalálható transzléziós polimerázok közül a polimeráz éta (Pol η), polimeráz iota (Pol ι), polimeráz kappa (Pol κ), és a Rev1 a polimerázok Y-családjába tartoznak, míg a polimeráz zéta (Pol ζ) a polimerázok B-családjának tagja. Replikációs polimerázok transzléziós polimerázokra való lecserélődésének mechanizmusa máig vitatott terület. A replikációs villa leállása után a transzléziós polimerázok közvetlenül a monoubikvitinálódott PCNA-hez csatlakoznak ubikvitin-kötő cinkujj doméneken keresztül (UBZ; Pol η , Pol κ), vagy helikális-ubikvitin-kötő motívumok (UBM; Pol ι , Rev1) által, további kölcsönhatások alakulhatnak ki a PIP (PCNA Interacting Peptide) domén jelenlétének köszönhetően a Pol η , Pol ι , és Pol κ -val ^{61–66}.

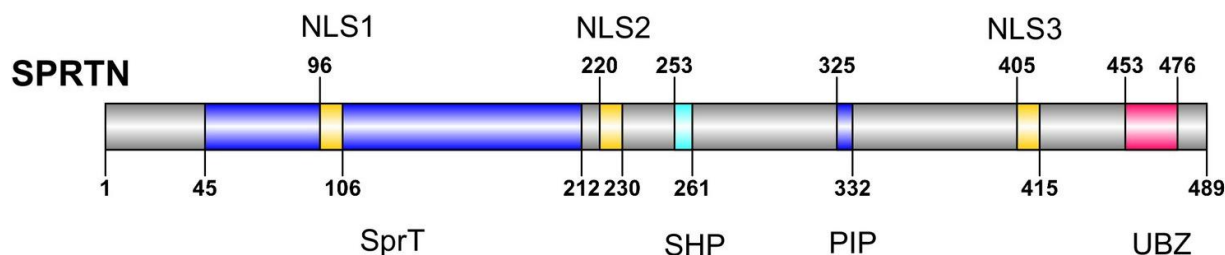
A PCNA poszttranszlációs módosításai fontos szerepet játszanak a DDT szabályozásában. Az S fázisban jelenlévő DNS-károsodások által kiváltott PCNA K164 monoubikvitinálódása és ezáltal a transzlációs szintézis aktiválódása mellett, a PCNA K164 monoubikvitinjére a Ubc13-Mms2/Rad5 fehérje komplex újabb ubikvitineket kapcsolhat létrehozva egy poliubikvitin láncot. Ez a poliubikvitináció a feltétele a DDT egy másik utvonalának, a templát váltásnak (template switching), és az úgynevezett „csírkeláb” struktúra kialakulásának, amely a replikációs villa visszafordítását jelenti, azaz az újonnan szintetizált szál szolgál a replikáció templátjaként ⁶⁷.

Az ubikvitinálás mellett fontos szerepe van a PCNA SUMO-val (Small Ubiquitin-like Modifier) való módosításának is, amit először élesztőben tanulmányoztak. S fázisban a sumoiláció előfeltétele a PCNA RFC általi DNS-re való feltöltése⁶⁸. A PCNA SUMO E2-E3 komplex, Ubc9-Siz1 általi K164, ritkábban K127 pozícióján történő SUMOilálása szupresszálja a spontán homológ rekombinációt, az Srs2 anti-rekombinációs helikáz toborzásán keresztül ^{67,69–71}. Továbbá a PCNA-n jelenlévő SUMO csoport, pozitívan befolyásolja a Rad18 ubikvitin-ligáz aktivitását is⁷².

S fázisban a PCNA ubikvitinációja a replikációs mechanizmus DNS-hibákon való áthaladásának elengedhetetlen lépése, és fontos feltétele a genomintegritás megőrzésének. A sejtekben az Ub-PCNA mennyisége szigorú szabályozás alatt áll. A sejtek ezzel a szabályozással kerülnek el az alacsony hibaráttával rendelkező transzlációs polimérázok sürgősszerű működésbe lépését, és az így létrejövő mutagenézist. A deubikvitináló enzim (DUB, De-Ubiquitinating Enzyme), és az USP1 (Ubiquitin-Specific Peptidase 1) negatívan befolyásolja a PCNA ubikvitinációját⁷³. DNS-károsodás hiányában, az USP1 egy katalitikusan aktív fehérjekomplexet képez az UAF1-gyel (USP1-associated factor 1), amely szabályozza az USP1 aktivitását és a stabilitását⁷⁴. Továbbá az RFC fehérjekomplex egyik alternatív alegysége, a hELG1 (Enhanced Level of Genomic Instability 1), a PCNA-hez irányítja az USP1-UAF1 dimert, így elősegítve a PCNA deubikvitinálását ⁷⁵. UV sugárzás hatására az USP1 saját magát hasítva inaktíválódik, ez a PCNA deubikvitinálásának megszűnéséhez vezet, tehát a monoubikvitinált PCNA mennyisége megnő a sejtekben, ami TLS aktiválódásának előfeltétele^{73,76}.

2.3 A humán Spartan fehérje

A humán Spartan (vagy DVC1, C1orf124) egy multidomén fehérje, amelyet 2012-ben csoportunkkal párhuzamosan több kutatócsoport is jellemzett. Rendelkezik egy UBZ4 (Ubiquitin-Binding Zinc Finger), PIP (PCNA Interacting Protein), SHP (p97-Binding Motif), DNS-kötő régióval és egy Spr-T metalloproteáz doménnel (3. ábra).



3. ábra: A humán SPRTN doménszerkezete. UBZ4 (Ubiquitin-Binding Zinc Finger), PIP (PCNA Interacting Protein), SHP (p97-Binding Motif), DNS kötő régióval és egy Spr-T metalloproteáz doménnel ⁹⁷ Forrás: SPRTN is a mammalian DNA-binding metalloprotease that resolves DNA-protein crosslinks, Jaime Lopez-Mosqueda

A Spartan PIP doménje felelős a módosítások nélküli PCNA felismeréséért, az UBZ domén pedig az ubikvitinnel való asszociáció helye. Az SHP domén a p97 (Valosin-Containing Protein (VCP)) fehérje kötésében vesz részt. A nemrégiben azonosított DNS-kötő domén pedig az egyesszálú DNS kötésében játszik szerepet⁷⁷, az SprT domén szerepe eddig ismeretlen.

A DDT útvonlaban betöltött fontos szerepére utal, hogy hiányában a humán sejtek megnövekedett érzékenységet mutatnak DNS-károsító ágensekre, illetve UV sugárzást követően a Spartan sejtmagi fókuszokba rendeződik, melyek helyzete egybeesik a PCNA, az RPA és Rad18 által létrehozott fókuszokkal, vagyis a DNS szintézissel és a DNS léziók miatt elakadt replikációs villákkal. A Spartan ezen aktivitása nagyban függ a PIP és UBZ domének működésétől, illetve specifikus azokra a DNS-hibákra, amelyek a replikációs villák elakadását és ezáltal a PCNA monoubikvitilálását okozzák. A Spartan expressziója sejtciklus függő, az S fázisban tetőzik, jelen van G2-ben és a korai M fázisban is.

Spartan DDT-ben betöltött szerepe számos ellentmondást tartalmaz és két csoportra osztja a kutatókat. Az egyik elmélet szerint UV sugárzást követően a Spartan az elakadt replikációs villákhoz kötődik, ezt követően a PIP és UBZ doménjének köszönhetően

képes közvetlenül az ubikvitilált PCNA-hez kapcsolódni. Spartan hiányában csökken mind a monoubikvitilált PCNA mennyisége, mind pedig a DNS-károsodások helyére lokalizáló Pol η fókuszok száma. A Spartan hiányában bekövetkező elváltozásokat csak a vad típusú Spartan expressziója képes menekíteni⁷⁸⁻⁸⁰. Hasonlóan, UV sugárzás hiányában a Spartan tranzienst túltermeltetése megnövekedett számú Pol η fókusz kialakulásához vezetett. Sem az UBZ doménben mutációt hordozó Spartan expressziója, sem a mutáns PIP domént tartalmazó Spartan jelenléte nem volt hatással a Pol η által képzett fókuszok számára. Következésképpen a Spartan ubikvitin-kötő és PCNA felismerő doménje is szerepet játszik a Pol η DNS-hibához való lokalizációjában⁸⁰, és a Spartan a DNS lézióknál elősegíti a transzléziós polimeráz η működését. Továbbá Spartan stabilan csendesített sejtekben UV sugárzást követően a Rad18 fókuszok száma szignifikánsan csökkent a vad típusú sejtekhez viszonyítva. Spartan és Rad18 között stabilan csendesített sejtvonalak UV hatására megegyező érzékenységet mutattak a Rad18 stabilan csendesített sejtvonalakkal, tehát a Rad18 és a Spartan ugyanabban az útvonalban működnek⁷⁸⁻⁸⁰. Ugyanakkor a Spartan gátolja a PCNA deubikvitilációját és ezáltal fontos szerepet játszik az ubikvitilált PCNA életidejének szabályozásában is. PIP és UBZ doménjeinek köszönhetően a Spartan felismeri a kromatinhoz kapcsolt PCNA-t, és gátolja az USP1 aktivitását, amely DDT-t követően eltávolítja az ubikvitin molekulát a PCNA-ról^{80,81}.

Ezzel ellentmondásban állnak azok az eredmények, amelyek nem találtak kapcsolatot a Rad18 által végzett PCNA ubikvitiláció és a Spartan TLS-ben betöltött szerepe között. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Spartan PCNA-hez való kötődését követően, részt vesz az ubikvitin szelektív chaperon p97 toborzásában, amely később elősegíti a monoubikvitilált PCNA-ról való transzléziós polimeráz η p97-függő eltávolítását^{79,82}.

Továbbá egyes kutatások eredményei azt bizonyítják hogy a Spartan közvetlen kapcsolatban áll a replikatív polimeráz δ POLD3 alegységével és ezáltal elősegíti a replikatív polimerázok cseréjét, a hibák átírására képes transzléziós polimerázokra, így lehetővé téve a DNS-hibákon való áthaladást^{79,82}.

A Spartan a genomintegritásának megtartásában betöltött fontos szerepét bizonyítja, hogy Spartan-hiányos (knock out) egerek korai embrionális letalitást mutatnak. A Spartan hipomorf egerek életképesek, viszont ezeknél az állatoknál megfigyelhetőek a korai

öregedés jelei, a DNS-hibák halmozott jelenléte, és a genominstabilitás⁸³. Emberben a Spartan hiánya korai hepatocelluláris karcinoma kialakulásához, genominstabilitáshoz és Ruijs-Aalfs progeroid szindróma megjelenéséhez vezet⁸⁴, tehát a Spartan jelenléte és zavartalan működése nélkülözhetetlen a genom integritásának megőrzéséhez.

A Spartan doménszerkezete nagyon hasonló az élesztő *wss1* fehérje felépítéséhez, amelyről leírtak, hogy DNS-függő proteáz aktivitással rendelkezik, és ennek köszönhetően részt vesz a replikációval kapcsolt DPC eltávolításban.

3 Célkitűzések

A DNS-fehérje keresztkötések gyakran előforduló DNS léziók, pl. endogén tényezők miatt naponta akár 6000 DPC/emplősejt is kialakulhat³⁷. Nagy méretük miatt erőteljesen blokkolják a transzkripciót és a replikációt, ezáltal nagyban veszélyeztetik a genomintegritás megőrzését. Annak ellenére, hogy gyakran előforduló DNS-hibákról van szó, az eltávolítási mechanizmusukról keveset tudunk. Az általánosan elfogadott nézet szerint a DPC-k javítását a NER és HR útvonalak végzik, és a kutatásunk kezdetekor nem volt tudomásunk sajátos mechanizmusokról, útvonalakról, amelyek a DPC-k eltávolításában játszanak elsődleges szerepet. A Wss1-DNS függő metalloproteáz DPC-k eltávolításában betöltött szerepe felvetette a lehetőségét egy új eddig ismeretlen DNS-hibajavító útvonal létezésének. A humán Spartan és az élesztő Wss1 fehérjék közötti szerkezeti hasonlóságok felvetették a két fehérje közötti homológia lehetőségét.

A humán Spartan rendelkezik egy SprT metalloproteáz doménnel, melynek funkciója ezidáig ismeretlen volt. Fő célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, mi a pontos szerepe a Spartan SprT metalloproteáz doménjének és hogy részt vesz-e a DPC-k eltávolításában.

Fő célunk eléréséhez a következő specifikus célokat fogalmaztuk meg:

1. A Spartan fehérje DNS-függő proteázaktivitásának jellemzése
2. A Spartan szerepének jellemzése a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában
3. A DNS-fehérje keresztkötések kimutatására alkalmas BrdU comet technika jellemzése
4. Vad típusú Spartan jelenlétében, Spartan stabilan csendesített sejtvonalakban felhalmozódó DNS-fehérje keresztkötések mennyiségi változásának jellemzése
5. A Spartan UBZ és PIP domének jellemzése a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában
6. A Spartan SprT és a DNS-kötő domének jellemzése a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában
7. A Spartan szerepének jellemzése a DNS-fehérje keresztkötések azonnali javításában

8. A formaldehid-kezelés Spartan stabilan csendesített sejtvonalak sejtciklusára gyakorolt hatásának jellemzése
9. A Spartan és a Rad18 együttműködésének jellemzése a genomi DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában

4 Anyagok és módszerek

4.1 Humán sejt kultúrák és transzfektálás

Az embrionális vesesejtekből származó immortalizált HEK293 sejteket DMEM (Dulbeccos's Eagle Medium, (Sigma)) tápoldatban 37 °C-on növesztettük, a médium még tartalmazott 10% FBS-t (Foetal Bovine Serum, (Gibco)) és 1% antibiotikum mixet (100 µg/ml sztreptomycin szulfát és 100 U/ml penicillin). A sejtek transzfektálását Lipofectamine 2000-t (Invitrogen) reagenssel végeztük, a gyártó által ajánlott protokoll szerint.

4.2 Western blot

A fehérjék expressziós szintjét HEK293 sejtekben, western blot analízissel vizsgáltuk. A kísérlet típusától függően a transzfekciót követően 24 vagy 48 óra elteltével 2xSDS oldatban lizáltuk a sejteket, majd denaturáló poliakrilamid gélen 200 mA futtattuk. A poliakrilamid gélből a fehérjéket éjszakán át, 4 °C-on és 300 mA-on transzfer puffert (0,242% Tris, 1,117% glicin, 20% metanol) tartalmazó blottolóban nitrocellulóz filterre kötöttük. Másnap reggel 1 órán át, 4 °C-on, 5% tejport, és 1% BSA-t tartalmazó TBS Tween pufferben (150 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH 7,5, 0,05% Tween20) blokkoltuk a nitrocellulóz filtert. A filtert 4 °C-on elsődleges ellenanyaggal 1,5 órát inkubáltuk, majd 3x5 percig mostuk TBS-Tween pufferrel, amennyiben szükség volt másodlagos ellenanyagra a TBS-Tween mosást követően, a filtert másodlagos ellenanyaggal 1,5 órát inkubáltuk 4 °C-on. Ezt követően mostuk TBS-Tween pufferrel 2x10 percet, majd TBS-el (150 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH: 7,5,) ismét 10 percet. A HRP-konjugált ellenanyag detektálásához a Western Bright ECL (Advansta, DVK12045-D50) terméket használtuk, a gyártó által ajánlott protokoll szerint. A kemilumineszcencia detektálását Kodak Imager 4000MM műszerrel végeztük.

A kísérletek során a következő ellenanyagokat használtuk:

- Egér HR- konjugált anti-FLAG (Sigma, M2 A8592,1:3000)
- Egér HRP-konjugált anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology, sc-56 HRP, 1:3000)
- Nyúl anti-β-actin (Abcam, 1:300)
- Kecske, anti-nyúl IgG (DAKO, P 0448, 1:3000)

4.3 Stabilan csendesített sejtvonalak létrehozása

Spartan, illetve Spartan/Rad18 stabilan csendesített HEK293 sejtvonalak létrehozásához a sejteket specifikus, shDNS-t tartalmazó plazmidokkal transzfektáltuk. A SPARTAN shDNS a (pil2322) o2689, illetve a SPARTAN/RAD18 (pil2321) o2702. Az shDNS-t tartalmazó egyedi klónokat G418 antibiotikummal szelektáltuk.

4.4 SDS/KCl precipitációs assay a DPC eltávolítás *in vivo* követésére

SDS/KCl precipitációs kísérleteket Costa és mtsai.⁸⁵ szabadalma szerint végeztük. Az exponenciálisan osztódó HEK293 sejt kultúrákat 2 órán át 500 μ M-os formaldehid tartalmú szérummentes tápoldatban inkubáltuk. Ezt követően PBS oldatot használtunk a formaldehid eltávolítására, majd a kísérletnek megfelelően vagy összegyűjtöttük a sejteket, ez volt a nulla időpont, vagy 3, illetve 6 órát inkubáltuk szérummal kiegészített DMEM tápoldatban (3, illetve 6 órás minták). Az összegyűjtött sejteket leszámoltuk, mintánként 1×10^6 sejt mennyiséggel és három párhuzamossal dolgoztunk. A sejteltávolító oldat 2% SDS-t, 20 mM Tris-HCl-t (pH 7,5) és proteáz inhibitor (1 mM PMSF) tartalmazott. A feltárt sejteket egy éjszakán keresztül folyékony nitrogénben tároltuk. Az olvasztást követően 10 másodperc erőteljes vortexelést következett, majd 10 perc 65 °C-on melegítés. Ezt követően 0,5 ml 200 mM KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) oldatot adtunk a mintákhoz, majd 1 ml-a A csapadékképződés elősegítésére 5 percig jégen inkubáltuk a mintákat, majd 5 percig 4 °C-on és 3000xg sebességen centrifugáltuk. A felülúszót 1,5 ml-s ependorfokban tároltuk a szabad DNS mennyiségének meghatározása céljából. A csapadékot, amely a DNS-fehérje keresztkötéseket tartalmazta feloldottuk 1 ml 100 mM KCl-t és 20 mM Tris-HCl-t (pH 7,5) tartalmazó oldatban, majd 10 percig 65 °C-on inkubáltuk, ezt követően a mintákat a fentiekhez hasonlóan jégen hűtöttük, majd 4 °C-on 3000x g sebességen centrifugáltuk, ezt megismételtük összesen kétszer. A mosási lépésekből nyert felülúszókat megtartottuk, amelyek a szabad DNS frakciókat tartalmazták. Az így maradt SDS-KCl csapadékot 1 ml 100 mM KCl, 10 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl-ben (pH 7,5) oldottuk fel, ehhez adtunk hozzá Proteináz K-t 0,2 mg/ml végkoncentrációban, ezt követően 3 órán át 50 °C-on inkubáltuk. A mintákat jégen hűtöttük, majd a kicsapódott csapadékhoz 10 μ l 50 mg/ml koncentrációjú BSA-t adtunk, centrifugáltuk. Az így kinyert felülúszóból a következő módon határoztuk meg a fehérjével keresztkötött DNS mennyiségét: a mintákat 0,7%-os

töménységű etídium-bromiddal festett agarózgélen választottuk el, majd a géleket Typhoon Trio Imager (GE Healthcare) műszer segítségével kvantitáltuk. A DNS-fehérje keresztkötések mennyiségét az összes szabad DNS-hez viszonyítva, százalékosan számoltuk.

4.5 BrdU comet technika Proteináz K alkalmazásával

Exponenciális növekedési fázisban levő HEK293 sejteket növeltünk 6 lyukú lemezen, DMEM tápoldatba, amelyet kiegészítettünk: 10% FBS-sel (Fetal Bovine Serum) (Sigma), 100 µg/ml sztreptomycin szulfáttal, és 100 U/ml penicillinnel. A sejteket 24 óra múlva, különböző, már leírt ^{77,80} shRNS rezisztens N-terminális FLAG-taggel ellátott plazmid konstrukciókkal transzfektáltuk: SPARTAN(4A) pIL2854, SPARTAN(HEAA) pIL2337, SPARTAN(PIP) pIL2338, SPARTAN(UBZ) pIL2336, és SPARTAN(PIP/UBZ) pIL2339; transzfekciós reagensként Lipofectamine 2000-t (Invitrogen) használtunk, a gyártó által javasolt protokoll szerint. Másnap a sejteket szétosztottuk, és 48 órával a transzfekciót követően a tápoldatot 37 °C-os 20 µM BrdU-t tartalmazó friss DMEM tápoldatra cseréltük, amelyet 20 perc elteltével kétszer 37 °C-os 1xPBS oldattal mostunk ki. Ezt követően a kezelt minták esetében a szérummentes DMEM tápoldathoz különböző mennyiségű formaldehidet adtunk (250 µM, 500 µM, 750 µM). A formaldehid-kezelés hossza 2 óra volt, ez után ismét háromszor mostuk a sejteket 37 °C-os 1xPBS oldattal, majd vagy összegyűjtöttük vagy, amely minták esetében indokolt volt 3 órát friss DMEM tápoldatban inkubáltuk, majd ezután gyűjtöttük csak össze, és jéghideg 1xPBS oldatban szuszpendáltuk. A sejteket 5 percig 1500 rpm-n centrifugáltuk, majd 1xPBS-ben hígított 150 µM jéghideg H₂O₂-ben szuszpendáltuk, 5 percig jégen inkubáltuk, majd többször centrifugáltuk és mostuk jéghideg 1xPBS oldattal. A menekítési kísérletnél a fentiekhez hasonlóan 500 µM formaldehidet használtunk 2 órán át, ezt követte egy 3 órásregenerációs időszak szérummal kiegészített DMEM tápoldatban. Az eddigiektől eltérően a sejteket 100 µM jéghideg H₂O₂-ban szuszpendáltuk. A PBS mosásokat követően a sejteket PBS-ben oldott és előmelegített 37 °C-os 0,75%-os alacsony olvadáspontú agarózban szuszpendáltuk. A sejteket éjszakán át 4 °C-os oldatban lizáltuk, a frissen elkészített lízis oldat tartalmazott: 2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris [pH 10], 1% Triton-X-100 és 0,5% szarkozint, ehhez adtunk hozzá 1,5 óra elteltével 0,8% w/v Proteináz K-t. Másnap a lemezeket jéghideg alkalikus puffert (0,3 M NaOH,

1 mM EDTA, pH 13) tartalmazó jégbe ágyazott elektroforézis tankba helyeztük, és 40 percig állni hagytuk, hogy a DNS letekeredjen, majd 20 percig futtattuk: 1 V/cm sebességgel (25 V, 300 mA). Következő lépésként a lemezeket neutralizáló pufferrel (0,4 M Tris-HCl, pH 7,4), majd 1xPBS-el mostuk. Az immunfestés előtt blokkoltuk a mintákat (1xPBS-ben 0,1% BSA, 0,1% Tween20), majd patkány anti-BrdU elsődleges ellenanyaggal (BioRad, OBT0030G, 1:300) dobozban éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Másodlagos ellenanyagként kecske anti-patkány AlexaFluor488-t (Molecular Probes Inc, A11006, 1:400) használtunk. A képek készítését Zeiss Axioscope fluoreszcens mikroszkópon végeztük, majd a mérésekhez Komet 5.0 (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK) programot alkalmaztuk.

4.6 DNS fiber módszer

Exponenciális növekedési fázisban levő HEK293 sejteket ültettünk ki 6 lyukú csészébe, majd shRNS rezisztens N-terminálisan FLAG-taggal ellátott plazmid konstrukciókkal transzfektáltuk (SPARTAN(WT) pIL2335, SPARTAN(HEAA) pIL2337, üres vektor (pIL1440), Turbofect (Thermo Scientific) transzfekciós reagens használatával, a gyártó által ajánlott protokoll szerint. Az exponenciális növekedési fázisban levő HEK293 sejteket transzfekció után 48 órával 20 μ M jódezoxiuridin (IdU), 37 °C-on kísérlettől függően 20 vagy 30 percig jelöltünk majd kétszer mostuk előmelegített 1xPBS-el. Ismét kísérlettől függően 40 vagy 60 percig inkubáltuk, kezeletlen kontroll esetében 200 μ M BrdU, a kezelt minták esetében 200 μ M BrdU és 500 μ M formaldehid tartalmú tápoldatban. A sejteket PBS oldatban szuszpendáljuk (10^6 sejt/ml), ebből 2 μ l-t 1:2 arányban hígítunk jelöletlen sejt szuszpenzióval, majd a 15°-os szögben elhelyezett tárgylemezre cseppentjük, és lízáljuk (0,5% SDS 200 mM Tris-HCl-ban (pH 5,5), 50 mM EDTA). A lemezeket a szárítás és metanol-ecetsavval (3:1) való fixálás után, vízzel újra hidratáljuk majd 2,5 M HCl oldatban 1 órát denaturáljuk. Ezt követően a BrdU és IdU jelölés láthatóvá tétele érdekében elsődleges ellenanyagként patkány anti-BrdU (BioRad, OBT0030G, 1:300) és egér anti-IdU (BD Biosciences, 347580, 1:400) ellenanyagot, másodlagos fluoreszcens ellenanyagként pedig kecske anti-patkány AlexaFluor488-t (Molecular Probes Inc, A11006, 1:400) és bárány anti-egér Cy3-t (Sigma Aldrich, C2181, 1:400) használtunk. DAPI festést követően a képek készítését Olympus konfokális lézer szkennelő mikroszkóppal végeztük. A fiberek hosszát az Olympus

Fluoroview 2.0 szoftverrel határoztuk meg. Minden kísérletben minimum 100 független fibert mértünk le.

4.7 Áramlási citométer-alapú sejterzékenységi teszt

Exponenciális növekedési fázisban levő HEK293 sejteket ültettünk ki 6 lyukú csészébe, majd 24 óra elteltével shRNS rezisztens N-terminálisan FLAG-taggel ellátott plazmid konstrukciókkal transzfektáltuk SPARTAN(WT) pIL2335, RAD18 pIL2615, üres vektor (pIL1440). A transzfekcióhoz Lipofectamine 2000-t (Invitrogen) használtuk a gyártó által javasolt előírásokat követve. A transzfekció után 24 órával a sejteket szétszítottuk majd, újabb 24 óra elteltével 2 órán keresztül formaldehiddel (Sigma) kezeltük, majd a formaldehid eltávolítása céljából háromszor mostuk 1xPBS-el. 7 nap növesztés után a 3:1 arányban kevert GFP pozitív és negatív sejtek arányát áramlási citométer segítségével határoztuk meg (FACSCalibur, BD Biosciences). Az érzékenységi százalékot úgy számoltuk, hogy minden esetben a megfelelő kezeletlen kontrollt vettük 100%-nak.

4.8 Resazurin-alapú sejterzékenységi teszt

A fentiekhez hasonlóan itt is, exponenciális növekedési fázisban levő HEK293 sejteket ültettünk ki 6 lyukú csészébe, majd 24 óra elteltével shRNS rezisztens N-terminálisan FLAG-taggel ellátott plazmid konstrukciókkal transzfektáltuk SPARTAN(WT) pIL2335, SPARTAN(4A) pIL2854, SPARTAN(HEAA) pIL2337, üres vektor (pIL1440), a transzfekcióhoz szintén az Invitrogen által forgalmazott Lipofectamine 2000-t használtuk, a hozzá ajánlott protokollal. Egy nappal a transzfekció után, a sejteket 2 órán keresztül különböző formaldehid koncentrációjú (0 μ M, 250 μ M, 500 μ M, 1000 μ M) szérummentes DMEM-ben inkubáltuk, majd háromszor mostuk előmelegített 1xPBS oldattal. A formaldehid eltávolítása után, a sejteket feltripszineztük majd 96 lyukú csészébe koncentrációnként három párhuzamost ültettünk ki, 10000 sejt/lyuk sűrűségben, 100 μ l 10% FBS-sel (Fetal Bovine Serum) (Sigma), 100 μ g/ml sztreptomycin szulfáttal, és 100 U/ml penicillinnel kiegészített DMEM tápoldatban. Két nap növesztés után, 0,15 mg/ml resazurint (Sigma, R7017-1G) 1xPBS oldatban kevertünk 20:100 arányban DMEM tápoldathoz, ebből 100 μ l-t pipettáztunk a 96 lyukú csészében lévő sejtekre. 5 óra 37 °C-on való inkubálás után a sejtek érzékenységét 565 nm excitációs és 580 nm

emissziós hullámhosszon Fluoroscanner Ascent FL (Thermo Scientific) fluorométer segítségével mértük. A fluoreszcens jel erőssége egyenesen arányos az élő sejtek számával, a sejtek érzékenységét százalékosan fejeztük ki, az egyes sejtvonalak kalibrációs görbéinek megfelelően ⁸⁶.

4.9 Áramlási citométer alapú sejtciklus vizsgálat

HEK293 sejteket ültettünk ki 100 mm nagyságú csészébe, 10% FBS-sel (Fetal Bovine Serum) (Sigma), 100 µg/ml sztreptomycin szulfáttal és 100 U/ml penicillinnel kiegészített DMEM tápoldatban. 24 óra múlva a sejteket 2 órát kezeltük 500 µM formaldehiddel majd a formaldehid eltávolítása céljából háromszor mostuk 1xPBS oldattal. A sejteket 70%-os alkoholba összegyűjtöttük, éjszakán át –20 °C-on fixáltuk. Másnap az alkoholt 1xPBS mosás során eltávolítottuk, a sejteket szuszpendáltuk és 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk 10 µg/ml RNáz A és 20 µg/ml propídium-jodid (Sigma) tartalmú foszfát pufferben. Ezt követően BD FACSCalibur (BD Biosciences) áramlási citométeren mértünk, és CellQuest™ (BD Biosciences) segítségével kvantitáltuk.

4.10 Spartan mutánsok létrehozása

A Spartan (C1orf124) cDNS-t ImaGenes cégtől származik (kat. szám: DKFZp54N043Q). A Spartan mutánsokat mutagén PCR alkalmazásával hoztuk létre. Az ehhez szükséges oligókat az 1. táblázat és a 2. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: A használt plazmidok és plazmidokon lévő mutációk

Konstrukt neve	Mutáció	Plazmid száma
Spartan(WT)	-	pIL2325
Spartan(UBZ)	C459S	pIL2026
Spartan(PIP)	YF331,F332AA	pIL2115
SPARTAN(HEAA)	HE111,112AA	pIL2234
Spartan(UBZ-PIP)	C459S, YF331,332AA	pIL 2210
Spartan(WT) siRNS rezisztens	-	pIL2235,
Spartan(HEAA) siRNS rezisztens	HE111,112AA	pIL2236
Spartan(PIP) siRNS rezisztens	Y331A/F332A	pIL2238
Spartan(4A)	K220A K221A G222A K223A	pIL2768
Flag-Spartan(4A)	K220A K221A G222A K223A	pIL2854
FLAG-Spartan(HEAA)	HE111,112AA	pIL2337
FLAG-Spartan(PIP)	YF331,F332AA	pIL2338
FLAG-Spartan(UBZ)	C459S	pIL2336
FLAG-Spartan(PIP/UBZ)	C459S, YF331,332AA	pIL2339
FLAG-Spartan(WT)	-	pIL2336
FLAG-Rad18 siRNS rezisztens		pIL2615

2. táblázat: A Spartan mutánsok létrehozásához használt oligók

Konstrukt neve	Felhasznált oligók	
Spartan(WT)	-	
Spartan(UBZ)	5'-GCC CAG TTT CTC AGA ATG AAG TTC TGG AGT CTC-3'	5'-GAG ACT CCA GAA CTT CAT TCT GAG AAA CTG GGC-3'
Spartan(PIP)	5'-GGC AAA TGA TAC TCT AGG AGC GGC GTT GCT TAG AAC ATT TTG G-3'	5'-GGC AAA TGA TAC TCT AGG AGC GGC GTT GCT TAG AAC ATT TTG G-3'
SPARTAN(HEAA)	5'-GTA GAG ACC CTC CTG GCT GCA-3'	5'-GGC AAA TGA TAC TCT AGG AGC GGC GTT GCT TAG AAC ATT TTG G-3'
Spartan(UBZ-PIP)	5'-GGC ATG TAT CAT TGC AGC CAG GAG GGT CTC TAC-3'	
Spartan(WT) siRNS rezisztens	(5'-CTA AGC AAC TAC TTT CCG CGA GTA TCA TTT GCC AAC C-3'	
Spartan(HEAA) siRNS rezisztens	5'GGT TGG CAA ATG ATA CTC GCG GAA AGT AGT TGC TTA G-3'	5'-GGC ATG TAT CAT TGC AGC CAG GAG GGT CTC TAC-3'
Spartan(PIP) siRNS rezisztens	5'-CCA AAA TGT TCT AAG CAA CGC CGC TCC GCG AGT ATC ATT TGC C3'	5'-CCA AAA TGT TCT AAG CAA CGC CGC TCC GCG AGT ATC ATT TGC C3'

A vad típusú és mutáns Spartan fehérjék tisztításához, a Spartan cDNS-t galaktózzal indukálható N-terminálisan fúziós glutation S-transzferáz (GST) vagy Flag-taghez kapcsoltuk. Az shRNS konstrukciók létrehozásához a következő oligokat használtuk: Spartan (5'- CUA CUU UCC UAG AGU AUC A-3', 5'- GGA UGU GAG UGG GUC UGA A-3', 5'-CAA GGA UAA GUG UAA CAG U-3'), Rad18 (5'GUU CAG ACA UCA UAA GAG A-3')

4.11 Fehérjék tisztítása

A Spartan és az Mgs1 TAP (Tandem Affinity Purification) illetve a Fan1, HLTF, yRad5, Ub-PCNA, PCNA, RFC és RPA fehérjék tisztításának bővebb leírása a következő cikkekben található meg ^{87,88} A GST-fúziós fehérjék expressziójára egy proteázhiányos élesztőtörzset, a BJ5465-et és egy élesztőben fenntartható expressziós vektort (pBJ842

118) használunk. Az expressziós plazmid tartalmazza a leu2-d gént, ez szolgál a transzformánsok szelekciójára –LEU táptalajon. A plazmidban a fehérjék cDNS-e a GST kódoló régióját követi úgy, hogy a két szekvencia között a PreScission proteáz felismerő helye helyezkedik el. A fehérje expressziója éjszakán át való növesztés után 0,02% galaktózzal indukálható. 6 óra galaktóz indukció után a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (5000g, 4°C). Az élesztőt elkevertünk pufferben (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1M NaCl, 1mM dithiotreitol, 0,01% Triton X-100, 10% glicerol, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF), üveggyönggyel feltörtük, centrifugáltuk, majd a lizátumot 100 µl glutation szefaróz (Amersham) oszlopra kötöttük. A kötés után a gyöngyöket kétszer mostuk 1 ml feltáró pufferrel, majd egyszer 1 ml mosó pufferrel (20mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM NaCl, 1mM dithiotreitol, 0,01% Triton X-100, 10% glicerol, 5 mM EDTA). A fehérjéket mosóoldattal eluáltuk, amely 20 mM redukált glutationt tartalmazott, vagy éjszakán át inkubáltuk a gyöngyöket PreScission proteázzal, amely a GST epitóp és a fehérje közötti specifikus felismerő szekvenciánál levágta a tisztítani kívánt fehérjét a GST-ről így ezek oldatba kerültek, majd –80 °C-on tároltuk őket.

A hPCNA termelése és tisztítása a GST-fúziós fehérjéknél leírtakhoz hasonlóan történt, de a glutation gyöngyöt T puffer (40 mM Tris HCl pH 7,5, 10% glicerol, 0,01% NP40, valamint használat előtt: 1,5 mM EDTA, 7,15 mM béta-merkaptotanol.) + 500 mM NaCl mosás után T puffer + 150 mM NaCl oldattal mostuk. Az elúció T puffer + 150 mM NaCl-ban, PreScission proteázzal egy éjszakán át 4 °C-on történt.

4.12 Spartan enzimatis hasadásának vizsgálata

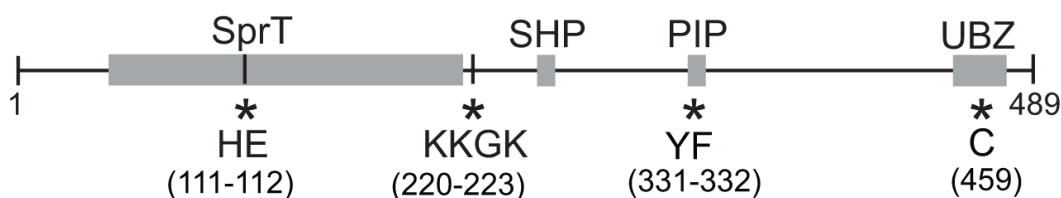
A vad típusú és a mutáns Spartan fehérjét élesztőben expresszáltuk, majd Glutation gyöngyökön tisztítottuk, az eluálást vagy glutationnal vagy a PreScission proteáz GST- és FLAG-tag közötti hasításával végeztük ⁸⁰. A proteáz reakciót 10 µl 20 mM Tris/HCl, pH:7,5, 50 mM NaCl pufferben és 0,5 µg tisztított Spartan, illetve 1 µg ΦX174 egyszálú DNS jelenlétében vagy hiányában végeztük. A reakciót 37 °C-on 2 óráig inkubáltuk, ezt követte az SDS-PAGE és a Coomassie festés, vagy Western Blot analízis anti-FLAG ellenanyaggal. A Spartan DNS-függő proteáz aktivitásának vizsgálatához 1 µg mennyiségű és különböző típusú DNS-t használtunk: ΦX174, kétszálú nikkelt Bluescript plazmid, egyszálú 75 nukleotid hosszú oligonukleotid, parciális heteroduplex 75/45nukleotid hosszú oligonukleotid.

5 Erdemények

5.1 A Spartan rendelkezik DNS-függő proteáz aktivitással

A Spartan öt különböző, jól elkülöníthető doménnel rendelkezik: az N-terminális végén elhelyezkedő úgynevezett metalloproteáz-szerű domén vagy SprT, az újonnan jellemzett DNS-kötő domén (KKGK), az SHP domén, a PCNA-vel kapcsolatba lépő PIP domén, és a C-terminálisan elhelyezkedő ubikvitin-kötő domén (UBZ). Ezek közül a PIP és az UBZ domének funkciója nagyrészt ismert, viszont keveset tudunk az SprT és a DNS-kötésben résztvevő domének szerepéről (4.ábra).

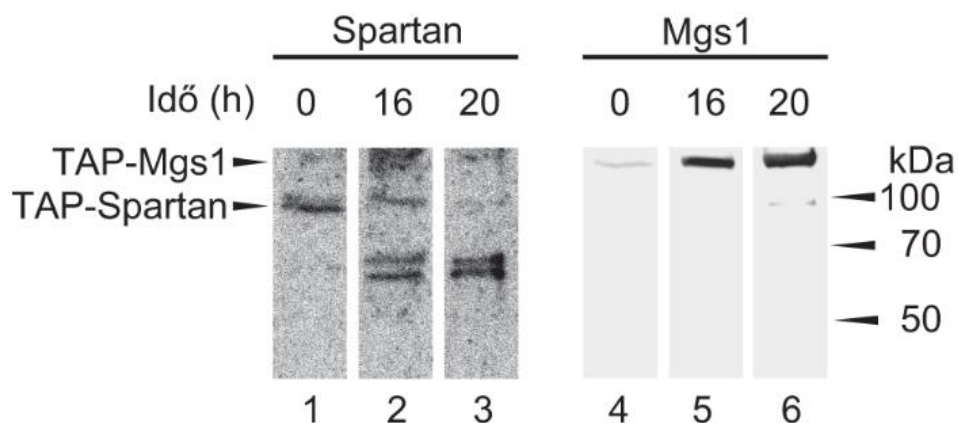
H. sapiens Spartan



4.ábra: A humán Spartan doménszerkezete és a doménekben létrehozott mutációk helye.

A csillaggal jelölt aminosavakat alaninokra cseréltük. SprT-metalloproteáz-szerű doménben eredeti: HE, módosított: AA, továbbiakban Spartan(HEAA), SHP domén, DNS kötésben résztvevő doménben eredeti: KKGK, módosított: AAAA, továbbiakban Spartan(4A), PIP-PCNA-vel kapcsolatba lépő doménben eredeti: YF, módosított: AA, továbbiakban Spartan(PIP), UBZ-Ubikvitin- kötő doménben eredeti: C módosított: S, továbbiakban Spartan(UBZ) mutáns.

Előző munkáink során⁸⁰ a Spartan csendesített sejteken különböző Spartan mutánsokkal végzett menekítési kísérletekben megfigyeltük, hogy az UV által okozott károkat az SprT doménben pontmutációkat hordozó, Spartan(HEAA) fehérje nem képes menekíteni. A domén pontos funkciójának meghatározása azonban eddig nem sikerült.



5.ábra: A Spartan humán sejtextraktumban való gyors bomlásának bemutatása anti-FLAG ellenanyaggal végzett Western Blot analízisen. Az 1. és 4. oszlopokban megjelenő teljes sejtextraktumok, amelyek tandem affinity epitóppal elátott Spartant vagy kontrollként Mgs1-t stabilan expresszálnak. A 16 (2,5) és 20 (3,6) óra eltelte után gyöngyökön tisztított mintákon anti-Flag ellenanyaggal megfigyelhető a Spartan bomlása.

Célunk az volt, hogy *in vitro* biokémiai módszerekkel kimutassuk a Spartan proteáz aktivitását. Első alkalommal a Spartannal kapcsolatba lépő fehérjék azonosítása során figyeltük meg, hogy a stabilan expresszáló humán sejtekből tisztított TAP-epitóppal ellátott Spartan a tisztítás folyamán a TAP-Mgs1-el ellentétben a sejtextraktumban nagyon gyorsan lebomlik (5. ábra)

Az *in vitro* kísérletek elvégzéséhez szükségünk volt nagy mennyiségű és nagy tisztaságú fehérje preparátumokra, amelyet élesztőből tisztítottunk. Ezek tisztítása során is megfigyeltük a Spartan gyors bomlását, viszont a fehérje stabilitása jelentősen megnőtt, ha a lizátumhoz DNáz-t adtunk. A Spartan(4A) mutáns, amelyben a DNS kötésért felelős KKGK aminosavakat AAAA-ra cseréltük, és ezáltal a DNS kötésében jelentős funkcióvesztést mutatott, a tisztítás során láthatóan stabilabb, mint a vad típusú Spartan (6. ábra).

A fenti eredmények alapján a további kísérletek elvégzéséhez szükséges tisztított vad típusú Spartan és Spartan(4A) mutáns fehérjék mennyiségének és tisztaságának megőrzése érdekében DNáz-t adtunk a fehérjepreparátumokhoz és így 4 °C-on hűtőben tároltuk. Későbbiekben a 7. ábrán látható fehérje preparátumokkal dolgoztunk, tisztított GST-FLAG-Spartan és GST-FLAG-Spartan(4A) fehérjéket (GST: 26 kDa, FLAG: 1kDa,

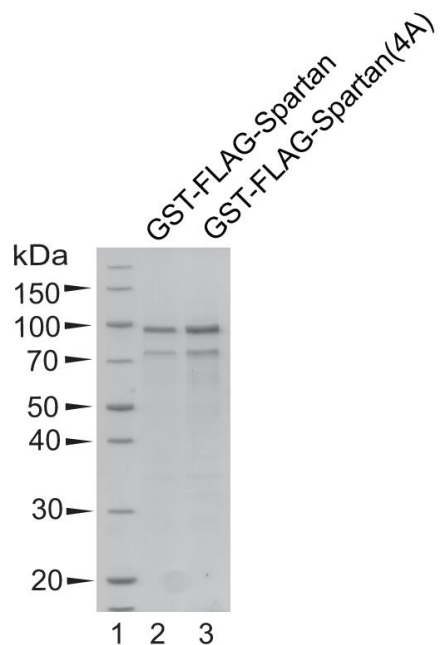
Spartan: 55 kDa; $\approx$ 82 kDa) gélelektroforézissel 8%-os denaturáló poliakrilamid gélen választottuk el és comassie késsel festettük.



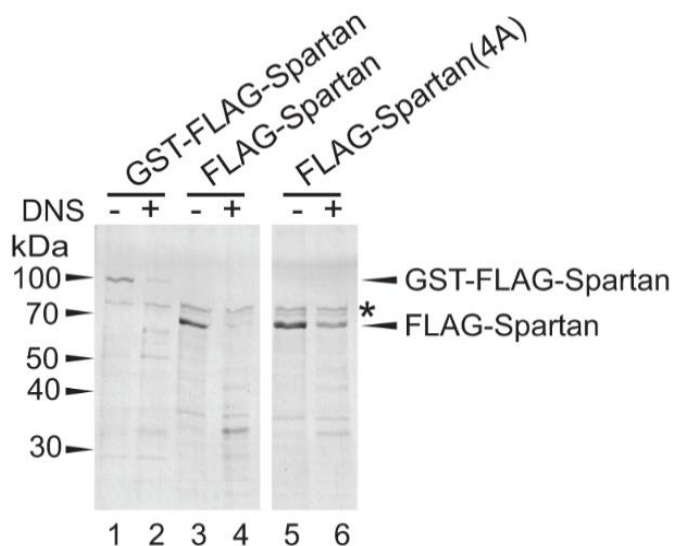
6. ábra Spartan proteáz aktivitása DNS-függő módon megy végbe. Élesztőben expresszált GST-FLAG-Spartan (oszlop 1-8), illetve Spartan(4A) (oszlop 9-12) sejtizátumokat különböző ideig 20 °C-on inkubáltuk. Az 5-8 oszlopokban bemutatott mintákhoz DNáz-t adtunk. A Spartan stabilitását Western Blot analízisben anti-FLAG ellenanyag használatával követtük.

A SprT doménben pontmutációkat hordozó, és ezáltal csökkent proteáz aktivitással rendelkező Spartan(HEAA) fehérjéből nem sikerült megfelelő mennyiségű és tisztaságú fehérjét tisztítani, ezért ezzel a fehérjével nem tudtuk elvégezni az *in vitro* kísérleteket.

A fenti eredményekből arra következtetünk, hogy a Spartan stabilitása erősen függ a DNS jelenlététől. Ennek megerősítésére az előzőleg DNáz kezelésen átesett, DNS hiányában stabil fehérjékhez egyesszálú DNS-t adtunk, majd poliakrilamid gélelektroforézis segítségével méretük szerint elválasztottuk a fehérjéket. A kísérlet eredménye azt mutatta, hogy a vad típusú, GST-taggal ellátott Spartan ugyanúgy, mint a Flag-Spartan (sem a GST sem a FLAG nem befolyásolja a Spartan viselkedését) DNS mentes környezetben nem mutat proteáz aktivitást, de ha a reakcióhoz hosszú egyesszálú DNS-t adtunk, a fehérje teljesen lebomlott. A párhuzamosan vizsgált Spartan(4A) mutáns a vad típusú Spartan fehérjénél DNS jelenlétében is gyengébb proteáz aktivitással rendelkezett (8 .ábra).



7. ábra: A tisztított fehérje preparátumok tisztaságát bemutató SDS-PAGE gél elektroforézis Coomassie brillantkékkel megjelenítve



8. ábra: A Spartan DNS függő proteáz aktivitásának kinetikája. 2 órán keresztül 37 °C-on történő inkubálást követően DNS jelenlétében és hiányában (Φ X174 ssDNS) a GST-FLAG-Spartan, FLAG-Spartan és FLAG-Spartan(4A) tisztított fehérjék proteáz aktivitását bemutató Coomassie brillantkékkel megjelenített SDS-PAGE elektroforézis.

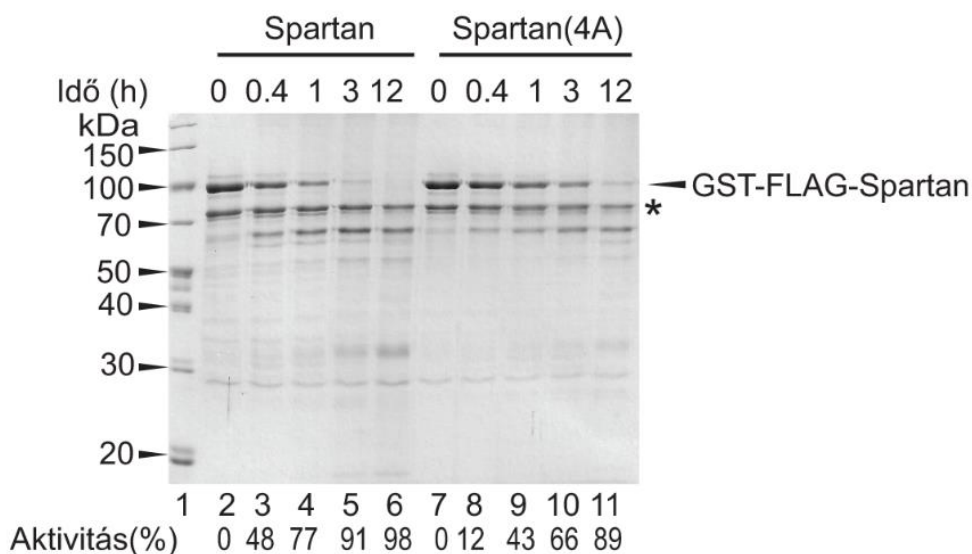
*Egy ismeretlen, Spartannal együtt tisztuló fehérje

Következő lépésként DNS jelenlétében megvizsgáltuk a két fehérje aktivitásának sebességét. A fehérjék proteáz aktivitásának kinetikáját, 0, 0,4, 1, 3, és 12 óra elteltével

mértük. Eredményeink azt mutatják, hogy amíg a vad típusú Spartan 1 óra elteltével 77%-os aktivitást mutatott, addig a Spartan(4A) esetében csak 43%-os aktivitást mértünk (9. ábra).

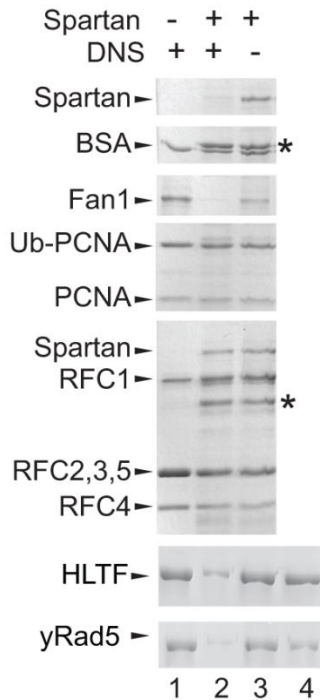
A két fehérje aktivitását DNS jelenlétében összehasonlítva azt kaptuk, hogy a vad típusú fehérje sokkal erőteljesebb aktivitással rendelkezik, mint a DNS-kötő régióban mutációt hordozó Spartan(4A) (9. ábra). *In vitro* biokémiai kísérleteink eredményei alapján kijelenthetjük, hogy a Spartan rendelkezik egy DNS-függő proteáz aktivitással, és ezáltal képes enzimatikusan emészteni önmagát.

Megvizsgáltuk a Spartan képes-e más fehérjék DNS-függő enzimátikus emésztésére is, vagy csak önmagát képes proteolitikusan emészteni. A kérdés megválaszolására biokémiai eszközökkel, DNS jelenlétében és hiányában egyaránt vizsgáltunk Spartannal interakcióba lépő több fehérjét is.



9. ábra: A Spartan (2-6. minta) és a Spartan(4A) (7-11. minta) fehérjék proteáz aktivitásának időbeli kinetikája Φ X174 egyesszálú DNS jelenlétében. A tisztított fehérjéket Φ X174 egyesszálú DNS jelenlétében és hiányában különböző ideig inkubáltuk, majd Western Blot analízist végeztünk. A fehérjék aktivitását Imager J segítségével határoztuk meg. A számok a Spartan aktivitását jelentik százalékban kifejezve.

*Egy ismeretlen Spartannal együtt tisztuló fehérje

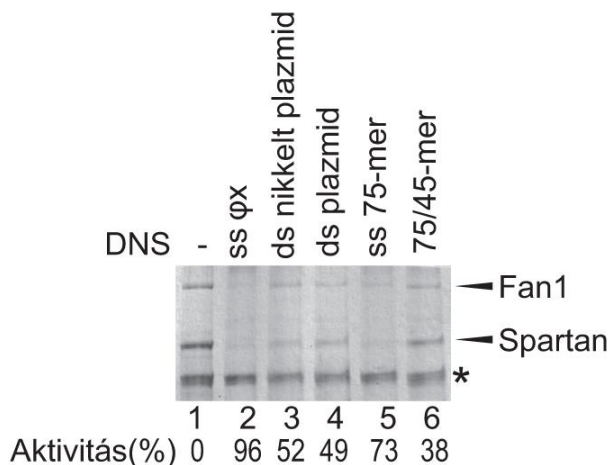


10. ábra: Spartan DNS-függő módon emészt a DNS kötő fehérjéket. Fan1, HLTF, Rad5, BSA, PCNA, ubikvitin-PCNA, és RFC tisztított fehérjéket inkubáltunk 2 óráig 37 °C-fokon Spartan és Φ X174 egyesszájú DNS jelenlétében és hiányában. A kontroll reakció az alsó két panel utolsó, 4. oszlopában látható, a reakció elegy a reakció minden összetevőjét tartalmazza, és elkészítése után azonnal forralva volt. *Egy ismeretlen Spartannal kapcsolatos tisztuló fehérje

A kísérlet eredményét a 10. ábra foglalja össze, amelyen látható, a Spartan nem csak önmaga DNS-függő proteolitikus emésztésére képes, hanem számos más DNS-kötő fehérjét is emészt, mint például a Fan1, HLTF és yRad5 míg a BSA, PCNA és RFC fehérjéket nem hasította. Ugyanakkor a kísérletből az is kiderül, hogy a DNS-hez nagy affinitással kötődő fehérjék, mint például az RPA és RFC koncentrációfüggő módon gátolják az Spartan aktivitását.

In vitro eszközökkel azt is megvizsgáltuk, hogy a Spartan milyen típusú DNS struktúrát köt nagyobb affinitással. A kísérlet eredményeit a 11. ábra foglalja össze, amelyen látható, hogy különböző típusú DNS jelenléte különböző hatással van a fehérje proteáz aktivitására. A legnagyobb hatást a Φ X174 egyesszájú DNS váltotta ki, ugyanakkor hasonló effektív hatást mutatott az egyesszájú 75 bázispár hosszúságú oligonukleotid szakasz, míg a kettősszájú, illetve bevágott plazmid DNS, és a 75/45 bázispár hosszúságú parciális heteroduplex alig váltott ki hatást.

Ezen eredményeket összefoglalva valószínűsíthető egy olyan modell, ahol a Spartan az elakadt replikációs villa során kialakuló egyesszálú DNS-t köti, majd a proteáz aktivitása révén képes eltávolítani néhány DNS-hez kötött fehérjét.



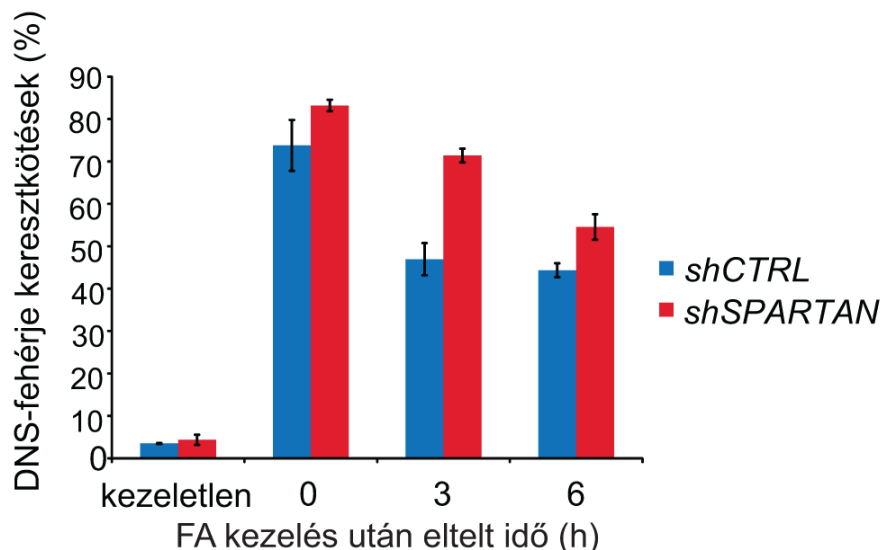
11. ábra: A Spartan különböző DNS struktúrák által kiváltott aktivitása. Tisztított Spartan és Fan1 fehérje keverékét inkubáltuk 2 órán át 37 °C-on különböző struktúrájú DNS (ΦX174 egyesszálú DNS, bevágott plazmid DNS, plazmid DNS, 75 bázispár hosszúságú oligonukleotid, 75/45 bázispár hosszúságú partciális heteroduplex oligonukleotid, 100 ng/μl koncentrációban) jelenlétében vagy hiányában. A hasítás mértéke százalékban a Fan1 és Spartan DNS nélküli mintában mért arányához viszonyítva van kifejezve.

*Egy ismeretlen Spartannal együtt tisztuló fehérje

5.2 A Spartan fehérjének szerepe van a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában

Biokémiai kísérletekkel sikerült kimutatnunk, hogy a Spartan rendelkezik egy DNS-függő proteáz aktivitással, és nem csak önmagát, hanem más DNS-kötő fehérjéket is képes emészteni. Továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a Spartan újonnan felfedezett aktivitása, milyen hatással van a DPC-k eltávolítására.

A Spartan DPC eltávolításában betöltött esetleges szerepének kimutatására *in vivo* SDS-KCl fehérjeprecipitációs technikát használtunk, melynek lényege a genomi DNS elválasztása, szabad DNS, illetve DNS-fehérje keresztkötéseket tartalmazó frakciókra. A DNS-fehérje keresztkötések létrehozására 2 órás formaldehid kezelést alkalmaztunk, majd a sejteket keresztkötő ágens eltávolítása után 3, illetve 6 órát szérummal kiegészített DMEM tápoldatban növesztettük. Ezt követően határoztuk meg a sejtek DPC tartalmát, amely a formaldehid kezelés következményeként a kezeletlen mintákhoz hasonlóan jelentős növekedést mutatott.



12. ábra: A Spartan *in vivo* szerepe a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában. A felhalmozódó DNS-fehérje keresztkötések mennyiségét 2 óra 500 μ M formaldehid (FA) kezelés után 0, 3, és 6 órával SDS/KCl precipitációs módszerrel Spartan stabilan csendesített (shSPARTAN) és kontroll (shCTRL) sejtvonalakban vizsgáltuk. A különböző DNS frakciókat Image J szoftver segítségével mértük, majd a DNS-fehérje keresztkötések mennyiségét a teljes DNS frakció, százalékaként fejeztük ki. Három független kísérlet eredményét ábrázoltuk. Hibaszávok a $\pm$ standard hibát jelölik

Valamint a kezelés után 3, illetve 6 óra elteltével a Spartan stabilan csendesített sejtvonalakban jelentős DPC felhalmozódás figyelhető meg a kontroll, illetve a Spartant expresszáló mintákhoz viszonyítva (12. ábra). Ezen eredmények alapján, kimondható, hogy a Spartan *in vivo* szerepet játszik a DNS–fehérje keresztkötések eltávolításában.

5.3 DNS–fehérje keresztkötések kimutatására alkalmas BrdU comet technika jellemzése

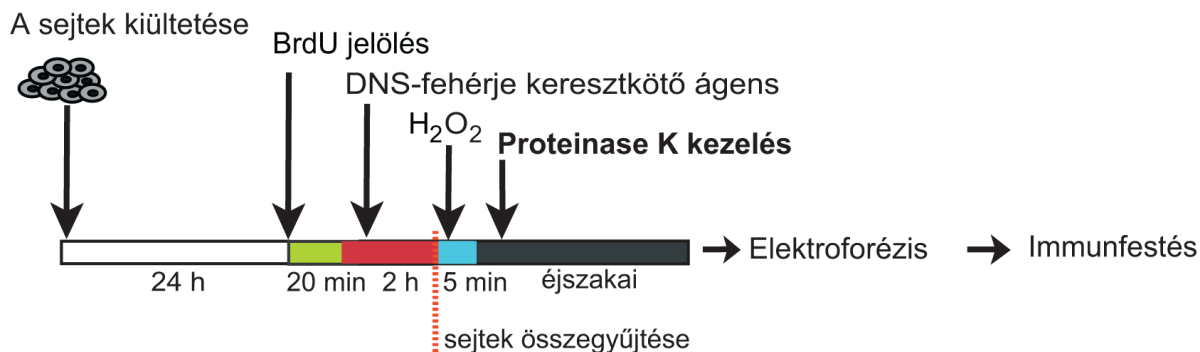
Az 5.1 és 5.2 fejezetekben ismertetett kísérleti elrendezések eredményeiből láttuk, hogy a Spartan a *wss1*-hez hasonlóan rendelkezik egy DNS-függő proteáz aktivitással, és a Spartan hiányában, formaldehid kezelést követően, a sejtekben lévő DNS–fehérje keresztkötések mennyisége megnövekedett a kontrollhoz képest. Ugyanakkor több kutatócsoport eredményei is bizonyították, hogy UV kezelést követően a Spartan fontos szerepet játszik az elakadt replikációs villák menekítésében, és ezáltal a genom integritásának megőrzésében ⁷⁷⁻⁸⁰. Ezen eredmények alapján valószínűsítettük, hogy a Spartan fontos szerepet tölthet be a DNS–fehérje keresztkötéseket tartalmazó DNS szakaszok replikációjában.

Hipotézisünk *in vivo* vizsgálatához, szükségünk volt egy olyan módszerre, amellyel el tudjuk különíteni és láthatóvá tudjuk tenni az S fázisban lévő sejteket, és ezekben az S fázisban lévő sejtekben tudjuk mérni a DNS-fehérje keresztkötések mennyiségét. Célunk elérésének érdekében a BrdU comet módszert, amely a BrdU jelölés miatt S fázis specifikus, Proteináz K kezeléssel egészítettük ki, így lehetővé vált a DNS-fehérje keresztkötések mennyiségének kimutatása S fázisban.

A comet módszer egy olyan, széleskörben használt egysejt elektroforézis, ami lehetővé teszi a DNS-törések, a DNS-fehérje keresztkötések és a DNS-DNS keresztkötések kimutatását és mennyiségi meghatározását. Comet technika eltérő változatai, különböző DNS-törések és -keresztkötések meghatározására és mérésére alkalmasak.

Például az alkalikus comet módszer alkalmazásával kimutathatóak, mind az egyesszájú és kettősszájú DNS-törések, mind pedig az alkáli labilis helyek (ALS). Neutrális körülmények között a kettősszájú DNS-törések mennyiségének mérésére alkalmas a technika. A módszer során a tápoldathoz rövid ideig BrdU timinanalógot adva, a timin helyett a sejtek a BrdU-t építik be a genomba és ennek köszönhetően lehetővé válik az újonnan szintetizált DNS szál elkülönítése, azaz az S fázisban történő DNS szintézis⁸⁹. Standard alkalikus körülmények között, gélelektroforézist követően a keresztkötések, az intakt DNS-hez hasonlóan alacsony mobilitást mutatnak. Ez a kísérleti elrendezés nem teszi lehetővé a DNS-DNS és a DNS-fehérje keresztkötések megkülönböztetését, hanem a két típusú keresztkötés együttes kimutatására alkalmas.

A csoportunk által kidolgozott és publikált ⁸⁹ bromodeoxyuridin (BrdU) comet módszert, Proteináz K emésztéssel egészítettük ki, így növelve a módszer specificitását a DNS-fehérje keresztkötések irányába. Mivel az irodalomban nem ismert olyan DNS-károsító ágens, ami csak kizárólag DNS-fehérje keresztkötéseket indukál, hanem ezek az ágensek a DNS-fehérje keresztkötések mellett még más DNS-károsodásokat is létrehozhatnak, ezért formaldehid-kezelés után egyszerű BrdU comet módszer alkalmazásával nem lehet elkülöníteni a DNS-fehérje keresztkötések okozta hatást a többi károsodástól. Erre a problémára jelentett megoldást a Proteináz K, amely enzimatis utón eltávolítja a keresztkötött fehérjét a DNS-ről. A Proteináz K-t előzőleg az irodalomban már használták formaldehid-indukált keresztkötések mennyiségi meghatározására ^{90,91}.



13.ábra: Proteináz K kezeléssel kiegészített BrdU comet technika sematikus ábrázolása.

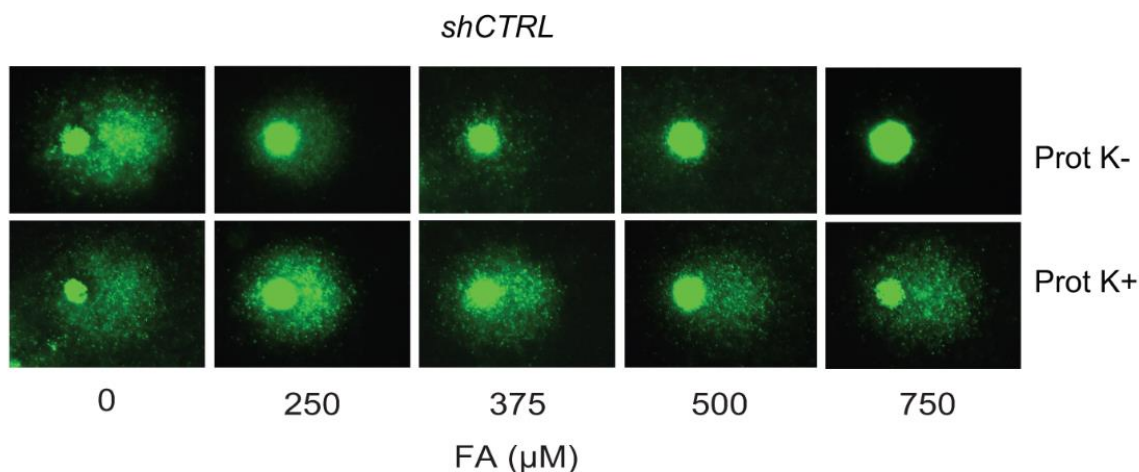
2 óra formaldehid kezelést megelőzően, 20 percig BrdU-val jelöltük az exponenciális növekedési fázisban lévő HEK 293 sejteket. Ezt követően a sejteket összegyűjtöttük, majd H_2O_2 használatával DNS szártöréseket indukáltunk. Az elektroforézis és immunfestés előtt a párhuzamos mintákat kettéválasztottuk, az egyik mintát Proteináz K-t tartalmazó lízis pufferbe, a másikat Proteináz K mentes lízis oldatban kezeltük. Ezt követte az egy sejt elektroforézis majd az immunfestés.

Tehát BrdU jelölést használtunk az újonnan szintetizált DNS szakaszok elkülönítéséhez. A formaldehid indukált DNS–fehérje keresztkötések mennyiségét az elektroforézis ideje alatt kisebb mobilitással rendelkező, úgynevezett csóva DNS méretének változása mutatja. A keresztkötött és a nem károsított intakt DNS megkülönböztetésére H_2O_2 kezelést alkalmaztunk, amely egyesszalú DNS töréseket indukál, és ez által a nem keresztkötött szabad DNS az elektroforézis során nagyobb mobilitást mutat, így jobban elkülönül a keresztkötött DNS-től.

Hogy a comet módszer specificitását és érzékenységét növeljük a DNS-fehérje keresztkötések irányába, és elkülönítsük a DNS-fehérje keresztkötéseket és a DNS-DNS keresztkötéseket, a formaldehiddel és H_2O_2 -vel kezelt mintákat két részre osztottuk: az egyik lemezt Proteináz K-t tartalmazó, a másik lemezt Proteináz K-t nem tartalmazó lízis pufferbe helyeztük. A lízis pufferben lévő Proteináz K eltávolítja a DNS-hez keresztkötött fehérjéket. Miután a Proteináz K peptidáz aktivitásának köszönhetően a keresztkötött fehérjék eltávolításra kerültek, a fehérjementessé vált DNS szakasz, nagyobb mobilitással rendelkezik gélelektroforézis során. Így lehetővé válik a DNS-fehérje keresztkötések elkülönítése a DNS-DNS keresztkötésektől. Tehát a Proteináz K-val kezelt vagy kezeletlen, de formaldehiddel és H_2O_2 -vel egyaránt kezelt minták közötti különbség mutatja a DNS-fehérje keresztkötések mennyiségét. Azaz, egy adott mintában lévő DNS–fehérje keresztkötések mennyiségét úgy kapjuk meg, hogy a Proteináz K-val

kezelt (Prot K+) minták comet csóva százalékos DNS tartalma és a Proteináz K-val nem kezelt (Prot K-) minták comet csóva százalékos DNS tartalma közötti különbség kiszámoljuk.

A módszer lépéseit részletesen a 13. ábra foglalja össze. Röviden, az S fázisban lévő sejtek elkülönítése érdekében BrdU-jelölést végeztünk, majd formaldehid kezeléssel DNS-fehérje keresztkötéseket hoztunk létre. Mivel mind a keresztkötött, mind pedig az intakt DNS alacsony mobilitási értéket mutat és ennek következtében nem különíthetők el. H₂O₂ kezelést alkalmaztunk, amely egyesszálú DNS törések létrehozásával növeli a DNS mobilizációját, és ezáltal lehetővé teszi az intakt és a keresztkötött DNS megkülönböztetését. A kezelés után a sejteket alacsony olvadáspontú agarózba ágyasztuk majd azonnal lizáltuk, hogy megakadályozzunk a H₂O₂ által okozott DNS károsodások kijavítását.



14. ábra: Különböző formaldehid koncentrációkkal végzett, Proteináz K kezeléssel kiegészített BrdU comet kísérlet eredményének bemutatása. A kontroll sejtvonalat bemutató képeken (shCTRL) 2 h formaldehid kezelés után, megfigyelhető a Proteináz K-val kezelt (Prot K+) minták esetében a csóva DNS mennyisége sokkal nagyobb, mint a Proteináz K-val nem kezelt mintáké (Prot K-), ugyan is a Proteináz K peptidáz aktivitása révén eltávolítódnak a DNS-hez keresztkötött fehérjék, és az így szabaddá vált DNS szakaszok nagyobb mobilitással rendelkeznek elektroforézis során.

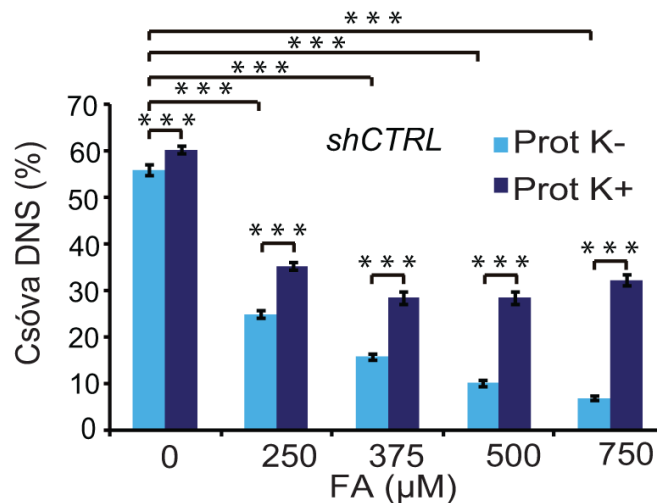
Az általunk módosított módszer hatékonyságát, érzékenységét és specificitását növekvő formaldehid koncentráció alkalmazásával vizsgáltuk. A 14. ábrán megfigyelhető, hogy a kontroll HEK293 sejtvonal a növekvő formaldehid koncentrációnak megfelelően a Proteináz K-val nem kezelt minták esetében csökken a csóva DNS mennyisége. 250 μM formaldehid kezelést követően Komet szoftvert használva 25% csóva DNS-t mértünk,

375 μ M formaldehid-kezelés után már 20% alatt van a csóva DNS mennyisége. Tehát, a növekvő formaldehid koncentrációval a comet csóva DNS mennyisége csökken.

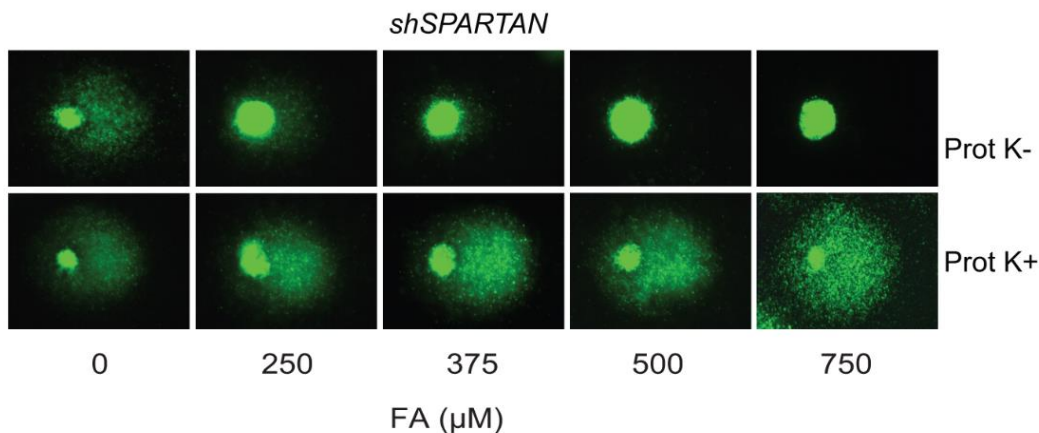
Továbbá a módszer érzékenységét bizonyítja az is, hogy a DNS-fehérje keresztkötések mennyiségét mutató Proteináz K-val kezelt (Prot K+) minták comet csóva százalékos DNS tartalma és a Proteináz K-val nem kezelt (Prot K-) minták comet csóva százalékos DNS tartalma közötti különbség jól korrelál a növekvő alkalmazott formaldehid koncentrációval (15. ábra) A kontroll sejtvonalon végzett és a 14-15. ábrákon bemutatott kísérletek eredményei azt bizonyítják, hogy a BrdU comet módszer Proteináz K kezeléssel kiegészítve alkalmas a replikáció során jelenlévő DNS-fehérje keresztkötések tartalmának kimutatására és mennyiségi mérésére.

Következő lépésként, DPC specifikus BrdU comet technika és stabilan Spartan specifikus shRNS-t expresszáló HEK293 Spartan csendesített sejtvonalat használva, megvizsgáltuk a humán Spartan replikálódó DNS szakaszokon lévő DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában betöltött szerepét.

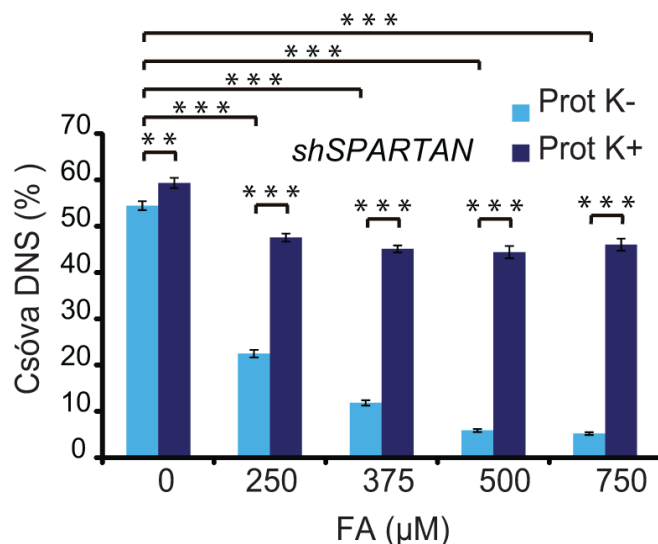
A kontroll sejtvonalhoz hasonlóan, a Spartan csendesített sejtvonalban is a növekvő formaldehid koncentráció csökkenő comet csóva DNS mennyiséget okoz (16. ábra). Továbbá, ugyanazon formaldehid koncentráció a Spartan csendesített sejtvonal esetében kisebb csóva DNS mennyiséget mutat, mint a kontroll minta esetében. Spartan hiányában 250 μ M formaldehid kezelést követően 20%-os csóva DNS mennyiséget kapunk, míg hasonló formaldehid koncentrációnál a kontroll sejtvonal esetében 25% volt, 375 μ M alkalmazott formaldehid koncentrációnál Spartan csendesítés esetén 15% csóva DNS mennyiséget mértünk, míg a kontrol sejtvonal esetében ez az érték 20% volt. (17. ábra).



15. ábra: A 14. ábrán bemutatott comet kísérlet eredménye grafikusan ábrázolva. A grafikonon három független kísérlet eredménye látható, a hibasávok a $\pm$ standard hibát jelölik. Statisztikai analíziseket Student t-próbával végeztük, illetve a statisztikailag szignifikáns különbséget *** jelöltük. ($P < 0,001$)



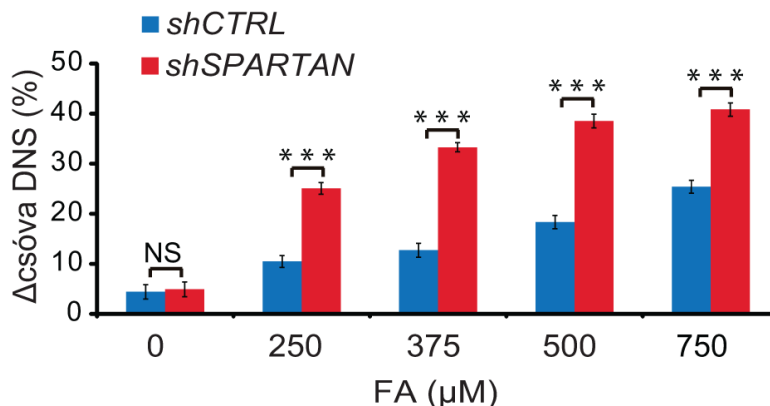
16. ábra: Különböző formaldehid koncentrációkkal elvégzett Proteináz K kezeléssel kiegészített BrdU comet kísérlet. Spartan stabilan shRNS-t expresszáló sejtvonalon (shSpartan) 2 óra formaldehid-kezelés után végzett comet kísérlet. A képeken látható a Proteináz K kezeletlen (Prot K-) minták esetében a növekvő formaldehid koncentráció által okozott csökkenő csóva DNS mennyiség, valamint az a mintákon alkalmazott Proteináz K kezelés hatására megnövekedett csóva DNS mérete



17. ábra: Stabilan Spartan shRNS-t expresszáló sejtvonalon végzett és a 16. ábrán bemutatott Proteináz K kezeléssel kiegészített BrdU comet kísérlet kvantitatív eredménye. A grafikonon három független kísérlet eredménye látható, a hibasávok a $\pm$ standard hibát jelölik. Statisztikai analíziseket Student t-próbával végeztük, valamint a statisztikailag szignifikáns különbséget *** jelöltük. ($P < 0,001$)

A stabilan csendesített kontroll és stabilan csendesített Spartan sejtvonal között, sokkal szembetűnőbb a különbség a Proteináz K-val kezelt minták esetében. A jobb átláthatóság érdekében kiszámoltam a Proteináz K-val kezelt és kezeletlen minták csóva DNS mennyiségének különbségét, amit a továbbiakban Δ csóva DNS-nek nevezek és százalékban fejezek ki. Ez az érték mutatja a DNS-fehérje keresztkötések mennyiségét az egyes mintákra vonatkoztatva.

A 18. ábrán megfigyelhető, hogy az alkalmazott 250 μ M és 750 μ M közötti formaldehid koncentrációk minden esetben a kontroll sejtvonalhoz képest szignifikánsan magasabb Δ csóva DNS mennyiségeket eredményeztek a Spartan stabilan csendesített sejtvonalban. 250 μ M formaldehid alkalmazása után a Δ csóva DNS mennyisége duplázódik Spartan hiányában, ez a különbség még szembetűnőbb lesz 375 μ M és 500 μ M formaldehid esetében. Ez azzal magyarázható, hogy Spartan hiányában a DPC-k felhalmozódnak mivel eltávolításuk kevésbé hatékonyan történik.

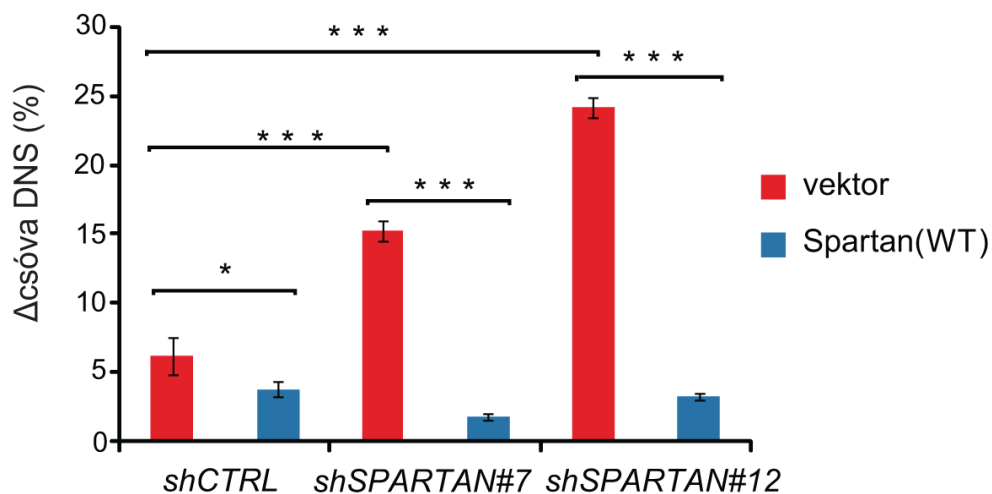


18. ábra: Stabilan Spartan vagy kontroll shRNS-t expresszáló sejtvonalon végzett Proteináz K kezeléssel kiegészített BrdU comet kísérlet kvantitatív eredményeiből számolt és százalékban kifejezett Δcsóva DNS mennyiségek. A hibásávok a $\pm$ standard hibát jelölik, melyek oszloponként legkevesebb 300 különböző mérési adatból lettek számolva. Statisztikai analíziseket Student t-próbával végeztük, valamint a statisztikailag szignifikáns különbséget *** jelöltük. ($P < 0,001$), NS-nem szignifikáns. A grafikonon a 15-17. ábrán látható kísérletek eredményét összesítettük.

5.4 A vad típusú Spartan jelenlétében Spartan stabilan csendesített HEK293 sejtvonalakban felhalmozódó DNS-fehérje keresztkötések mennyiségi változása

Annak igazolására, hogy a Spartan csendesített HEK293 sejtvonalban kimutatott, kontroll sejtvonalhoz viszonyított DPC akkumuláció, valóban a Spartan fehérje hiányának tulajdonítható, és nem más, Spartantól független hatásnak, Proteináz K kezeléssel kiegészített BrdU Comet kísérletet végeztünk. A kísérletet két független Spartan shRNS-t stabilan expresszáló HEK293 klónon is elvégeztük (shSpartan#7, shSpartan#12). A sejtvonalakban N-terminálisan FLAG-taggel ellátott vad típusú Spartant expresszáltunk majd 2 órás formaldehid kezelést követően 100 μM H_2O_2 -t alkalmaztunk, illetve 0 és 3 óra elteltével is vizsgáltuk a DNS-fehérje keresztkötések mennyiségének változását az említett sejtvonalakban.

Kísérleteink azt mutatják, hogy a Spartan fehérje jelenléte megszüntette a DNS-fehérje keresztkötéseket felhalmozódását mindkét Spartan csendesített sejtvonalban, tehát az előzőekben kimutatott elváltozások a Spartan hiányának tulajdoníthatók. Továbbá azt is megfigyeltük, hogy a kontrollhoz viszonyítva az ektopikusan expresszált Spartan tovább csökkenti a DNS-fehérje keresztkötések számát, ($\Delta\text{csóva DNS}$ mennyisége csökken) ami azzal magyarázható, hogy keresztkötések eltávolításának hatékonysága valószínűleg összefügg a jelenlévő fehérje mennyiségével (19. ábra).



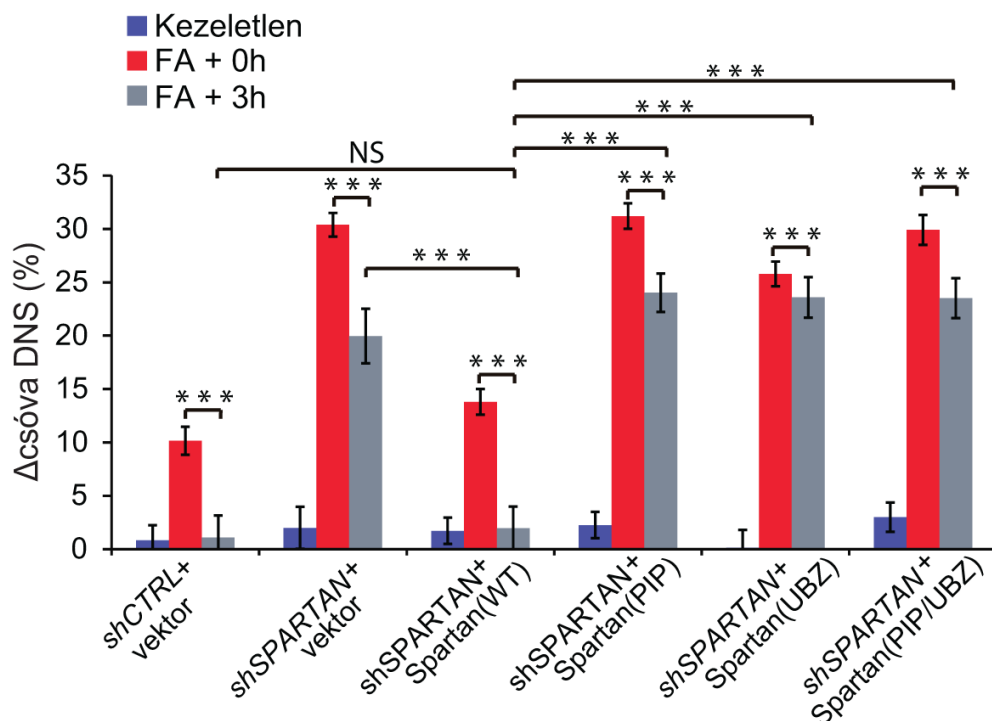
19. ábra: shSPARTAN-t stabilan expresszáló HEK 293 sejtekben végzett comet kísérlet. shSPARTAN-t stabilan expresszáló HEK 293 sejteket transzfektáltunk csendesítésre rezisztens Spartan fehérje konstrukttal, majd comet kísérletet végeztünk. A Spartan-hiányos sejtekben az ektopikusan termelt csendesítésre rezisztens Spartan fehérje megszüntette a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában jelentkező hibákat. A hibasávok a $\pm$ standard hibát jelölik, melyek három független kísérlet eredményeiből számoltunk, kísérleteként 100 mérési adatból. Statisztikai analíziseket Student t-próbával végeztük, valamint a statisztikailag szignifikáns különbséget *** jelöltük ($P < 0,001$), * nem szignifikáns.

5.5 Az UBZ és PIP doméneknek szerepe van a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában

A Spartan ubikvitin (UBZ) illetve PCNA-kötő (PIP) doménjének DPC eltávolításában betöltött szerepének vizsgálatához shRNS rezisztens PIP, UBZ és PIP/UBZ mutáns Spartan fehérjét expresszáltunk a HEK293 Spartan stabilan csendesített sejtvonalon, majd Proteináz K kezeléssel kiegészített BrdU comet technikát alkalmaztunk a következő módon: a két óráig tartó 500 μ M-os formaldehid kezelést követően, 0 illetve 3 és 6 órával később mintát vettünk.

A 20. ábrán bemutatott eredmények elemzése során kiderült, hogy a vad típusú Spartan expresszálása a Spartan stabilan csendesített sejtvonalon csökkenti a Spartan hiányában jelentkező DNS-fehérje keresztkötések mennyiségének növekedését. Továbbá a 20. ábrán az is megfigyelhető, hogy sem 3, sem 6 órával a formaldehid kezelés után a Spartan stabilan csendesített sejtvonalon valamennyi fenn említett (PIP, UBZ, PIP/UBZ) doménben mutációt hordozó humán Spartan expresszálása nem volt

képes komplementálni a Spartan hiányában bekövetkező DPC felhalmozódást. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a replikáció során a Spartan UBZ és PIP doménjei szerepet játszanak a DNS–fehérje keresztkötések eltávolításában.



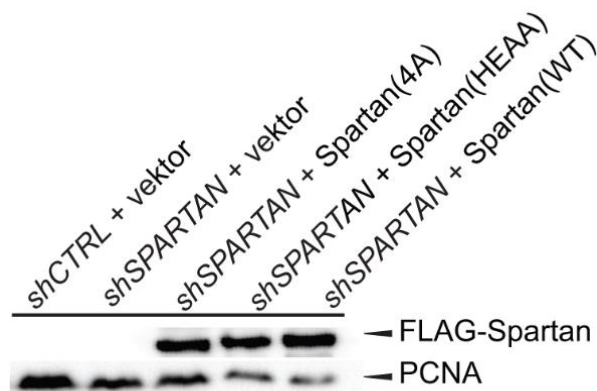
20. ábra: A Spartan UBZ és PIP doménje szerepet játszik a DNS–fehérje keresztkötések eltávolításában. Stabilan kontroll vagy Spartan shRNS-t expresszáló sejteket transzfektáltunk shRNS rezisztens: FLAG-üres (vektor), FLAG-Spartan(PIP), FLAG-Spartan(UBZ), FLAG-Spartan(PIP/UBZ), FLAG-Spartan(WT) plazmidokkal. A sejteket 2 óra 500 μ M formaldehiddel kezeltük, majd 0 és 3 órával a kezelés után mintát vettünk és Proteináz K kezeléssel kiegészített BrdU comet módszert alkalmaztunk. Statisztikai analíziseket Student t-próbával végeztük, valamint a statisztikailag szignifikáns különbséget *** jelöltük. ($P < 0,001$), NS-nem szignifikáns.

5.6 SprT és a DNS kötő domének szükségesek a DNS–fehérje keresztkötések eltávolításához

A PIP és UBZ doménekkel végzett kísérletek után megvizsgáltuk, az SprT metalloproteáz és a DNS-kötő domének funkciójának hiánya milyen hatással van a DNS-fehérje keresztkötések eltávolítására.

Az SprT metalloproteáz és a DNS-kötő domének szerepét a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában először formaldehid kezelést követően túlélési kísérletben vizsgáltuk. Spartan stabilan csendesített HEK293 sejtvonalon expresszáltunk N-terminálisan

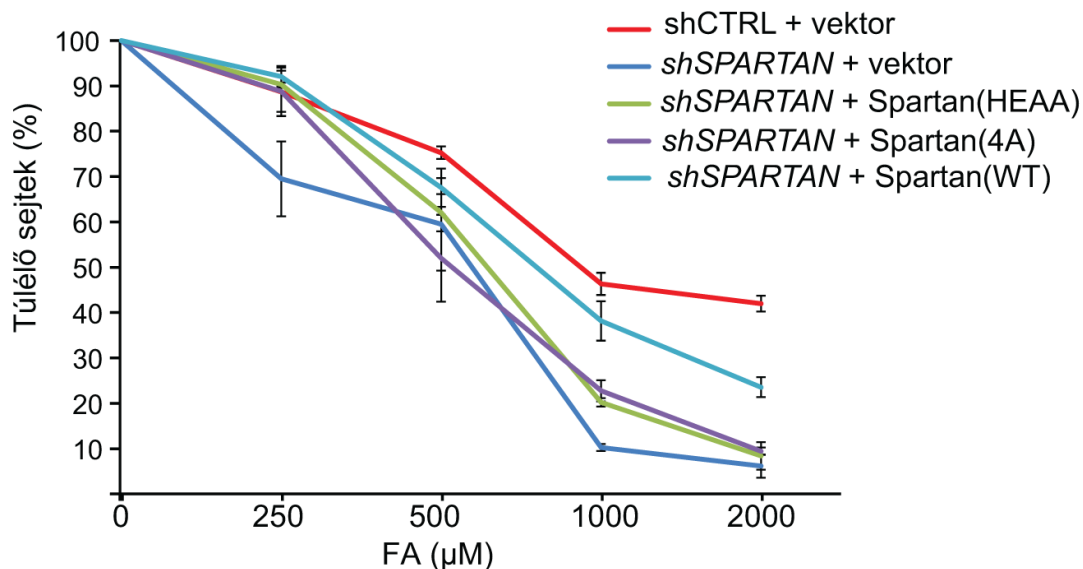
FLAG-taggel ellátott shRNS rezisztens SprT metalloproteáz mutációt hordozó Spartan(HEAA), DNS-kötő doménben mutációt hordozó Spartan(4A) és Spartan vad típusú Spartan(WT) fehérjéket. Formaldehid-kezelés után 48 óra elteltével összehasonlítottuk a különböző minták formaldehidre mutatott érzékenységét.



21. ábra: A kísérletben használt Spartan(HEAA), Spartan(4A) és Spartan(WT) fehérjék mennyiségét bemutató anti-FLAG és anti-PCNA ellenanyaggal elvégzett Western Blot analízis

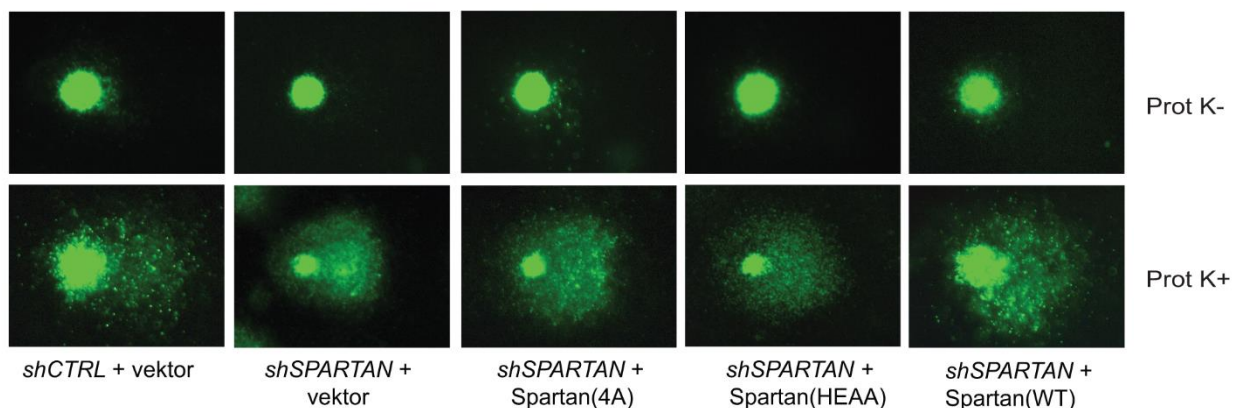
Annak ellenére, hogy a három különböző fehérje mennyisége azonos volt (21. ábra), csak a vad típusú fehérje jelenléte menekítette a Spartan hiányában bekövetkező formaldehiddel szembeni megnövekedett érzékenységet; sem a Spartan (HEAA) sem a Spartan(4A) expresszálása nem csökkentette a sejtek formaldehidre mutatott érzékenységét (22. ábra).

A metalloproteáz és DNS-kötő domének szerepét tovább vizsgáltuk Proteináz K kezeléssel kiegészített S fázis és DNS-fehérje keresztkötésekre specifikus BrdU Comet módszerrel. A kísérlethez 500 μ M formaldehiddel indukáltunk DNS-fehérje keresztkötéseket. A 23. ábrán látható, a Proteináz K-val nem kezelt minták esetében a formaldehid által okozott comet csóva DNS mennyiségének hiánya, illetve a Proteináz K-val emésztett és formaldehiddel kezelt minták esetében a csóva DNS növekedése (DNS-ről a keresztkötött fehérje frakció eltávolításra kerül a Proteináz K hatására és ezáltal elektrofórézis alatt a DNS mobilitása megnő).



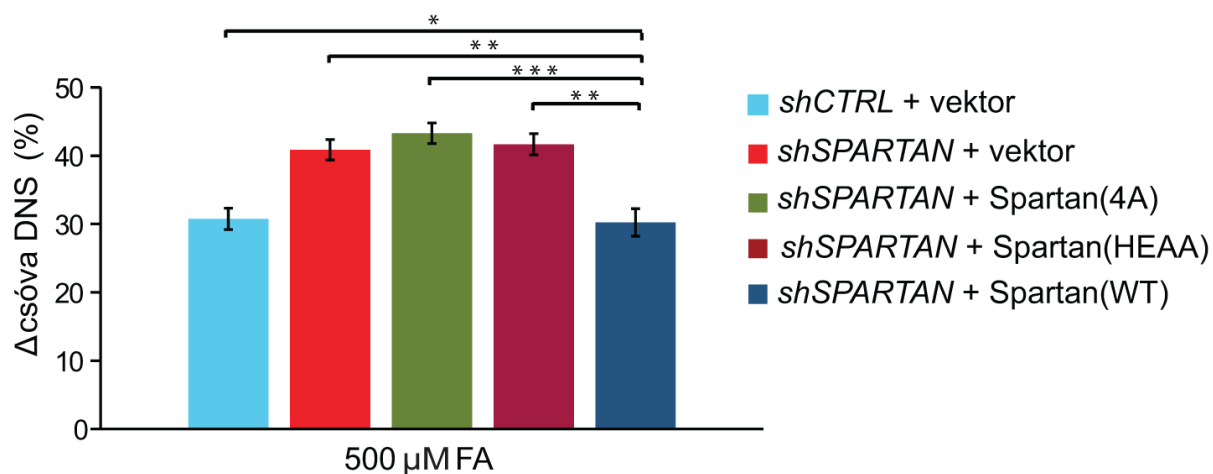
22. ábra: HEK293 Sejtek érzékenysége formaldehid kezelést követően. Stabílan kontroll vagy Spartan shRNS-t expresszáló sejteket transzfektáltunk shRNS rezisztens: vektor (FLAG-üres), FLAG-Spartan(HEAA), FLAG-Spartan(4A), FLAG-Spartan(WT), plazmidokkal. A sejteket 2 óra 500 μ M formaldehiddel kezeltük, majd 2 nappal a kezelést követően elvégeztük a resazurin alapú sejt túlélési kísérletet. Az érzékenységet százalékban a megfelelő kezeltlen shRNS-t expresszáló sejtvonalhoz viszonyítva fejeztük ki. A hiba sávok az $\pm$ átlagtól való eltérést (standard error of the mean) mutatják, és 3 független kísérlet eredményeiből számoltuk.

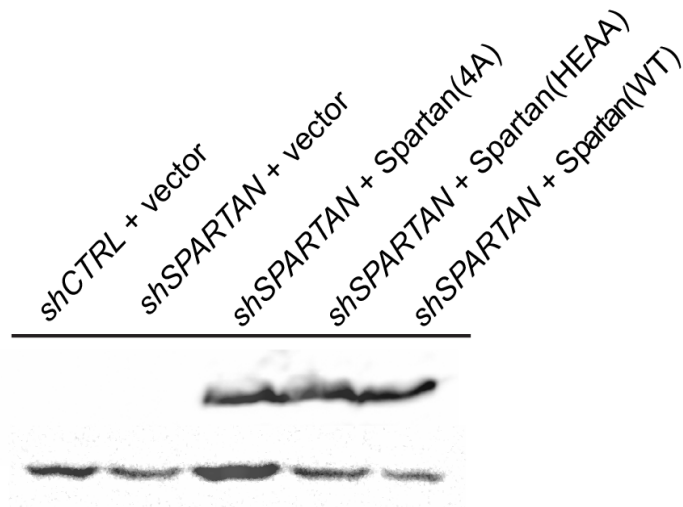
A Spartan-hiányos sejtekben a csendesítésre rezisztens Spartan fehérje expresszálása csökkentette DNS-fehérje keresztkötések mennyiségét a kontroll plazmiddal transzfektált mintákhoz viszonyítva. (A Spartan jelenléte növelte a comet fejirésznének DNS tartalmát, és csökkentette a csóva Proteináz K kezelés utáni mennyiségét, 23. ábra második és ötödik oszlopa). Sem a Spartan(HEAA) sem pedig a Spartan(4A) jelenléte nem volt képes csökkenteni a Spartan hiányában felhalmozódó DNS-fehérje keresztkötések mennyiségét, azaz a comet fejirésznének DNS tartalma nem növekedett és a comet csóva Proteináz K kezelés utáni mennyisége nem csökkent a Spartan(HEAA) és a Spartan(4A) expresszálásával.



23. ábra: A DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában fontos szerepe van a Spartan DNS-kötő, illetve SprT doménjának. A stabilan kontroll vagy Spartan shRNS-t expresszáló sejteket transzfektáltunk shRNS rezisztens: vektor (FLAG-üres), FLAG-Spartan(HEAA), FLAG-Spartan(4A), FLAG-Spartan(WT) plazmidokkal. A sejteket 2 órán át 500 μ M formaldehiddel kezeltük, majd Proteináz K kezeléssel kiegészített BrdU comet technikát alkalmaztunk. A képeken a comet módszer eredményeit mutatjuk be.

A BrdU comet technikával kapott eredmények ugyanazt a mintázatot mutatják mint, amit a túlélési kísérletek esetében is látunk, hogy sem a Spartan(HEAA) sem a Spartan(4A) expresszálása nem állítja helyre a formaldehid-kezelés által kiváltott és Spartan hiányában felhalmozódott DNS-fehérje keresztkötések mennyiségét.





24. ábra: A 23. ábrán bemutatott Comet kísérlet kvantitatív eredménye, illetve a kísérletben használt fehérjék mennyiségét bemutató anti-FLAG ellenanyaggal elvégzett Western Blot analízis. A hibasávok az $\pm$ átlagtól való eltérést (standard error of the mean) mutatják, és 3 független kísérlet eredményeiből számoltuk. Statisztikai analíziseket Student t-próbával végeztük, valamint a statisztikailag szignifikáns különbséget *** jelöltük. ($P < 0,001$), * nem szignifikáns.

A kvantitatív adatok is azt mutatják, hogy a stabilan csendesített Spartan sejtvonalonban sem a Spartan(4A), sem pedig a Spartan(HEAA) jelenléte nem képes lecsökkenteni a felhalmozódott DNS-fehérje keresztkötések mennyiségét. A Spartan(4A) és a Spartan(HEAA) is a Spartan hiányához hasonló nagy mennyiségű DNS-fehérje keresztkötést mutatott. Amint azt a 24. ábrán bemutatott Western Blot mutatja, a kísérlet során a fehérjék mennyisége közel azonos volt. A fenti eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a Spartan DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában betöltött szerepében, az Sprt metalloproteáz és a DNS-kötő domének kiemelten fontosak.

5.7 A Spartannak szerepe van az azonnali DNS-fehérje keresztkötések hibajavításában

A replikációs stressz egyik legjellemzőbb következménye a replikáció sebességének abnormális lelassulása, amely a replikációs villa elakadásához vezethet. A DNS-fehérje keresztkötések méretük miatt, nem csak a replikatív polimerázoknak jelentenek akadályt, hanem az őket helyettesítő, sokkal flexibilisebb aktív centrummal rendelkező transzléziós polimerázoknak is. A Spartan funkcióját a DNS-fehérje keresztkötések hibajavításában már megvizsgáltuk, a következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a Spartannak van-e szerepe a DNS-fehérje keresztkötések azonnali eltávolításában?

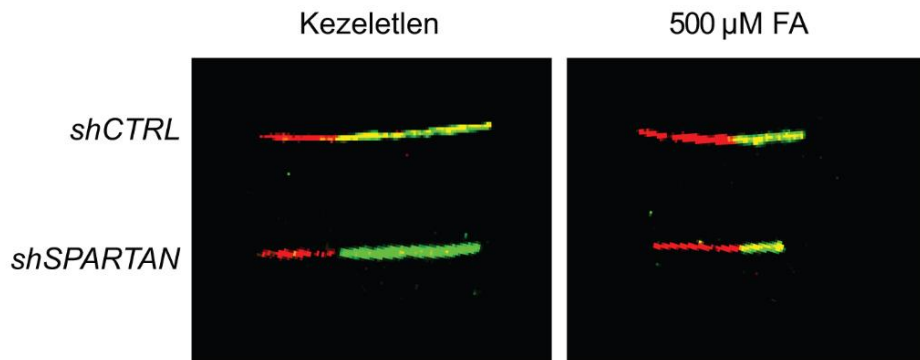


25. ábra: A DNS fiber technika sematikus ábrázolása. A DNS fiber kísérlet során exponenciális növekedési fázisban levő HEK 293 sejteket jelöltünk 20 percig 37 °C fokon 20 μ M IdU-val, majd 40 percig kezeltük őket 500 μ M formaldehiddel és 200 μ M BrdU tartalmú szérummentes tápoldattal, vagy csak 200 μ M BrdU tartalmú szérummentes tápoldattal. A DNS fibereket immunfestést követően konfokális mikroszkóp segítségével fotóztuk majd lemértük.

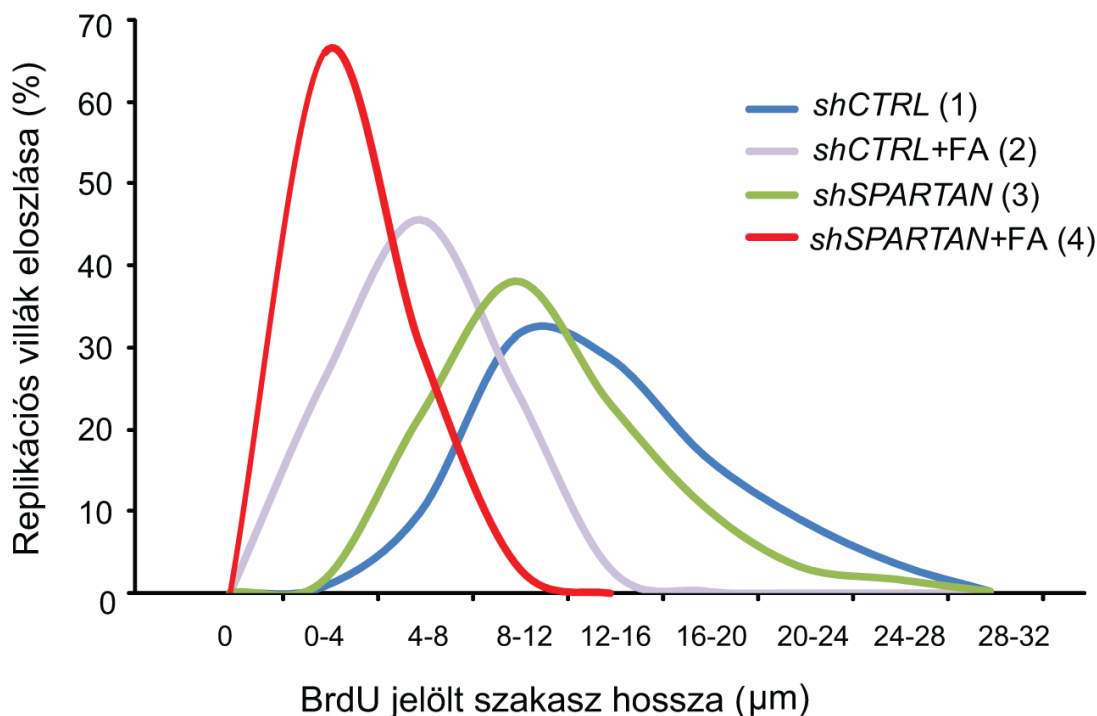
A kérdés megválaszolására DNS fiber technikát választottuk, amely lehetővé teszi, a replikáció sebességének mérését nukleotidanalóggal (IdU, BrdU) jelölt, újonnan szintetizálódó DNS szál növekedésének követése által. A replikáció során a sejtek a tápoldatban jelenlévő Idu-t és BrdU-t építik be timin helyett a DNS-be. Immunfestést alkalmazva mikroszkóp alatt, a DNS szálba beépített Idu és BrdU molekulák láthatóvá tehetők. Ezeknek az újonnan szintetizált Idu-t, BrdU-t tartalmazó DNS szakaszoknak a követésével lehetővé válik a replikáció sebességének mérése.

Első lépésként HEK293 sejteket jelöltünk IdU-val (piros), majd kezeletlenül hagytuk (kontroll), vagy formaldehiddel kezeltük, ezzel egyidőben végeztük a második jelölést BrdU-val (zöld). Ezt követően immunfestést végeztünk, majd mikroszkóp segítségével képeket készítettünk az újonnan replikálódott DNS szakaszokról, amelyeket az Olympus szoftver segítségével egyenként kvantifikáltuk. A kísérleti elrendezést a 25. ábra foglalja össze.

A mikroszkópos képekből kiválasztottunk néhány képet (26. ábra), amelyen jól látható a formaldehyd-kezelés által kiváltott replikációs stressz hatása (vagyis BrdU-val jelölt (zöld színű) szakaszok hosszának rövidülése).



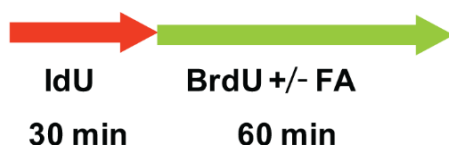
26. ábra: Reprezentatív képek a DNS fiber kísérlet eredményeiből. A képeken megfigyelhető a formaldehid kezelés által kiváltott, zöld színű szakaszok rövidülése a kezeletlen piros színű szakaszokhoz viszonyítva.



27. ábra: Spartan hiányában a formaldehid által indukált DNS-fehérje keresztkötések erőteljesebben lassítják a replikációs villák sebességét. A DNS fiber kísérlet eredményeit eloszlási görbéken láthatjuk. Statisztikai analíziseket Student t-próbával végeztük, ($p_{(1-2)} < 0,001$, $p_{(1-3)} < 0,001$, $p_{(2-4)} < 0,001$)

Az adatokból jól látható, hogy a kontrollhoz viszonyítva a BrdU-val jelölt DNS szakaszok rövidebbek a Spartan csendesített sejtvonal esetében (27. ábra), tehát a Spartan fehérje hiányában a formaldehid által kiváltott DNS-fehérje keresztkötések gátló hatása sokkal

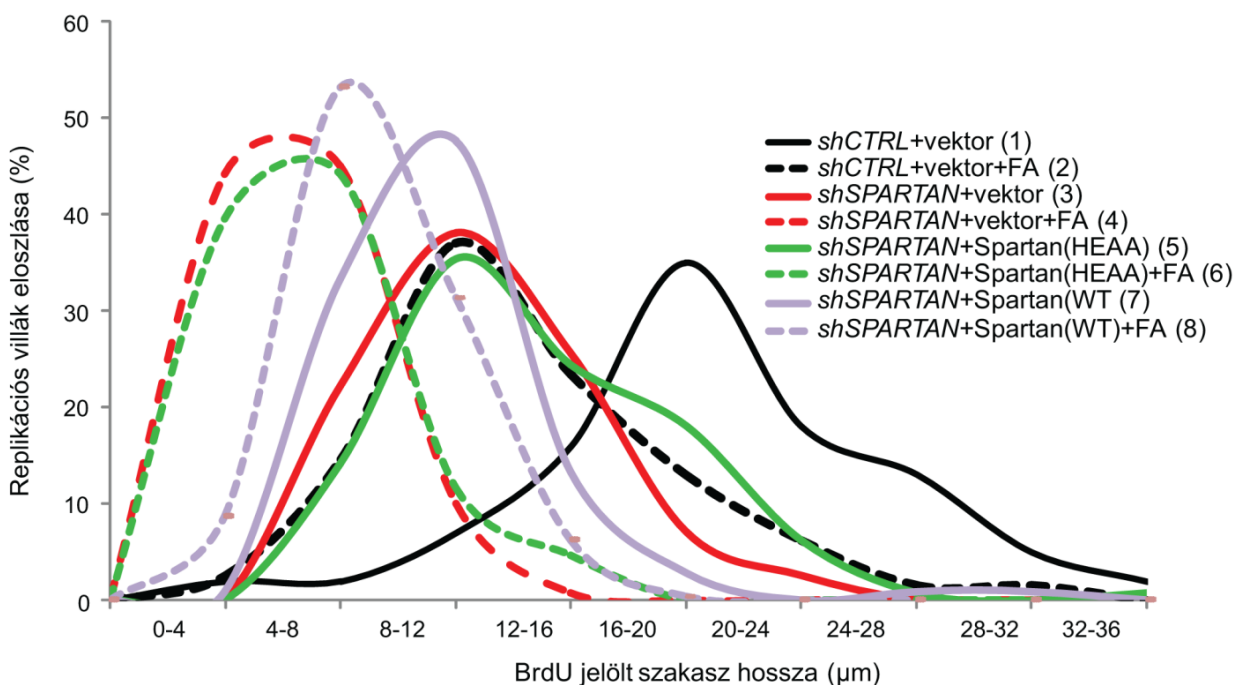
kifejezettebb. A másodlagosan BrdU-val jelölt DNS szakaszok hosszának eloszlását ábrázoló grafikont (27. ábra) megtekintve látható, hogy a Spartan csendesítés formaldehid kezelés nélkül is lassítja a replikáció sebességét. Spartan hiányában formaldehid-kezelést követően a BrdU-val jelölt, újonnan szintetizált DNS szakaszok tovább rövidülnek.



28. ábra: A 29. ábrán bemutatott DNS fiber kísérlethez tartozó IdU és BrdU jelölés sematikus ábrázolása. A DNS fiber kísérlet során exponenciális növekedési fázisban levő HEK 293 sejteket transzfektáltunk shRNS rezisztens plazmid konstrukttal majd jelöltünk 30 percig 37 °C fokon 20 μ M IdU-val. Ez után 60 percig kezeltük őket 500 μ M formaldehiddel és 200 μ M BrdU tartalmú szérumban tápoldattal, vagy csak 200 μ M BrdU tartalmú szérumban tápoldattal. A DNS fibereket immunfestést követően konfokális mikroszkóp segítségével fotóztuk majd lemértük.

Formaldehid-kezelést követően az SprT domén a DNS-fehérje keresztkötések azonnali hibajavításában betöltött szerepének vizsgálatára stabilan kontroll vagy Spartan shRNS-t expresszáló sejteket transzfektáltunk shRNS rezisztens: vektor (FLAG-üres), FLAG-Spartan(HEAA), FLAG-Spartan(WT) plazmidokkal. Ezt követően 30 perc IdU-jelölést, majd 60 perc BrdU-jelölést és formaldehid-kezelést végeztünk (28. ábra). A vad típusú fehérjével ellentétben az SprT doménben mutációt hordozó fehérje expresszálása nem javította a formaldehid okozta, Spartan hiányában erőteljesebben kifejeződő replikációra gyakorolt gátlóhatást. (29. ábra)

Ezen eredmények megerősítik az általunk felállított modellt, amely szerint a Spartan DNS-függő proteáz aktivitása révén eltávolítja a replikációs villa elakadását okozó DNS-fehérje keresztkötésekben lévő fehérje egy részét, azonban nem képes a teljes fehérje eltávolítására, ezért egy rövidebb peptidlánc marad a DNS-hez kapcsoltnak. Ezt a peptidláncot tartalmazó DNS szakaszt a későbbiekben a transzléziós polimerázok képesek átírni.



29. ábra: Formaldehid által kiváltott replikációs leállást az SprT mutáns Spartan nem menekítette. A DNS fiber kísérlet során exponenciális növekedési fázisban levő HEK 293 sejteket transzfektáltunk shRNS rezisztens plazmid konstrukttal majd jelöltünk 30 percig 37 °C fokon 20 μM IdU-val, és 60 percig kezeltük őket 500 μM formaldehiddel és 200 μM BrdU tartalmú szérummentes tápoldattal, vagy csak 200 μM BrdU tartalmú szérummentes tápoldattal. A grafikonon a második szakasz (BrdU-val jelölt) hosszát eloszlási görbéken ábrázoltuk. Statisztikai analíziseket Student t-próbával végeztük ($p_{(1-2)} < 0,001$, $p_{(2-4)} < 0,001$, $p_{(3-4)} < 0,001$, $p_{(4-6)} < 0,05$ (nem szignifikáns), $p_{(3-5)} < 0,05$ (nem szignifikáns), $p_{(5-6)} < 0,001$, $p_{(6-8)} < 0,001$, $p_{(4-8)} < 0,001$)

5.8 A formaldehid-kezelésnek hatása van a Spartan stabilan csendesített sejtvonalak sejtciklusára

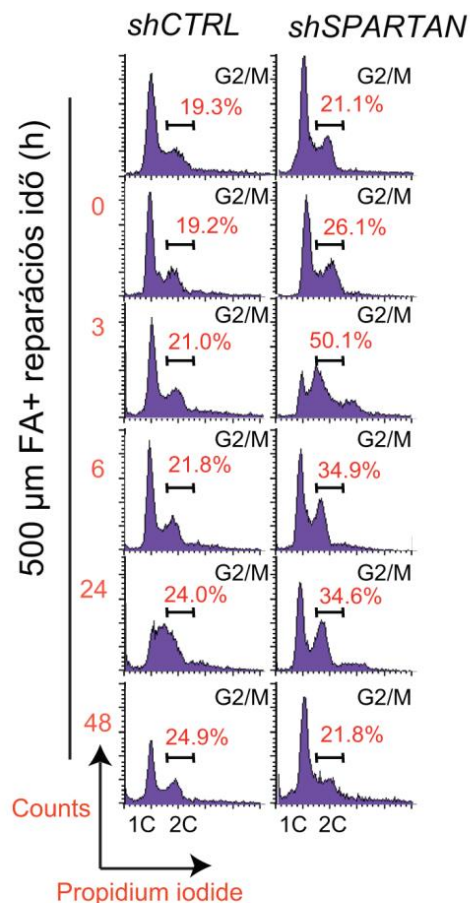
Az irodalomból ismert, hogy formaldehid-kezelés hatására a sejtek felhalmozódnak G2/M fázisban ^{92,93}, továbbá a Spartan potenciális homológja az élesztő *wss1* delécio (knockdown), formaldehid-kezelést követően a sejtek G2 fázisban való felhalmozódását eredményezte⁴⁶. Spartan hiányában a nem megfelelően működő DPC hibajavítás, illetve a DNS-fehérje keresztkötéseket tartalmazó DNS szakaszok replikációjának lelassulása hatással lehet sejtek sejtciklusára.

Annak vizsgálatához, hogy formaldehid kezelést követően a kontroll sejtvonalhoz képest a Spartan hiánya hatással van-e a sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejtek eloszlására, sejtcitometriás vizsgálatokat végeztünk. A kontroll és Spartan stabilan csendesített sejteket 500 μM formaldehiddel kezeltük 2 órát, majd propidium-jodidos festést

végeztünk rajtuk. Gyenge G2/M felhalmozódás a Spartan csendesített sejtekben formaldehid-kezelés hiányában is megfigyelhető volt. Ez a felhalmozódás formaldehid-kezelést követően még szembetűnőbb: 3 órával a kezelést követően késői S/G2 felhalmozódás figyelhető meg.

A Spartan-csendesített sejtvonalban feltűnőek a több mint 2C (C is defined as the mass of DNA present in a haploid chromosome set, C-.egy haploid sejt DNS mennyisége) DNS-tartalommal rendelkező sejtek (30. ábra). Ezek valószínűleg mikronukleuszokat tartalmaznak, illetve további fel nem oldott mitotikus struktúrákat, mint például a kromoszómahidakat, melyeket a Comet kísérletek fotózása közben is megfigyeltünk.

Továbbá, 24 órával a formaldehid-kezelést követően a kontroll sejtek felhalmozódtak S fázisban, ami arra utal, hogy a hibás DNS-sel rendelkező sejtek nem lépnek tovább a sejtciklus következő fázisába; ezzel ellentétben a Spartan stabilan csendesített sejtvonal a kontrollhoz képest gyorsabban elhagyja az S fázist. Feltételezhetően ezekben a Spartan stabilan csendesített sejtekben formaldehid-kezelést követően létrejött DPC-k átjutnak a sejtciklus következő szakaszába, ez magyarázatul szolgálhat a formaldehid-kezelést követően Spartan stabilan csendesített sejtekben megfigyelt genominstabilitásnak.

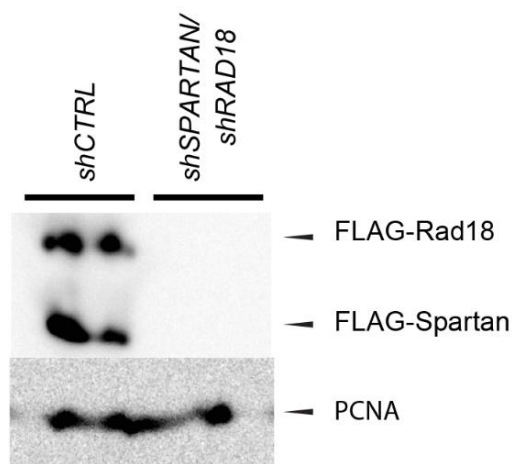


30. ábra: Spartan stabilan csendesített sejtek formaldehid kezelést követően G2/M felhalmozódást mutatnak. Exponenciális növekedési fázisban lévő HEK293 sejteket 2 óra 500 μ M formaldehid kezelésnek vetettünk alá, majd 0–48 óra eltelte után 70%-os jéghideg etanolban éjszakán át fixáltuk majd propidium-jodiddal (Propidium iodide) festettük. FACS-on mértük a sejtek DNS tartalmát.

5.9 A Spartan és a RAD18 együttműködésének jellemzése a genomi DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában

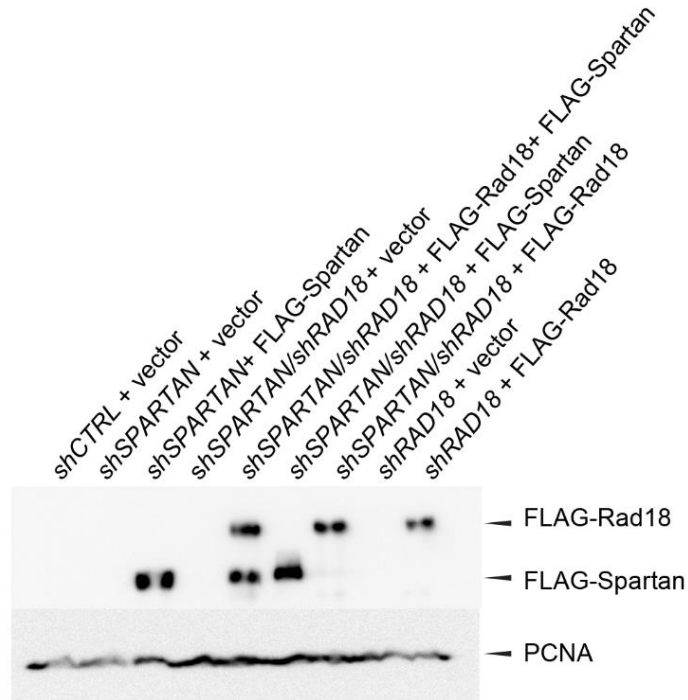
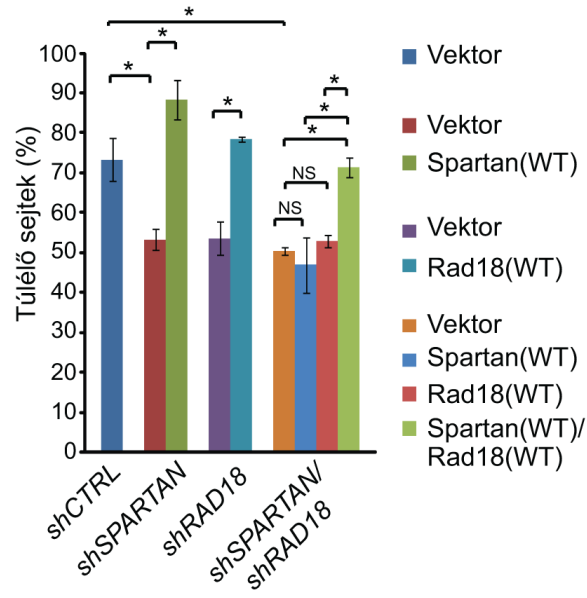
Eddig a szakirodalomban a DNS-fehérje keresztkötések hibajavításának nem tulajdonítottak külön DNS-hibajavító útvonalat. A Spartan proteázaktivitásának DNS-fehérje keresztkötéseket tartalmazó DNS-szakaszok replikációjában betöltött szerepének felfedezése, felveti a kérdést, hogy a Spartan funkciója egy önálló független DPC-specifikus hibajavító útvonalként működik vagy együttműködik más, már jól ismert replikációs villát menekítő fehérjével.

Az elakadt replikációs villa leggyakrabban elforduló menekítési módja a legtöbb fajban a Rad6–Rad18-függő PCNA-monoubikvitilálási útvonalon keresztül történik.⁸⁹. Az irodalomban többen leírták a Rad18 és Spartan együttműködését UV károsodás esetén, azonban a Spartan szabályozása a Rad18 által még mindig ellentmondásos. A Rad18 és Spartan kapcsolatát a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában még senki nem vizsgálta. Felmerül a kérdés, hogy az UV sugárzás által okozott károsodás javításához hasonlóan, a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában is együttműködik-e a két fehérje. Ezt Spartan stabilan csendesített, Rad18 stabilan csendesített és Spartan/Rad18 kettős stabilan csendesített HEK293 sejtvonalon három különböző módszerrel vizsgáltuk.



31. ábra: Spartan/Rad18 kettős stabilan csendesített sejtvonalban a fehérjék csendesítésének mértékét bemutató anti-FLAG ellenanyaggal végzett Western Blot analízis.

Elsőként, stabilan shRNS termelő sejtvonalak csendesítésének mértékét vizsgáltuk meg, N-terminálisan FLAG-taggel ellátott fehérje konstrukciók expresszáásával, ennek eredményét a 31. ábrán lévő Western Bloton láthatjuk. Mind a Spartan, mind pedig a Rad18 csendesítésének mértéke megfelelő.

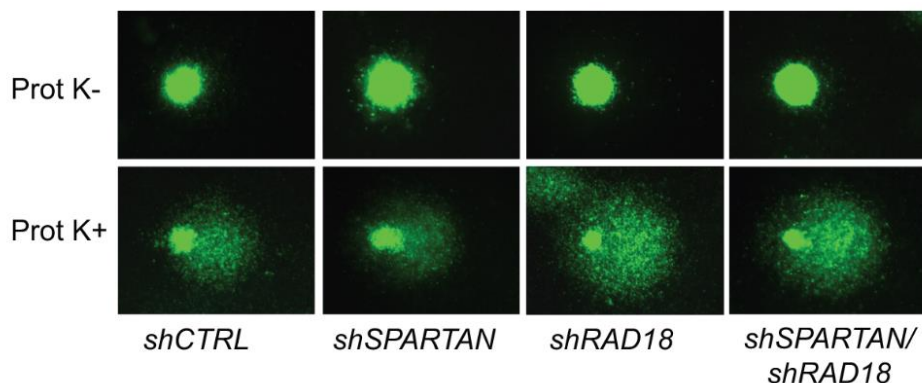


32. ábra: A Spartan és a Rad18 episztázis analízise túlélési kísérletben és a fehérjék mennyiségét ábrázoló anti-FLAG és anti-PCNA ellenanyaggal elvégzett Western Blot analízis. A stabilan kontroll, Spartan, Rad18, vagy Spartan+Rad18 shRNS-t expresszáló sejteket transzfektáltunk shRNS rezisztens: vektor (FLAG-üres), FLAG-Spartan, FLAG-Rad18, FLAG-Spartan+FLAG-Rad18 plazmidokkal. A sejteket 2 óra 500 μ M formaldehiddel kezeltük, majd 7 nap elteltével megmértük a sejtek túlélését FACS-on. A hibasávok az $\pm$ átlagtól való eltérést (standard error of the mean) mutatják, és 3 független kísérlet eredményeiből számoltuk. Statisztikai analíziseket Student t-próbával végeztük, valamint a statisztikailag szignifikáns különbséget * jelöltük. ($P < 0,001$), NS-nem szignifikáns.

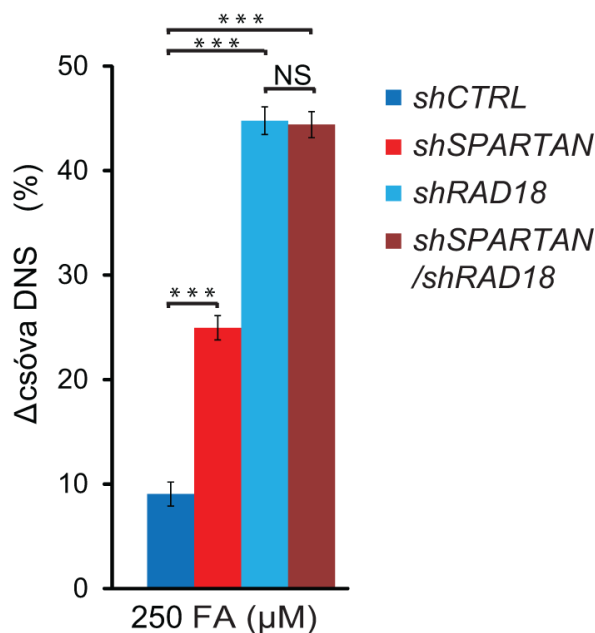
Ezt követően annak megválaszolására, hogy az UV sugárzás által okozott károsodás javításához hasonlóan a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában is együttműködik-e a Spartan a Rad18 fehérjével, túlélési kísérletet végeztünk. A kísérletben használt shRNS rezisztens N-terminálisan FLAG-taggal ellátott Spartan, illetve Rad18 mennyiségét a 32. ábrán láthatjuk. A Rad18 és a Spartan stabilan csendesített és a Spartan/Rad18 kettős stabilan csendesített sejtvonalak formaldehid-kezelést követő túlélési százalékat összevetve láthatjuk, hogy a Spartan/Rad18 kettős stabilan csendesített sejtvonala nem mutat további érzékenységet a Spartan stabilan csendesített és Rad18 stabilan csendesített sejtvonalakhoz viszonyítva. Tehát elmondhatjuk, hogy a Rad18 és Spartan együtt nyújtanak védelmet a formaldehid által okozott DNS-károsodások ellen.

Ezen hipotézis megerősítéséhez megvizsgáltuk, hogy a Spartan/Rad18 kettős stabilan csendesített sejtvonalba az shRNS rezisztens Rad18, illetve shRNS rezisztens Spartan expresszállása helyreállítja-e a formaldehid-érzékenységet. A Spartan jelenléte a Spartan stabilan csendesített sejtvonalba, valamint a Rad18 expressziója a Rad18 stabilan csendesített sejtvonalba teljesen megszüntette a formaldehid-sejtérzékenységet. Ezzel ellentétben viszont a Rad18/Spartan stabilan csendesített sejtvonalba csak a Rad18 és a Spartan egyidejű jelenléte csökkentette a sejtek érzékenységét, a fehérjék expressziója külön-külön nem. Tehát ezen eredmények is erősítik a feltételezést, miszerint a hatékony hibajavítás érdekében mindkét fehérjére szükség van.

A formaldehid-kezelést követően Proteináz K kezeléssel kiegészített S fázis és DPC specifikus comet módszerrel is megvizsgáltuk a Rad18 és Spartan fehérjék közötti kapcsolatot. A túlélési kísérlet eredményéhez hasonlóan a Rad18/Spartan kettős stabilan csendesített sejtvonala itt sem mutatott nagyobb mennyiségű DPC-felhalmozódást a Rad18 stabilan csendesített, illetve Spartan stabilan csendesített sejtvonalakhoz viszonyítva (33. ábra). Ezen eredmények is megerősítik a következtetésünket, miszerint mindkét fehérje együttes jelenléte szükséges a DNS-fehérje keresztkötések hatékony javításához, és a genomintegritás megőrzéséhez.

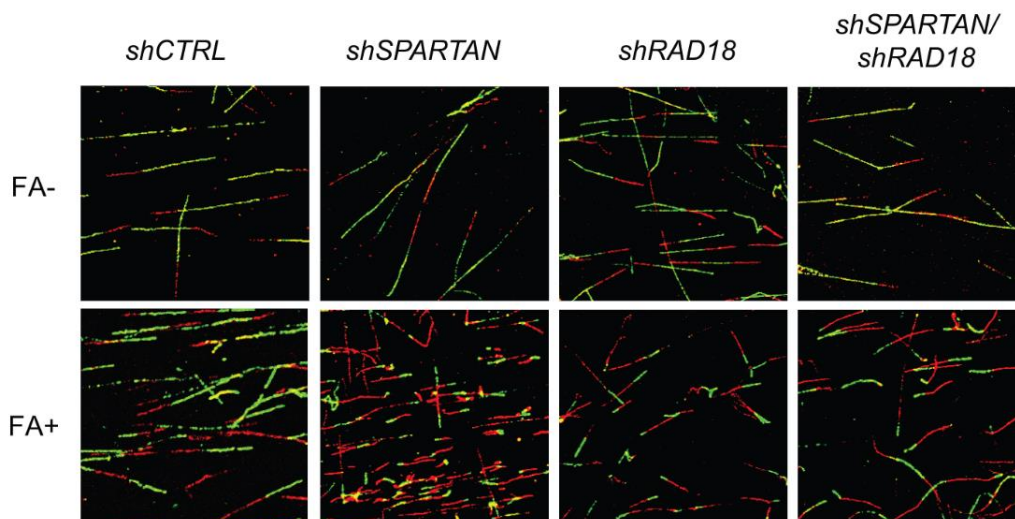


33. ábra: A Spartan és a Rad18 episztázis analízise Proteináz K kezeléssel kiegészített Comet kísérletben. A stabilan kontroll, Spartan, Rad18, vagy Spartan+Rad18 shRNS-t expresszáló sejteket transzfektáltunk shRNS rezisztens: FLAG-üres, FLAG-Spartan, FLAG-Rad18, FLAG-Spartan+FLAG-Rad18 plazmidokkal. A sejteket 2 óra 250 μ M formaldehiddel kezeltük, majd Proteináz K kezeléssel kiegészített Comet technikát alkalmaztunk



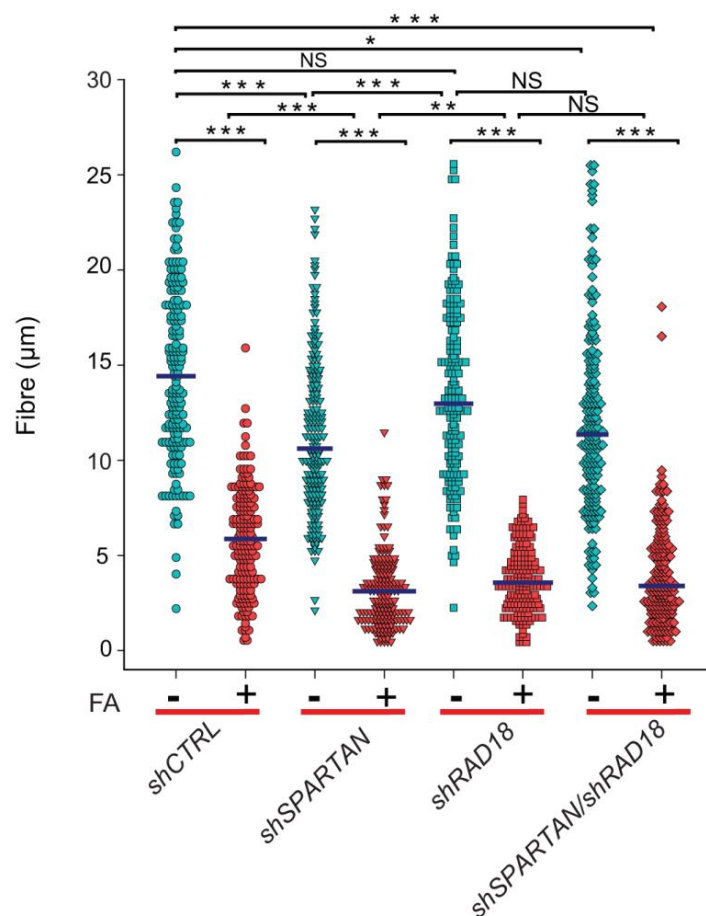
34. ábra: A 33. ábrán bemutatott, Spartan és a Rad18 Proteináz K kezeléssel kiegészített BrdU comet kísérletben végzett episztázis analízisének kvantitatív eredménye. A stabilan kontroll, Spartan, Rad18, vagy Spartan+Rad18 shRNS-t expresszáló sejteket transzfektáltunk shRNS rezisztens: FLAG-üres, FLAG-Spartan, FLAG-Rad18, FLAG-Spartan+FLAG-Rad18 plazmidokkal. A sejteket 2 óra 250 μ M formaldehiddel kezeltük, majd Proteináz K kezeléssel kiegészített BrdU comet technikát alkalmaztunk. A hiba sávok az $\pm$ átlagtól való eltérést (standard error of the mean) mutatják, és 3 független kísérlet eredményeiből számoltuk. Statisztikai analíziseket Student t-próbával végeztük, valamint a statisztikailag szignifikáns különbséget *** jelöltük. ($P < 0,001$), NS-nem szignifikáns.

A comet technikával végzett kísérletek során a Rad18 stabilan csendesített sejtvonal, nagyobb érzékenységet mutatott, mint a Spartan stabilan csendesített (34. ábra), ami annak tulajdonítható, hogy a Rad6-Rad18 útvonal kikapcsolása nem csak a Spartanhoz kapcsolt DPC javítást befolyásolja, hanem valamilyen jelenleg ismeretlen DPC-k eltávolításában szerepet játszó „útvonal” kikapcsolását is.



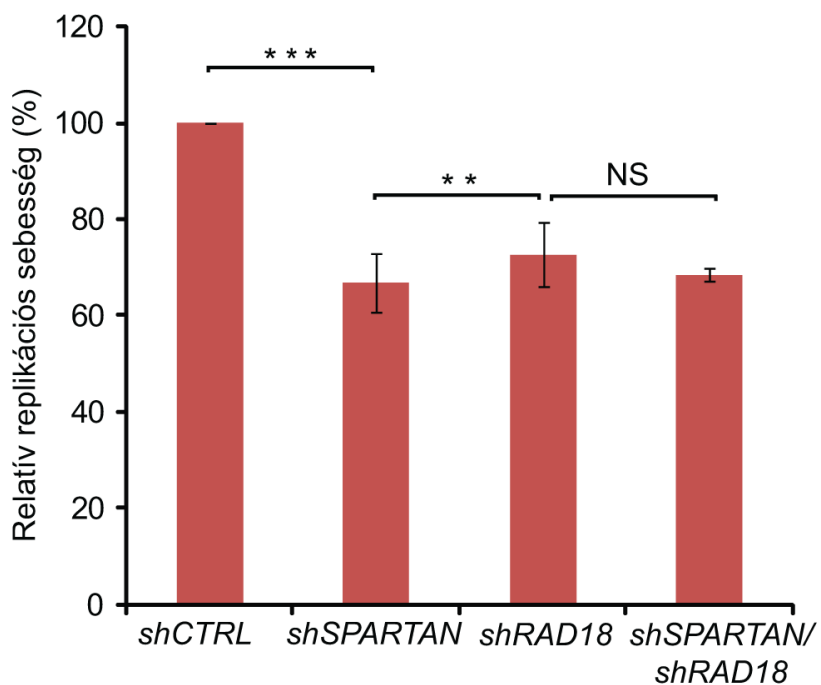
35. ábra: A Spartan és a Rad18 episztázis analízise DNS fiber kísérletben. Képek a DNS fiber kísérlet eredményeiből. A képeken megfigyelhető a formaldehid kezelés által kiváltott, zöld színű, szakaszok rövidülése a kezeletlen piros színű szakaszokhoz viszonyítva.

Utolsóként egy DNS fiber kísérletben vizsgáltuk a Rad18 és Spartan kapcsolatát az azonnali hibajavításban (35. ábra) A DNS fiber kísérlet során exponenciális növekedési fázisban levő HEK 293 sejteket jelöltünk 37 °C fokon 20 μ M IdU-val, és kezeltük 500 μ M formaldehiddel és 200 μ M BrdU tartalmú szérumentes tápoldattal, vagy csak 200 μ M BrdU tartalmú szérumentes tápoldattal. A 36. ábrán látható dot-blot ábrán minden egyes pont megfelel egy egyedi DNS fibernek, a kék horizontális vonalak a DNS fiber szakaszok hosszának átlagát jelölik. Mivel a különböző csendesített HEK293 sejtvonalak replikációs sebessége formaldehid kezelés nélkül is eltérő (36. ábra, formaldehiddel nem kezelt minták esetében a DNS fiber szakaszok hosszának átlaga eltérő), az értékeket a stabilan csendesített kontroll sejtvonalra normalizáltuk (9. ábra).



36. ábra: A Spartan és a Rad18 DNS fiber kísérletben végzett episztázis analízisének kvantitatív eredménye. 3 független kísérlet eredményeit ábrázoltuk. A hibasávok az $\pm$ átlagtól való eltérést (standard error of the mean) mutatják. Statisztikai analíziseket Student t-próbával végeztük, valamint a statisztikailag szignifikáns különbséget *** jelöltük. ($P < 0,001$), ** ($P < 0,01$), * ($P < 0,1$) NS-nem szignifikáns.

Így láthatóvá vált a formaldehid által okozott replikációs stressz mértéke a stabilan csendesített kontroll, Spartan, Rad18 és Spartan/Rad18 sejtvonalak közt. Formaldehid-kezelést követően a kontroll sejtvonálnál lassabb replikációs sebességet mértünk a Rad18, Spartan, és Rad18/Spartan stabilan csendesített sejtvonálhoz képest. A fenti eredményekhez hasonlóan ebben a kísérleti elrendezésben sem mutatott nagyobb érzékenységet a Spartan/Rad18 kettős stabilan csendesített sejtvonál, mint a Rad18 vagy Spartan stabilan csendesített sejtvonalak.



9 A replikáció relatív sebessége. A kontroll sejtvonalra normalizált replikációs különbségek ábrázolása. A 36.ábrán bemutatott DNS fiber kísérlet adataiból számoltuk ki a relatív sebességet. Statisztikai analíziseket Student t-próbával végeztük, valamint a statisztikailag szignifikáns különbséget *** jelöltük. (P<0,001)** (P<0,01), NS-nem szignifikáns.

Mindhárom vizsgálati módszer eredménye megegyező mintázatot mutat és egységesen arra utalnak, hogy a Spartan és a Rad18 fehérjék együttműködve védik a sejteket a DNS-fehérje keresztkötések okozta káros hatásoktól.

6 Eredmények megvitatása

Csoportunk fő kutatási területe a humán DNS-hibatolerancia útvonal fehérjéinek vizsgálata és szabályozásainak feltárása. Célunk a szabályozási mechanizmusok feltárása mellett a fehérjék pontos funkcióinak felderítése, amelyet a fehérjét alkotó domének alapos vizsgálatával végzünk.

Csoportunk 2012-ben azonosította a humán Spartan (DVC1, C1orf124). Leírtuk, hogy a fehérje a Rad6-Rad18 ubikvitin ligáz komplex által monoubikvitilált PCNA-hez kapcsolódik. PIP és UBZ doménjei által megvédi a monoubikvitilált PCNA-t a deubikvitilálástól, továbbá stimulálja a polimeráz η , egy hibamentes transzléziós polimeráz fókuszformálását, és így elősegíti a hibatolerancia útvonal aktiválásának fenntartását és ezáltal a genomintegritás megőrzését⁸⁰. Ezen túlmenően a Spartan fehérje mutációit megtalálták három korai hepatocelluláris karcinómát hordozó és progeroid szindrómát mutató betegben is. Lessel és munkatársai igazolták, hogy a Spartan teljes hiánya egerekben korai embrionális letalitást okoz⁸⁴.

Nemrégiben jellemezték a fehérje DNS-kötő régióját is. Emellett a Spartan rendelkezik egy SprT doménnel, amelynek a funkciója eddig ismeretlen volt⁷⁷. Továbbá a humán fehérje doménszerkezete nagyfokú homológiát mutat az élesztőben (*S. cerevisiae*) található *wss1*-gyel, amelyről kimutatták, hogy a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában van szerepe⁴⁶.

A DNS-fehérje keresztkötések méretüket, kialakulásukat tekintve nagyon változatos és toxikus DNS léziók, amelyek akadályozhatják a DNS-en végbemenő enzimatikus reakciókat, mint például a replikáció és a transzkripció. Mindeddig az általános nézet a DNS-fehérje keresztkötések javításáról az volt, hogy a kanonikus hibajavító útvonalak végzik, mint például a Fanconi-anémia útvonal, vagy a homológ rekombináció⁹⁴. Ez az általánosan elfogadott tény megdőlt, amikor élesztőben felfedezték az eddig ismeretlen DNS-fehérje keresztkötésekre specifikus hibajavító útvonalat, valamint kimutatták, hogy az élesztő *wss1* proteáz aktivitásának köszönhetően közvetlenül eltávolítja a DNS-fehérje keresztkötések fehérje komponensét⁴⁶, *Xenopus* petékből készített sejtkivonatokban leírtak replikáció-függő proteolitikus mechanizmusokat, amelyek részt vettek a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában⁵³. Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a fent említett DNS-fehérje keresztkötésekre specifikus mechanizmusok

jelenlétét a humán sejtekben. A Spartan SprT metalloproteáz doménje hasonló doménstruktúrával rendelkezik, mint a *wss1* proteáz doménje. A Spartan és a *wss1* doménjei közötti jelenlévő hasonlóságok a következő kérdéseket vetik fel: A Spartan rendelkezik-e proteáz aktivitással? Van-e szerepe a DNS-fehérje keresztkötések hibajavításában? A humán sejtek rendelkeznek-e specifikus DNS-fehérje keresztkötéseket javító mechanizmussal?

Humán sejtekből történő Spartan fehérje tisztítása során megfigyeltük a Spartan degradációját, amely specifikusan két méretre elkülönülő mintázatot mutatott akrilamid gélen. A sejt extrakthoz való DNáz hozzáadása nagyban stabilizálta a vad típusú Spartan fehérje szerkezetét. Illetve a DNáz-al kiegészített vad típusú Spartan extraktumhoz hasonló stabilitást mutatott a DNS kötésben mutációt hordozó Spartan(4A) fehérje is. Továbbá a sejtextraktumban lévő DNS jelenlétében a Spartan(4A) mutáns proteolitikus aktivitása sokkal kisebb, mint a vad típusú Spartan fehérjéé. Az 5.1 fejezetben bemutatott eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a Spartan rendelkezik egy DNS-függő proteázaktivitással, és ezáltal képes önmaga emésztésére.

In vitro eredményeink azt mutatták, hogy a Spartan önmaga proteolitikus emésztésén kívül más DNS-hez kapcsolódó fehérjék emésztésére is képes. Emésztí például: a Fan1, HLTF és Rad5 fehérjéket, ellenben a BSA, PCNA és RFC emésztésére már nem képes. Ugyanakkor a DNS-hez nagy affinitással kötődő fehérjék, mint például az RPA és RFC koncentrációfüggő módon gátolják az Spartan aktivitását. Ez arra utalhat, hogy a Spartan proteázaktivitásának szabályozásában fontos szerepe lehet a DNS-hez nagy affinitással kötődő fehérjéknek. A Spartan ily módon történő szabályozásának nagy jelentősége lehet az elakadt replikációs villánál, ahol a keletkező egyesszálú DNS-t hamar beburkolja a DNS-t nagy affinitással kötő RPA.

A Spartan különböző DNS struktúrák iránti affinitása tovább erősíti a feltételezést mely szerint az elakadt replikációs villában kialakuló egyesszálú DNS-hez kapcsolódva vesz részt a DNS-hez kötött fehérjék proteolitikus eltávolításában. Ugyanis a legerősebb kötést a Φ X174 egyesszálú DNS-sel alakította ki, amíg a kettősszálú, illetve bevágott plazmid DNS, és a 75/45 bázispár hosszúságú parciális heteroduplex alig váltott ki proteolitikus aktivitást.

A Spartan DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában betöltött esetleges szerepének kimutatására *in vivo* SDS-KCl fehérjeprecipitációs technikát használtunk, melynek lényege a genomi DNS elválasztása, szabad DNS, illetve DNS-fehérje keresztkötéseket tartalmazó frakciókra. Az SDS-KCl fehérjeprecipitációs kísérleteink eredményei azt bizonyítják, hogy a Spartan jelentős szerepet tölt be a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában. A humán Spartan DPC-ket tartalmazó DNS-szakaszok replikációjában betöltött szerepének pontosabb és specifikusabb vizsgálatához a csoportunk által korábban kidolgozott BrdU comet technikát kiegészítettük egy Proteináz K kezeléssel. A Proteináz K kezelésre azért volt szükség, hogy DNS-fehérje keresztkötések által okozott DNS-hibákat el tudjuk különíteni a formaldehid kezelés által indukált más DNS lézióktól (pl: különböző DNS-DNS keresztkötések). Ugyanis nincs tudomásunk olyan kémiai ágensről vagy fizikai módszerről, ami csak kizárólag DNS-fehérje keresztkötéseket hoz létre. Az irodalomban a DNS-fehérje keresztkötések indukálásához általában formaldehidet használnak, de köztudott, hogy a formaldehid nem csak DNS-fehérje keresztkötéseket, hanem más DNS-DNS keresztkötéseket is okoz. Az fentiekben leírt változtatásokkal a Proteináz K kezeléssel kiegészített BrdU comet módszer az S fázisban jelenlévő DNS-fehérje keresztkötések kimutatására egy megbízható, érzékeny, és specifikus módszer. Az azonos minták Proteináz K-val kezelt és kezeletlen (Prot K+ és Prot K-) csóva DNS mennyisége közti különbség (Δ csóva) mutatja a jelenlévő DNS-fehérje keresztkötések mennyiségét. Spartan stabilan csendesített sejtvonalakban minden esetben DNS—fehérje keresztkötés felhalmozódást mutattunk ki, ami arra utal, hogy Spartan hiányában kevésbé hatékonyan megy végbe a DNS-fehérje keresztkötéseket tartalmazó DNS régiók replikációja. Továbbá a Spartan DNS-fehérje keresztkötések javításában betöltött fontos szerepét bizonyítják a BrdU comet technikával elvégzett menekítési kísérletek eredményei, mely szerint az ektopikusan termeltetett Spartan nem csak menekítette a Spartan hiányában mutatkozó DPC akkumulációt, hanem a kontroll sejtvonalhoz képest csökkentette a DPC-k jelenlétét. A különböző domének DNS-fehérje keresztkötések javításában betöltött szerepének meghatározására irányuló kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy kiemelt szerep jut a Spartan SprT és DNS-kötő doménjeinek, de ugyanakkor nem elhanyagolhatók a PIP és UBZ domének jelenléte sem.

A DNS-t érő különböző stresszhatások következményeként a replikáció sebessége lelassulhat, ami a replikációs villák leállításához és genominstabilitáshoz vezethet. A DNS fiber technikával végzett kísérleteink eredményeiből kiderül, hogy a kontroll stabilan csendesített sejtvonálhoz hasonlítva a Spartan hiánya már önmagában a replikáció lelassulásához vezet. Ehhez képest Spartan stabilan csendesített sejtvonálban formaldehid kezelést követően a replikáció sebessége tovább lassul, ennek jeleként a DNS fiber szakaszok még intenzívebb rövidülést mutatnak, mint a formaldehiddel kezelt kontroll stabilan csendesített sejtvonál esetében. DNS fiber technikával végzett kísérleteink eredményei a Spartan azonnali hibajavításban betöltött fontos szerepére utalnak, a DPC-ket tartalmazó DNS szakaszok replikációja során. Továbbá a DNS fiber technikával végzett kísérleteink eredményei alátámasztják a következőkben bemutatásra kerülő modellünket, miszerint a Spartan a replikáció folyamán DNS-fehérje keresztkötésekhez érve proteolitikusan emészti azokat. Azonban a Spartan nem képes a teljes fehérje eltávolítására, ezért egy rövidebb peptidlánc marad a DNS-hez kapcsoltnak. Ezt a hibás DNS szakaszt a későbbiekben a transzléziós polimerázok képesek átírni.

Megvizsgáltuk, hogy az újonnan felfedezett DNS-fehérje keresztkötésekre specifikus javítómechanizmus teljesen új és különálló DNS hibajavító útvonalat alkot-e, vagy a Spartan korábban ismert funkcióihoz képest a már jól jellemzett DNS-hibitolerancia útvonal részeként működik. A kérdés megválaszolásához több kísérleti módszert is alkalmaztunk, mint például a Proteináz K-val kiegészített BrdU comet technika, a DNS fiber technika és a túlélési kísérlet. Ezen módszerek eredményei igazolták a proteolitikus DPC hibajavítás során a Spartan szoros együttműködését a Rad18 útvonallal. Mind a Rad18, mind pedig a Spartan jelenléte fontos a DNS-fehérje keresztkötéseket tartalmazó DNS szakaszok replikációjához.

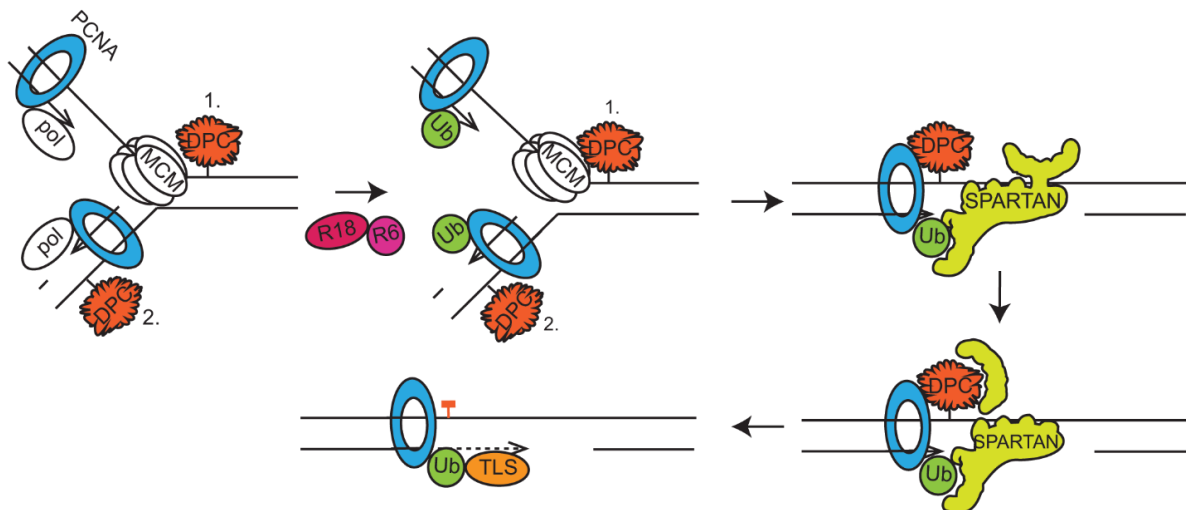
A bemutatott BrdU comet és DNS fiber technikák eredményeivel igazoltuk, hogy a humán Spartan elősegíti a DNS-fehérje keresztkötések eltávolítását, illetve a DNS-fehérje keresztkötéseket tartalmazó DNS szakaszok replikációját. Azt is kimutattuk, hogy a Spartan ezen funkcióját a Rad6-Rad18 DNS-hibitolerancia útvonallal kapcsoltnak végzi. Elsőként igazoltuk, hogy a tisztított humán Spartan fehérje rendelkezik proteáz aktivitással, amely proteolitikusan emészti a DNS-hez kovalensen kötött fehérjéket. *In*

vivo Proteináz K-val kiegészített BrdU comet kísérlet eredménye igazolta, hogy Spartan hiányában a DNS-fehérje keresztkötések javítása kevésbé hatékonyan működik, illetve az SprT metalloproteáz vagy a DNS-kötő domének funkcióvesztéses mutációi nagyban megnehezítik a DNS-fehérje keresztkötéseket tartalmazó DNS szakaszok replikációját. Továbbá formaldehid által indukált replikációs stressz jelenléte után a DNS fiber technika eredményei rámutattak a Spartan hiányában bekövetkező replikációs villák sebességének drasztikus lelassulására.

Munkánk során kimutattuk, hogy a humán Spartan rendelkezik proteáz aktivitással, amelyért a fehérje SprT metalloproteázszerű doménje a felelős. Meghatároztuk, hogy a Spartan ezen aktivitása kizárólag DNS jelenlétében valósul meg. Továbbá, bemutattuk a Spartan létfontosságú szerepét a DNS-fehérje keresztkötéseket tartalmazó DNS szakaszok replikációja során, és ezen keresztkötések eltávolításában. Kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a Spartan DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában betöltött aktivitását a Rad18 útvonallal kapcsolatosan végzi.

Az eredményeink összhangban vannak a publikációnk utolsó lépései alatt Spartan proteáz aktivitásáról és DNS-fehérje keresztkötések hibajavításában betöltött szerepéről megjelent tudományos cikkekkel. Továbbá eredményeink bemutatják a Spartan és a DNS-hibatolerancia útvonal együttműködésének szükségességét a hatékony DPC hibajavítás érdekében.

Az általunk felállított modellben (38. ábra) a Spartan fehérje a DNS-fehérje keresztkötések miatt elakadt replikációs villához lokalizál. Az ott kialakult egyesszálú DNS-hez való kötődése konformációváltozást okoz, aminek következtében az újonnan felfedezett proteázaktivitásának köszönhetően emészti a DNS-hez keresztkötött fehérjét, ezáltal biztosítva a replikáció továbbhaladását. Abban az esetben, ha a DNS-hez a fehérje kovalensen kapcsolódik, a Spartan nem képes a teljes fehérje eltávolítására, hanem egy rövid peptidlánc marad a fehérje helyén, amelyen keresztül a replikáció később transzléziós polimerázok vagy templátváltás segítségével mehet végbe.



38.ábra: A Spartan szerepe a DNS-fehérje keresztkötéseket tartalmazó DNS szakaszok replikációjában. A DNS-fehérje keresztkötések által okozott DNS helikáz elakadása a vezetőszálon és DNS polimeráz (pol) elakadása (1) a vezető és a követőszálon (2) a Rad6-Rad18 (R18-R6) fehérje komplex aktiválódásához és ez által a PCNA monoubikvitinálásához (Ub) vezet. Mindkét esetben replikációs részek keletkeznek, a vezetőszál esetében az összeérő ellenkezőirányú replikációs villáknál, a követőszálon pedig a DPC-vel szemben nem replikálódott szakaszok maradnak az Okazaki-fragmentek között. A DPC-ken gyakran a TLS DNS polimerázok sem képesek áthaladni nagy méretük és DNS-hez való kapcsoltságuk miatt. Ilyen esetekben a monoubikvitilált PCNA és a szabad egyesszálú DNS jelenléte a DNS hibához toborozza a Spartant. A Spartan egyszerre köti az Ub-PCNA-t UBZ és PIP doménjein, és az egyesszálú DNS-t, a DNS-kötő doménjén keresztül. Az egyesszálú DNS kötése a Spartan fehérje konformáció változását okozza és ezzel a Spartan proteázaktivitásának aktiválását idézi elő. Az így aktivált Spartan proteázaktivitásának köszönhetően emészt a DNS-fehérje keresztkötéseket. Abban az esetben, ha a fehérje kovalens kötéssel kapcsolódott a DNS-hez, rövid peptid gyökök maradhatnak a DPC helyén. A Spartan proteáz-aktivitása révén pozitív hatással lehet a polimerázcserére is, például a replikációs komplex egyes alegységeinek eltávolítása révén, elősegítve a TLS polimerázok működését, amelyek aztán képesek a peptidláncot tartalmazó DNS- szakaszok átírására. Ezek az események történhetnek azonnal a replikációs villa elakadása után, vagy a posztreplikatív reparációs szakaszban is.

7 Magyar nyelvű összefoglaló

Sejtjeink folyamatosan különböző DNS károsító hatásoknak vannak kitéve, mint például az UV sugárzás vagy különböző vegyületek. De nem csak külső tényezők károsíthatják DNS-ünket hanem a sejtek metabolizmusa során is keletkeznek DNS károsodást kiváltó köztes termékek, mint például a reaktív oxigén gyökök, vagy a hisztonok demetilálása során keletkező formaldehid és az etanol bontásából származó acetaldehid. Egy sejtben naponta több ezer DNS-hiba keletkezik. A sejtek mégis túlélnek, mert az evolúció során létrejöttek DNS-hibajavító mechanizmusok, amelyek képesek felismerni és kijavítani DNS-hibákat. Ezek a mechanizmusok folyamatosan helyreállítják a DNS-hibákat, mégis akadnak olyanok, amelyek nem javítódnak ki a sejtciklus S fázisának megkezdődése előtt, vagy a sejtciklus S fázisában keletkeznek. Ebben az esetben a replikáció alatt jelenlévő hibák a replikációs apparátus elakadását okozhatják, ez kettősszalú DNS törések kialakulásához vezethet, amelyek a legnagyobb veszélyt jelentik a genom stabilitására nézve. A kettősszalú DNS törések nagyobb kromoszómaátrendeződéseket is okozhatnak, ezzel együtt karcinogenezist és végső soron akár sejthalált is okozhatnak. A kettősszalú DNS törések kialakulásának elkerülése érdekében jött létre a DNS-hibatolerancia útvonal, amely különböző mechanizmusok révén képes a replikációs villa menekítésére.

A DNS-hibatolerancia útvonal első lépése a polimerázok processzívítási faktoraként működő PCNA molekula 164-es lizinjének monoubikvitilálása a Rad6-Rad18 fehérje komplex által. Következő lépésként a replikatív polimerázok, amelyek egy merev aktív centrummal rendelkeznek és ennek következtében nem képesek a hibák átírására, lecserélődhetnek úgynevezett transzléziós polimerázokra, amelyek aktív centruma rugalmasabb és ezáltal képesek hibamentesen vagy hibásan átírni a DNS léziókat. Ha a PCNA K164-es aminosavon lévő monoubikvitinjére az Ubc13-Mms2/Rad5 fehérje komplex újabb ubikvitint kapcsol, akkor az a DDT egy másik alútvonalának aktiválódásához, a templát váltáshoz vezet, amely replikációs villa visszafordítását jelenti, ahol az újonnan szintetizált szál szolgál a replikáció templátjaként.

Kutatásaim célja a DNS-hibatolerancia útvonal működésének és szabályozásának feltárása, azon belül is a humán Spartan fehérje funkcióinak és betöltött szerepének jellemzése. A Spartant először 2012-ben írták le és jellemezték, a közétett információk

jelentős részét kutatócsoportunk tette közé. A Spartan sejtekben való jelenléte sejtciklus függő, mennyisége a sejtek S fázisában a legnagyobb, de jelen van G2-ben és a korai M fázisban is. A Spartan fehérje expressziója specifikus azokra a DNS-hibákra, amelyek a replikációs villák leállítását és ezáltal a PCNA monoubikvitilálását okozzák.

A Spartan rendelkezik egy PCNA-kötő PIP doménnel, egy ubikvitint felismerő UBZ doménnel, a DNS-kötésben résztvevő motívummal, és egy SprT-szerű metalloproteáz doménnel melynek funkciója eddig ismeretlen. Spartan hiányában UV sugárzás hatására a sejtek megnövekedett UV érzékenységet mutatnak, illetve csökken mind a monoubikvitinált PCNA mennyisége, mind pedig a DNS-károsodások helyére lokalizáló Pol η fókuszok száma. A Spartan fehérje nélkülözhetetlen szerepére utal az is, hogy emberben hiánya korai hepatocelluláris karcinoma kialakulásához, genominstabilitáshoz és Ruijs-Aalfs progeroid szindróma megjelenéséhez vezet. Ugyanakkor egerekben a Spartan leütése embrionális letalitást okoz.

Élesztőben nemrégiben kimutatták, hogy a Spartannal homológiát mutató *wss1* fehérjének proteáz aktivitása révén, szerepe van a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában és ez által a genomstabilitás fenntartásában. A Spartan SprT-szerű metalloproteáz doménjének funkciója eddig ismeretlen volt, ezért célul tűztük ki a domén funkciójának jellemzését, illetve a Spartan esetleges szerepének vizsgálatát a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában.

Először tisztított Spartan fehérjét használva *in vitro* biokémiai módszerekkel igazoltuk, hogy a Spartan DNS jelenlétében képes önmaga és más DNS-kötő fehérjék proteolitikus emésztésére. Biokémiai módszerekkel megvizsgáltuk a Spartan proteínáz aktivitását különböző DNS struktúrák jelenlétében, a legerősebb kötést a Φ X174 egyesszálú DNS-sel alakította ki, amíg a kettősszálú, illetve bevágott plazmid DNS, és a 75/45 bázispár hosszúságú parciális heteroduplex alig váltott ki proteolitikus aktivitást. A Spartan különböző DNS struktúrák iránti affinitása, arra utal, hogy a Spartan az elakadt replikációs villában kialakuló egyesszálú DNS-hez kapcsolódva vesz részt a DNS-hez kötött fehérjék proteolitikus eltávolításában.

A Spartan DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában betöltött esetleges szerepének kimutatására *in vivo* SDS-KCl fehérjeprecipitációs technikát használtunk, kísérleteink eredményei azt bizonyítják, hogy a Spartan jelentős szerepet tölt be a DNS-fehérje

keresztkötések eltávolításában. A humán Spartan DNS-fehérje keresztkötéseket tartalmazó DNS szakaszok replikációjában betöltött szerepének pontosabb és specifikusabb vizsgálatára a csoportunk által korábban kidolgozott BrdU comet technikát kiegészítettük Proteináz K kezeléssel. A Proteináz K kezelésre azért volt szükség, hogy DNS-fehérje keresztkötések által okozott DNS-hibákat el tudjuk különíteni a formaldehid kezelés által indukált más DNS lézióktól (pl: különböző DNS-DNS keresztkötések). A Proteináz K kezeléssel kiegészített BrdU comet módszer, az S fázisban jelenlévő DNS-fehérje keresztkötések kimutatására egy megbízható, érzékeny és specifikus módszernek bizonyult. Spartan stabilan csendesített sejtvonalakban minden esetben DPC felhalmozódást mutattunk ki, ami arra utal, hogy a Spartan hiányában kevésbé hatékonyan megy végbe a DPC-t tartalmazó DNS régiók replikációja. Továbbá a Spartan DPC-k javításában betöltött fontos szerepét bizonyítják a BrdU comet technikával elvégzett menekítési kísérletek eredményei, mely szerint az ektopikusan termeltetett Spartan nem csak menekítette a Spartan hiányában mutakozó DPC akkumulációt, hanem a kontroll sejtvonalhoz képest csökkentette a DPC-k jelenlétét.

A Spartan különböző doménjeinek DPC hibajavításban betöltött szerepének meghatározására irányuló kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy kiemelt szerep jut a Spartan SprT és DNS-kötő doménjeinek, de ugyanakkor a DPC hibák hatékony javításhoz szükséges a PIP és UBZ domének jelenléte is.

A DNS-t érő különböz stresszhatások következményeként a replikáció sebessége lelassulhat, ami a replikációs villa leállításához és genominstabilitáshoz vezethet. DNS fiber technikával végzett kísérleteink eredményei a Spartan azonnali hibajavításban betöltött fontos szerepére utalnak a DPC-ket tartalmazó DNS szakaszok replikációja során.

Proteináz K kezeléssel kiegészített BrdU comet technikával, DNS fiber technikával és túlélési kísérletekben vizsgáltuk, hogy az újonnan felfedezett DPC specifikus hibajavítási mechanizmus, teljesen új és különálló DNS-hibajavító útvonalat alkot, vagy a Spartan korábban ismert funkcióihoz képest a már jól a jellemzett DNS-hibatolerancia útvonal részeként működik. Ezen módszerek eredményei igazolták a DPC-hibák proteolitikus javítás során a Spartan szoros együttműködését a Rad18 útvonallal. Mind a Rad18, mind pedig a Spartan jelenléte fontos a DPC-ket tartalmazó DNS szakaszok replikációjához.

Összefoglalva eredményeinket, munkánk során igazoltuk, hogy a humán Spartan rendelkezik proteáz aktivitással, amelyért a fehérje SprT metalloproteázszerű doménje a felelős. Meghatároztuk, hogy a Spartan ezen aktivitása kizárólag DNS jelenlétében valósul meg. Továbbá, bemutattuk a Spartan létfontosságú szerepét a DNS-fehérje keresztkötéseket tartalmazó DNS szakaszok replikációja során, és ezen keresztkötések eltávolításában. Kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a Spartan DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában betöltött aktivitását a Rad18 útvonallal kapcsoltan végzi.

8 Summary of the PhD thesis

DNA is constantly exposed to different exogenous and endogenous factors that may cause DNA damage, which can lead to the stalling of the replication fork. Understanding DNA repair mechanisms, discovering and characterizing the members of these pathways could provide key elements for the prevention of carcinogenesis, mutagenesis, and progeroid syndromes.

DNA-protein crosslinks (DPCs) are formed when proteins covalently and irreversibly bind to the DNA. Any protein (histones, transcription factors, DNA repair and replication proteins) that is in the vicinity of the DNA can be covalently bound to the DNA. DPCs can be induced exogenously by different reactive aldehydes, ionizing irradiation, UV light, etc., or endogenously during the metabolism of ethanol, which leads to acetaldehyde formation, or histone demethylation, which generates formaldehyde. The primary genotoxic effect of formaldehyde is the formation of DNA-protein crosslinks, which, due to their bulky size, inhibit transcription and DNA replication. Although DPCs are one of the most frequent and harmful DNA alterations because they interfere with replication and transcription, their repair mechanism and elimination is barely known. Until recently, DPC repair was thought to be performed only by canonical DNA repair pathways such as NER (Nucleic Excision Repair), homologous recombination, and the Fanconi anaemia pathway^{45,46,48}. A recent discovery in yeast revealed that during replication a newly identified protein, *wss1*, exhibits a DNA-dependent activity in removing DPCs. The yeast *wss1* protein is suggested to be the human homologue of Spartan because the two proteins have similar domain structures containing a metalloprotease domain in the form of an SprT domain in Spartan and a WLM domain in Wss1^{45,46}.

Spartan, a new protein of the DNA Damage Tolerance (DDT) pathway, was discovered and characterized in 2012 by our and other laboratories^{78-80, 82}. We described that Spartan promotes genome stability by regulating the choice of rescue of the stalled replication fork and that the silencing of the protein results in a 2.5-fold increase in sister chromatid exchange⁸⁰. Spartan's essential role in the maintenance of chromosomal and genome integrity is supported by the facts that Spartan mutations were found in three patients from two unrelated families with early onset of hepatocellular carcinoma and

progeroid features and complete loss of Spartan leads to early embryonic lethality in mice^{83,84}.

Our *in vitro* experiments revealed that in the presence of DNA Spartan has a DNA-dependent protease activity, and it can also degrade other DNA-binding proteins such as Fan1, HLTF, and yRad5. Furthermore, we found that some proteins that have high affinity to DNA, such as RFC and RPA, exhibit a concentration-dependent inhibitory effect on Spartan's DNA-dependent protease activity.

The previously published BrdU comet assay (Single Cell Electrophoresis) protocol was modified in a way that the assay became highly specific for replication and DNA-protein crosslinks in order to reveal Spartan's role in the replication of DPC-containing DNA⁸⁹. Although formaldehyde exposure generates DNA-protein crosslinks, DNA-DNA crosslinks are also induced to a lesser extent. To distinguish between these types of damage, Proteinase K treatment was introduced to eliminate the proteins crosslinked to DNA. Due to the removal of crosslinks, the free DNA can migrate in electrophoresis resulting in a higher percentage of comet tail DNA. The difference between the comet tails of Proteinase K-treated and untreated samples reveals the percentage of DNA-protein crosslinks. This modification enables the monitoring and measurement of DPCs at the single-cell level. Our result revealed that this method is reliable and highly DPC- and S-phase specific. Moreover, every formaldehyde concentration used caused higher DPC accumulation in the Spartan-silenced HEK293 cell lines compared to control cells. From these results, we concluded that Spartan is required for the replication of DPC-containing DNA fragments; the lack of the protein leads to slower DPC removal; and Spartan's protease or DNA-binding deficiency impairs highly the DPC-repair of replicating cells.

To demonstrate that the protease activity of Spartan is indeed required for DPC removal and to further confirm that the observed phenotype is Spartan-dependent, complementation assays were carried out. First, to rescue the effect of Spartan silencing on formaldehyde-induced DPC accumulation, we ectopically expressed silencing-resistant FLAG-Spartan in two independently generated stably Spartan-depleted cell lines and carried out the DPC-specific comet assay applying 2 hours of formaldehyde treatment and 3 hours of recovery. We found that ectopic expression of silencing-resistant

FLAG-Spartan resulted in the restoration of DPC repair, indicating that the impairment in the silenced cell lines was indeed caused by the absence of Spartan.

Furthermore, we tested the effect of the inactivation of the protease and DNA-binding activities of Spartan by a cell viability assay employing formaldehyde treatment. We ectopically expressed the siRNA-resistant forms of wild-type, DNA-binding mutant Spartan(4A) and SprT-mutant Spartan(HEAA) in Spartan-silenced cells and compared their formaldehyde sensitivity. We found that while wild-type Spartan compensated the negative effects of Spartan depletion in the cell survival assay quite well, neither Spartan(4A) nor Spartan(HEAA) was able to significantly rescue the deleterious effect of Spartan silencing, though their ectopic expression levels were similar. To further investigate the role of the protease and DNA-binding activities of Spartan in DPC-removal, BrdU comet assay was carried out. Quantitative comparison of the differences in the tail DNA percentage of Prot K-treated and untreated samples revealed that in contrast to wild-type Spartan, expression of Spartan(4A) and Spartan(HEAA) was not able to rescue the DPC repair deficiency caused by Spartan knockdown. From these results, we conclude that the DNA-binding domain- and protease domain-mediated activities of Spartan are important determinants of the function Spartan has in the protection against the genotoxic effects of FA-induced DPCs.

One of the main hallmarks of replication stress is the abnormal slowing of replication fork movement, which can eventually lead to the stalling of the replication fork. Having established the requirement of Spartan for DPC repair in replicating cells, our next question was whether Spartan has a role in the immediate bypass of DPCs, which can pose strong barriers to the movement of not only the replicative polymerases but the translesion synthesis polymerases as well. To monitor the speed of replication, we used the DNA fiber assay with which we can follow the elongation of the nucleotide analogue-labelled nascent DNA track at the single molecule level. The replicating DNA was visualized first by pulse labelling of the cells with iododeoxyuridine (IdU, red label) followed by mock or formaldehyde treatment, performed simultaneously with BrdU pulse labelling before immunodetection of the nucleotide analogues via microscopy of the individual, newly replicated DNA tracks. We found that formaldehyde treatment significantly decreased replication fork speed as revealed by the shorter second tracks.

To unravel whether Spartan can facilitate the bypass of formaldehyde-induced DNA damage, we compared Spartan-depleted and control cells and noticed that the lengths of the second tracks in Spartan-silenced cells are significantly shorter compared to control cells after formaldehyde treatment, reflecting a significantly stronger inhibitory effect of formaldehyde-induced damage on immediate bypass in the absence of Spartan.

No particularly defined pathway has been assigned to DPC repair yet, and the discovery of the requirement of the Spartan protease for the replication of DPC-containing DNA raised the question whether it constitutes an independent DPC repair pathway or acts together with other fork rescue pathways. In a wide variety of species, Rad6-Rad18-dependent PCNA-monoubiquitylation constitutes a predominant pathway for the rescue of stalled replication forks, and similarly, human Rad18 is required for the PRR (Post Replication Repair) of UV-damaged DNA⁸⁹. Independent laboratories have also reported that RAD18 and SPARTAN cooperate in the protection against UV-irradiation, though the role of Rad18 in regulating Spartan's function is still contradictory^{78-80, 82}. To address whether Spartan cooperates with Rad18 in DPC repair, we carried out epistasis analysis comparing the phenotypes of single Spartan- and Rad18- and double Spartan/Rad18-silenced cell lines employing three different assays; namely, cell survival assay, DPC-specific BrdU comet assay, and DNA fiber analysis.

When comparing the formaldehyde sensitivity of the single- and double-silenced cell lines, we observed that the Spartan/Rad18-silenced cells did not exhibit higher FA sensitivity than the Spartan-silenced or the Rad18-silenced cells, indicating that Spartan and Rad18 act together in protecting cells from formaldehyde-induced damage. To further confirm the epistatic relationship between SPARTAN and RAD18, we tested whether ectopic expression of the siRNA-resistant Spartan or Rad18 proteins can rescue the observed phenotype. While the expression of Spartan in Spartan-silenced cells and the expression of Rad18 in Rad18-silenced cells could fully rescue formaldehyde sensitivity, the expression of either Spartan or Rad18 alone could not rescue the sensitivity of the Spartan/Rad18 double-silenced cells. However, expression of Spartan and Rad18 together rescued the sensitivity of Spartan/Rad18-silenced cells, supporting further that their cooperation is required to achieve DPC resistance.

The results of the DPC-specific BrdU comet assay and the DNA fiber analysis showed the same results as the cell survival assay. In sum, all three independent methods confirmed an epistatic relationship between SPARTAN and RAD18 in providing cellular resistance against DPC.

In my thesis I showed that human Spartan is required for facilitating DPC repair and replication of DPC-containing DNA and that it acts together with the *RAD6-RAD18* DDT pathway.

9 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Haracska Lajosnak, hogy lehetőséget biztosított a kutatásaim elvégzéséhez, valamint a támogatást és a nélkülözhetetlen szakmai segítségüket.

Szeretnék köszönetet mondani Mórocz Mónikának, Tóth Robertnek, Pintér Lajosnak és Tick Gabriellának a kísérletekben és a cikk megírásában nyújtott segítséget!

Köszönöm továbbá Kovács Katalinnak és Nótári Péterné Icnak a technikai segítséget, amivel könnyebbé tették a labormunkát.

Különösen köszönöm Frittmann Orsolyának, Tóth Ágnesnek és a Deltabio 2000 Kft minden tagjának, hogy mindig számíthattam rájuk mind szakmai, mind baráti tekintetben. Szeretnék köszönetet mondani továbbá az SZBK Genetikai Intézetének vezetőinek, és minden tagjának, akik valamilyen módon hozzájárultak dolgozatom megírásához, valamint szakmai segítséget nyújtottak.

Végezetül szeretném megköszönni családomnak, férjemnek, és barátaimnak, hogy mindig mellettem álltak, és mindenben számíthattam rájuk. Köszönöm!

10 Saját közlemények jegyzéke.

A dolgozat alapját képező közlemények:

Mónika Mórocz*, Eszter Zsigmond*, Róbert Tóth, Márton Zs. Enyedi, Lajos Pintér, Lajos Haracska DNA-dependent protease activity of human Spartan facilitates replication of DNA–protein crosslink-containing DNA NUCLEIC ACIDS RESEARCH. 2017 Apr 7; 45(6): 3172–3188. doi: 10.1093/nar/gkw1315 IF: 11,14

* **Megosztott első szerző**

További közlemények:

Caitlin A.L. Riddick, Peter D. Hunter, José Antonio Domínguez Gómez, Victor Martinez-Vicente, Mátyás Présing, Hajnalka Horváth, Attila W. Kovács, Lajos Vörös, Eszter Zsigmond, Andrew N. Tyler Optimal Cyanobacterial Pigment Retrieval from Ocean Colour Sensors in a Highly Turbid, Optically Complex Lake; REMOTE SENSING. 2019, 11(13), 1613; <https://doi.org/10.3390/rs11131613> IF:4,7

Sarolta Szentes, Nikolett Zsibrita, Mihály Koncz, Eszter Zsigmond, Pál Salamon, Zita Pletl and Antal Kiss I-Block: a simple E. coli based assay for studying sequence-specific DNA binding of Proteins NUCLEIC ACIDS RESEARCH 2020 March 18; 48(5): doi: 10.1093/nar/gkaa014 IF:11,4

11 Referenciák

1. Thiagarajan, V., Byrdin, M., Eker, A. P. M., Muller, P. & Brettel, K. Kinetics of cyclobutane thymine dimer splitting by DNA photolyase directly monitored in the UV. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2011). doi:10.1073/pnas.1101026108
2. Wallace, S. S., Murphy, D. L. & Sweasy, J. B. Base excision repair and cancer. *Cancer Letters* (2012). doi:10.1016/j.canlet.2011.12.038
3. uchicago_qrb81_273 ber 30 000 mut_day.
4. Spivak, G. HHS Public Access. 13–18 (2016). doi:10.1016/j.dnarep.2015.09.003.Nucleotide
5. Laat, W. L. De, Jaspers, N. G. J. & Hoeijmakers, J. H. J. Molecular mechanism of nucleotide excision repair Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 768–785 (1999). doi:10.1101/gad.13.7.768
6. Black, J. O. Xeroderma Pigmentosum. *Head Neck Pathol.* **10**, 139–144 (2016).
7. De Boer, J. & Hoeijmakers, J. H. J. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* **21**, 453–460 (2000).
8. Chapman, J. R., Taylor, M. R. G. & Boulton, S. J. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Mol. Cell* **47**, 497–510 (2012).
9. Shrivastav, M., De Haro, L. P. & Nickoloff, J. A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* **18**, 134–147 (2008).
10. Pandey, M. & Raghavan, S. C. Editorial: Public sociology, trust and informal practices. *Stud. Transit. States Soc.* **7**, 1–3 (2015).
11. Featherstone, C. & Jackson, S. P. DNA double-strand break repair. *Curr. Biol.* **9**, 759–761 (1999).
12. Gerodimos, C. A., Chang, H. H. Y., Watanabe, G. & Lieber, M. R. Effects of DNA end configuration on XRCC4-DNA ligase IV and its stimulation of Artemis activity. *J. Biol. Chem.* **292**, 13914–13924 (2017).
13. Weterings, E. & Chen, D. J. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res.* **18**, 114–124 (2008).
14. Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U. & Schwarz, K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 712 (2003).
15. Ceccaldi, R., Sarangi, P. & D'Andrea, A. D. The Fanconi anaemia pathway: New players and new functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 337–349 (2016).
16. Castella, M. *et al.* FANCI Regulates Recruitment of the FA Core Complex at Sites of DNA Damage Independently of FANCD2. *PLoS Genet.* **11**, 1–27 (2015).
17. Crossan, G. P. *et al.* Disruption of mouse Slx4, a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia. *Nat. Genet.* **43**, 147–152 (2011).
18. Yamamoto, K. N. *et al.* Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 6492–6496 (2011).
19. Smogorzewska, A. *et al.* A Genetic Screen Identifies FAN1, a Fanconi Anemia-Associated Nuclease Necessary for DNA Interstrand Crosslink Repair. *Mol. Cell* **39**, 36–47 (2010).
20. Liu, T., Ghosal, G., Yuan, J., Chen, J. & Huang, J. FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair. *Science* (80-.). **329**, 693–696 (2010).
21. Walden, H. & Deans, A. J. The Fanconi Anemia DNA Repair Pathway: Structural

- and Functional Insights into a Complex Disorder. *Annu. Rev. Biophys.* **43**, 257–278 (2014).
22. Rodríguez, A. & D'Andrea, A. Fanconi anemia pathway. *Curr. Biol.* **27**, R986–R988 (2017).
 23. Loeber, R. L. *et al.* Proteomic Analysis of DNA-protein cross-linking by antitumor nitrogen mustards. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1151–1162 (2009).
 24. Michaelson-Richie, E. D. *et al.* DNA-protein cross-linking by 1,2,3,4-diepoxybutane. *J. Proteome Res.* **9**, 4356–4367 (2010).
 25. Lai, Y. *et al.* Measurement of Endogenous versus Exogenous Formaldehyde-Induced DNA-Protein Crosslinks in Animal Tissues by Stable Isotope Labeling and Ultrasensitive Mass Spectrometry. *Cancer Res.* **76**, 2652–2661 (2016).
 26. Kooistra, S. M. & Helin, K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat. Publ. Gr.* **13**, 297–311 (2012).
 27. Trewick, S. C., Henshaw, T. F., Hausinger, R. P., Lindahl, T. & Sedgwick, B. Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature* **419**, 174–178 (2002).
 28. Swenberg, J. A. *et al.* Endogenous versus exogenous DNA adducts: Their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment. *Toxicol. Sci.* **120**, 130–145 (2011).
 29. O'Brien, P. J., Siraki, A. G. & Shangari, N. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit. Rev. Toxicol.* **35**, 609–662 (2005).
 30. Heck, H. D. A. & Casanova, M. The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: A critical review of the biological evidence on distant-site toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **40**, 92–106 (2004).
 31. Tong, Z. *et al.* Accumulated hippocampal formaldehyde induces age-dependent memory decline. *Age (Dordr.)* **35**, 583–596 (2013).
 32. Coulombe, R. A. J., Drew, G. L. & Stermitz, F. R. Pyrrolizidine alkaloids crosslink DNA with actin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **154**, 198–202 (1999).
 33. Chvalova, K., Brabec, V. & Kasparkova, J. Mechanism of the formation of DNA-protein cross-links by antitumor cisplatin. *Nucleic Acids Res.* **35**, 1812–1821 (2007).
 34. Tretyakova, N. Y., Groehler, A. 4th & Ji, S. DNA-Protein Cross-Links: Formation, Structural Identities, and Biological Outcomes. *Acc. Chem. Res.* **48**, 1631–1644 (2015).
 35. Pommier, Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem. Rev.* **109**, 2894–2902 (2009).
 36. Nitiss, J. L. & Nitiss, K. C. Tdp2: a means to fixing the ends. *PLoS Genet.* **9**, e1003370 (2013).
 37. Oleinick, N. L., Chiu, S. M., Ramakrishnan, N. & Xue, L. Y. The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Br. J. Cancer. Suppl.* **8**, 135–140 (1987).
 38. Ide, H., Shoukamy, M. I., Nakano, T., Miyamoto-Matsubara, M. & Salem, A. M. H. Repair and biochemical effects of DNA-protein crosslinks. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **711**, 113–122 (2011).
 39. Minko, I. G., Zou, Y. & Lloyd, R. S. Incision of DNA-protein crosslinks by UvrABC nuclease suggests a potential repair pathway involving nucleotide excision repair.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 1905–1909 (2002).
40. Nakano, T. *et al.* Nucleotide Excision Repair and Homologous Recombination Systems Commit Differentially to the Repair of DNA-Protein Crosslinks. *Mol. Cell* **28**, 147–158 (2007).
 41. Ide, H., Nakano, T., Shoulkamy, M. I. & Salem, A. M. H. Formation , Repair , and Biological Effects of DNA – Protein Cross-Link Damage.
 42. de Graaf, B., Clore, A. & McCullough, A. K. Cellular pathways for DNA repair and damage tolerance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks. *DNA Repair (Amst)*. **8**, 1207–1214 (2009).
 43. Baker, D. J. *et al.* Nucleotide excision repair eliminates unique DNA-protein crosslinks from mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 22592–22604 (2007).
 44. Nakano, T. *et al.* Homologous recombination but not nucleotide excision repair plays a pivotal role in tolerance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 27065–27076 (2009).
 45. Krasich, R., Wu, S. Y., Kuo, H. K. & Kreuzer, K. N. Functions that protect *Escherichia coli* from DNA-protein crosslinks. *DNA Repair (Amst)*. **28**, 48–59 (2015).
 46. Stinglee, J., Schwarz, M. S., Bloemeke, N., Wolf, P. G. & Jentsch, S. A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair. *Cell* **158**, 327–338 (2014).
 47. Shaham, J., Bomstein, Y., Melzer, A. & Ribak, J. DNA–Protein Crosslinks and Sister Chromatid Exchanges as Biomarkers of Exposure to Formaldehyde. *Int. J. Occup. Environ. Health* **3**, 95–104 (1997).
 48. Vaz, B. *et al.* Metalloprotease SPRTN/DVC1 Orchestrates Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair. *Mol. Cell* **0**, 137–151 (2016).
 49. Nakano, T., Xu, X., Salem, A. M. H., Shoulkamy, M. I. & Ide, H. Radiation-induced DNA-protein cross-links: Mechanisms and biological significance. *Free Radic. Biol. Med.* **107**, 136–145 (2017).
 50. Quievryn, G. & Zhitkovich, a. Loss of DNA-protein crosslinks from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteasome function. *Carcinogenesis* **21**, 1573–1580 (2000).
 51. Lin, C.-P., Ban, Y., Lyu, Y. L., Desai, S. D. & Liu, L. F. A ubiquitin-proteasome pathway for the repair of topoisomerase I-DNA covalent complexes. *J. Biol. Chem.* **283**, 21074–21083 (2008).
 52. Ortega-Atienza, S., Green, S. E. & Zhitkovich, A. Proteasome activity is important for replication recovery, CHK1 phosphorylation and prevention of G2 arrest after low-dose formaldehyde. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **286**, 135–141 (2015).
 53. Duxin, J. P., Dewar, J. M., Yardimci, H. & Walter, J. C. Repair of a DNA-protein crosslink by replication-coupled proteolysis. *Cell* **159**, 349–357 (2014).
 54. Bailly, V., Lamb, J., Sung, P., Prakash, S. & Prakash, L. Specific complex formation between yeast RAD6 and RAD18 proteins: A potential mechanism for targeting RAD6 ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites. *Genes Dev.* **8**, 811–820 (1994).
 55. Prakash, L. Domains Required for Dimerization of Yeast Rad6 Ubiquitin-Conjugating Enzyme and Rad18 DNA Binding Protein. **17**, 4536–4543 (1997).
 56. Davies, A. A., Huttner, D., Daigaku, Y., Chen, S. & Ulrich, H. D. Activation of

- Ubiquitin-Dependent DNA Damage Bypass Is Mediated by Replication Protein A. *Mol. Cell* **29**, 625–636 (2008).
57. Masuda, Y., Suzuki, M., Kawai, H., Suzuki, F. & Kamiya, K. Asymmetric nature of two subunits of RAD18 , a RING-type ubiquitin ligase E3 , in the human RAD6A – RAD18 ternary complex. **40**, 1065–1076 (2012).
 58. Notenboom, V. *et al.* Functional characterization of Rad18 domains for Rad6 , ubiquitin , DNA binding and PCNA modification. **35**, 5819–5830 (2007).
 59. Hedglin, M. & Benkovic, S. J. Regulation of Rad6 / Rad18 Activity During DNA Damage Tolerance. 207–230 (2015). doi:10.1146/annurev-biophys-060414-033841
 60. Finley, D., Ulrich, H. D., Sommer, T. & Kaiser, P. The Ubiquitin – Proteasome System of. **192**, 319–360 (2012).
 61. Guo, C. *et al.* Ubiquitin-Binding Motifs in REV1 Protein Are Required for Its Role in the Tolerance of DNA Damage □ †. **26**, 8892–8900 (2006).
 62. Wood, A., Garg, P. & Burgers, P. M. J. A Ubiquitin-binding Motif in the Translesion DNA Polymerase Rev1 Mediates Its Essential Functional Interaction with Ubiquitinated Proliferating Cell Nuclear Antigen in Response to DNA Damage *. **282**, 20256–20263 (2007).
 63. Plosky, B. S. *et al.* Controlling the subcellular localization of DNA polymerases i and g via interactions with ubiquitin. **25**, 2847–2855 (2006).
 64. Bienko, M. *et al.* American Association for the Advancement of Science. **310**, 1821–1824 (2016).
 65. Watanabe, K. *et al.* Rad18 guides pol g to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. **23**, 3886–3896 (2004).
 66. Kannouche, P. L., Wing, J., Lehmann, A. R. & Bn, B. Interaction of Human DNA Polymerase □ with Monoubiquitinated PCNA: A Possible Mechanism for the Polymerase Switch in Response to DNA Damage. **14**, 491–500 (2004).
 67. Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135–141 (2002).
 68. Parker, J. L. *et al.* SUMO modification of PCNA is controlled by DNA. **27**, 2422–2431 (2008).
 69. Stelter, P. & Ulrich, H. D. Control of spontaneous and damage- induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. **425**, (2003).
 70. Papouli, E. *et al.* Crosstalk between SUMO and Ubiquitin on PCNA Is Mediated by Recruitment of the Helicase Srs2p. **19**, 123–133 (2005).
 71. Pfander, B., Moldovan, G., Sacher, M., Hoege, C. & Jentsch, S. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. **436**, 17–22 (2005).
 72. PcnA, S., Parker, J. L. & Ulrich, H. D. A SUMO-interacting motif activates budding yeast ubiquitin ligase Rad18 towards. **40**, 11380–11388 (2012).
 73. Huang, T. T. *et al.* Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. **8**, (2006).
 74. Cohn, M. A. *et al.* Article A UAF1-Containing Multisubunit Protein Complex Regulates the Fanconi Anemia Pathway. **1**, 786–797 (2007).
 75. Lee, K., Yang, K., Cohn, M. A., Sikdar, N. & Myung, K. Human ELG1 Regulates the Level of Ubiquitinated Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) through Its

- Interactions with PCNA and USP1 *. **285**, 10362–10369 (2010).
76. Niimi, A. *et al.* Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. 1–6 (2008).
 77. Toth, A., Hegedus, L., Juhasz, S., Haracska, L. & Burkovics, P. The DNA-binding box of human SPARTAN contributes to the targeting of Pol η to DNA damage sites. *DNA Repair (Amst)*. (2016). doi:10.1016/j.dnarep.2016.10.007
 78. Centore, R. C., Yazinski, S. A., Tse, A. & Zou, L. Spartan/C1orf124, a Reader of PCNA Ubiquitylation and a Regulator of UV-Induced DNA Damage Response. *Mol. Cell* **46**, 625–635 (2012).
 79. Ghosal, G., Leung, J. W. C., Nair, B. C., Fong, K. W. & Chen, J. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)-binding protein C1orf124 is a regulator of translesion synthesis. *J. Biol. Chem.* **287**, 34225–34233 (2012).
 80. Juhasz, S. *et al.* Characterization of human Spartan/C1orf124, an ubiquitin-PCNA interacting regulator of DNA damage tolerance. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10795–10808 (2012).
 81. Villamil, M. A., Chen, J., Liang, Q. & Zhuang, Z. A Noncanonical Cysteine Protease USP1 Is Activated through Active Site Modulation by USP1-Associated Factor 1. (2012).
 82. Kim, M. S. *et al.* Regulation of error-prone translesion synthesis by Spartan/C1orf124. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1661–1668 (2013).
 83. Maskey, R. S. *et al.* Spartan deficiency causes genomic instability and progeroid phenotypes. *Nat. Commun.* **5**, 5744 (2014).
 84. Lessel, D. *et al.* Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features. *Nat. Genet.* **46**, 1239–44 (2014).
 85. US5545529.
 86. Kanagaraj, R. *et al.* RECQ5 helicase associates with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II during productive elongation phase of transcription. *Nucleic Acids Res.* **38**, 8131–8140 (2010).
 87. Unk, I. *et al.* Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3768–73 (2008).
 88. Han, J. *et al.* SIVA1 directs the E3 ubiquitin ligase RAD18 for PCNA monoubiquitination. *J. Cell Biol.* **205**, 811–827 (2014).
 89. M??rocz, M., Gali, H., Rask??, I., Downes, C. S. & Haracska, L. Single Cell Analysis of Human RAD18-Dependent DNA Post-Replication Repair by Alkaline Bromodeoxyuridine Comet Assay. *PLoS One* **8**, (2013).
 90. Merk, O. & Speit, G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* **33**, 167–172 (1999).
 91. Merk, O. & Speit, G. Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* **32**, 260–268 (1998).
 92. Kumari, A., Lim, Y. X., Newell, A. H., Olson, S. B. & McCullough, A. K. Formaldehyde-induced genome instability is suppressed by an XPF-dependent pathway. *DNA Repair (Amst)*. **11**, 236–246 (2012).
 93. Kumari, A., Owen, N., Juarez, E. & McCullough, A. K. BLM protein mitigates formaldehyde-induced genomic instability. *DNA Repair (Amst)*. **28**, 73–82 (2015).
 94. Gangavarapu, V. *et al.* Mms2-Ubc13-dependent and -independent roles of Rad5 ubiquitin ligase in postreplication repair and translesion DNA synthesis in

- Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7783–90 (2006).
95. Spivak, G. et al. Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair (Amst)*.36 13-18 (2015)
 96. Ravindra, A et al. Homologous Recombination in Eukaryotes. *Prog. in Mol. Biol. and Translat. Sci.*, 110, 1877-1173, (2012)
 97. Jaime Lopez-Mosqueda, et al. SPRTN is a mammalian DNA-binding metalloprotease that resolves DNA-protein crosslinks. *Elife*. 5:e21491, (2016)