

A DNS szerkezetében bekövetkező hibák gyakran a replikáció elakadását okozzák és ezzel mutációk kialakulását és karcinogenezist indukálnak. A sejtekben különféle mechanizmusok működnek az elakadt replikációs villa menekítésére, az azonban nem ismert, hogy milyen döntés alapján történik egy adott menekítési útvonal kiválasztása. A közelmúltban - részben saját kutatásinknak köszönhetően -, különösen a PCNA replikációs fehérje mono- és poliubikvitinálása és e poszttranszkripciós modifikáció szerepe került a replikáció mentési folyamatainak megértését célzó kutatások középpontjába. A pályázatban megfogalmazott központi kérdés azon fehérjék vizsgálatára irányult, amelyek a mono- és poliubikvitinált állapotú PCNA-t felismerik, és hatását továbbítják a replikációs villa menekítését szolgáló útvonalakhoz.

A pályázat megírása előtt egy új, konzervált ubikvitinkötő domént (UBZ) azonosítottak az ubikvitinált PCNA-hez kapcsolódni képes polimeráz η (Pol η) és a polimeráz κ (Pol κ) transzléziós polimerázokban. Az UBZ egy speciális zinc finger C2HC fehérje domén, melynél az ubikvitin kötéshez nem szükséges a cink kötése. Előzetes vizsgálatok feltártak számos új, addig még nem jellemzett, UBZ családba tartozó fehérjét is, melyek bioinformatikai analízise alapján állítottuk fel azt a hipotézist, hogy a C2HC motívumot tartalmazó fehérjék közül számos szerepet játszik az elakadt replikációs villa menekítésében azáltal, hogy hozzákötődik a mono-, illetve poliubikvitinált PCNA-hez és közvetíti az ubikvitináció hatását a különböző hibajavítási útvonalakhoz. Hipotézisünk igazolása érdekében a pályázatban az alábbi célokat tűztük ki:

I. Jellemezzük az új, UBZ domént tartalmazó fehérjéket, és meghatározzuk, hogy szerepet játszanak-e a károsodott DNS replikációjában.

II. Meghatározzuk az UBZ fehérjék funkcióját a PCNA ubikvitináció hatásának közvetítésében.

Eredmények:

I. Az új, UBZ domént tartalmazó fehérjék jellemzése, a károsodott DNS replikációjában betöltött szerepük meghatározása

I/1

A C2HC domént tartalmazó fehérjecsaládnak hat olyan tagját vizsgáltuk, melyekről még nem volt ismert, hogy rendelkeznek-e DNS hibajavítási funkcióval. Ezek a Znr f_1 , a Znr f_2 , a ZBTB1, a FAM164a, a Fam164b és a Fam164c, melyek cDNS-ét humán cDNS könyvtárból felszorzoztuk, és melyeket szekvencia-ellenőrzést követően Gateway vektorba klónoztunk. Számos expressziós és tisztítási rendszert teszteltünk homogenitásig tisztított fehérjék létrehozása érdekében. A tisztított fehérjék jellemzéséhez vizsgáltuk:

a, interakciójukat ubikvitinnel, poliubikvitin láncsal, monoubikvitin-PCNA-vel és poliubikvitin PCNA-vel pull-down kísérleteket végezve;

b, a PCNA monoubikvitinációjára és poliubikvitinációjára, valamint a PCNA USP1 deubikvitiláz általi deubikvitinációjára gyakorolt hatásukat;

c, hatásukat a PCNA és az ubikvitin-PCNA által mediált DNS hibajavítás átírásra, mely TLS polimerázok és HLTF által közvetített templát csere révén történik.

Ezekkel a kísérletekkel meghatároztuk, hogy az új fehérjék közül melyek képesek *in vitro* specifikusan kötödni az ubikvitinált PCNA-hez és közvetíteni a PCNA modifikáció hatását a hibaátírás folyamatához.

I/2

Meghatároztuk a Znrf1, a Znrf2, a ZBTB1, a FAM164a, és a Fam164c fehérjék sejtmagi lokalizációját különös tekintettel a DNS-károsodás következtében bekövetkezett lokalizációs változásokra.

FLAG taggal jelölt fehérjék lokalizációja révén:

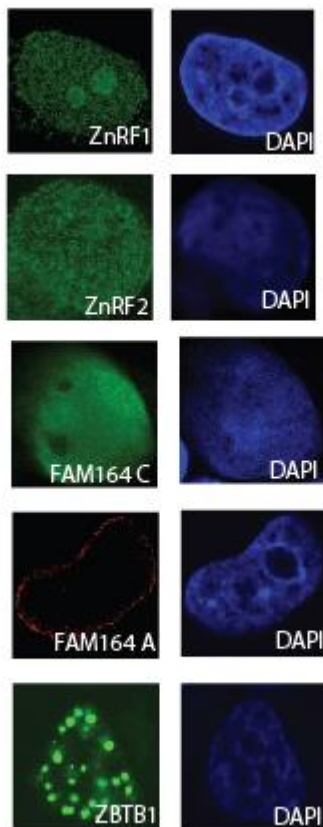
a, konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a DNS-károsodás indukálta magi fókuszképződést, mely a DNS hibajavítás jele;

A ZnRF1, a ZnRF2 és a FAM164C homogén sejtmagi lokalizációt mutat, amely nem változik akkor sem, ha a sejteket DNS-károsító ágenssel kezeljük.

A FAM164A perinukleáris lokalizációt mutat, és a lokalizációját nem befolyásolják DNS-károsító ágensek.

A ZBTB1 fehérje sejtmagi fókuszokat formál DNS-károsító ágens nélkül is.

Az UBZ doménnel rendelkező fehérjék sejtmagi lokalizációja



b, teszteltük a fehérjék kolokalizációját PCNA-vel és egyéb DNS repair fehérjékkel, melyek a replikációs villa menekítésében vesznek részt;

c, vizsgáltuk a fehérjék lokalizációját Rad18-kiütött sejtekben, melyekben a PCNA monoubikvitinációja károsodott és HLTF leütött sejt vonalban, melyben a PCNA poliubikvitinációja hibás.

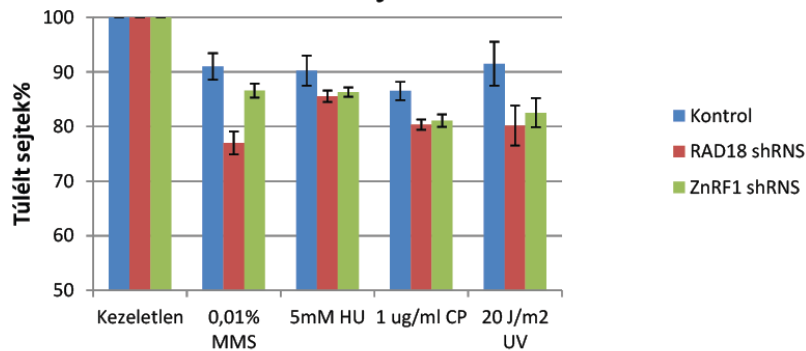
A ZnRF1, a ZnRF2, a ZBTB1, a FAM164A és a FAM164 fehérjék lokalizációja nem változik RAD18 kiütött sejt vonalban.

I/3

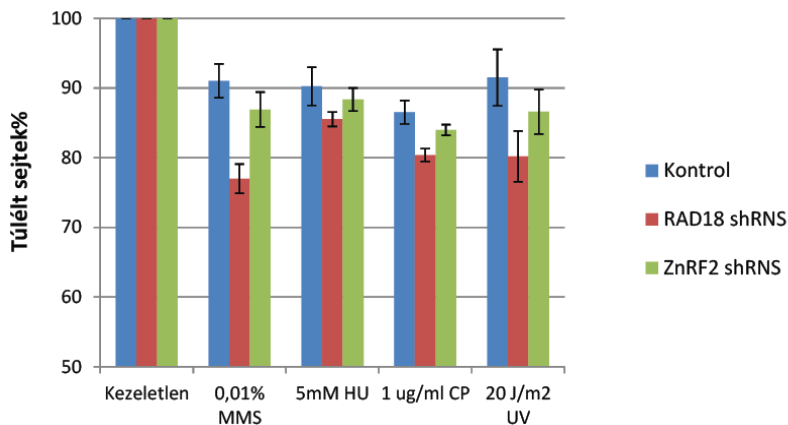
Megvizsgáltuk a *Znrf1*, a *Znrf2*, a *ZBTB1*, a *FAM164a*, a *Fam164b* és a *Fam164c* gének shRNS általi csendesítésének hatását a sejtek különböző DNS-károsító ágensekkel (UV fény, ciszplatin, metiláló ágensek) szembeni érzékenységére. Bizonyos esetekben teszteltük a DNS-károsodás által indukált mutagenézist is újonnan kidolgozott riporter rendszerünkkel, mely a mutációk gyakoriságát méri a GFP génben FACS módszerrel.

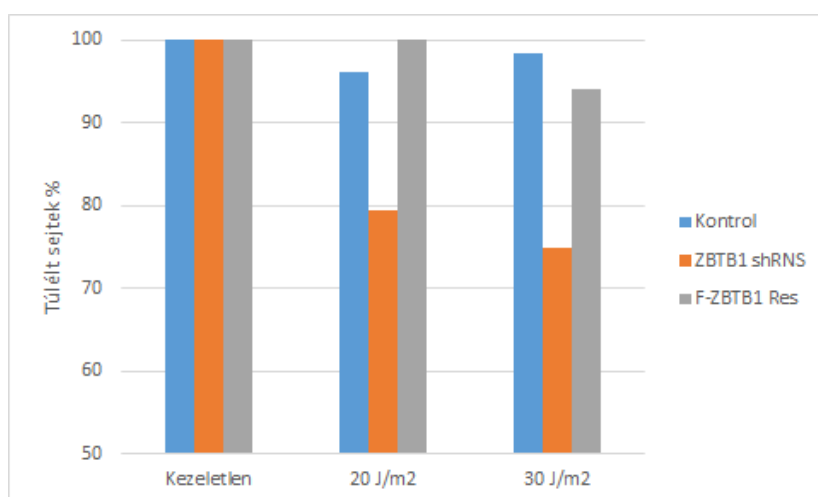
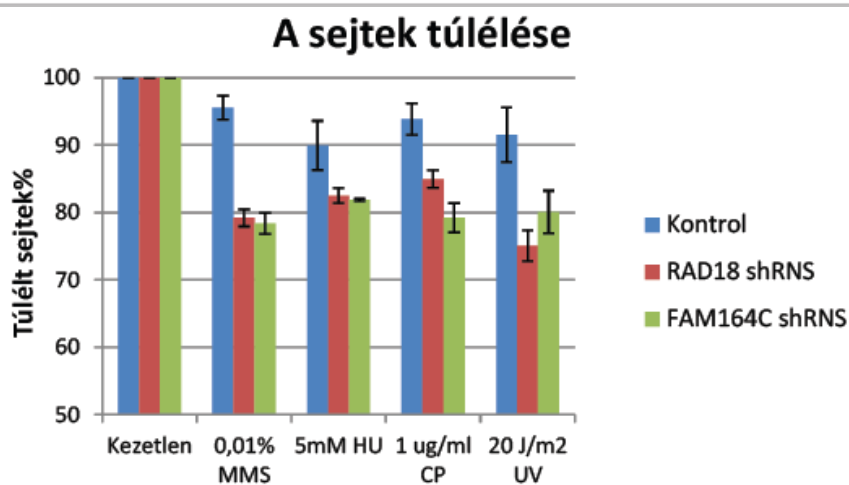
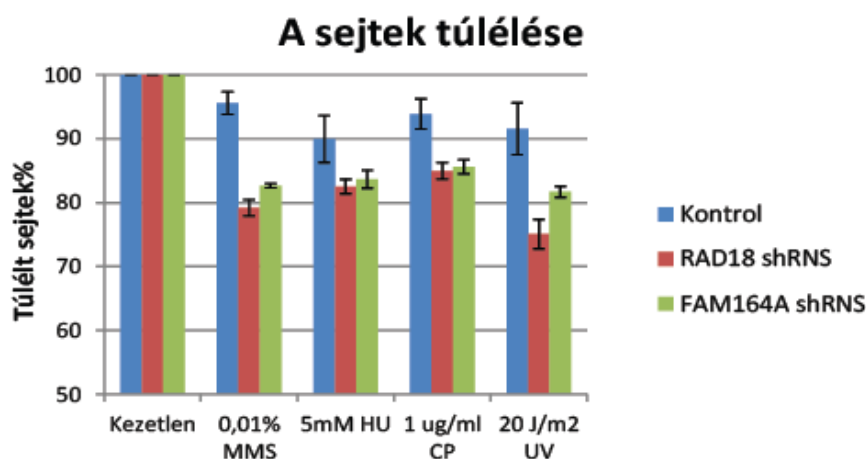
Az általunk vizsgált UBZ doménnel rendelkező fehérjék hiányában a sejtek megnövekedett érzékenységet mutattak DNS-károsító ágensekkel való kezelésre. Legnagyobb hatást UV-sugárzás, illetve metiláló ágensek (MMS) következtében tapasztaltunk.

A sejtek túlélése



A sejtek túlélése





II. Meghatároztuk a Fan1, az Mgs1 és a Zizi (Spartan/C1orf124) fehérjék *in vivo* szerepét, valamint az újonnan azonosított C2HC hibajavító fehérjék funkcióját a PCNA ubikvitináció hatásának közvetítésében

Kimutattuk, hogy a Zizi (Spartan/C1orf124) fehérje magasabb ubikvitinált PCNA szintet biztosít a sejtben, mellyel a DNS hibajavítási útvonalak közötti döntést szabályozza. Azt tapasztaltuk, hogy a Spartan fehérje a replikációs stressz helyén jelenik meg. A folyamat a PCNA- és ubikvitin-kötő doménektől, valamint a RAD18 PCNA ubikvitin ligáztól függ. A Spartan asszociációja az ubikvitinált PCNA-vel véd az ubikvitin specifikus proteáz 1 általi deubikvitináció ellen és elősegíti a TLS polimeráz hozzáférését a replikációs villához. Ezzel

összhangban a Spartan hiánya növeli a sejtek érzékenységét DNS-károsító ágensekkel szemben és a testvérkromatida-kicserélődések számát. A Spartan a genom stabilitás fenntartását segíti elő azáltal, hogy szabályozza, milyen úton történjen az elakadt replikációs villa menekítése.

II/1

Bizonyos esetekben megvizsgáltuk egyes C2HC fehérje hatását a homológ rekombinációra és a nem homológ végek összekapcsolására. Kidolgoztunk egy riportert rendszert a homológ rekombináció és a nem homológ vég összekapcsolás arányának meghatározására. siRNS által csendesített C2HC fehérjéket használva meghatároztuk, hogy az adott C2HC fehérje szerepet játszik-e a homológ rekombinációban vagy a nem homológ végek összekapcsolásában. Megvizsgáltuk a fehérjék overexpressziójának hatását, kifejeztünk siRNS rezisztens C2HC pontmutáns fehérjéket is, és adatokat nyertünk DNS-károsító anyagokkal kezelt riportert sejtek révén is.

II/2

Alkalikus egy-sejt elektroforézist (comet assay) végeztünk annak vizsgálatára, hogy a C2HC fehérjék milyen szerepet töltenek be a DNS-károsodást követő, újonnan szintetizálódott DNS érésében.

A HEK293/shSpartan stabilan csendesített sejtvonalonban vizsgáltuk különböző károsító ágensek (UV, hidroxürea, formaldehid) hatását a posztreplikációs repair folyamatok időbeli lefolyására. A Spartan fehérje hiányában a replikációs villa instabilitása miatt károsító ágensek nélkül is fokozódik a DNS kettős szálú törések mennyisége. Mindhárom fent említett károsító ágens a Spartan-csendesített sejtekben késlelteti az újonnan szintetizálódott DNS érését, azaz a replikáció befejeztével folytonossá váló hibamentes új DNS képződését. Az újonnan képződő DNS-ben a Spartan fehérje hiányában nagy mennyiségben maradnak fenn egyesszálú DNS szakaszok, ún. gap-ek, melyek az S-fázis végére sem javítódnak ki, így az alulreplikált régiók átkerülve a G2/M fázisba megnövelik a genomi instabilitást.

II/3

Megvizsgáltuk a C2HC fehérjék szerepét a replikációs villa károsodott DNS-en történő továbbhaladásában, kromoszómális DNS fiber assay-t alkalmazva.

A már korábban általunk megvizsgált és publikált Rev1, Rev3 és HLF1 hibajavító fehérjék mellett most ezzel a technikával felderítettük a Fan1, a Rad18, az Mgs1, a Zizi (Spartan/C1orf124), valamint az új, C2HC motívumot tartalmazó fehérjék szerepét a DNS károsodás közvetlen átírásában, valamint a replikációs villák károsodott DNS-en történő áthaladásában.

Az UV-károsodás hatására kialakuló nagyméretű, erős száltorziót okozó UV-fototermekek és a formaldehid hatására létrejövő DNS-fehérje keresztkötések is gátolják a replikációs villa továbbhaladását és az új DNS szintézisének sebessége lecsökken, melyet a DNS fiber assay-vel követtünk nyomon. A Spartan fehérje hiányában a replikációs villában menet közben, azaz „on fly” történő replikáció menekítés is gátolt. Ez a speciális, transzlációs szintézissel járó folyamat, mely a hibás nukleotidokat is átírni képes ún. TLS polimerázokkal történik, lelassul a Spartan fehérje hiányában. A Spartan fehérje az élesztőben a DNS-fehérje keresztkötések eltávolításában kulcsszerepet játszó wss1 fehérje szerkezeti homológja. Emberi sejtekben a Spartan fehérje hiányában szintén gátolt a DNS-fehérje keresztkötések eltávolítása, mivel Spartan hiányában a DNS-fehérje keresztkötéseket indukáló formaldehid jelenlétében a replikáció sebessége jelentősen lassul.