

Ph.D. értekezés tézisei

Az élesztő Rad18 fehérje szerkezeti és funkcionális vizsgálata

Frittmann Orsolya

Témavezető: Dr Unk Ildikó,
tudományos tanácsadó

Biológia Doktori Iskola
SZTE Természettudományi és Informatikai Kar

Eötvös Lóránd Kutatási Hálózat
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

Szeged
2021.

Bevezetés

A sejtek örökítőanyagát számos károsító hatás éri, mely származhat a környezetből, de a sejtek alapvető életfolyamataiból is. A hibák kijavításának és a DNS információtartalmának hibátlan megőrzése érdekében számos mechanizmus jött létre az evolúció során. Mégis vannak olyan károsodások, amelyek nem kerülnek kijavításra a sejtciklus S fázisáig és ott a replikációs villa megakadását, kettős szálú töréseket, kromoszómális átrendeződéseket okoznak. A genom stabilitásának megőrzésére olyan mechanizmusok jöttek létre, melyek biztosítják a replikációs gépezet továbbhaladását a károsodott bázison. Ezeket a folyamatokat nevezzük összefoglalóan DNS-hiba tolerancia útvonalaknak (DDT).

A DDT számos útvonala közül csoportunk a Rad6/Rad18 vezérelte DDT útvonal működésének pontos megértésével foglalkozik. Az útvonal működése során az elakadt replikációs villában a Rad6/Rad18 komplex ubikvitinálja a PCNA molekulát a 164-es lizinjén, melynek hatására a replikatív DNS-polimeráz helyét egy transzléziós (TLS) polimeráz veszi át. A TLS polimeráz flexibilis aktív centrumának köszönhetően átsegíti a replikációs apparátust a hibás DNS szakaszon, majd a replikatív polimeráz folytatja a DNS szintézisét. Ha a monoubikvitinált PCNA molekula az Mms2/Ubc13-Rad5 komplex által poliubikvitinálódik, akkor a hibamentes átírást biztosító villa-visszafordításon/templátváltáson alapuló alútvonal lép életbe.

A Rad6/Rad18 komplex nélkül a DDT útvonal nem lép működésbe. Annak ellenére, hogy a Rad18 fehérje jelenléte és hibátlan működése esszenciális, s ezért intenzíven kutatott, mégsem ismerjük működésének és szerkezetének minden részletét ma még. A hosszú évek kutatómunkájának eredményeként hat domént azonosítottak a Rad18 fehérjén. Az első Rad18-cal foglalkozó közleményekben még ATP-ázként írták le, a C-terminális részén meg is találjuk a Walker-A típusú nukleotid kötő motívumot. Szintén a C-terminális végén találjuk a Rad6 ubikvitin konjugázzal való interakcióért felelős régiót. Az N-terminális részén az E3 ubikvitin ligázokra jellemző RING domént és a SUMO molekulával kölcsönható motívumot (SIM) is tartalmazza a fehérje. A középső részen helyezkedik el a cink-ujj motívum és a SAP domén is, melyek pontos szerepe a mai napig nem tisztázott. Ezért célul tűztük ki, hogy a már ismert domének szerepeit tisztázzuk az élesztő Rad18 fehérje esetében, és a még funkció nélküli nagyobb fehérjerészleteket megvizsgáljuk a DNS-hiba tolerancia mechanizmus tekintetében.

Célkitűzések

Célul tűztük ki, hogy a Rad18 fehérje azon részeit, melyek funkciója eddig még nem ismert feltérképezzük, és a behatárolt domének pontos szerepét meghatározzuk.

Ehhez a következő feladatok elvégzését terveztük:

1. Deléciós és pontmutáns *RAD18* gének elkészítése.
2. A mutánsokat, mint egyedüli Rad18 forrást tartalmazó élesztőtörzsek előállítás.
3. A létrehozott mutánsok közül kiszűrni azokat, amelyek DNS-károsító hatásokra mutatott fenotípus alapján a DNS-hiba tolerancia útvonalában betöltött szerepében befolyásolják a Rad18 működését.
4. Genetikai analízissel besorolni az adott mutációk hatását valamelyik episztázis csoportba, vagyis kideríteni, hogy a deléció/pontmutáció melyik alútvonal működését befolyásolja.
5. A mutáns fehérjék interakciós viszonyait feltérképezni a jól ismert kölcsönható partnerek tekintetében. Megvizsgálni, hogy az eltávolított régióknak van-e szerepe a Rad18 fehérje által kialakított kölcsönhatások létrejöttében.
6. Megvizsgálni a kérdéses mutáns fehérjék DNS kötési aktivitását.

Kísérleti megközelítés

Génkiütés helyspecifikus mutagenezissel

DNS manipulálás, klónozás

Élesztő genetika, mutagenezis mérése

Fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatása

Rekombináns fehérje tisztítás

DNS-kötés vizsgálata

Eredmények és megvitatásuk

Munkánk során 8 deléciós és egy pontmutáns Rad18 fehérje DNS-hiba tolerancia folyamatában betöltött szerepét vizsgáltuk meg. A fehérje N-, és C-terminálisán is rendelkezik két nagyobb régióval, melyhez funkciót a munkánk tervezésekor még senki nem tudott rendelni, így mi 3-3 delécióval fedtük le ezeket a részeket. Idő közben az N-terminálison, a RING és cink-ujj domének között, egy SUMO-val kölcsönható motívumnak nevezett régiót (SIM, SUMO interacting motif) azonosítottak. A SAP domén szerepéről élesztő fehérje esetében szinte semmi információ nem állt rendelkezésünkre, így a SAP domén felének és az előtte elhelyezkedő 42 aminosavnak az eltávolításával szerettünk volna fényt deríteni a domén funkciójára. A cink-ujj és a SAP közötti 62 aminosavat is eltávolítottuk, hogy ennek a darabnak a lehetséges szerepére is rátaláljunk. A cink-ujj, C2HC szekvencia motívumú régió, mely sok fehérje esetében konzervált. Ebben az esetben csak pontmutációval rontottuk el, így meggátolva a domén jellegzetes harmadlagos struktúrájának kialakulását.

A C-terminális rész vizsgálatát három különböző méretű C-terminális deléciót hordozó konstrukció segítségével végeztük el. Azonban azt tapasztaltuk, hogy a C-terminális részéhez semmilyen funkció nem kapcsolódik, a deléciós Rad18 fehérjék hibátlanul működnek a DNS-hiba tolerancia útvonal folyamataiban.

Az N-terminális vég vizsgálatához is három, különböző méretű szakaszt eltávolító konstrukciót hoztunk létre. Az ezekkel végzett kísérletekben a legnagyobb deléciót hordozó fehérjét tartalmazó törzs extrém érzékenységet mutatott DNS-károsító hatásokra, tehát a hiányzó régióknak nélkülözhetetlen szerepe van a DDT működésében. Élesztő kettős hibrid és GST pull-down kísérletekben ezután megvizsgáltuk azt is, hogy képes-e a fehérje kölcsönhatni az ismert interakciós partnerekkel. Azt találtuk, hogy Rad6-tal képes a komplex kialakítására, önmagával is tud dimert alkotni, viszont a Rad5 fehérjével nem képes kölcsönhatásba lépni. Ez azonban önmagában nem magyarázza a tapasztalt nagymértékű érzékenységet. Ezért arra gondoltunk, hogy a PCNA és a Rad18 között nem tud létrejönni a kapcsolat, és ez áll a megfigyelt nagy érzékenység mögött. Az általunk elvégzett kísérletek azonban ezt nem igazolták, így továbbra is nyitott kérdés marad, hogy mi áll a tapasztalt fenotípus hátterében.

A másik két N-terminális deléciót hordozó törzs közepes érzékenységet mutatott a használt DNS-károsító ágensekre, tehát ezekben az esetekben a Rad18 funkciója sérült a DDT folyamatában. Episztázis analízissel bebizonyítottuk azt is, hogy a hiányzó részlet a villa-visszafordításon/templátváltáson alapuló alútvonal működését érintette. Élesztő kettős hibrid

kísérletben pedig világossá vált, hogy a deléciós Rad18 fehérje nem tud a Rad5-tel interakcióba lépni, ami az említett alútvonalnak nélkülözhetetlen eseménye. A deléciós konstrukciókkal sikerült a Rad5 kölcsönhatásért felelős régiót a 155-190. aminosavig terjedő fehérjerészletre behatárolni. Lehetséges, hogy a legnagyobb deléciót tartalmazó fehérje esetében a 80-115. aminosavig terjedő részlet hiánya okozza az extrém érzékenységet, ide kötődik egy olyan alapvető funkció, ami nélkülözhetetlen a Rad18 működéséhez.

Közvetlenül az N-terminális deléciók után találjuk a Rad18 fehérjében a cink-ujj motívumot, melyet pontmutációval rontottunk el (CC190,193GG). A cink-ujj pontmutáns hasonlóan viselkedett, mint a két N-terminális deléciós törzs: közepesen érzékeny fenotípust mutatott UV-kezelés hatására és episztatikus kapcsolatban állt a Rad5 alútvonallal. Élesztő kettős hibrid kísérletben pedig a Rad5 kivételével az összes ismert interakciós partnerrel kölcsönhatott. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a cink-ujj is nélkülözhetetlen a Rad5-Rad18 kölcsönhatás kialakításához, tehát az interakcióhoz szükséges fehérjerégiót kibővíthetjük a 155-210 aminosavig terjedő szakaszra.

A fehérje középső részét a cink-ujj és SAP domén közötti részt deletáló (M) valamint a fél SAP doménben hiányos konstrukciókat tartalmazó törzsekkel vizsgáltuk meg. Mind az M, mind a SAP deléciós törzs a teljes *RAD18* gén deléciójával megegyező érzékenységet mutatott a mutagén ágensek hatására. A SAP domén funkciójaként az irodalom DNS kötést feltételez. Ezzel összhangban a DNS-kötési kísérletben azt tapasztaltuk, hogy a SAP doménjében hiányos fehérje nem tudta megkötni az egyszálú DNS-t, ami pedig nyilvánvalóan a tapasztalt fenotípushoz vezethet. Ezen túl leellenőriztük a SAP mutáns fehérje kölcsönhatási mintázatát is, hiszen a fehérje szerkezetében bekövetkező változás hatással lehet a kialakított interakciókra is. A mutáns azonban kivétel nélkül kölcsönhatott a jól ismert interakciós partnerekkel.

Az M mutáns vizsgálata ezzel szemben meglepő eredményt hozott. A deléciós fehérje nem tudott interakcióba lépni a Rad5 molekulával, valamint az egyszálú DNS szubsztrátot sem volt képes megkötni. Ebből arra következtethetünk, hogy a cink-ujj és a SAP domén közötti régió mintegy hídként funkcionál, megfelelő távolságot tart a két domén között, hogy azok a helyes térbeli konformációt kialakítva el tudják látni a feladatukat.

Eredmények:

1. A Rad18 C-terminális része nem vesz részt a DNS-hiba tolerancia útvonal működésében.
2. A cink-ujj motívumot is tartalmazó, 155-246. aminosavig terjedő régió a felelős a Rad5 fehérjével való kölcsönhatás kialakításáért.

3. A SAP domén hélix-loop-hélix motívuma szükséges a DNS kötéséhez.

4. A cink-ujj és SAP domén közötti rész a helyes konformáció kialakításával egyaránt hozzájárul a Rad5 és az egyszálú DNS kötésének megvalósulásához.

Publikációk

1. A doktori eljárás alapját képező közlemények

Frittmann O, Gali VK, Halmai M, Toth R, Gyorfy Z, Balint E, Unk I
The Zn-finger of *Saccharomyces cerevisiae* Rad18 and its adjacent region mediate interaction with Rad5.

G3 (Bethesda). 2021 Feb 11. doi: 10.1093/g3journal/jkab041.

PMID: 33570581 IF (2020): 2.781

Vamsi K. Gali, Eva Balint, Nataliia Serbyn, **Orsolya Frittmann**, Françoise Stutz, Ildiko Unk
Translesion synthesis DNA polymerase η exhibits a specific RNA extension activity and a transcription-associated function

Sci Rep. 2017; 7: 13055. Published online 2017 Oct 12. doi: 10.1038/s41598-017-12915-1

PMCID: PMC5638924, IF (2020): 4.12

2. Referált folyóiratban megjelent közlemények

Miklos Halmai, **Orsolya Frittmann**, Zoltan Szabo, Andreea Daraba, Vamsi K. Gali, Eva Balint, Ildiko Unk

Mutations at the Subunit Interface of Yeast Proliferating Cell Nuclear Antigen Reveal a Versatile Regulatory Domain

PLoS One. 2016; 11(8): e0161307. Published online 2016 Aug

18. doi: 10.1371/journal.pone.0161307

PMCID: PMC4990258, IF (2020): 2.87

Vamsi K. Gali, Eva Balint, Nataliia Serbyn, **Orsolya Frittmann**, Françoise Stutz, Ildiko Unk
Translesion synthesis DNA polymerase η exhibits a specific RNA extension activity and a transcription-associated function

Sci Rep. 2017; 7: 13055. Published online 2017 Oct 12. doi: 10.1038/s41598-017-12915-1

PMCID: PMC5638924, IF (2020): 4.12

Frittmann O, Gali VK, Halmai M, Toth R, Gyorfy Z, Balint E, Unk I

The Zn-finger of *Saccharomyces cerevisiae* Rad18 and its adjacent region mediate interaction with Rad5.

G3 (Bethesda). 2021 Feb 11; jkab041. doi: 10.1093/g3journal/jkab041.

PMID: 33570581 IF (2020): 2.781

Összes IF: 9.59

MTMT azonosító: 10055123

3. Egyéb szakmai anyagok

3.1.Konferencia előadások:

- Central European Genome Stability and Dynamics Meeting, 2016. október 15-16, 2016, Zagreb
- XXXII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, 2015, Pécs, 1. helyezés
- FIBOK 2014, Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája 2014, Szeged
- Innovation In Science- Doctoral Student Conference, 2014, Szeged

3.2.Poszterek:

- 6. Central European Genome Stability and Dynamics Meeting, 2015, Szeged
- Straub Napok, 2013, Szeged