

**A humán Spartan szerepe a DNS–fehérje keresztkötések
eltávolításában**

Ph.D. értekezés tézisei

Sági-Zsigmond Eszter

Témavezető:

Dr. Haracska Lajos, D.Sc.

tudományos tanácsadó

Az Európai Unió Kiválósági Központja
ELKH-Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

Szeged
2021

Bevezetés

A DNS molekula a sejtek életéhez szükséges nélkülözhetetlen információkat tartalmaz. Annak érdekében, hogy egy utódsejt az eredeti pontos másolata legyen, genetikai információja nem változhat meg. A sejtek számára létfontosságú a genetikai információ pontos és hibamentes megőrzése, mivel az elakadt replikációs villák mutációk, száltörések, és genom átrendeződések kialakulásához vezethetnek, ami végső esetben rákos sejtek kialakulását vagy sejthalált is okozhat. Az élőlények sejtjei azonban állandóan külső és belső DNS károsító tényezőknek vannak kitéve, amelyek DNS-hibák, DNS-száltörések és különböző keresztkötések kialakulásához vezethetnek.

A DNS-hez kovalensen és irreverzibilisen kapcsolódó fehérjéket DNS–fehérje keresztkötéseknek (DNA–Protein Crosslinks, DPC) nevezzük, ezek a DNS hibák egy specifikus csoportját képezik. A DNS–fehérje keresztkötések fizikai akadályt képeznek a replikáció során. A replikációval egyidőben való jelenlétük kettősszalú DNS-törések kialakulásához vezethetnek, amely a legnagyobb veszélyt jelenti a genomintegritás megőrzésében.

Genetikai és biokémiai kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a DNS–fehérje keresztkötések eltávolítását két hibajavító mechanizmus végzi: a Nukleotid Kivágó Rendszer (NER) és a Homolog Rekombináció (HR). Stinglee és mtsai. 2014-ben *Saccharomyces cerevisiae*-ben azonosítottak egy eddig ismeretlen DPC-t eltávolító mechanizmust, amelyben az úgynevezett *wss1* (weak supressor of *smt3* protein 1) metalloproteáz fehérjének van kulcsszerepe. A csoport további

kísérletekben bizonyította, hogy a *wss1* metalloproteáz doménjének DNS-függő proteáz aktivitása révén, valóban fontos szerepet játszik a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában.

A humán Spartan (vagy DVC1, C1orf124), egy multidomén fehérje, amelyet 2012-ben csoportunkkal párhuzamosan több kutatócsoport is jellemezett. Rendelkezik egy UBZ4 (Ubiquitin-Binding Zinc Finger), PIP (PCNA Interacting Protein), SHP (p97-Binding Motif), DNS-kötő régióval és egy Spr-T metalloproteáz doménnel. 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 szerepet, az SprT domén szerepe eddig ismeretlen.

A DDT-ben (DNS-hibitolerancia, DNA damage tolerance) betöltött fontos szerepére utal, hogy hiányában DNS károsító ágensek hatására a sejtek megnövekedett érzékenységet mutatnak, illetve UV sugárzást követően a Spartan magi fókuszokba rendeződik, melyek helyzete egybeesik a PCNA, az RPA és Rad18 által létrehozott fókuszok helyével, vagyis a DNS szintézissel és a DNS léziók miatt elakadt replikációs villákkal. A Spartan expressziója sejtciklus függő, a sejtek S fázisában tetőzik, jelen van G2-ben és a korai M fázisban is. A Spartan a genomintegritás megtartásában betöltött fontos szerepét bizonyítja, hogy Spartan-hiányos (knock out) egerek korai embrionális letalitást mutatnak. A Spartan hipomorf egerek életképesek, viszont megfigyelhetőek a korai öregedés jelei, a DNS-hibák halmozott jelenléte, és a genominstabilitás. Emberben a Spartan hiánya,

korai hepatocelluláris karcinoma kialakulásához, genominstabilitáshoz és Ruijs-Aalfs progeroid szindróma megjelenéséhez vezet.

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

Célkitűzések

Munkánk során a humán Spartan SprT metalloproteáz doménjének funkcióját és a humán Spartan DNS–fehérje keresztkötések hibajavításában betöltött szerepét szeretnénk jobban megérteni.

A kérdéseink megválaszolásához az alábbi kísérletek elvégzését tűztük ki célul:

- A Spartan fehérje DNS-függő proteáz aktivitásának kimutatása és jellemzése *in vitro* biokémiai módszerekkel
- A Spartan szerepének kimutatása és jellemzése a DNS–fehérje keresztkötések eltávolításában SDS/KCl precipitációs módszerrel
- DNS–fehérje keresztkötések kimutatására alkalmas BrdU comet technika jellemzése
- A Spartan UBZ, PIP, SprT és a DNS-kötő doménjeinek jellemzése a DNS–fehérje keresztkötések eltávolításában
- A Spartan szerepének jellemzése a DNS–fehérje keresztkötések azonnali javításában
- Az Spartan és a Rad18 együttműködésének jellemzése a genomi DNS–fehérje keresztkötések eltávolításában

Alkalmazott módszerek

- A humán Spartan fehérjék tisztításához szükséges plazmidkonstrukciók létrehozásához restrikciós emésztést, LR reakciót, ligálást, plazmidtisztítást, valamint baktérium és élesztő transzformálást használtunk.
- A fehérjetisztítást GST-affinitáskromatográfia módszerrel végeztük, és a tisztítás eredményét gélelektroforézissel ellenőriztük, amelyhez denaturáló poliakrilamid gélt használtunk.
- Spartan enzimátikus hasadásának vizsgálatához *in vitro* biokémiai módszereket használtunk (denaturáló poliakrilamid gél, Comassie kék festés, Western blot analízis).
- A Spartan DNS–fehérje keresztkötések eltávolításában betöltött szerepének *in vivo* vizsgálatára HEK293 humán sejt kultúrát, transzfektálással végeztük, illetve stabilan csendesített sejt vonalakat hoztunk létre.
- A Spartan DNS–fehérje keresztkötéseket eltávolításában betöltött szerepének kimutatására SDS-KCl precipitációs módszert használtunk.
- A Spartan a DNS–fehérje keresztkötéseket tartalmazó DNS szakaszok replikációjában betöltött szerepének kimutatására Proteináz-K kezeléssel kiegészített BrdU comet technikát alkalmaztunk.
- A Spartan szerepének jellemzésére a DNS–fehérje keresztkötések azonnali javításában DNS fiber módszert használtunk.
- A formaldehid-kezelés hatását a Spartan stabilan csendesített sejt vonalak sejt ciklusára áramlási citométer alapú sejt ciklus vizsgálattal végeztük.

- A Spartan és a RAD18 DPC hibajavításban betöltött kapcsolatának vizsgálatára sejtérzékenységi tesztet, DNS fiber technikát és Proteináz-K kezeléssel kiegészített BrdU comet technikát alkalmaztunk.

Eredmények

A humán Spartan rendelkezik DNS-függő proteáz aktivitással

Tisztított Spartan fehérje preparátumot használva, *in vitro* biokémiai módszerekkel igazoltuk, hogy a Spartan DNS jelenlétében képes önmaga és más DNS-kötő fehérjék proteolitikus emésztésére. Továbbá, biokémiai módszerekkel vizsgáltuk, a Spartan aktivitását különböző DNS struktúrák jelenlétében, a legerősebb aktivitást a Φ X174 egyesszálú DNS-sel alakította ki, amíg a kettősszálú, illetve bevágott plazmid DNS, 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 humán Spartannak szerepe van a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában

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

DNS-fehérje keresztkötések kimutatására alkalmas BrdU comet technika jellemzése

Spartan a DNS-fehérje keresztkötéseket tartalmazó DNS szakaszok replikációjában betöltött szerepének 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 eléréséhez 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 Proteináz K kezelésre azért volt szükség, hogy DNS–fehérje keresztkötéseket el tudjuk különíteni a formaldehid kezelés által indukált más DNS lézióktól (pl. különböző DNS-DNS keresztkötések). Az általunk módosított módszer hatékonyságát, érzékenységét és specificitását növekvő mennyiségű formaldehid alkalmazásával vizsgáltuk. A módszer alkalmasnak bizonyult az S fázisban jelenlévő DNS–fehérje keresztkötések mennyiségének kimutatására és mérésére.

A módszert alkalmazva, 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.

Az SprT, a DNS-kötő, az UBZ és a PIP domének szükségesek a DNS–fehérje keresztkötések eltávolításához

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

A humán Spartannak szerepe van az azonnali DNS–fehérje keresztkötések hibajavításában

A DNS-t érő különböző stresszhatások következményeként a replikáció sebessége lelassulhat, ami a replikációs villák leállításához és genominstabilitáshoz vezethet. DNS fiber technikával végzett kísérleteink eredményei a Spartan azonnali hibajavításban betöltött fontos szerepére utalnak a DNS–fehérje keresztkötéseket tartalmazó DNS szakaszok replikációja során.

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

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 hasonlóan a már jól jellemzett DNS-hibitolerancia útvonal részeként működik. 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 DPC-ket tartalmazó DNS szakaszok replikációjához.

Összefoglalva eredményeinket, munkánk során igazoltuk, hogy a humán Spartan rendelkezik proteáz aktivitással, amelyért a fehérje SprT metalloproteáz-szerű doménje a felelős. Meghatároztuk, hogy a Spartan ezen aktivitása kizárólag DNS jelenlétében valósul meg. Továbbá, bemutattuk a Spartan létfontosságú szerepét a DNS–fehérje

keresztköteket tartalmazó DNS szakaszok replikációja során, és ezen keresztkötekek eltávolításában. Kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a Spartan DNS-fehérje keresztkötekek eltávolításában betöltött aktivitását a Rad18 útvonallal kapcsolatosan végzi.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Haracska Lajosnak, hogy lehetőséget biztosított a kutatásom elvégzéséhez, valamint a támogatását és a nélkülözhetetlen szakmai segítségét.

Köszönöm Dr. Mórocz Mónika Krisztinának és Tóth Robertnek, a kísérletekben nyújtott segítséget.

Köszönöm Dr. Pankotai Tibornak, hogy rövid határidővel elvállalta a dolgozatom bírálatát.

Szeretném megköszönni Pintér Lajosnak, Dr. Burkovics Péternek, Dr. Juhász Szilviának, Hegedűs Lilinek és Tick Gabriellának a segítségét, és a dolgozatom írása során nyújtott támogatásukat. Emellett köszönöm Kovács Katalinnak a technikai segítséget, valamint a Mutagenézis és Karcinogenezis csoport és a Deltabio 2000 Kft tagjainak segítségét.

Köszönöm Dr. Erdélyi Miklósnak, valamint a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetikai Intézet tagjainak a kutatásom elvégzéséhez biztosított hátteret.

Köszönöm Tóth Ágnes, Frittmann Orsolya segítségét és támogatását, és hogy segítettek túljutni ezen az időszakon.

Végül szeretném megköszönni szüleimnek, férjemnek és barátaimnak, hogy mindig támogattak és mellettem álltak.

Saját közlemények jegyzéke

MTMT azonosító: 10055207

Összesített impakt faktor: 27,24

A fokozatszerzési eljárás alapját képező közlemények jegyzéke:

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 NAR. 2017 Apr 7; 45(6): 3172–3188. doi: 10.1093/nar/gkw1315, **IF: 11,14**

* Megosztott első szerző

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**

További közlemények:

Sarolta Szentés, 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**

Konferencia

Előadás

Zsigmond Eszter, Mórocz M, Toth R, Berczeli O, Dome L, Juhasz S, Haracska L: The role of human Spartan in the maintenance of genome integrity, Straub- napok, 2016 (Szeged, Magyarország)

Zsigmond Eszter, Horvath H, Presing M: A Balaton és Kis-Balaton vízminőségének jellemzése a tápelemek és a fotoszintetikus pigmentek (a-klorofill és fikocianin) koncentrációja alapján, 13. Kolozsvári Biológus Napok, 2012 (Kolozsvár, Románia)

Poszter

Horvath H, Kovacs A, **Zsigmond E**, Voros L, Matyas K, Kobor I, Presing M: Estimation of cyanobacterial biomass based on the determination of their phycocyanin content, Interaction of Natureal and Social Processes in Shallow Lake Aleas International Conference, 2014 (Kaposvár, Hungary)

Horvath H, Kovacs AW, Voros L, **Zsigmond E**, Presing M: Extraction method of phycocyanin determination in filamentous cyanobacteria, Fresh Blood for Fresh Water Young Aquatic Science, 2013 (Lunz am See, Austria)

Horvath H, Kovacs AW, Matyas K, Sule G, Voros L, **Zsigmond E**, Presing M: Nitrogen fixation and phycocyanin content of phytoplankton in freshwaters, International Society of Limnology XXII. Congress, 2013 (Budapest, Magyarország)

