

Ph.D. tézisek

**A HLTF (*Helicase like transcription factor*) és az SHPRH
(*SNF2 histone linker PHD RING helicase*) fehérjék szerepe a
károsodott DNS replikációjában**

Írta: Hajdú Ildikó

Témavezető: Dr. Haracska Lajos

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

2009

1 Bevezetés és célkitűzések

A sejt élete során örökítő anyagában folyamatos sérülések következtében hibák halmozódnak fel, amelyek a sejtek rákos elfajulását illetve halálát okozhatják. A károsodott DNS hatékony javítása így kulcsfontosságú feladat, mind az egysejtű, mind a többsejtű élőlények túlélése szempontjából.

A sérült bázisok egy részét hatékony DNS hibajavító rendszerek mint pl. a NER (*Nucleotide Excision Repair*), BER (*Base Excision Repair*) eltávolítják mielőtt a sejt belépne a sejtciklus szintetikus fázisába. Ezen javító mechanizmusok azonban nem tudják az összes hibát javítani, így a fennmaradó léziók a sejtciklus S fázisában a replikációs villák előrehaladását megakadályozzák. A befejezetlen replikáció genomikus instabilitáshoz illetve a sejt halálához vezet, amelynek elkerülése érdekében az evolúció során kialakultak olyan DNS hibajavító rendszerek melyek segítségével a sérült DNS szakaszok is átírásra kerülhetnek.

Élesztővel végzett kutatások azonosították a DNS-hiba átírásban szerepet játszó legfőbb géneket. Ezen kutatások alapján a károsodott DNS replikációja elsősorban egy Rad5 fehérje függő, a replikációs villa megfordításán alapuló úgynevezett *copy choice* mechanizmus segítségével történik. Emellett egyéb átírást biztosító rendszerek is működnek, amelyek során specializálódott DNS polimerázok, a TLS (*Translesion Synthesis*) polimerázok (pl. RAD30, REV1, pol ζ) folytatják a DNS szintézist a károsodott szakaszokon. Mindezen folyamatokban a Rad6-Rad18 ubikvitin ligáz enzim komplexnek kulcsfontosságú szerepe van; mind a Rad5 fehérje függő mind a TLS polimeráz függő útvonalakat szabályozza.

Az élesztőben azonosított, DNS hiba átírásban résztvevő fehérjék erősen konzerváltak az eukarióták között, számosak már a humán megfelelőjét is azonosították. Kivételt képez a Rad5, amelynek humán homológja munkánk kezdetekor még azonosításra várt. Emberben, az élesztő TLS polimeráz η homológjának hibája egy rákos betegséget, a *Xeroderma Pigmentosum Variáns (XP-V)* formáját okozza. Feltételezhető, hogy a Rad5 emberi megfelelőjének elvesztése is súlyos következményekkel, daganatképződéssel vagy apoptózissal jár, mivel élesztőben a replikációs villa blokkját

okozó hibák javításában elsősorban a Rad5 fehérje vesz részt, míg a polimeráz η és a többi TLS polimeráz szerepe lényegesen kisebb.

Munkám célja az élesztő Rad5 fehérje humán homológjának azonosítása, annak vizsgálata, hogy a Rad5-függő DNS hiba átírási útvonal emberben is megtalálható-e. Illetve a Rad5 homológok segítségével a károsodott DNS replikációjának tanulmányozása emberben.

2 Anyagok és módszerek

Rekombináns DNS-technikák

- Polimeráz-lánreakció (PCR), illetve PCR alapú mutagenézis
- Restrikciós emésztés
- DNS fragmentumok ligálása
- Agaróz gélelektroforézis

Fehérje módszerek

- Fehérjék tisztítása élesztőből
- GST pull down
- In vitro* ubikvitilálás

Sejtbiológiai kísérletek

- koimmunoprecipitáció
- In vivo* ubikvitilálási kísérletek
- Replikáció vizsgálata DNS fiber módszerrel

Élesztőgenetika

- Komplementációs kísérletek

Számítógépes módszerek

- Fehérje szekvenciák illesztése
- Fehérje adatbázisok szűrése

3 Eredmények és megvitatásuk

3.1 1. Az élesztő Rad5 fehérje strukturális emberi megfelelőinek azonosítása

A Rad5 humán homológjainak azonosítását szekvencia adatbázisok szűrésével kezdtük, az élesztő Rad5 fehérje aminosav szekvenciáját használva a szűrés alapjául. Két emberi fehérjét a HLTF-et és az SHPRH-t azonosítottuk, amelyek aminosav szekvenciája, domén szerkezete nagy hasonlóságot mutatott Rad5-ével. Mindkettőben megtalálható a Rad5-re jellemző, SWI/SNF családkhoz tartozó, hét motívumból álló helikáz domén és a harmadik és negyedik helikáz domén közé ékelődött RING finger domén. A HLTF és a Rad5 N-terminálisán található egy szekvencia elem a HIRAN domén, amely az SHPRH-ban nincs jelen, funkciója jelenleg ismeretlen, predikciók DNS hiba felismerő, DNS kötő aktivitást társítanak hozzá. Az SHPRH N-terminálisát két motívum, a hiszton linker fehérjékre jellemző H15 és egy PHD domén gazdagítja, amelyek sem a Rad5-ben, sem a HLTF-ben nem találhatók meg.

A HLTF mRNS-éről két, az N-terminális régióban különböző fehérje termék keletkezik emberi sejtekben. A 123. pozícióban található egy metionin, amely egy alternatív translációs start kodonként funkcionál, amely egy rövidebb 886 aminosavas fehérjét eredményez a teljes hosszúságú, 1009 aminosavas fehérjével szemben. A rövid izoformából a HIRAN domén hiányzik. Bizonyított, hogy ezen izoforma transzkripciós faktorként specifikus promóter régiókhoz kötődve fehérjék transzkripcióját aktiválja. Példa erre a plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAL-1) fehérje, amely promóterének B box eleméhez kötődve annak transzkripcióját serkenti. Ezzel szemben a HLTF hosszú izoformájáról, mely a HIRAN domént tartalmazza, nem mutattak ki transzkripciós faktor aktivitást.

3.2 A HLTF részlegesen menekíti az élesztő Rad5 DNS károsító hatásokra mutatott érzékenységét

A funkcionális homológia ellenőrzésére irányuló kísérletekben először megvizsgáltuk, hogy a HLTF és az SHPRH képes-e menekíteni vagy enyhíteni az élesztő *rad5* deléciós mutáns UV érzékenységi fenotípusát. A HLTF és SHPRH cDNS-ét élesztő expressziós

vektorokba klónoztuk különböző expressziós szintet biztosító promóterek mögé. Az elkészült plazmidokat *rad5* deléciós mutánsba transzformáltuk, a transzformánsok UV érzékenységét összehasonlítottuk a *rad5* deléciós és a vad típusú élesztő törzsek UV érzékenységével. A HLTF esetében nagyon enyhe komplementációt láttunk, míg az SHPRH nem enyhített a *rad5* deléciós törzs UV érzékenységi fenotípusán. Annak érdekében, hogy a HLTF, esetleg az SHPRH hatását jobban láthatóvá tegyük tovább érzékenyítettük a kísérletet *rad30rad5* deléciós mutáns alkalmazásával *rad5* egyes mutáns helyett. Ezen az érzékenyített háttéren a HLTF UV érzékenységet komplementáló hatása egyértelműen detektálható volt, feljavítva a *rad30rad5* kettős mutáns UV érzékenységét *rad30*-éig. Az SHPRH-val nem figyeltünk meg komplementációt *rad30rad5* háttéren sem.

3.3 A HLTF és az SHPRH kölcsönhat a Rad5 kölcsönható partnereinek emberi megfelelőivel

Megvizsgáltuk, hogy a HLTF és az SHPRH kölcsönhatásba lépnek-e a Rad5 fehérje ismert interakciós partnereinek humán homológjaival. A Rad5 kölcsönhatásba lép a Rad6-Rad18, Mms2-Ubc13 ubikvitin ligáz komplexekkel, a PCNA-vel. Az interakciók ellenőrzését GST pull down-nal, koimmunoprecipitációs kísérleti rendszerekkel végeztük. Interakciót mutattunk ki a HLTF és a hPCNA, a HLTF és a hRad18, a HLTF és a hUbc13-hMms2 között illetve az SHPRH és a hUbc13-hMms2 között. Ezen interakciók megléte megerősítik azon feltételezésünket, hogy a HLTF, az SHPRH és a Rad5 funkcionális homológok.

3.4 A HLTF és az SHPRH stimulálja a PCNA poliubikvitilációját

Élesztőben DNS-károsodás hatására a Rad18 monoubikvitilálja a PCNA-t, amely monoubikvitinre a Rad5 az Mms2-Ubc13 komplex-szel együttműködve poliubikvitin láncot épít. *In vivo* és *in vitro* kísérletekben arra kerestük a választ, hogy a HLTF stimulálja-e a PCNA poliubikvitilálását. Eredményeink szerint humán sejtekben az Mms2-Ubc13 és a Rad18 overexpressziója stimulálja a PCNA poliubikvitilálását, amelyet a HLTF tovább fokoz, arra utalva, hogy a HLTF Rad18-al és Ubc13/Mms2-vel együttműködve a Rad5-höz hasonló ubikvitin ligáz aktivitással rendelkezik. A HLTF-ről

és az SHPRH-ról *in vivo* kísérletekben kimutattuk, hogy a Rad6-Rad18-al és Mms2-Ubc13-mal együttműködve poliubiquitilálja a PCNA-t.

3.5 A HLTF részt vesz a károsodott DNS replikációjában

A HLTF-et először transzkripciós faktorként azonosították, azonban csoportunk eredményei szerint a HLTF részt vesz a károsodott DNS replikációjában is. Ennek bizonyítására a DNS fiber módszert használtuk, amely segítségével a replikációs villák láthatóvá tehetőek. Megfigyeltük, hogy a HLTF siRNS-el való csendesítése következtében a DNS károsodás hatására megállt replikációs villák újraindulása gátolt, hosszabb időt vesz igénybe, mint a HLTF megfelelő expressziója esetén, a károsodás ellenére továbbhaladó villák átlagsebessége lecsökken, az eredeti sebesség helyreállása hosszabb időt vesz igénybe.

A fent bemutatott kísérleteinkkel a HLTF (*Helicase like transcription factor*) és az SHPRH (*SNF2 histone linker PHD RING helicase*) fehérjéket mint az élesztő Rad5 DNS károsodás tolerancia útvonalban szerepet játszó fehérje strukturális és funkcionális emberi megfelelőit azonosítottuk. Bizonyítottuk, hogy a Rad5 képviselte DNS hiba átíró útvonal erősen konzervált, emberben is megtalálható. A munkánk során kapott eredményeink és a velük párhuzamos, más laboratóriumokból származó, független tanulmányok egyértelműen bizonyítják, hogy az SHPRH és a HLTF, potenciális tumorszupresszor fehérjék az evolúció során erősen konzervált mechanizmuson, a PCNA poliubiquitilálásán keresztül védik a sejteket a mutációk, illetve a rákos sejtekre jellemző genomikus instabilitás kialakulásától.

A csoportunkban folyó jövőbeni kutatások e fehérjék károsodott DNS replikációjában betöltött pontos szerepének tisztázására irányulnak majd.

4 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Haracska Lajosnak, témavezetőmnek, hogy lehetővé tette csoportjában Ph.D. munkám elvégzését. Dr. Fátyol Károlynak a koimmunoprecipitációs, Dr. Unk Ildikónak a GST pull down kísérletek elvégzéséért. Köszönöm Dr. Satya és Louise Prakash-nak, Rad5 mutáns élesztőtörzsek rendelkezésünkre bocsátását, illetve a hogy elvégezhetjük a komplementációs kísérleteket laboratóriumukban. Köszönöm Apolinar Maya Mendoza-nak, Dean Alan Jackson-nak a DNS fiber módszer megtanítását. Köszönettel tartozom Blastyák Andrásnak és a laboratórium minden tagjának a munkám során nyújtott hasznos ötleteikért, tanácsaikért. Illésné Kovács Katalinnak, Kraviár Ildikónak, Nótári Péterné Ilonának az aszisztenciáért. Szakál Barnabásnak, Szukacsov Valériának, Juhász Szilviának a Ph.D dolgozat elkészítése során nyújtott tanácsaikért, kritikai bírálatukért.

5 Közlemények:

Nemzetközi tudományos folyóiratban megjelent publikáció:

Unk I*, Hajdu I*, Fatyol K, Bermudez V, Hurwitz J, Yoon Jung Hoon, Prakash L, Prakash S, Haracska L.

Human HLTf functions as a ubiquitin ligase for PCNA poliubiquitination.
PNAS, 2008 Mar 11;105(10):3768-73.

* Contributed equally

András Blastyák*, Ildikó Hajdú*, Ildikó Unk, Lajos Haracska

Role of double stranded DNA translocase activity of human HLTf in DNA damage bypass

* Contributed equally

Under submission

Unk I, Hajdu I, Fatyol K, Szakal B, Blastyak A, Bermudez V, Hurwitz J, Prakash L, Prakash S, Haracska L.

Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen.

PNAS, 2006 Nov 28;103(48):18107-12

Péter Burkovics, Ildikó Hajdú, Valéria Szukacsov, Ildikó Unk and Lajos Haracska

Role of PCNA-dependent stimulation of 3'-phosphodiesterase and 3'-5' exonuclease activities of Ape2 in repair of oxidative DNA damage

Under submission

Poszterek :

Nemzetközi konferenciák

EMBO conference on DNA recombination

May 19-23 May, 2008, Il Ciocco, Italy

Ildikó Hajdú, Ildikó Unk, Barnabás Szakál, Károly Fátyol, Jerald Hurwitz, Jung-Hoon Yoon, Louise Prakash, Satya Prakash, Lajos Haracska

Indication for a role of HLTf in the replication of damaged DNA

EMBO workshop

„*Invasive Growth: A Genetic Program for Stem Cells, Cancer and Cancer Stem Cells*”
Third IRCC International Cancer Conference

May 26-29, 2005 Candiolo, Torino-Italy

Kornélia Szabó, Éva Bálint, Tamás Lukacsovich, **Ildikó Hajdú**, Enikő Molnár, Adrienn Hossó, Klarissza Domokos, István Török, Bernard Mechler and Istvan Kiss:

Novel screens for cancer-related genes in *Drosophila* and *in vitro* cell line models.

Magyarországi konferenciák:

VII. Magyar Genetikai Kongresszus *Április 15-17, 2007 Balatonfüred*

Hajdú Ildikó, Apolinar Maya-Mendoza, Dean Alan Jackson, Haracska Lajos
Rad18 ubiquitin-ligáz és DNS hibajavító fehérje új szerepe a DNS replikációjában

VII. Magyar Genetikai Kongresszus *Április 15-17, 2007 Balatonfüred*

Szakál Barbabás, **Hajdú Ildikó**, Juhász Szilvia, Haracska Lajos
A transzléziós DNS polimerázok és a Rad5 fehérje emberi homológjainak kölcsönhatása

VII. Magyar Genetikai Kongresszus *Április 15-17, 2007 Balatonfüred*

Burkovics Péter, **Hajdú Ildikó**, Szukacsov Valéria, Unk Ildikó, Haracska Lajos
Az Ape2 antimutagén proofreader exonukleázként működik a replikációs komplexben

VI. Magyar Genetikai Kongresszus *Április 10-12, 2005 Eger*

Ildikó Hajdú, Lajos Pintér, Ildikó Unk, Lajos Haracska:
HLTF tumorszupresszor fehérje szerepe a károsodott DNS replikációjában

Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 8. Munkaértekezlete,
Május 12-15, 2003 Tihany

Ildikó Hajdú, Éva Bálint, Kornélia Szabó, Imre Boros, István Kiss:
Identification of novel *dp53* interacting genes using activating transposon mutagenesis in
Drosophila melanogaster

Előadások

Straub napok, 2004

Ildikó Hajdú, Lajos Pintér, Ildikó Unk, Lajos Haracska
Indications for a function of HLTF in the replication of damaged DNA

HHMI 2006, Meeting of International Research Scholars

September 26-29, Janelia Farm Research Campus in Virginia, USA

Lajos Haracska, **Ildikó Hajdú**, András Blastyák, Péter Burkovics, Ildikó Unk
Replication of damaged DNA in yeast and human cells

Nyilatkozat

Alulírott, Haracska Lajos, Hajdú Ildikó doktorandusz témavezetője, illetve Unk Ildikó, társszerző igazolom, hogy a hallgató lényegesen hozzájárult a Ph.D. dolgozat alapjául szolgáló, már elfogadott és publikálás alatt lévő cikkek létrejöttéhez.

Hajdú Ildikó klónozte a humán HLTF és SHPRH fehérjéket, részt vett tisztításukban, igazolta a HLTF fehérje PCNA poliubikvitilálásában, illetve a károsodott DNS replikációjában betöltött szerepét. A kéziratok szerkesztésében és megírásában szintén aktívan részt vett.

Kijelentem, hogy a téziseket a saját fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használtam fel, illetve nem kívánom felhasználni.

Szeged, 2009. január 15.

Dr. Haracska Lajos
Témavezető

Dr. Unk Ildikó
Társszerző