

**A nem klasszikus polimerázok és a SUMO PCNA-
függő mechanizmusok szerepe a genom stabilitás
fenntartásában**

Ph.D Tézisek

GALI Himabindu

Témavezető: Dr. Haracska Lajos

Biológiai Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézet

Szeged

2012

Bevezetés

Az élő szervezetek DNS tartalma folyamatosan károsodik a (külső és belső forrásból származó) genotoxikus anyagok következtében. A külső források, mint az ultraibolya sugárzás (UV), az ionizáló sugárzás és egyéb kémiai anyagok egyes esztős szálú DNS töréseket illetve számos különféle báziskárosodást okoznak. Ezek a DNS törések a fő akadályai a DNS replikációnak, valamint, amennyiben kijavíthatlanul maradnak végül genomi átrendeződésekhez vagy a sejt halálához vezetnek. A belső károsító források azokat az anyagcsere folyamatokat jelentik, amelyek során a sejt normális körülményei között is keletkeznek DNS károsító anyagok. A belső forrásból származó károsodások a hidrolitikus és oxidatív reakciók következményei, és más sejt folyamatok melléktermékei, s mint ilyenek természetes velejárói a sejt környezetnek. A nagy gyakorisággal jelentkező számtalan típusú károsodás kiküszöbölésére a sejtek sokszoros védelmi rendszert dolgoztak ki. Ezek a folyamatok két fő kategóriába sorolhatók: a DNS hibajavítás és a DNS károsodás tolerancia. A számos különböző DNS hibajavító útvonal ellenére a sejtben folyamatosan jelen van bizonyos mennyiségű DNS károsodás, amit a sejtnek a DNS replikáció folyamán tolerálnia kell.

A DNS károsodás jelenlétét egy ideig javítás nélkül eltűrő folyamatot DNA károsodás toleranciának nevezzük.

A DNS károsodás tolerancia fő mechanizmusa a transléziós szintézis (TLS). A transléziós szintézis a DNS replikáció során történő károsodás elkerülést jelent, amelyet a nem-klasszikus DNS polimerázok hajtanak végre. Ez a folyamat magában foglalja a nukleotidok direkt beépítését az olyan típusú károsodásokkal szemben, melyek blokkolják a klasszikus DNS polimerázok által végzett replikációt, mivel azok aktív helyei képtelenek a különfajta károsodáshoz illeszkedni. Ez a folyamat hibára hajlamosító, hiszen a transléziós szintézisért felelős enzimek csökkent másolási hűséggel illesztik be a nukleotidokat, mely tulajdonság képessé teszi őket a különböző károsodások által okozott szerkezeti torzulások tolerálására. A transléziós szintézisben szerepet játszó nem-klasszikus polimerázok, az ún Y-családba tartozók: a polimeráz η , polimeráz ι , polimeráz ζ , polimeráz κ , és a Rev1 fehérje. A nem klasszikus polimerázok működésének feltétele, hogy a feltartóztatott klasszikus polimeráz lecserélődjön egy nem klasszikus polimerázra. A nem klasszikus polimeráz

ezután áthalad a károsodáson és egy második cserével a klasszikus polimeráz visszakerül a replikációs villához és folytatja a szintézist. Ez a cserefolyamat olyan segítő faktorok közvetítésével zajlik, mint például a PCNA molekula, amely a transzlációs szintézis fő szabályozójaként is ismeretes. Az összes Y-családba tartozó polimeráz-homológ a Rad6 episztázis csoportba tartozik.

A PCNA molekula TLS-ben betöltött szerepét a posztranszlációs módosításai irányítják. A replikációs villa feltartóztatásának hatására indukálódó módosítás lehet SUMOilálás, mono- és poliubikvitilálás. A Rad6 fehérje E2 ubikvitin-konjugáló enzimeként funkcionál, amely kölcsönhat a Rad18 E3 ligázzal. A DNS károsodás replikációt feltartóztató hatására a Rad6 és Rad18 összehangolt működése szükséges a PCNA molekula 164-es lizinén történő monoubikvitiláláshoz. Az Ubc13/Mms2 a Rad5-tel együttműködve tovább módosíthatja a PCNA-t egy nem-proteolitikus, K63 kapcsolódású poliubikvitin láncot építve. A PCNA SUMOilálás szerepe főként a hasadó élesztővel (*Saccharomyces cerevisiae*) végzett vizsgálatokból ismert. Eszerint a PCNA Lys-164 aminosaván végbemenő SUMOilálás az Srs2 helikáz helyszínre toborzását végzi, ami letaszítja a Rad51 helikázt a DNS-ről. Ez segít megakadályozni mindenfajta nemkívánatos homológ rekombinációs folyamatot az S-fázis során. Habár a PCNA SUMOilálás létezését magasabbrendű eukarióták közül *Xenopus* és csirke sejtekben is leírták, a SUMO függő rekombináció szabályozást csak az olyan természetesen magas rekombinációs rátájú sejtek esetében tartottak lényegesnek, mint az élesztő. Csak mostanában, egy a mi munkánkkal párhuzamosan futó kutatás eredményeként igazolták a humán PCNA molekula SUMOilálását és kimutatták, hogy a SUMOilált PCNA preferenciálisan együttműködik a PCNA intereacting protein-nek (PARI) elnevezett újonnan leírt fehérjével. A PARI-ről feltételezik, hogy gátolja a nem megfelelő rekombinációs folyamatokat, azonban az emberi PCNA molekula SUMO módosításának direkt szerepét nem vizsgálták.

Célkitűzések

Az értekezés fő célja a DNS tolerancia mechanizmusoknak a genom stabilitásában és a rákos daganatok megelőzésében betöltött szerepének alaposabb megértése volt. Vizsgálatainkban célul tűztük ki a Pol η , Rev1 és a Rev3 transzlációs polimerázok szerepének tisztázását valamint az emberi sejtekben a SUMO-PCNA függő

mechanizmusok megismerését. Ennek érdekében a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

- Ismert, hogy a PCNA központi szerepet játszik a DNA károsodásoknál bekövetkező polimeráz-csere folyamatokban. Ezért feltettük a kérdést: Mi a szerepe a Polimeráz η UBZ és a PIP doménjének a PCNA-vel való kölcsönhatásban és a replikációs fókuszhoz való hozzáférésben?
- A transzléziós szintézis polimerázok fontos szerepet játszanak a károsodott DNA templát átírásában, ezért feltettük a kérdést: Vajon a Rev1 és a Rev3 deficiencia hatással van az UV károsodott DNS replikációjára?
- A nem megfelelő rekombináció súlyos átrendeződéseket okoz a genomban. A PCNA SUMO-izálása élesztőben a rekombináció szabályozását végzi. Nem ismertek annak a részletei, hogy az emberi sejtek hogyan bírkóznak meg a replikációs villa összeomlásával és a nem megfelelő rekombinációs eseményekkel. Vajon a SUMO-PCNA függő mechanizmusok konzerváltak az emberi sejtekben?

Kísérletes megközelítések

In vivo lokalizációs vizsgálatok

DNS fiber assay

Fehérjetisztítás

Immunoprecipitáció

Eredmények összefoglalása

Az értekezés alapjául szolgáló vizsgálatok során kapott eredményeket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

- A Polimeráz η -nak a PIP doménon keresztül való kötődése a PCNA molekulához a transzléziós szintézis szükséges feltétele a humán sejtekben, az Ub-modifikációhoz való direkt kötődés (az UBZ doménon keresztül) viszont nem szükséges a TLS-hez.

- A Rev1 két módon tölt be koordináló szerepet a DNS károsodás elkerülésében, egy korai és egy késői útvonalban: Ezek a vizsgálatok a Rev1 BRCT doménjének a szerepét bizonyítják a mutagén transzléziós szintézisben. A Rev1, de a BRCT domén nélkül, szükséges a posztreplikációs hibajavítás során a hézagok betöltéséhez, amely a késői fázisban dominál.
- A Rev3 esszenciális a késői DNS károsodás tolerancia útvonalakban, míg az azonnali transzléziós szintézis folyamatok a Rev3-tól függetlenül is végbemennek.
- A humán PCNA *in vivo* és *in vitro* elsősorban SUMO1 által módosítódik. *In vivo* ez a módosítás szabályozza a rekombinációs gyakoriságot, amely alátámasztja a SUMO módosítás konzerváltságát és jelentőségét az emberi sejtekben.

Közlemények jegyzéke

Himabindu Gali, Szilvia Juhasz, Monika Morocz, Ildiko Hajdu, Karoly Fatyol, Valeria Szukacsov, Peter Burkovics and Lajos Haracska. (2012) Role of SUMO modification of human PCNA at stalled replication fork. *Nucleic Acids Research* (Manuscript in press)

Jacob G. Jansen, Anastasia Tsaalbi-Shtylik, Giel Hendriks, Johan Verspuya, **Himabindu Gali**, Lajos Haracska, Niels de Wind. (2009) Mammalian polymerase ζ is essential for post-replication repair of UV-induced DNA lesions. *DNA Repair.*; 8(12):1444-51.

Jacob G. Jansen, Anastasia Tsaalbi-Shtylik, Giel Hendriks, **Himabindu Gali**, Ayal Hendel, Fredrik Johansson, Klaus Erixon, Zvi Livneh, Leon H. F. Mullenders, Lajos Haracska, Niels de Wind. (2009) Separate Domains of Rev1 Mediate Two Modes of DNA Damage Bypass in Mammalian Cells. *Mol Cell Biol.*(11):3113-23.

Narottam Acharya, Jung-Hoon Yoon, **Himabindu Gali**, Ildiko Unk, Lajos Haracska, Robert E. Johnson, Jerard Hurwitz, Louise Prakash, Satya Prakash. (2009) Reply to Sabbioneda et al.: Role of ubiquitin-binding motif of human DNA polymerase eta in translesion synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*106:(8) p.E21.

Narottam Acharya, Jung-Hoon Yoon, **Himabindu Gali**, Ildiko Unk, Lajos Haracska, Robert E. Johnson, Jerard Hurwitz, Louise Prakash, Satya Prakash. (2008) Roles of PCNA-binding and ubiquitin-binding domains in human DNA polymerase eta in translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 105(46):17724-9.