

**A FAN1 fehérje RAD18-függő Ub-PCNA-mediált aktiválása a DNS-szálak közötti keresztkötések TLS pol η közreműködésével történő áthidalása során**

*Ph.D. értekezés tézisei*

**Qiuzhen Li**

Témavezető: Prof. Haracska Lajos



Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Genetikai Intézet, Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Szeged, 2021.

## Bevezetés

A DNS-szálai között létrejövő, citotoxikus kovalens keresztkötéseket számos vegyület okozhatja, például olyan kemoterápiás szerek, mint a ciszplatin. Ezek a léziók akadályt jelenthetnek a replikáció számára, a replikációs villa elakadását eredményezhetik, ami genomikus instabilitáshoz vezethet. A Fanconi anemia útvonal az egyik legfontosabb mechanizmus a sejtben lévő DNS-szálak közötti keresztkötések következtében elakadt replikációs villa menekítésében. Az útvonal hibás működése a Fanconi anemia nevű ritka genetikai rendellenességet okozza, melynek főbb tünetei az abnormális csont- és bőrfejlődés, csontvelő defektusok, endokrin zavarok és túlzott érzékenység keresztkötő ágensekkel szemben. A DNS-szálai között létrejött keresztkötések replikáció-kapcsolt javítása szigorúan szabályozott foszforilációs és ubiquitilációs szignáltransdukciós útvonalak révén. Amikor a replikációs villa egy DNS-szálak közötti keresztkötés miatt megakad, az egyesszálú DNS-régióhoz kapcsolódik az RPA fehérje (Replication Protein A). Ez jelzésként szolgál az ATR fehérje (ataxia telangiectasia and Rad3-related) autofoszforilációjához a 1989. treoninján. Az aktivált foszforilált ATR, kináz aktivitása révén, aktiválja a 1045. szerinjén a FANCM (FAAP250) fehérjét. A foszforilált FANCM horgonyként szolgál az úgynevezett FANC központi fehérjekomplex összeszereléséhez, és indukálja a FANCD2/FANCI (ID2) monoubiquitilációját. A monoubiquitilált ID2 komplex interakcióba lép a FAN1 fehérjével (ID2-associated nuclease 1), annak UBZ doménjén keresztül. Az aktivált FAN1, struktúrspecifikus endonukleáz aktivitása révén képes hasítani a DNS-szálak között létrejött keresztkötést tartalmazó DNS-szakaszt a lézió közelében, ezzel elősegítve a hiba áthidalását. A PCNA fehérje (Proliferating cell nuclear antigen) egy homotrimer gyűrűszerű fehérje, amely esszenciális szerepet tölt be a DNS replikációja során. A PCNA fehérjét az RFC (replication factor C) tölti fel a DNS vezető száljára. A Rad18-függő DNS-hibitolerancia útvonal képes menekíteni az elakadt replikációs villát. DNS-hiba következtében a PCNA 164. lizinjén monoubiquitilálódik az Uba1 (E1), Rad6 (E2) és Rad18 (E3) fehérjék összehangolt működése révén. A monoubiquitilált PCNA a károsodás helyére toborozza UBZ doménnel rendelkező transzléziós polimerázokat. Korábbi tanulmányok arra utalnak, hogy a FAN1 fehérje rendelkezik egy még nem jellemzett PIP box doménnel, és feltehetően funkcionális kapcsolatban áll az ubiquitilált PCNA-vel. Korábbi bizonyítékok szólnak emellett is, hogy a TLS polimerázok fontos szerepet töltenek be a DNS-szálak között létrejött keresztkötések processzálasban. Emiatt

vizsgáltuk meg, hogy melyik TLS polimeráz képes a FAN1-el együttműködve áthaladni a fent említett lézió az elakadt replikáció villa menekítése során.

## Célkitűzés

Tanulmányunk fő célja annak vizsgálata, hogy a FAN1 együttműködik-e a RAD18-függő DNS-hibitolerancia útvonallal, és közreműködik-e az ubiquitilált PCNA-vel, valamint a transzléziós polimerázokkal a DNS-szálak között létrejött keresztkötések következtében elakadt replikációs villa menekítésében.

A részletes kutatási kérdéseink a következők:

-A FAN1 interakcióba lép-e az ubiquitilált PCNA-vel a PIP box vagy az UBZ doménjein keresztül?

-A FAN1 ubiquitilált PCNA-vel való interakciója hatással van-e a FAN1 nukleáz aktivitására?

-A transzléziós polimerázok képesek együttműködni a FAN1-el a DNS-szálak között létrejött keresztkötések áthidalásában elakadt replikációs villa esetén?

-Végső soron, célunk az, hogy a FAN1 részletes molekuláris szerepét a megértsük. Terveim között szerepel, hogy rekonstruáljam a DNS-szálak között létrejött keresztkötések kikerülését *in vitro*, tisztított fehérjék segítségével, illetve olyan szubsztrát használatával, amely utánozza a fent említett léziót.

A fenti célok eléréséhez a következő kísérleteket terveztük elvégezni:

- A FAN1 fehérje és annak mutáns változatai, illetve egyéb DNS-hibajavításban szereplő fehérjék (PCNA, transzléziós polimerázok ( $\eta$ ,  $\kappa$ ,  $\iota$ ) tisztítása affinitáskromatográfia segítségével.
- A FAN1 mutánsainak összehasonlítása annak érdekében, hogy meghatározzuk mely domének felelősek a FAN1 PCNA/Ubiquitilált PCNA-vel való interakciójáért:
  - I. Fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata pull down segítségével
  - II. A FAN1 nukleáz aktivitásának vizsgálata PCNA vagy ubiquitilált PCNA jelenlétében különféle DNS szubsztrátokon.
- Annak vizsgálata, hogy mely Y-családba tartozó transzléziós polimeráz működik együtt a FAN1-el az elakadt replikációs villa menekítése során *in vitro*

- A pol  $\eta$  transzléziós polimeráz funkciójának jellemzése a FAN1-el a TMP-indukált DNS-szálak közötti keresztkötést tartalmazó szubsztráton.

## **Anyagok és módszerek**

### ***In vivo* vizsgálatok:**

- Sejtkultúrák és transzfecció
- Koimmunprecipitáció
- Immunfestés és mikorszópos vizsgálások
- Bimolekuláris Fluoreszcens Komplementáció
- Resazurin-alapú sejttúlélési vizsgálatok

### ***In vitro* vizsgálatok:**

- Plazmidok klónozása fehérje expresszióhoz
- Mutagén PCR
- Fehérjetisztítás affinitás kromatográfia segítségével
- Pull down kísérlet
- Helyspecifikus szálak közötti keresztkötést tartalmazó oligonukleotidok létrehozása
- Nukleáz-aktivitás vizsgálatok
- Transzléziós polimeráz esszé
- Western blot

## **Eredmények:**

### **FAN1 részt vesz a RAD6/RAD18-függő DNS-hibatolerancia útvonalban:**

Munkánk során számos *in vivo* kísérleti rendszert alkalmaztunk, mint koimmunprecipitáció és kolokalizációs vizsgálatok. Az eredményeink alapján az anti-FLAG gyöngyökhöz kötött FLAG-FAN1 kölcsönhatásba lép a RAD18 fehérjével. A FAN1 nem formál sejtmagi fókuszokat kezeletlen sejtekben, de cisplatin kezelés hatására igen, és kolokalizál az ubiquitilált PCNA-vel. A FAN1 különféle mutánsai teljesen elveszítik fókuszformáló képességüket, és nem kolokalizálnak az ubiquitilált PCNA-vel.

### **Pull down kísérlet és a FAN1, illetve mutánsai tisztítása affinitás kromatográfia segítségével:**

Azért, hogy megvizsgáljunk direkt fehérje-fehérje interakciókat, affinitás kromatográfia alapú pull down kísérleteket alkalmaztunk. Kimutattuk, hogy a FAN1 erősebben köt az ubiquitilált PCNA-hez, és az UBZ doménjében pontmutációkat hordozó FAN1 erre nem volt képes. A FAN1 PIP doménjében létrejött mutációk hatására PCNA-kötése sérült, az ubiquitilált PCNA-hez való kötődése részlegesen megmaradt. Ez arra utal, hogy a FAN1 képes kölcsönhatni a PCNA-vel a két PIP doménjén, illetve az UBZ doménjén keresztül.

### **A PCNA PIP box doménje stimulálja a FAN1 nukleáz aktivitását:**

Nukleáz esszé során tisztított fehérjéket alkalmaztunk, valamint RFC fehérje segítségével feltöltöttük a PCNA fehérjét az 5' túlnyúló véget tartalmazó szubsztrátra. Eredményeink arra utalnak, hogy a vad típusú FAN1 nukleáz aktivitása megnövekedett emelkedő PCNA koncentrációgradiens alkalmazása esetén, de a PIP mutáns FAN1 esetében ezt nem figyelhettük meg.

### **Az ubiquitilált PCNA szabályozza a FAN1 PIP box és UBZ doménjait:**

Amennyiben RFC segítségével feltöltött ubiquitilált PCNA-t alkalmaztunk a kísérleinkben, a FAN1 nukleáz aktivitása szignifikánsan megnövekedett a módosítatlan PCNA-hez viszonyítva. Ennek megerősítéseként PIP/UBZ mutáns FAN1-et alkalmaztunk a nukleáz esszében. Az UBZ doménjében mutáns FAN1 esetében az Ubiquitin-PCNA által okozott erős stimuláció sérült.

### **A PCNA a térben szabályozza a FAN1 funkcióját:**

A nukleáz esszé során, amikor a FAN1 nukleáz aktivitását vizsgáltuk PCNA jelenlétében, megfigyeltük, hogy a PCNA megváltoztatta a FAN1 hasítóhelyének specificitását, az 5' túlnyúló végről a 3' elágazási ponttól 4 nukleotidra.

### **TMP-indukált szálak közötti keresztkötést tartalmazó szubsztrát:**

Azért, hogy utánozzuk azt a sejtben zajló folyamatot, amely során a FAN1 processzálja a szálak között létrejött kovalens keresztkötéseket, létrehoztunk egy 5'-AT dinukleotidokon keresztkötést tartalmazó 73 nukleotid hosszú 5' túlnyúló véget tartalmazó DNS szubsztrátot 4,5',8-Trimethylpsoralen segítségével.

### **A FAN1 és Pol $\eta$ fehérjék áthidalják a DNS-szálak között létrejött keresztkötéseket ubiquitilált PCNA jelenlétében:**

Tisztított fehérjék segítségével *in vitro* rekonstruáltuk azt a folyamatot, amely során a DNS-szálak között létrejött keresztkötés processzálása zajlik. Különböző transzléziós polimerázok összehasonlítása során azt találtuk, hogy ez a folyamat csak a FAN1, az ubiquitilált PCNA és a Pol  $\eta$  összehangolt működése révén valósulhatott meg.

### **A FAN1 a DNS-szálak között létrejött kovalens kötésekben működik, és a károsodás helyére lokalizálja a Pol $\eta$ transzléziós polimerázt:**

Cisplatin kezelés hatására a FAN1 funkcionális interakcióba lép a Pol  $\eta$ -val, amelyet a YFP pozitív sejtek jelölnek BiFC esszé során. Ez a funkcionális interakció igazolható túlélési vizsgálatok segítségével is. Az eredményeink arra utalnak, hogy mind FAN1, mind Pol  $\eta$  hiányában a sejtek megnövekedett érzékenységet mutattak cisplatin kezelése a kontroll sejtekhez viszonyítva. Ezzel szemben a FAN1 és a Pol  $\eta$  együttes csendesítése nem fokozta a sejtek érzékenységét, utalva a FAN1 és a Pol  $\eta$  episztatikus kapcsolatára.

## Összefoglaló

Tanulmányaink során bebizonyítottuk, hogy a FAN1 fehérjét a Rad18 DNS-hibatolerancia útvonal szabályozza *in vivo*, és koloklizál az ubiquitilált PCNA-vel. *In vitro* kísérleti rendszerekkel bemutattuk, hogy a PCNA, illetve az ubiquitilált PCNA fokozza a FAN1 endonukleáz aktivitását. Továbbá bebizonyítottuk, hogy a PIP-box, illetve az UBZ doménjai interakcióba lépnek az ubiquitilált PCNA-vel. Azt is kimutattuk, hogy a FAN1 endonukleáz aktivitásának specificitása megváltozott a PCNA hatására. A PCNA ugyanis képes pozicionálni a FAN1-et, hogy egy adott régióban hasítson (4 nukleotiddal a replikációs villa elágazási pontja után) egy 5' túlnyúló véget tartalmazó szubsztráton, így elősegítve a DNS-szálak között létrejött keresztkötések javítását. Továbbá összehasonlítottuk három transzléziós polimeráz (pol  $\eta$ , pol  $\iota$ , and pol  $\kappa$ ) működését a DNS-szálak közötti keresztkötéseken. A pol  $\eta$  az egyetlen transzléziós polimeráz, amely képes áthaladni a hibás szakaszon. Sejt túlélési vizsgálatokkal bebizonyítottuk a FAN1 és a pol  $\eta$  episztázisát, és azt, hogy a FAN1 és a pol  $\eta$  funkcionális interakciót mutat cisplatin kezelést követően.

Összefoglalásként kijelenthetjük, hogy a jelenlegi eredményeink arra utalnak, hogy a FAN1 nem csak a Fanconi anemia útvonalban játszik szerepet, de részt vesz a RAD18-függő DNS-hibatolerancia útvonalakban is az elakadt replikációs villa menekítése során. Ezáltal egy új modellt állítottunk fel a működésére: A DNS-szálak között létrejött keresztkötések során az FAN1 nukleáz ubiquitilált PCNA-függő módon kihurkolja a DNS kettős spirálban létrejött kovalens keresztkötést. Ez a kihurkolt szerkezet fog szubsztrátként szolgálni Pol  $\eta$  számára a transzléziós szintézis során, így menekítve az elakadt replikációs villát. A FAN1 lehet az összekötőkapocs a két útvonal között a sejtciklus különböző fázisaiban. Az általunk felállított modell jelentős tudományos betekintést ad a DNS-szálak között létrejött kovalens keresztkötések javításába, és részleteiben vizsgálja azokat.

## Publikációs lista

MTMT szám: 10061209

### 1. A doktori eljáráshoz szükséges kötelező nemzetközi publikációk

- Biophysical characterization of histone H3.3 K27M point mutation. Szabolcs Hetey, Beata Boros-Olah, Tímea Kuik-Rozsa, **Qiuzhen Li**, Zsolt Karanyi, Zoltan Szabo, Jason Roszik, Nikoletta Szaloki, Gyorgy Vamosi, Katalin Toth, Lorant Szekvolgyi. **Biochem Biophys Res Commun**. 2017 Aug 26;490(3):868-875. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.133 (IF: 3.575)
- Coordinated Cut and Bypass: Replication of Interstrand Crosslink-Containing DNA. **Qiuzhe Li**, Kata Dudás, Gabriella Tick and Lajos Haracska.(2021) **Front. Cell Dev. Biol.** 9:699966. doi: 10.3389/fcell.2021.699966 (IF: 6.684)

Összesített IF: 10.259

### 2. Publikáció alatt álló közlemények

- FAN1 and Pol  $\eta$  constitute a pathway for replicational bypass of DNA interstrand crosslinks under the control of RAD18-dependent PCNA-ubiquitylation. Qiuzhen Li, Mónika Mórocz, Szilvia Juhász, Lili Hegedűs, Alexandra Gráf, Ádám Sánta, Gaurav Sharma, Péter Burkovics, Ernő Kiss and Lajos Haracska
- Ubiquitylate for tolerance: regulatory mechanisms at the stalled replication fork. Lili Hegedűs, Kata Dudás, Qiuzhen Li, Indra Balogh, Gabriella Tick, Lajos Haracska. Peer reviewing in Cancers Journal (IF:6.639).



## **Köszönetnyilvánítás**

Hálával tartozom témavezetőmnek, Prof. Haracska Lajosnak a tanácsaiért, a folyamatos támogatásáért és a türelméért, melyet a PhD tanulmányaim alatt tanúsított. Az ő hatalmas tudása és széleskörű tapasztalata segítette a kutatásaimat. Szeretném megköszönni Dr. Kiss Ernőnek, Dr. Mórocz Mónika Krisztinának, Hegedűs Lili, Dudás Kata, Illésné Kovács Katalinnak, Vincze-Kontár Katalinnak, Dr. Tóth Ágnesnek és Pintér Lajosnak a technikai segítséget a munkám során. Köszönöm Tick Gabriellának a dolgozatom és a publikációm lektorálásában nyújtott segítségét. Szeretném megköszönni a HCEMM-BRC Mutagenézis és Karcinogenezis Csoportjának és a Delta Bio 2000 kft.-nek, valamint Dr. Unk Ildikónak és Dr. Bálint Évának a DNS Reparáció Csoportból a segítségét a munkám minden egyes lépése során. Hálás vagyok, hogy öt évet tölthettem el kiváló kutatók között, és számos tudást sajátíthattam le tőlük.

Külön köszönettel tartozom Dr. Honti Viktornak és Dr. Bodai Lászlónak, hogy elvállalták a doktori disszertációm bírálatát. Számos hasznos megjegyzést és javaslatot kaptam tőlük.

Végző soron szeretném kifejezni a hálámat a szüleimnek (Qing Li és Beiqung Wu) és a feleségemnek (Orsolya Li). Az ő megértésük és bátorításuk nélkül lehetetlen lett volna befejezni a tanulmányaimat.

Jelen kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (GINOP-2.3.2–15-2016–00024 és GINOP-2.3.2–15-2016–00026) valamint az Európai Unió Horizont 2020 keretprogram 739593 Tsz támogatta.

## Nyilatkozat

Kijelentem, hogy Qiuzhen Li hozzájárulása jelentős volt a felsorolt kiadványokban, és a doktori folyamat a felsorolt kiadványokon alapul. A Ph.D. disszertációban közölt eredményeket és a publikációkat korábban nem használták PhD fokozat megszerzésére, és a jövőben sem fogják.

### Declaration

I declare that the contribution of Qiuzhen Li was significant in the listed publications and the doctoral process is based on the publications listed. The results reported in the Ph.D. dissertation and the publications have not been used to acquire any PhD degree previously and will not be used in the future either.

Szeged, 2021.08.24

-----  
Lajos Haracska Ph.D., D.Sc

-----  
Kata Dudás