

Ph.D. Értekezés tézisei

**Def1 elősegíti a polimeráz cserét a DNS  
károsodás következtében elakadt  
replikációs villáknál**

**Daraba Andreea**

Témavezető: **Dr. Unk Ildikó**  
Tudományos főmunkatárs

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai kar  
Biológia Doktori iskola  
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetikai intézet

2014

Szeged

## BEVEZETÉS

A DNS károsodás következtében elakadt replikációs villa mentése nagy kihívást jelent a sejtek számára, mivel az elakadt replikáció kromoszóma instabilitáshoz, végső esetben pedig a sejtek halálához vezethet. A sejtek túlélésük érdekében különböző mechanizmusokat fejlesztettek ki, amelyekkel képesek a replikációs villa mentésére. Ezek az úgynevezett DNS-hiba tolerancia útvonalak teszik lehetővé, hogy a DNS-hibák tényleges eltávolítása nélkül a replikáció folytatódhasson. A DNS-hiba tolerancia útvonalnak két fő típusa van: a templátváltás és a transzléziós DNS szintézis (TLS). A templátváltás hibamentes átírást biztosít, mivel templátként az újonnan szintetizált komplementer DNS szálát használja. Ezzel szemben a transzléziós szintézis során speciális polimerázok veszik át a replikatív polimeráz helyét, és a DNS-hibával szemben az eredeti templátnak megfelelő vagy egy hibás bázist épít be.

A Rad6-Rad18 fehérje komplex kulcsfontosságú szereplője a DNS-hiba tolerancia útvonalnak *Saccharomyces cerevisiae* élesztőben. Ezek a fehérjék három alútvonalon keresztül szabályozzák az UV-károsodást szenvedett DNS replikációját: 1. a Rad5-függő hibamentes átírás, 2. a Rad30-függő hibamentes átírás, 3. a Rev3-függő pontmutációt generáló átírás. Ismert, hogy UV kezelés hatására a Rad6-Rad18 ubikvitin konjugáló és ligáló enzim komplex monoubikvitinálja a PCNA-t a 164-es lizinén. A monoubikvitinált PCNA aktiválja a Rev3 illetve a Rad30 függő transzléziós DNS szintézist. Más esetekben azonban további faktorok, mint az Mms2/Ubc13 ubikvitin konjugáz és Rad5 ubikvitin ligáz enzimek poliubikvitinálják a PCNA-t és aktiválják a Rad5 alútvonalat.

Jelen tanulmányban a Def1 fehérjét, mint a Rad6-Rad18 DNS-hiba tolerancia útvonal Rev3-függő ágának tagját, és az élesztő mutagenézis egyik szabályozóját azonosítottuk. Kimutattuk, hogy DNS-károsodás következtében a Def1 fehérje elősegíti a replikatív DNS-polimeráz katalitikus alegységének a proteozomális lebomlását. Bebizonyítottuk, hogy az UV által indukált-degradáció nem befolyásolja a replikatív DNS polimeráz nem-katalitikus alegységeit, és hogy azok komplexet alkotnak a Rev1 TLS polimerázzal. Eredményeink alapján az elakadt replikációs villáknál bekövetkező polimeráz cserének egy új modelljét alkottuk meg.

## CÉLKITŰZÉSEK

A disszertáció fő célkitűzése olyan faktorok azonosítása, amelyek a DNS-hiba tolerancia útvonalat befolyásolják. Kísérleteink során megvizsgáltuk a *DEF1* gént, mivel a *DEF1* deléciója érzékenyíti a sejteket az UV-sugárzásra, és a *def1 rad18* kettős deléciós törzs a *rad18* egyszeres deléciós UV-érzékenységet mutatja, ami egy episztatikus kapcsolatra utal, amelyben a *DEF1* funkciója a *RAD18* funkciójától függ.

A következő lépéseket terveztük, hogy bebizonyítsuk a Def1 szerepét a *RAD6-RAD18* útvonalban:

1. Elemezni a *DEF1* genetikai kapcsolatait a *RAD6* útvonal mindhárom ágának tagjaival DNS-károsodás hatására.
2. Ellenőrizni a *DEF1* és a *RAD6* útvonal fehérjéi közötti kölcsönhatást.
3. Kísérletsorozatunk végső célkitűzése a Def1 fehérje DNS- hiba toleranciában betöltött szerepének meghatározása

# ANYAGOK és MÓDSZEREK

## 1. DNS manipulációs technikák

- Molekuláris klónozás: Plazmidok készítése élesztő két hibrid vizsgálathoz, génkiütéshez használt konstruktokhoz és epitóp jelöléshez
- Deléciós törzsek létrehozása *Saccharomyces cerevisiae*-ben homológ rekombináció alapuló génhelyettesítés módszerrel

## 2. Élesztő genetikai módszerek

- Élesztő két hibrid vizsgálat
- UV-és MMS-érzékenység vizsgálat kvalitatív és számszerűsíthető módszerei
- UV-indukált mutagenézis mérése

## 3. Biokémiai eljárások

- Sejt szinkronizálás
- Fehérje extraktum készítése élesztősejtekből és Western blot
- GST fúziós fehérjék expressziója és fehérje kölcsönhatás vizsgálata vizsgálatok

## EREDMÉNYEK

Kísérleteink célja, hogy hozzájáruljunk a pontmutációk képzésében kulcsfontosságú DNS-hiba tolerancia útvonal mélyebb megismeréséhez. Ezért olyan új fehérjéket kívántunk azonosítani, amelyek részt vesznek a DNS-hiba tolerancia folyamatában.

Az irodalomból ismert volt, hogy a *DEF1* gén deléciója érzékenyíti a sejteket az UV sugárzásra, továbbá a *def1-rad18* kettős deléciót hordozó törzs ugyanazt az UV érzékenységet mutatja, mint a *rad18* deléciós törzs. Ez arra utalhat, hogy a *DEF1* részt vesz a DNS károsodások javításában, és hogy a *RAD18* génnel episztatikus ezen funkciójában, vagyis a Def1 funkciója a Rad18 funkciójától függ.

A DNS tolerancia útvonal, amelyet a Rad6-Rad18 fehérje komplex irányít, három további útvonalra bontható. Az általunk vizsgált *DEF1* gént úgynevezett episztázis analízisnek vetettük alá. Ez a genetikai elemzés lehetővé teszi, hogy a vizsgált gén és a *RAD6-RAD18* útvonal ismert szereplőinek kettős deléciós törzsei által mutatott UV érzékenység alapján a vizsgált gént besoroljuk az ismert útvonalak egyikébe. Eredményeink szerint a *DEF1* gén episztatikus a *RAD6* és a *RAD18* génekkel. Nem mutat episztázist a hibamentes utakba tarozó *RAD5*, *MMS2* és *RAD30* fehérjékkel, ami arra utal, hogy a *DEF1* nem a hibamentes DNS hiba tolerancia útvonalakban fejti ki hatását. A *def1-rev3* kettős mutáns a *def1* deléciós törzssel azonos érzékenységet mutat UV és MMS kezelésre is. A genetikai anlízis tehát azt igazolja, hogy a *DEF1* a *RAD6-RAD18* DNS-hiba tolerancia útvonal mutációkat generáló transzléziós polimerázok által működő ágában fejti ki hatását.

A *REV3* útvonal transzléziós polimerázai felelősek a DNS károsodás által indukált pontmutációk jelentős részéért. Hogy bizonyítsuk a *DEF1* szerepét a *REV3* útvonal működésében, megmértük az UV károsodás által indukált mutációs rátát a *def1* deléciós törzsben. Míg egyre nagyobb UV dózis hatására a vad típusú törzsben a mutációs ráta enyhe növekedést mutat, a *def1* deléciós törzsben az UV indukált mutációk teljes hiányát figyelhetjük meg. A *DEF1* hiánya még az önmagában emelkedett mutációs rátát mutató *mms2* deléció jelenlétében is megszüntette a pontmutációk képződését.

A *DEF1* plazmidról történő ektopikus expressziója a *def1* deléciós törzsben helyreállította a mutagenézis mértékét, bizonyítva, hogy a mutagenézisben tapasztalt defektus a *DEF1* hiányának köszönhető.

A *DEF1* szakirodalomból ismert egyik funkciója, hogy a DNS károsodás által blokkolt transzkripció esetén elősegíti az RNS-polimeráz eltávolítását proteolitikus degradáció által. Feltételeztük, hogy ehhez hasonló szerepet tölthet be a replikáció során is, és az elakadt replikációs villánál elősegíti a replikatív DNS polimeráz eltávolítását, ezáltal lehetővé téve a replikatív polimeráz TLS polimerázra cserélését.

E lehetőség vizsgálatának érdekében UV károsodás kiváltása után nyomon követtük a replikatív polimeráz katalitikus alegysége (Pol3 fehérje) szintjének alakulását a sejtciklus során.

A nem kezelt sejtekkel szemben UV-besugárzás által kiváltott átmeneti Pol3 szint csökkenést tapasztaltunk vad típusú sejtekben a sejtciklus S fázisban. Ezt a Pol3 szint csökkenést az *mms2* és *rad30* deleciós sejtekben is láttuk. Fontos, megjegyezni, hogy *def1* deléciós törzsben nem tudtuk kimutatni a Pol3 szintjének csökkenését. A Pol3 szintjének csökkenése nem volt megfigyelhető a *rad6* deléciós törzsben, ami alátámasztja a genetikai analízisben kapott adatokat, miszerint a *DEF1* a DNS hiba toleranciában betöltött szerepét a *RAD6* felsőbb ellenőrzése alatt végzi.

A Pol3 szint csökkenésének legvalószínűbb magyarázata, hogy a Pol3 szabályozott UV által kiváltott fehérje degradáción megy keresztül. Amikor a tápoldatot kiegészítettük az MG132 proteaszóma inhibitorral, a Pol3 UV- indukált degradációja valóban teljesen megszűnt.

A Pol $\delta$  egy heterotrimer, a Pol3 katalitikus alegység mellett két nem katalitikus alegysége van: a Pol31 és a Pol32. Célul tűztük ki, annak tisztázását, hogy az egész Pol $\delta$  enzim célpontja-e az UV- indukált proteolízisnek, vagy az csak a katalitikus alegységet érinti. Kísérleteink szerint a Pol3-al ellentétben a Pol31-et és a Pol32-t nem érintette az UV- indukált proteolízis. Mivel a Pol31 és a Pol32 nem bomlik le UV kezelést követően és jelen marad a replikációs villánál, azt feltételeztük, hogy egy TLS polimeráz, például a Rev1 foglalhatja el a Pol3 helyét a Pol31 és a Pol32 mellett és végzi el a hiba átírását. Ellenőriztük, hogy a Pol31 és a Pol32 képes-e komplexet képezni a Rev1 fehérjével. *In vitro* vizsgálatokban tisztított fehérjéket használva detektálni tudtuk mindhárom fehérje jelenlétét az elúciós frakcióban, ami a GST- Pol32, Pol31 és Rev1 komplex képződésének bizonyítéka.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Laborunkban azonosítottuk a *DEF1*-et, mint a *RAD6-RAD18* DNS-hiba tolerancia útvonal Rev3-függő ágának tagját és az élesztő mutagenézis egyik szabályozóját. Munkánk során bizonyosságot nyert, hogy a Def1 kulcsfontosságú szereplő a polimerázok cseréjében. Igazoltuk, hogy a Pol3, a replikatív polimeráz Pol $\delta$  katalitikus alegysége lebomlik UV kezelés hatására. Kimutattuk, hogy a Pol3 lebomlása poliubikvitináció függő proteozómális degradáció eredménye, amely a Def1 szabályozása alatt áll. Ezzel szemben a Pol31 és a Pol32, a Pol $\delta$  másik két alegysége nem degradálódik. Azt is kimutattuk, hogy Pol31 és Pol32 együttesen stabil komplexet képezhetnek a Rev1 TLS polimerázzal.

Kutatási eredményeink alapján új modellt állítottunk fel. A DNS károsodás következtében elakadt replikációs villánál a Rad6-Rad18 fehérjék monoubikvitinálják a PCNA-t. A monoubikvitinált PCNA aktiválja a mutagén útvonalat, ahol a Def1 közreműködésével a Pol $\delta$  replikatív polimeráz komplexből a Pol3 polibukvitin szignálnak köszönhetően proteozómális degradációt szenved. Így a Pol3 helyét egy mutagén TLS polimeráz veszi át, amely a Pol31 és Pol32 alegységekkel komplexet képezve írja át a hibás szakaszt. Miután a sérült szakasz átírásra került, a TLS polimeráz ledisszociál, a Pol3 ismét kötődik a replikatív polimeráz alegységeként, így a replikáció folytatódhat tovább.

További kérdés maradt azonban: Hogyan működhet *DEF1*-től függetlenül a *RAD30* által kódolt Pol $\eta$  TLS polimeráz? Kísérleteink azt mutatják, hogy a Pol3-t ebben az esetben nem kell eltávolítani az elakadt villáról. A Pol $\eta$  elsősorban az UV-károsodás következtében kialakuló ciklobután pirimidin dimerek hibamentes javítására specializálódott. Mivel az UV az egyik leggyakoribb DNS károsító hatás az élőlényekre nézve, ezért úgy gondoljuk, hogy a Pol $\eta$  előnyt kell, hogy élvezzen a TLS polimerázok kiválasztásánál DNS hiba átírás során.

A Pol  $\eta$  a polimerázok Y családjának egy tagja, amely a Rev1 és Pol  $\zeta$  TLS polimerázoktól eltérően kötődik a PCNA molekulához. Míg a Rev1 és a Pol  $\zeta$  a PCNA gyűrű külső felületéhez kötnek, addig a Pol $\eta$  hasonlóan a Pol $\delta$ -hoz, a PCNA intermolekuláris hurok doménjéhez kötődik. Ez lehetővé teszi, hogy a PCNA trimerhez egyszerre mind a két polimeráz kapcsolódjon. Feltételezzük, hogy az elakadt replikációs villánál a PCNA monoubikvitinálásának hatására olyan

konformációs változás zajlik le, aminek során a PCNA-hez kötődött Pol  $\eta$  átveszi a szintézist a Pol  $\delta$ -tól. Elvégezve az átírást, a PCNA deubikvitinálása visszaállítja a korábbi állapotot, a Pol  $\delta$  pedig folytathatja a szintézist.

Bizonyosságot nyert, hogy a DNS-hiba tolerancia útvonal több eleme erős konzerváltságot mutat élesztő és az ember között. Ezért úgy gondoljuk, hogy kutatási eredményünk hozzájárul az emberi mutagenézis folyamatának megértéséhez is.

## KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Rentsendorj O, Nagy A, Sinkó I, **Daraba A**, Barta E, and Kiss I- Highly conserved proximal promoter element harboring paired Sox9-binding sites contributes to the tissue- and developmental stage-specific activity of the matrilin-1 gene. **Biochem J.** 2005 Aug 1; 389:705-716.(IF<sub>2005</sub>: 4,224)

Ianovici N, **Daraba A**, Postelnicu M, Kiss I- Studiul Bioparticulelor aeropurtate in Timisoara -România (Study of airborne bio-particles in Timisoara-România). **Revista Lucrări Științifice. Seria Agronomie (Scientific works Journal. Agronomy series)** 2007, vol. 50, 2: 501-506; ISSN (electronic): 2069-7627; CNCSIS code: 477

**Daraba Andreea.** Regulation of translesion synthesis. (2007). Szeged University Biology Ph.D. School Seminars, Szeged, Hungary published in *Acta Biologica Szegediensis* 51 (2) p.137-160 Dissertation summary

**Daraba A**, Gali VK, Halmai M, Haracska L, Unk I (2014) Def1 Promotes the Degradation of Pol3 for Polymerase Exchange to Occur During DNA Damage-Induced Mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Biol** 12 (1): e1001771. doi:10.1371/journal.pbio.1001771; (IF<sub>2013</sub>:12,690).



## Előadások:

1. **Daraba Andreea** and Kiss Ibolya-Functional analysis of the regulatory regions of the matrilin-1 gene, International Training Course: Proceedings of the Closing Seminar, Biological Research Center Hungarian Academy of Science, Szeged, Hungary, 2004 August 4-6
2. **Blastyák András**, Hajdu Ildikó, Szukacsov Valeria, **Daraba Andreea**, Unk Ildikó and Haracska Lajos- Role of def1 gene in the post-replication repair machinery; The 6<sup>th</sup> Hungarian Genetic Congress, 13<sup>th</sup> Cell and Development Biology Days - Eger, 2005 April 10-12
3. **Szukacsov Valéria**; **Blastyák András**; **Daraba Andreea**; Unk Ildikó and Haracska Lajos- A new member of DNA repair machinery; Straub Days Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences -2005 november 16-18
4. **Ianovici Nicoleta**, **Daraba Andreea**, Postelnicu Mihaela, Kiss Izabela, Matis Adriana (2007)– *Study of airborne bio-particles in Timisoara, România*, Scientific Conference "ROMANIAN AGRICULTURE IN THE EU - OPPORTUNITIES AND PERSPECTIVES", University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iasi, 18-19 October 2007
5. **Halmi Miklós**, Gali Vamsi Krishna, **Daraba Andreea** and Unk Ildikó- Rescue of the stalled replication fork; Straub Days Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences-2008 december 3-5
6. **Daraba Andreea**, Gali Vamsi Krishna, Halmi Miklós, Unk Ildikó - Polymerase exchange at stalled replication forks; Straub Days Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences-2012 May 23-24
7. **Daraba Andreea**, Gali Vamsi K., Halmi Miklós, Haracska Lajos, **Unk Ildikó** - DNA damage induced polymerase exchange at stalled replication forks; Hungarian Molecular Life Sciences 2013,5-7 April, Siófok, Hungary
8. **Daraba Andreea**, Gali Vamsi Krishna, Halmi Miklós, Haracska Lajos, Unk Ildikó - Polymerase exchange at replication forks stalled at DNA damage sites; Central European DNA Repair Meeting, 2013, November 8<sup>th</sup>, Vienna, Austria

## Poszterek:

1. **Sinkó Ildikó**, Nagy Andrea, Rentsendorj Otgonchimeg, **Daraba Andreea**, Barta Endre, Kiss Ibolya- *Cartilage-specific Sox transcription factors bind to the conserved proximal promoter element of the matrilin-1 gene*; 30<sup>th</sup> FEBS Congress-9<sup>th</sup> IUBMB Conference, Budapest, Hungary (2-7 July,2005)
2. **Daraba Andreea** -*New player in the post replication repair*; 1<sup>st</sup> ITC Alumni Meeting 2006-Modern trends in biological sciences: Seeking an integrative approach, , Szeged, Hungary (19-21 October,2006)
3. **Daraba Andreea**, **Gali Vamsi Krishna**, Halmi Miklós, Unk Ildikó – Polymerase exchange at replication forks stalled at sites of DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*; 38<sup>th</sup> FEBS Congress, „Mechanisms in Biology”; July 6<sup>th</sup>, 2013; Saint Petersburg, Russia