

A Rad5 fehérje szerepe a blokkolt replikációs villa menekítésében

Doktori értekezés

Írta: Blastyák András

Témavezető: Dr. Haracska Lajos

**Szegedi Tudományegyetem
Biológus Doktori Iskola**

**Készült a
Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Genetika Intézetében**

Szeged

2008.

Előzmények

Valamennyi makromolekula, beleértve valamennyi élőlény örökítőanyagát folyamatosan olyan celluláris és környezeti hatásoknak van kitéve amelyek megváltoztatják annak kémiai szerkezetét. Az örökítő anyag a “tervrajza” a sejtek működésének, bármilyen, kémiaiilag akár aprónak tűnő megváltozása is alapvetően érintheti a sejt működésének egészét. A sejt összes fehérjéje közül minimálisan száz az, ami közvetlen szerepet játszik a DNS károsodások javításában, ezeknek a fehérjéknek a feladata a lehetséges végtelen változatosságú DNS károsodások kijavítása. Belátható, hogy a DNS károsodások keletkezése és javítása dinamikus folyamatok, bizonyos károsodások akár hosszabb ideig is megúszhatják a reparációt, példának okáért, ha olyan kromatin környezetben helyezkednek el, ami a hibajavítás számára a hibás szerkezetet nem teszi hozzáférhetővé. Ha a DNS replikációját végző enzimikus apparátus rendkívüli templáthúsége okán nem képes a négy bázis egyikeként sem interpretálni a károsodást, akkor a DNS szintézise ezen a ponton leáll, ami leállíthatja a sejt ciklust és a sejt halálához, vagy legalábbis a genom nagymértékű átrendeződéséhez vezet; ez utóbbi eukariótákban közvetlen kapcsolatba hozható a karcinogenezissel. A probléma megoldása ezekben az esetekben nem a hiba javítása, hanem annak tolerálása, azaz egy olyan megoldás ami lehetővé teszi a replikáció folytatását a károsodott bázison keresztül. Mivel a hiba reparációja a valódi hibajavító mechanizmusok feladata lesz a későbbiekben, ezért a folyamatra poszt-replikációs reparációként (PRR) szokás hivatkozni. Tekintve, hogy a blokk közvetett oka a replikációs apparátus nagy pontossága, ezért az egyik lehetőség a sejt számára az, hogy átengedje, legalábbis néhány nukleotid beillesztése erejéig, a szintézist olyan DNS polimerázoknak, amelyek akár nem megfelelő bázis beépítése árán is, de képesek átírni a károsodott bázist (*Trans-Lesion Synthesis; TLS*). A károsodás kémiai természete alapvetően meghatározza azt, hogy az átírható-e, és azt is, hogy az átírás hibával jár-e, avagy sem. A TLS út, tekintve a lehetséges károsodások végtelen számát, bizonyosan nem univerzálisan használható tolerancia mechanizmus és bizonyosan nem hibátlan.

1976-ban egymástól függetlenül két kutatócsoport is arra a következtetésre jutott, hogy a blokkolt replikációs villa átrendezése bizonyos feltételek teljesülése esetén lehetővé teheti a hiba átírását egy olyan módon, ami esszenciálisan hibamentes és nem, vagy csak kevésbé függ a károsodás kémiai természetétől. A model szerint a blokkolt szintetizálódó szál az ép szálon szintetizálódó másik szálal templátként használva képes lehet a hiba átírására, hangsúlyozni kell: egy olyan trükköt használva, ahol a hibás DNS szakasz immáron nem templátja a szintézisnek, éppen ezért blokkja sem lehet. A modellre a leggyakrabban a replikációs villa megfordulásaként szokás hivatkozni. Ehhez a replikációs villa olyan átrendeződése szükséges, amely genetikai kontrolljáért élesztőben a Rad6-Rad18 fehérjékkel megjelölt út felelős, még pontosabban annak az úgynevezett Rad5 ága. A Rad5 fehérje egy ubikvitin ligáz és egy DNS függő ATPáz, mind a kettő aktivitása nélkülözhetetlen a PRR-ben. A Rad5 DNS függő ATPáz funkciója arra utal, hogy ez a fehérje lehet az a helikáz, ami a replikációs villában a szálak közötti kapcsolatok átrendezésével létrehozza a villa megfordítását. Éppen csak bizonyosan nincs helikáz aktivitása és ez úgy tűnik kizárja annak a lehetőségét, hogy direkt szerepe lenne a “csirkeláb” létrehozásában.

Célkitűzések

Jelen munka célja annak a lehetőségnek a kritikus újravizsgálata, hogy a Rad5 fehérjének nem indirekt, hanem direkt szerepe van a replikációs villa megfordításában. Kissé másképpen megfogalmazva, a szándékunk szerint a Rad5 genetikája és biokémiája közötti szakadékot kívántuk betömni, azzal a motivációval, hogy amennyiben ez lehetséges, akkor biokémiai magyarázatát adjuk a villa megfordítása során történő eseményeknek. A kísérletes munka tervezése során próbáltunk arra a tényre támaszkodni, amit biztosnak tarthatunk, azaz: a Rad5 ATPáz aktivitásának szerepe van a replikációs villa megfordításában; ugyanakkor próbáltunk megfeledezni arról, amit a villa megfordításának mechanizmusáról csak sejthetünk, azaz arról, hogy azt feltétlenül egy DNS helikáznak kell végrehajtania.

I. Ehhez feladatunk volt egy olyan kísérlet rendszer létrehozása, amely a replikációs villa *in vitro* modellje, és lehetőséget ad a villa megfordulásának észlelésére. Szándékaink szerint ezen rendszer az elképzelhető legegyszerűbb modellje kell legyen az *in vivo* szituációnak, ezért ezeket a szubsztrátokat oligonukleotidokból állítjuk elő.

II. Amennyiben a kísérleti rendszer adott, akkor nyílik lehetőség annak a tesztelésére, hogy *in vitro* a homogenitásig tisztított Rad5 fehérje szükséges, és elégséges-e a modellrendszerben a villa megfordítására. Ha igen, akkor részletesen vizsgáljuk a reakció biokémiai tulajdonságait, ideértve a szubsztrát kötésének a specifitását, a kofaktor szükségességét, és a reakció kinetikáját.

III. Ha az előzőekben megfogalmazott célok alapján a Rad5 olyan biokémiai aktivitása azonosítható, amely összefüggésbe hozható az *in vivo* szerepével, akkor megkíséreljük a kísérleti rendszerünk olyan átalakítását, mely a korábbi minimalista rendszerhez képest jobban közelíti a replikációs villa *in vivo* szerkezetét. Ehhez olyan méretű replikációs villa modell szubsztrátot hozunk létre, ahol a villa megfordulása akár több száz bázispárnyi is lehet. Ebben az esszenciálisan független kísérleti rendszerben szintén megvizsgáljuk a Rad5 aktivitását.

IV. Végül pedig, amennyiben a Rad5 biokémia szerepe a villa megfordításában igazolható, abban az esetben megvizsgáljuk, hogy mi a mechanisztikus alapja ezen aktivitásának. Ennek során tisztázzuk, hogy a fehérje egyszálú, avagy kétszálú transzlokázként működik-e.

Alkalmazott módszerek

Rekombináns fehérje termelése eukarióta expressziós rendszerben

Fehérjetisztítás

DNS-fehérje interakció vizsgálata

Enzimaktivitás vizsgálata

Eredmények

A poszt-replikációs reparáció, és azon belül a replikációs villa megfordításának modellje több mint 30 éves múltra tekint vissza. Ez alatt a 30 év alatt sikerült tisztázni azt, hogy mi a genetikai alapja a PRR-nek, melyek azok a gének amelyek fehérjetermékei nélkülözhetetlenek a blokkolt replikációs villa menekítéséhez, és számos esetben sikerült biokémiai funkciót is ezekhez hozzárendelni. Érdekes módon pont a villa megfordításának effektorát nem lehetett azonosítani biokémiailag; ehhez, mint a dolgozatban bemutatjuk, szükséges volt annak a hipotézisnek az elvetése, hogy a villa megfordítását végző enzim helikáz kell legyen.

A dolgozat alábbiakban részletezett, tudományos szempontból lényegesebb új eredményei a következők:

I. Létrehoztunk egy olyan kísérleti rendszert, amely segítségével világosan megkülönböztethető a replikációs villa modell szubsztrátok processzálásának helikáz-szerű, és villamegfordító módja. Ezt a kísérleti rendszert kihasználva elsőként sikerült igazolnunk, hogy a Rad5 fehérje képes *in vitro* a replikációs villa modell szubsztrát megfordításának katalízisére, mely reakcióhoz ATP hidrolízise szükséges.

II. Bemutattuk, hogy a Rad5 képes plazmid méretű replikációs villa modell szubsztrát megfordítására oly módon, hogy a reakció mértéke összemérhető az *in vivo* eseményekre adható becsléssel. Ezen a szubsztráton igazoltuk, hogy a Rad5 által katalizált reakció progresszív.

III. Bemutattuk, hogy a Rad5 egy kétszálú DNS transzlokáz, és a hatékony transzlokációhoz mind a két szál integritása szükséges, habár nem egyenlő mértékben. Az eredményeink alapján a replikációs villa megfordulásának olyan modelljét javasoljuk, mely megmagyarázhatja azt, hogy a Rad5 kétszálú DNS transzlokázként miként katalizálhatja ezt a reakciót.

Az értekezés készítéséhez felhasznált tudományos közlemény:

Blastyák A, Pintér L, Unk I, Prakash L, Prakash S, Haracska L. 2007. Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Molecular Cell*. 28(1):167-175.

Egyéb közlemények:

Blastyák A, Mishra RK, Karch F, Gyurkovics H. 2006. Efficient and specific targeting of Polycomb group proteins requires cooperative interaction between Grainyhead and Pleiohomeotic. *Mol Cell Biol*. 26(4):1434-1444.

Pettkó-Szandtner A, Mészáros T, Horváth GV, Bakó L, Csordás-Tóth E, **Blastyák A**, Zhiponova M, Miskolczi P, Dudits D. 2006. Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *Plant J*. 46(1):111-123.

Unk I, Hajdú I, Fátyol K, Szakál B, **Blastyák A**, Bermudez V, Hurwitz J, Prakash L, Prakash S, Haracska L. 2006. Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(48):18107-18112.

Chalkley GE, Moshkin YM, Langenberg K, Bezstarosti K, **Blastyák A**, Gyurkovics H, Demmers JA, Verrijzer CP. 2008. The transcriptional coactivator SAYP is a trithorax group signature subunit of the PBAP chromatin remodeling complex. *Mol Cell Biol*. 28(9):2920-2929.