

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Szerkezet és funkció összefüggésének vizsgálata az élesztő Rad18 fehérjében

Frittmann Orsolya

II.éves Biológia MSc hallgató

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóintézete

Genetikai Intézet

Témavezető: Dr. Unk Ildikó

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

Belső konzulens: Dr. Deák Péter

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

Genetika Tanszék

2014.

Tartalomjegyzék

I. Bevezető	4.
I.1. DNS károsodások.....	4.
I.2. DNS reparáció.....	6.
I.3. A DNS hibatolerancia útvonal	7.
3.1. Rad30	8.
3.2. Rev1	8.
3.3. Rev3 és Rev7.....	8.
3.4. Def1.....	8.
3.5. Rad5, Mms2-Ubc13	8.
3.6. Ubikvitin.....	9.
I.4. A Rad18 fehérje	9.
II. Célkitűzések	11.
III. Anyagok és módszerek	12.
III.1. Törzsek és plazmidok.....	12.
1.1. Baktérium törzsek	12.
1.2. Élesztő törzsek.....	12.
1.3. Felhasznált plazmidok.....	12.
III.2. Tápoldatok, lemezek	13.
2.1. YPD tápoldat	13.
2.2. LB tápoldat	13.
2.3. Szintetikus tápoldat	13.
2.4. Szelektív szintetikus tápoldat	13.
2.5. MMS lemezek	13.
2.6. HU lemezek.....	13.
2.7. CAN lemezek	14.
III.3. Módszerek	14.
3.1. Escherichia coli kompetens sejtek transzformálása	14.
3.2. Plazmid preparálás	14.
3.3. Genomi DNS izolálás élesztő sejtekből	14.
3.4. Polimeráz láncreakció	15.
3.5. Élesztő törzsek érzékenységeinek vizsgálata UV és mutagén ágensek hatására	15.
3.6. Élesztő sejtek transzformálása	15.
3.7. Spontán mutagenézis mérése	16.
3.8. Indukált mutagenézis mérése	16.
3.9. Irányított génkiütés.....	16.
3.10. Fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatása élesztő kettős hibrid módszerrel	17.
IV. Eredmények.....	18.
IV.1. A deléciós <i>RAD18</i> származékok létrehozása	18.
1.1. C-terminális deléciót hordozó mutánsok.....	18.
1.2. N-terminális részen deléciót hordozó mutánsok	19.

1.3. A Zn-finger és SAP domén környékén deléciót hordozó mutánsok elkészítése.....	20.
IV.2. A deléciós fehérjéket hordozó törzsek fenotípus vizsgálata	23.
2.1. C-terminális deléciós mutánsok fenotípus vizsgálata	23.
2.2. Rad18 fehérje N-terminális részén (RING és Zn-finger domén között deléciót hordozó mutánsok vizsgálata	24.
2.3. Zn-finger és SAP domén, valamint csak Zn-finger deléciós mutánsok vizsgálata	25.
IV.3. RAD18 Δ (115-190) deléciós törzs genetikai vizsgálata	25.
IV.4. Indukált és spontán mutagenézis a Rad18 Δ (115-190) deléciós törzsekben	28.
IV.5. A Rad18 fehérje által kialakított fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata élesztő kettős hibrid módszerrel	29.
5.1. N-terminális deléciós mutánsok fehérje kölcsönhatásainak vizsgálata élesztő kettős hibrid rendszerben	29.
IV.6. A Rad5 fehérje Rad18 független funkciójának vizsgálata a Rad18 Δ (115-190) törzs alkalmazásával	31.
V. Konklúzió	32.
VI. Rövidítések	33.
VII. Irodalomjegyzék	34.
VIII. Köszönetnyilvánítás	37.
IX. Nyilatkozat.....	38.

I. Bevezető

A sejtek alapvető életfolyamata önmaguk reprodukálása és a túlélés, mely hibátlan genetikai állomány jelenlétét feltételezi. A sejtek DNS-ét azonban számos celluláris és környezeti hatás károsíthatja, csökkentve a túlélési esélyt. Például a reaktív oxigéngyökök keletkezése az aerob anyagcsere során, a környezetből érkező UV és ionizáló sugárzás, valamint a különböző kémiai ágensek, melyek a nitrogén bázisokon, cukor-foszfát kötéseken fejtik ki károsító hatásukat. A törzsfajlás során több, evolúciósan rögzült reparációs útvonal alakult ki a túlélés biztosítása érdekében. Ha azonban a sejt olyan mértékű károsodást szenved, amit ezek a javítási mechanizmusok nem képesek eltávolítani a genomból, a sejtciklus az S fázisban elakad, mert a replikatív polimeráz a hibás bázist nem képes átírni, a replikációs villa eltörhet. Ilyen esetben lép életben a DNS hiba tolerancia (DDT), és a sejt a DNS károsodás mellett is képes lesz a túlélésre. A reparációs folyamatok konzerváltak, az élesztő reparációs géneknek szinte kivétel nélkül humán homológja is ismert. Az élesztőben ezen a területen tett felfedezések ezért jó alapot szolgáltatnak a humán sejtek DNS hibajavító folyamatainak megértéséhez.

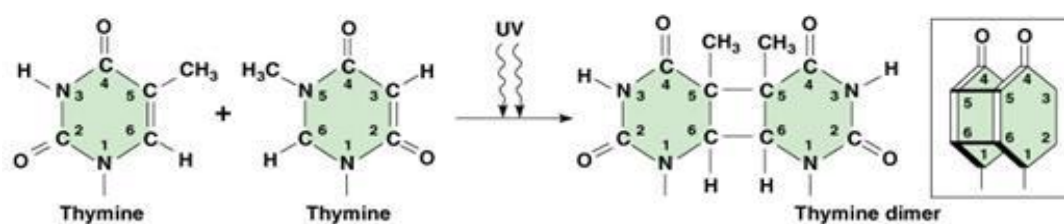
Mivel az élesztő *Saccharomyces cerevisiae* genomja ismert, gyors növekedésének, rövid életciklusának, haploid genomjának, keresztezhetőségének, a homológ rekombináción alapuló génkiütés lehetőségének és az alacsony fenntartási költségeknek köszönhetően vált a DNS hibajavítási folyamatok kutatásának eukarióta modelljévé.

Élesztőben azonosították az első reparációs géneket. A telepeket UV sugárzásnak tették ki, és az érzékeny törzseket RAD (radáció érzékeny) névvel illették. Később a felelős gének térképezése és azonosítása után a géneket genetikai vizsgálatoknak vetették alá, és működésük alapján genetikai csoportokba sorolták őket. A fő reparációs genetikai csoportok a Rad14, Rad52, és Rad6/Rad18 csoport. A Rad14 csoport az excíziós javításokért, a Rad52 csoport a kettős szálú DNS törések javításáért felelős. A Rad6/Rad18 csoport a DDT folyamatát teszi lehetővé, mely során a DNS károsodásnál megakadt replikációs apparátus tovább tud haladni a DNS szálon úgy, hogy a hiba nem kerül javításra és mutációt tartalmazó újonnan szintetizált szál keletkezik.

I.1. DNS károsodások

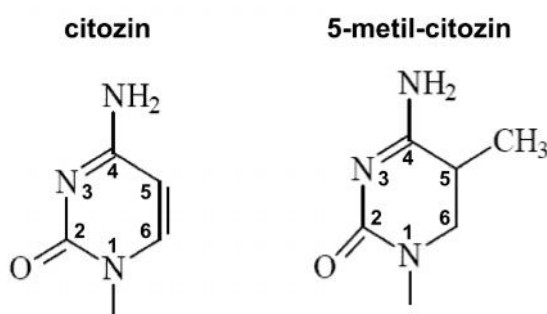
Nézzük meg kicsit részletesebben a különböző reparációs útvonalak aktiválódását kiváltó károsodásokat. A DNS-t számos hatás károsíthatja. Az egyik jelentős és talán a

leggyakoribb ezek közül az UV sugárzás, amelyet a kísérleteim során is alkalmaztam. UV hatására a szomszédos pirimidin bázisok között kovalens keresztkötések jönnek létre, így pirimidin dimerek keletkeznek, a legismertebb talán a timin dimer (1.ábra). Élesztőben működik egy látható fény hatására aktiválódó fotoliáz nevű enzim, ami képes az UV okozta sérüléseket kijavítani, elhasítja a timin dimernél lévő kettős kötést, ezért az UV-val kezelt törzseket sötétben kell tartani, hogy az általunk vizsgálni kívánt reparációs útvonalak működését tudjuk megfigyelni. Ugyancsak fény hatására a pirimidinek között keletkezik a 6-4 fotoproduktum, amely mutagénebb a timin dimereknél. Ezek a dimerek a DNS merevségét idézik elő. A replikáció előtti eltávolításukról a nukleotid kivágó hibajavítás (NER) gondoskodik.



1.ábra: UV sugárzás hatására keletkező timin dimer

Bizonyos vegyületek kémiai csoportok addíciójával változtatják meg a DNS-t. A metilmetanoszulfonát (MMS) a bázisok metilációját okozza (2.ábra), amit a bázis excíziós reparáció (BER) javít ki. Működése során abázikus helyek keletkeznek, melyeket ezen útvonal enzimeit processzálják tovább, de ha ez nem történik meg, a későbbiekben, a replikáció során itt is a DNS hibatolerancia aktiválódik. A genomban spontán is létrejönnek abázikus helyek az N-glikozidos kötés felbomlása által (4).



2.ábra: A citozin és az 5-metil citozin szerkezete

Az aerob anyagcsere során felszabaduló reaktív oxigéngyökök a bázisok oxidációját idézik elő, pl. a 7,8-dihidro-8-oxo-guanozin ami szintén a bázis kivágó reparáció

aktiválódását váltja ki. Ha az oxoguanin nem vágódik ki a replikáció előtt, a DNS polimeráz timinnek értelmezi, ezáltal mutáció keletkezik.

A röntgensugárzás kettős szálú DNS törést idéz elő, mely a homológ rekombináción alapuló ún. DSBR által javítódik.

I.2. DNS reparáció

A DNS károsodások javítására számos mechanizmust ismerünk, mint például a bázis kivágó reparáció (base excision repair - BER), nukleotid kivágó reparáció (nucleotide excision repair - NER), nem párosodó bázisok kivágása (mismatch repair - MMR), homológ rekombinációs reparáció (homologous recombination repair - HRR), nem homológ végek összekapcsolása (non homologous end joining - NHEJ).

A **bázis kivágó reparáció** főleg a metilált, oxidált bázisok eltávolítását, és a spontán keletkező abázikus helyek megszüntetését teszi lehetővé. Az abázikus helyek, enzimatikus működés hatására keletkeznek, és ezek mellett történik a hasítás. Az első lépés, hogy az N-glükozidáz kivágja a sérült bázist. Az így keletkező abázikus hely mellett az 5' oldalról egy specifikus endonukleáz hasít, majd az így keletkező egyes szálú DNS törés végéről egy 5'-3' exonukláz aktivitású fehérje emészt le 1-5 nukleotidos szakaszt. Ezt a DNS polimeráz tölti fel, majd a folytonosság ligázok által áll helyre. (20)

Nukleotid kivágó reparációnál a BER-rel ellentétben egy oligonukleotid formájában vágódik ki a károsodott DNS. A sérült bázisok vagy dimerek két oldalán 5' és 3' irányban is egyszerre történik meg a bemetszés, majd a hibás szakasz 25-30 nukleotidnyi hosszúságban kiválik, míg a helye a replikatív polimeráz által feltöltődik. (20)

Homológ rekombinációs hibajavítás a kettősszálú DNS törések javítását teszi lehetővé. A kettős szálú DNS törések mindkét oldalán az 5' vég visszaemésztődik, a keletkező 3' túlnyúló vég hibridizál a homológ ép duplex komplementer szálaival, ez vezet a Holliday szerkezet kialakulásához. Ebben a struktúrában a törött DNS molekula 5' leemésztett végei újraszintetizálódnak az ép DNS molekulát használva templátul, majd a hurkot kettős hasítás szünteti meg. (20)

Nem homológ végek összekapcsolása nem hibamentes. A törött végekhez fehérjék kapcsolódnak, majd tompa végeket hoznak létre és összekapcsolják azokat. Ez a mechanizmus természetéből adódóan kromoszóma átrendeződéseket okoz. (20)

Nem párosodó bázisok reparációja során a polimeráz által beillesztett nem komplementer de ép nukleotidot a MMR enzimek hasítják ki. (20)

I.3. A DNS hibatolerancia útvonal:

Előfordulhat, hogy az evolúciósan rögzült DNS javító mechanizmusok nem távolítják el a hibát a genomból, a replikatív polimeráz nem képes a hibás bázison áthaladni, így ezek az S fázisban a replikációs villa elakadását eredményezik. Ha a villa megakad egy nem megfelelő bázis jelenléte miatt és szétesik, az nagyfokú genomi átrendeződéshez vagy a sejt halálához vezet. Létezik olyan mechanizmus, mely a károsodott szálon is továbbsegíti a replikációs apparátust a károsodott bázisok eltávolítása nélkül. Ennek megfelelően ezt az útvonalat DNS hibatolerancia útvonálnak (DDT) nevezzük és a Rad6/Rad18 fehérjekomplex irányítása alatt működik. A DDT három al-útvonalra osztható; a transzléziós polimerázokon keresztül megvalósuló mutagén (*REV3*, *REV7*, *DEF1*, *REV1*) és hibamentes (*RAD30*) tolerancia al-útvonalra, valamint a hibamentes villa visszafordítást végző (*RAD5*, *MMS2-UBC13* géneket tartalmazó) ágra; melyek a Rad18 fehérje jelenléte nélkül nem léphetnének életbe. (3.ábra) A Rad18 (E3 ubikvitin ligáz) a Rad6 (E2 ubikvitin konjugáz) fehérjével komplexet alkotva van jelen a sejtekben és a proliferating cell nuclear antigene (PCNA) fehérje monoubikvitinálódását elősegítve irányítja a megakadt replikációs villa mentését (3).

A PCNA egy gyűrű alakú, homotrimer szerkezetű fehérje, mely a replikatív polimerázt a DNS szálhoz rögzíti. A PCNA ubikvitinálódása aktiválja a DNS hibatolerancia útvonalakat. A PCNA monoubikvitinációja a 164-es lizin oldalláncon történik, a Rad18 és a Rad6 közreműködésével és a transzléziós polimerázok által megvalósuló transzléziós szintézist segíti elő azáltal, hogy segíti a replikatív polimeráz leválását a DNS szálról és a helyére a transzléziós polimeráz tud csatlakozni. A monoubikvitinált PCNA poliubikvitinációja a DDT másik ágát, a hibamentes, replikációs villa visszafordítást aktiválja. A Rad18 enzim a folyamat első lépésénél jelen van, nélküle nem jöhet létre az első ubikvitin kapcsolódása, és inaktív marad a teljes hiba tolerancia útvonal.

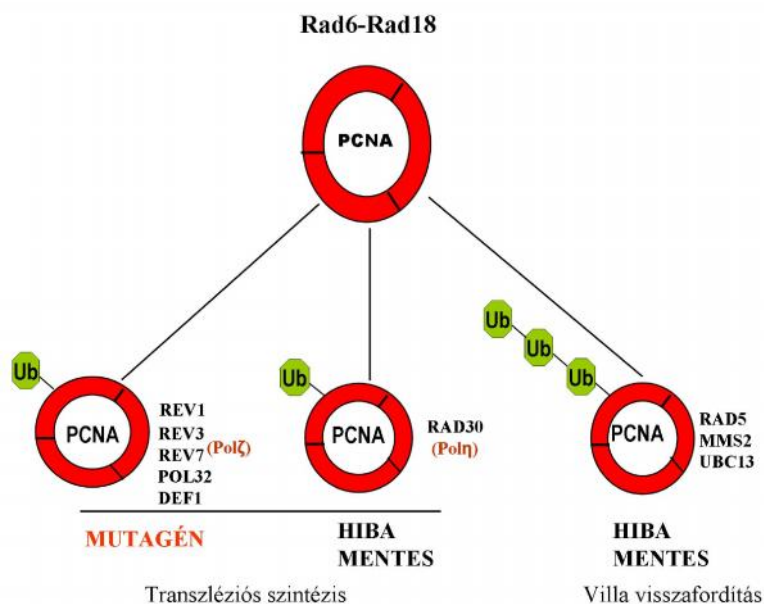
A DDT tehát három útra osztható (7). A TLS útvonalat a PCNA monoubikvitinálódása aktiválja. A hibatolerancia transzléziós polimerázokon által valósul meg. Élesztőben az aktiválódott polimerázoktól és a hiba típusától függően ez az útvonal lehet mutáció mentes és mutációt rögzítő is.

TLS (transzléziós szintézis) hibamentes útvonal:

3.1. Rad30

A TLS polimerázok által megvalósuló hibamentes tolerancia útvonal egyedüli képviselője a Pol η (Rad30), mely a timin dimerek mutáció mentes átírására képes. (21) Aktív centrumában a replikatív polimerázzal ellentétben a kovalensen keresztkötött ciklobután pirimidin

bázispárok számára is van elég hely. A timin dimerekkel szemben tud a Watson-Crick szabályt követve két adenint beépíteni. Más UV okozta károsodásokat azonban hibásan ír át, például a 6,4 fotoproduktum esetében a 3' pirimidintől függetlenül mindig G-t helyez be, ez esetben a Pol η sem hibamentes.



3. ábra: DDT két ága a PCNA ubikvitináltságától függően

TLS mutagén útvonal:

A DDT TLS polimerázokon keresztül megvalósuló mutációt rögzítő útvonalának résztvevői a Rev1, Def1, Rev3 és Rev7.

3.2. Rev1

Rev1 egy templát függő citozin specifikus polimeráz, a szintézis során dCTP-t képes beépíteni a DNS-be. Bár pontos szerepe még nem tisztázott, a mutagenézis folyamataihoz nélkülözhetetlen.

3.3. Rev3 és Rev7

A Pol ζ a Rev3 és Rev7 fehérjék komplexe, magas fidelitású enzim, nem képes a sérült bázisokkal szemben bázist beilleszteni, de amennyiben ezt egy másik enzim már megtette, onnan folytatja a szintézist, akkor is, ha a behelyezett bázis nem a templát komplementere. A Pol ζ folytatja az átírást, így rögzítve a hibát a genomban.

3.4. Def1

A Def1 fehérje nélkülözhetetlen a mutagenézishez. DNS károsodás hatására elősegíti a replikatív polimeráz katalitikus alegységének proteolitikus lebomlását, amelynek helyét a

jelenlegi modellek szerint egy transzléziós DNS polimeráz veheti át, amely képes bizonyos DNS károsodásokat, mutációk képzésével átírni.

Villa visszafordításon alapuló útvonal:

A TLS polimerázoktól eltérő mechanizmussal működik a villa visszafordításon alapuló hibamentes javítást végző útvonal, melynek résztvevői a Rad5, Mms2 és Ubc13.

3.5. Rad5, Mms2-Ubc13

A DDT harmadik, hibamentes átírást biztosító ágát a replikációs villa visszafordítását indukáló Mms2-Ubc13 E2 ubikvitin konjugáz fehérje komplex és a Rad5 egy több aktivitással rendelkező fehérje. Egyrészt egy E3 ubikvitin ligáz, amely az Mms2 – Ubc13 fehérjék ubikvitin konjugáló dimerével együtt egy poliubikvitin láncot hoz létre a PCNA fehérjén, így mutáció mentes átírást aktiválja (12). Másrészt a Rad5 egy transzlokáz, ATPáz aktivitással, és DNS kötő aktivitással. Domén struktúrája különleges, a konzervált helikáz domének közé ékelődve hordoz egy, az ubikvitin ligáz fehérjékre jellemző RING domént is. A Rad5 kettősszalú DNS transzlokáz aktivitásának köszönhetően képes a replikációs villa megfordítására. (16)

3.6. Ubikvitináció

A Rad6/Rad18 fehérjekomplexnek együttesen DNS kötő, ATP hidrolitikus és ubikvitin konjugáló/ligáló aktivitása van. Az ubikvitin egy minden eukarióta szervezetben jelen lévő 76 aminosavból álló fehérje. (15) A fehérjék egy enzimkaskád közreműködésével ubikvitinálódnak. Az ubikvitin aktiváció egy ATP-függő folyamattal kezdődik, amikor az ubikvitin tioészter kötéssel kötődik egy E1-ubikvitin aktiváló enzimhez. Ezután az ubikvitin E2 ubikvitin konjugáló enzimre kerül (esetünkben ez a Rad6), ahonnan az ubikvitin ligáz-E3 (Rad18) juttatja át a szubsztrát fehérje lizinjére. Az ubikvitináció elsődlegesen felfedett szerepe a proteoszómális fehérjelebontáshoz kapcsolódik. Újabban az ubikvitin biológiai útvonalakat szabályozó szerepére is fény derült, mint például az endocitózis, gyulladásos folyamatok, transzláció és DNS repair.

I.4. A Rad18 fehérje:

A Rad18 Ub ligáz fehérje a Rad6 Ub konjugáz fehérjével komplexet alkotva vesz részt a hibatolerancia útvonalban. A Rad18 fehérje öt azonosított doménnel rendelkezik, melyek közül csak három funkciója ismert biztosan élesztőben (RING, ATPáz, Rad6BD) a többi domén vizsgálatát eddig élesztőben nem végezték el.

A Rad18-at először ATPáz-ként azonosították az C-terminális részén lokalizálódó ATP kötő domén nukleotid kötő Walker típusú A motívuma alapján. (14)



4.ábra: Rad18 gén doménjei: A számok az aminosavakat jelölik.

A Rad18 fehérje N-terminális részén azonosítottak egy RING domént (28-65), amely E3 ligázok körében gyakran megtalálható, hiszen az E2 konjugázzal, esetemben a Rad6-tal és az Ubc13-Mms2 komplexszel való interakcióért felelős (2). Ettől függetlenül, szintén a Rad6 fehérjével való interakcióért felelős 40 aminosavat felölelő helix-loop-helix motívum jelenléte is szükséges a Rad18 fehérje C-terminális részén, mely a Rad6 fehérje két amfipatikus α -hélix struktúrájával hidrofób interakció kialakítása révén eredményezi a Rad6-Rad18 komplex stabilitását (6).

Azonosítottak a Rad18 szekvenciában más fehérjékkel való szekvencia homológia alapján, egy úgynevezett ciszteinben gazdag C2HC Zn-finger domént (190-210) is, amely szerepe a DNS, valamint az ubikvitin kötése lehet. Humánban a Zn-finger jelenléte elengedhetetlen a Rad18 megfelelő működéséhez, hiszen már az egyik Zn kötő cisztein fenilalaninra történő módosítása is a Rad18 fehérje DNS hiba körüli lokalizációját gátolja, ahogy azt egy humán Rad18 fehérjével foglalkozó cikk említi.(1)

A SAP domén a fehérje középső részén helyezkedik el, ahogy azt a szekvencia homológia vizsgálatok alapján feltérképezték. Nevét arról a három fehérjéről kapta, melyekben először azonosították ezt a domént, ezek pedig a SAF-A/B, Acinus és Pias voltak.(1) A SAP domén a ssDNS-sel való kölcsönhatásban játszhat szerepet és a Pol η DNS károsodás körüli lokalizációjában meghatározó a jelenléte humán Rad18-cal végzett kísérletek alapján.(1)

Mivel az ismert domének a Rad18 fehérjének csak kis részét fedik le és az adatok többsége humán Rad18 fehérjével végzett kutatásokból származik, kutatásaim a feltérképezetlen régiók vizsgálatára és a már azonosított, de nem vizsgált domének szerepének élesztőben való megismerésére irányulnak.

II. Célkitűzések

Célom a Rad18 fehérje még nem karakterizált régióinak analízise, a már azonosított domének szerepének megismerése élesztőben, valamint ezen területek DNS hibatolerancia folyamatokban betöltött szerepének vizsgálata volt.

Ehhez a következő feladatok elvégzését terveztem:

1. A Rad18 fehérje C-terminális részén deléciót hordozó mutánsok elkészítése
2. A Rad18 fehérje N-terminális részén deléciót hordozó mutánsok elkészítése
3. A Rad18 fehérje középső részén, a Zn-finger és SAP domén környékén deléciót hordozó mutánsok elkészítése
4. A deléciós mutánsokat hordozó törzsek fenotípus vizsgálata
5. Az érdekes fenotípust mutató törzsek részletes vizsgálata, a deletált régió funkciójának meghatározása

III. Anyagok és Módszerek

III.1. Törzsek és plazmidok:

1.1. *Baktériumtörzsek:*

E. coli DH5~ kompetens baktérium sejt, mely ampicillinre és kanamicinre is szenzitív.

1.2. *Élesztő törzsek:*

EMY 747: MATa, his3-D1 leu2-3 leu2-112 trp1D ura3 genotípusú vad típusú élesztő törzs. Ebben a törzsben készítettem el minden további mutációt.

PJ69-4A: MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4D gal80D GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ genotípusú élesztő törzs. Az élesztő kettős hibrid kísérleteket ebben a törzsben végeztem.

1.3. *Felhasznált plazmidok:*

pUC19, pUC18 *E.coli* klónozó plazmid: (17) Magas kópiaszámú, kisméretű 2686 bp hosszúságú plazmid. pMB1 replikációs origót tartalmaz, a bla gén az ampicillin rezisztenciáért felelős, az MCS (klónozó régió) a lacZ gén 5' szakaszán belül helyezkedik el. A lacZ gén beépített szakaszát a saját promótere hajtja, a gén előtt a CAP fehérje kötési helyét, és a represszor kötési helyét is tartalmazza. A lac Z gén által szelekció végezhető a klónozó régióba beépült DNS-t hordozó telepekre.

YCplac33 *E.coli*/Saccharomyces cerevisiae élesztő centromeres inga vektor, (18) a szelekciót az URA3 gén biztosítja. Kísérleteim során, erről a vektorról expresszáltattam a klónozással létrehozott deléciós Rad18 fehérjét.

pGAD424(+1) aktivációs domén vektor, élesztő kettős hibrid kísérletekhez: (19) inga vektor, mely *E.coli*ban és *S.cerevisiae*ban is képes autonóm replikációra, az élesztőben a szelekciót a LEU2 gén biztosítja. A vektor a GAL4 fehérje aktivációs doménjének szekvenciáját tartalmazza a multiklónozó régióban (MCS) egyedi restriktációs helyekkel a gén 3' végén. A hibrid fehérje létrejöttéhez a vizsgálni kívánt gént a MCS-re megfelelő orientációba és leolvasási keretbe kell klónozni. A fúziós fehérje magas szinten expresszálódik a gazda sejtben konstitutív ADH1 promóterről, majd a sejtmagba szállítódik egy nukleáris lokalizációs szignálnak köszönhetően, ami az AD szekvenciája mögött helyezkedik el.

pGBT9(+1) GAL4 DNS kötő domén vektor, élesztő kettős hibrid kísérletekhez: (19) inga vektor, mely *E.coliban* és *S.cerevisiae*ban is képes autonóm replikációra, élesztőben a szelekciót a TRP1 gén biztosítja. A vektor a GAL4 fehérje DNS kötő doménjének szekvenciáját tartalmazza a multiklónozó régióban (MCS) egyedi restrikciós helyekkel a gén 3' végén. A hibrid fehérje létrejöttéhez a vizsgálni kívánt gént a MCS-re megfelelő orientációba és leolvasási keretbe kell klónozni. A fúziós fehérje magas szinten expresszálódik a gazda sejtben konstitutív ADH1 promóterről, majd a sejtmagba irányítódik egy nukleáris lokalizációs szignálnak köszönhetően, ami az BD szekvenciájában helyezkedik el.

III.2. Tápanyagok, lemezek:

2.1. YPD (teljes élesztő táptalaj/tápanyag) szelekciót nem igénylő törzsek növesztésére: 10 g élesztő extraktum, 20 g pepton, 20 g D-glükóz, 1 liter steril vízben feloldva. Szilárd talaj esetén +17 g agar por/1 liter víz.

2.2. LB (Luria Bertani baktérium tápanyag/táptalaj): 10 g tripton, 5 g élesztő extraktum, 10 g NaCl/1 liter víz. Szilárd talaj esetén 17 g agar por/1 liter víz.

2.3. Szintetikus tápanyag és táptalaj: 2% D-glükóz, 0.17% élesztő nitrogén bázis (NH₄)₂SO₄-tal, adenin 40 mg/liter, L-arginin 30 mg/liter, L-uracil 20 mg/liter, L-histidin 20 mg/liter, L-izoleucin 20 mg/liter, L-leucin 30 mg/liter, L-lizin 30 mg/liter, L-metionin 20 mg/liter, L-fenilalanin 50 mg/liter, L-triptofán 30 mg/liter, L-tirozin 30 mg/liter, L-valin 100 mg/liter. Szilárd táptalaj esetén 17g agar por/ 1 liter víz.

2.4. Szelektív szintetikus tápanyag: Szintetikus tápanyag összetevőit tartalmazza a szelekciót biztosító aminosav kivételével.

2.5. MMS (metil-metanoszulfonát) lemezek: a táptalajhoz közvetlenül dermedése előtt különböző koncentrációkban adagolt 99%-os metil-metanoszulfonát törzsoldat (SIGMA) felhasználásával készülnek.

2.6. HU (hidroxü-urea) lemezek: a táptalajhoz dermedés előtt különböző koncentrációkban adagolt 76 g/mol-os hidroxü-urea törzsoldat hozzáadásával készülnek.

2.7. CAN (kanavanin) lemezek: a táptalaj fent felsorolt komponensét tartalmazza, avval a különbséggel, hogy ez a szelekciós táptalaj L-arginin helyett L-kanavanint tartalmaz 80mg/1 liter táptalaj koncentrációban

III.3. Módszerek:

3.1. *Escherichia coli* kompetens sejtek transzformálása:

Egy 100 µg/ml ampicilin tartalmú, LB táptalajt tartalmazó Petri-csészét szobahőmérsékletre tettem melegedni kb. 30 percig. Ezzel egy időben 200 µl CaCl₂-dal kompetensé tett *Escherichia coli* sejtet tartalmazó Eppendorf csövet jégen tartottam kb. 5 percig. 50-200 ng plazmidot adtam az inkubált sejtekhez, és további 30 percig jégen tartottam őket, majd 42°C-on 1 percig hősokkoltam, ezután 2 percig ismét jégen inkubáltam őket. Ezután a felmelegített táptalajra szélesztettem a baktérium sejteket, majd a lemezeket egy éjszakán át 37°C-on növesztettem.

3.2. Plazmid preparálás:

3 ml 100 µg/ml ampicilin tartalmú LB tápoldatba leoltottam egy baktérium telepet. A kultúrát egy éjszakán át 37°C-on inkubáltam, majd másnap reggel a felnőtt kultúrákat Eppendorf csőben lecentrifugáltam. A kiülepített sejteket 100 µl SOLI (1 M Tris-t (pH8), 0,5 M EDTA-t) oldatban szuszpendáltam majd 200 µl SOLII (10 N NaOH-t, 10% SDS-t) oldat hozzáadása után összekevertem. Ezt követően 150 µl (pH4,8-as 147 g K-acetátot) oldatot adtam az elegyhez és keverés után 10 percig 13000 rpm-en centrifugáltam. A felülúszót új Eppendorfba vittem át, majd 400 µl fenol-kloroform elegyet mértem rá. A 10 perces centrifugálást követően a felülúszóból a DNS-t 100%-os izopropanollal csaptam ki (400 µl) ezt követően ismét centrifugáltam. A csapadékot egy újabb lépésben 70%-os etanollal (300 µl) mostam. Az etanol eltávolítása és a DNS beszáradása után a mintákat RNáz-zal kiegészített TE oldatban (10 mM Tris, 1 mM EDTA) szuszpendáltam fel.

3.3. Genomi DNS izolálás élesztő sejtekből:

Leoltottam 1 ml szelektív szintetikus tápoldatba élesztő sejteket az adott lemezről. Másnap lecentrifugáltam a sejteket, majd a felülúszó leszívása után a sejteket 100 µl 200 mM-os LiAc és 1%-os SDS tartalmú oldatban szuszpendáltam fel. Ezt követően 5 percig 70°C-on tartottam őket, majd 300 µl 100%-os etanol hozzáadásával csaptam ki a DNS-t. A mintákat egy további lépésben 70%-os etanollal mostam, majd a beszáradás után 100 µl desztillált vízben oldottam fel.

3.4. Polimeráz láncreakció:

Polimeráz láncreakció során egy kiválasztott DNS szakasz felamplifikálása válik lehetővé, melyhez a DNS szakaszra komplementer 20-30 bázispár nagyságú oligonukleotidok tervezése szükséges első lépésben.

Reakcióelegy tartalma: amplifikálni kívánt szakasz, primerek, dezoxiribonukleotidok, DNS polimeráz, $MgCl_2$, víz/puffer.

PCR reakció lépései: 1. rész: denaturáció (92-95°C, 1-5 perc)

2. rész: három ciklusból áll, mely ismétlődik a reakció során 32x denaturáció (95 °C), primerek bekötődése (52 °C), elongáció (72 °C)

3.5. Élesztő törzsek érzékenységének vizsgálata UV és mutagén ágensek hatására:

Az élesztő sejteket leoltottam 3 ml szelektív szintetikus tápoldatba. Másnap Bürker-kamra segítségével megszámoltam a sejteket, és 4 lépcsős hígítási sort készítettem. A legtöményebb lépcső koncentrációját 10^7 sejt/ml-re állítottam be, minden további lépcső egy-egy nagyságrenddel kisebb koncentrációjú. Minden vizsgált törzs esetében a leghígabb lépcsőtől a legtöményebb felé haladva 10-10 μ l-t cseppentettem ki sorban a különböző mutagén ágenszt tartalmazó táptalajokra. UV érzékenység vizsgálatánál a törzseket szelektív szintetikus táptalajra csepegtettem, majd a beszáradás után a vizsgálni kívánt dózissal sugároztam be őket. A lemezeket 3 napig 30°C-on inkubáltam. A kísérletnek köszönhetően összehasonlíthatóvá válik a vizsgált törzsek érzékenysége az adott ágensre, hiszen az egymás alatt elhelyezkedő cseppek ugyanannyi sejtet tartalmaznak minden összehasonlított törzs esetében.

3.6. Élesztő sejtek transzformálása:

Az adott élesztő sejteket a megfelelő táptalajba leoltottam és egy éjszakán át nőni hagytam. Másnap OD=0.2-re oltottam át ezeket a starter kultúrákat és OD=0.8-ig hagytam őket növekedni. Ezt követően 5 perces centrifugálással leüleptítettem a sejteket 3000 rpm-en. A kapott sejteket 1 ml desztillált vízben szuszpendáltam fel, majd asztali centrifugán 1 percig centrifugáltam. A felülúszó leszívása után 1 ml 100 mM-os LiAc-ban szuszpendáltam fel a sejteket, majd ismét 1 percig centrifugáltam őket. A sejteket ezután 400 μ l 100 mM-os LiAc-ban oldottam fel. Ebből a szuszpenzióból 50 μ l-nyi mennyiségeket mértem ki egy-egy transzformáláshoz. A 400 μ l-nyi szuszpenzió tehát 8 különböző DNS-sel történő transzformáláshoz elegendő. Az 50 μ l kultúrát kiüleptítettem és a sejtekre 240 μ l 50%-os PEG-et mértem, valamint 37 μ l 1M-os LiAc-ot, 10 μ l heringsperma DNS-t, 1 μ l plazmidot, 49 μ l

steril vizet adtam hozzá, az alapos vortexelés után 20 percig 42°C-on inkubáltam a sejteket. A hősokkolás után 1 percig centrifugáltam az elegyet, majd a kapott sejteket 150 µl steril ultratisztított vízben vettem fel és a megfelelő táptalajt tartalmazó petri csészére széleszttem. 3 napig 30°C-on inkubáltam a lemezeket.

3.7. Spontán mutagenesis mérése:

A kísérlet során az élesztő egy adott markergénjében spontán keletkező mutációk száma válik mérhetővé, 10^7 sejtre vonatkoztatva. Az élesztő törzs 50-50 sejtjét tartalmazó kultúrából kiindulva tíz párhuzamos 500 µl térfogatú kultúrát 3 napig 30°C-on növesztettem. Osztódás közben folyamatosan képződnek a spontán mutációk. Az inkubáció lejártával a tíz kultúrát tíz kanavanin tartalmú arginint nem tartalmazó lemezre széleszttem ki. A kanavanin aminosav az arginin analógja, így a fehérjeszintézis enzimei arginin helyett beépítik a polipeptidláncba. Az ily módon képződő aberráns fehérjék nem képesek ellátni feladatukat és a sejt pusztulásához vezetnek. Az arginin és kanavanin felvételéért a *CAN1* gén által kódolt arginin-permeáz a felelős. Ha a sejtben a *CAN1* lokuszt inaktiváló pontmutáció keletkezik a kanavanin nem tud bejutni a sejtbe, így az életképes marad [13]. A kinőtt telepek tehát egy-egy a kanavanin génben létrejött funkcióvesztéssel járó mutációs eseményt jelölnek, így a tíz párhuzamos kanavanin lemez telepszámát átlagolva kiszámítható a spontán mutációs ráta.

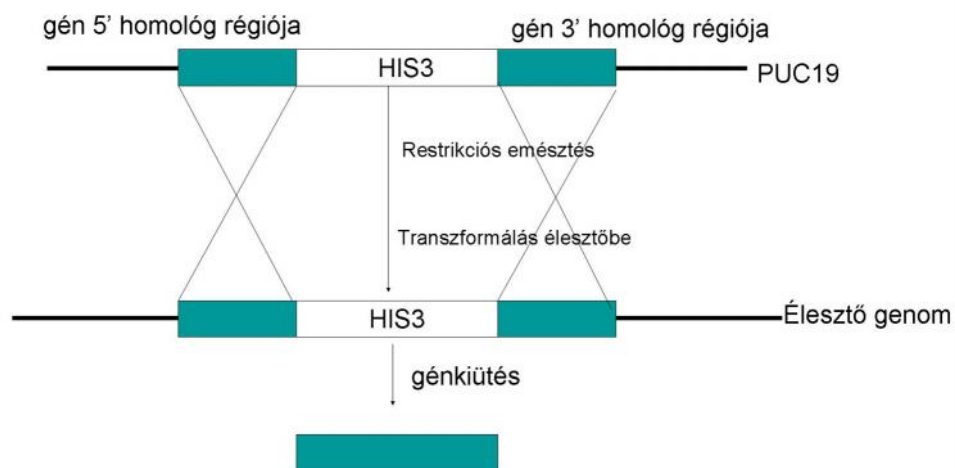
3.8. Indukált mutagenesis mérése:

A kísérlet során az élesztő egy adott markergénjében UV károsodás által indukált mutációk száma válik mérhetővé. A leoltott élesztő starter kultúrákból hígítást készítek és nagy mennyiségű sejtet (10^7 - 10^8 sejt/ lemez nagyságrendben) lemezelek ki kanavanin tartalmú arginint nem tartalmazó lemezekre. Ezeket a lemezeket egyenként különböző dózisu UV fénnel kezelem közvetlenül a beszáradás után. Esetemben a kezeletlen kontroll mellett 20, 40, 50, 60 J/m²-t használtam. Az UV pusztító hatását az adott dózison úgy vettem figyelembe, hogy kanavanint nem tartalmazó kontroll lemezekre is lemezeltem a vizsgált törzsekből és ellenőriztem a túlélésüket. A kanavanin lemezeken kinövő telepszámokból az adott dózison tapasztalható túlélés figyelembe vételével kiszámítható a dózistra jellemző mutációs gyakoriság. Ezt a mutációs gyakoriságot egy törzs esetében 10^7 (UV-t) túlélő sejtre adjuk meg.

3.9. Irányított génkiütés:

A homológ rekombináción alapuló génkiütés során először primereket kell tervezni a kiűtni kívánt génre. A gént két oldalról körülfogó szekvenciát restriktions hasító helyeket

tartalmazó primerekkel amplifikáljuk és az így kapott két fragment közé a PCR primerekkel beépített helyekre egy szelekciós markert klónozzunk. Az így elkészült génre specifikus konstruktot klónozó vektorban tartjuk fenn. Génkiütéshez a konstruktból a génspecifikus régiókat az általuk közrefogott szelekciós markerrel együtt kihalásztjuk és ezt a linearizált fragmentet transzformáljuk az élesztő sejtekbe. (5.ábra) A sejt saját homológ rekombinációs gépezete beépíti a marker gént a kiütni kívánt gén helyére.



5.ábra: Irányított génkiütés

3.10. Fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatása élesztő kettős hibrid rendszerrel:

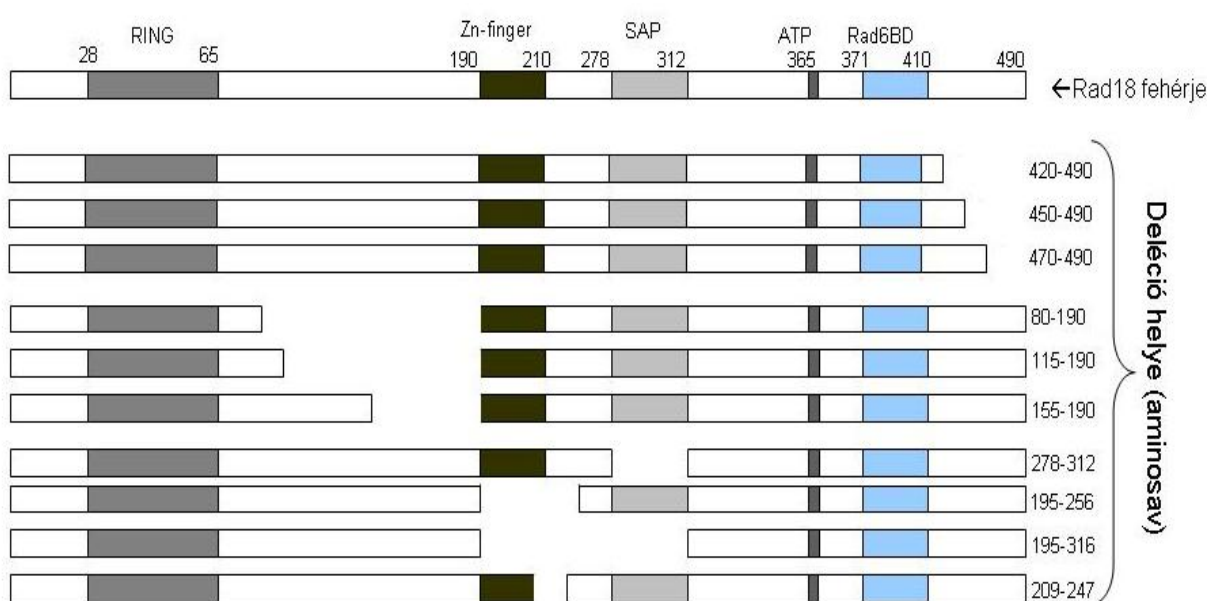
A kölcsönhatás szempontjából vizsgálni kívánt géneket beklónoztuk a transzaktivációs domént illetve a DNS kötő domént tartalmazó kettős hibrid vektorokba úgy, hogy a leolvasási keret ne sérüljön és fúziós fehérje képződjön. Az elkészített konstruktot betranszformáltuk az élesztő kettős hibrid vizsgálatra használt PJ69-4A élesztő törzsbe (22), majd –Leu/Trp lemezekre kentük ki. Ezt követően a felnőtt telepeket –Leu/Trp táptalajban növesztettük egy éjszakán át, az így kapott kultúrát 1×10^7 sejt/ml legnagyobb töménységűre hígítottuk majd –Leu/Trp, -Leu/Trp/His, -Leu/Trp/His/Ade tartalmú lemezekre cseppentettük ki. 3-5 napot növesztettük 30°C-on.

A transzformációt követően a két fúziós fehérje termelése megkezdődik az élesztő sejtekben, önmagában azonban egyik sem képes a riporter gén expressziójának aktiválására, így –Leu/-Trp/-His tartalmú lemezekeken csak azok a telepek nőnek fel, ahol a két fehérje kölcsönhatásának köszönhetően aktiválódik a HIS2 gén és hisztidin termelődik a sejtekben.

IV. Eredmények

IV.1. A deléció *RAD18* származékok létrehozása

A *RAD18* gén öt azonosított doménnel rendelkezik, ezek sorban a RING, Zn-finger, SAP, ATP és Rad6 kötő domének. Mivel az említett domének a fehérje kódoló régiójának csak kicsiny részét fedik le, a még nem vizsgált régiók analízisét végeztük el. A domének közül csak a RING, ATPáz és Rad6 kötő domén funkciója ismert pontosan élesztőben, a Zn-finger és SAP doménhez még nem rendeltek funkciót így ezek karakterizálása is céljaink közé tartozik. Ennek érdekében tíz részleges deléciós mutánst terveztünk.(6.ábra)



6.ábra: Rad18 fehérje már azonosított doménjei és az előállított deléciós mutánsok szerkezete (a számok aminosavakat jelölnek)

Az élesztő törzsek genomjából eltávolítottam a *RAD18* gént és a deléciós fehérjéket élesztő centromeres plazmid konstruktokról expresszáltattam.

Az elkészített Rad18 deléciós konstruktok 3 csoportra oszthatók.

1.1. C-terminális deléciót hordozó mutánsok:

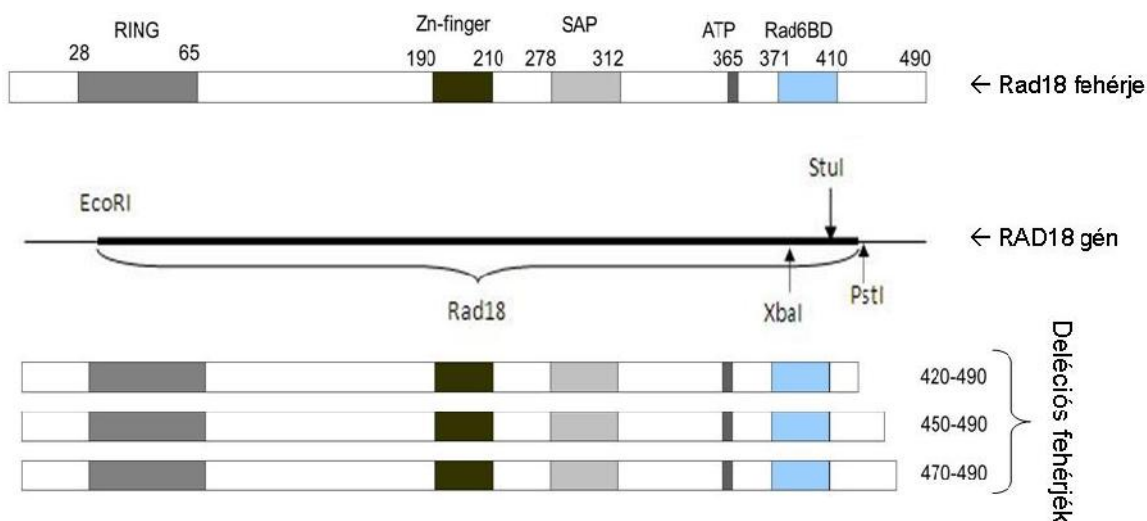
Vad típusú *RAD18* gént tartalmazó YCplac33 élesztő centromeres vektor (pID466) *EcoRI*-*PstI* enzimekkel történő emésztése után a keletkező, csaknem a *RAD18* gén teljes szekvenciáját tartalmazó 1600bp-os fragmentet a pUC19 vektor azonos hasítási helyeire klónoztam. Az így létrejött konstruktot *XbaI*-*StuI* enzimekkel emésztettem, ugyanis ezen

helyek segítségével a konstruktból eltávolítható a fehérje C-terminális végét kódoló régió, és helyére XbaI-StuI helyeket tartalmazó, a *RAD18* gén általunk megválasztott régiójához hibridizáló oligonukleotidokat használva, PCR-rel előállított tetszőleges *RAD18* fragmentek klónozhatók. Esetemben az XbaI helyet hordozó szensz oligó az eredeti XbaI helyhez hibridizált, míg háromféle STOP kodont és StuI helyet hordozó antiszensz oligót terveztünk, melyek az XbaI helyhez egyre közelebbi részhez hibridizáltak és építették be a STOP kodont. A három deléciós PCR fragmentet visszaklónoztam a *RAD18* gént tartalmazó pUC19 konstruktba majd az így kapott szubklónokból a már deléciós *RAD18* gént EcoRI-PstI-el az eredeti vad típusú *RAD18* gént tartalmazó élesztő centromeres vektorba klónoztam. A szekvenálást követően meggyőződtem arról, hogy nem történt frameshift, így a *RAD18* deléciós konstruktok felhasználhatók élesztőbe transzformáláshoz és a genomi *RAD18* gén deléciójának komplementációjához.(7.ábra)

pID479: Rad18Δ(420-490)

pID495: Rad18Δ(450-490)

pID501: Rad18Δ(470-490)



7.ábra: Rad18 C-terminális deléciók

1.2. N-terminális részen (RING és Zn-finger domén között) deléciót hordozó mutánsok:

Vad típusú *RAD18* gént tartalmazó élesztő centromeres vektor (pID466) NarI-PstI enzimekkel történő emésztése után a keletkező 2700bp-os fragmentet a YCplac33 módosított

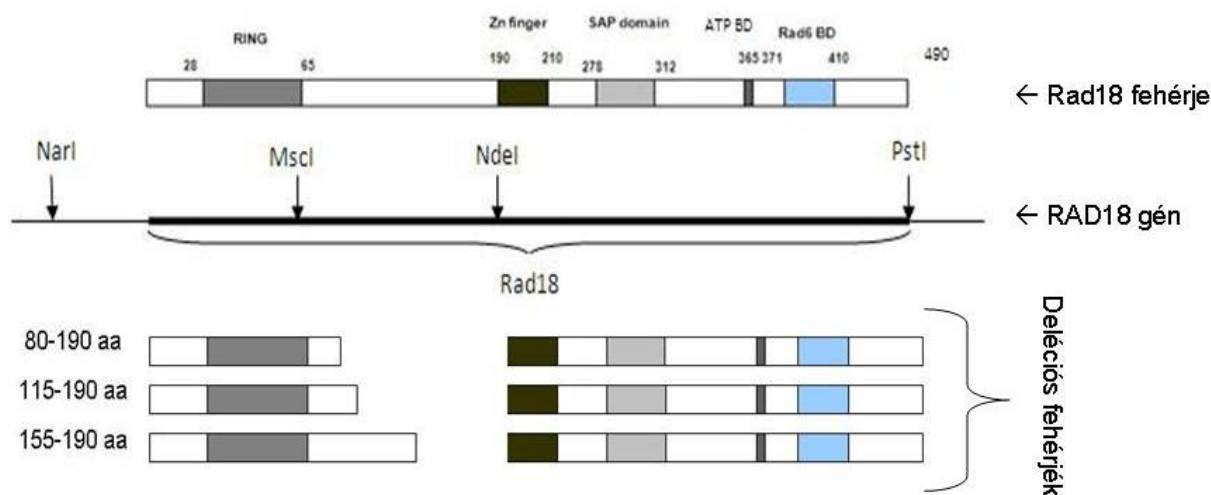
élesztő vektor ugyanezen hasítási helyeire klónoztam. Az így létrejött konstruktot MscI-NdeI enzimekkel emésztettem, ugyanis ezen helyek segítségével a konstruktból eltávolítható a fehérje RING és Zn-finger domének közé eső részt kódoló régiója és helyére MscI-NdeI helyeket tartalmazó, a *RAD18* gén N-terminálisán egyre rövidebb részt felamplifikáló oligonukleotidokat használva, PCR-rel előállított tetszőleges *RAD18* fragmentek klónozhatók. Esetemben az MscI helyet hordozó szensz oligó az eredeti MscI helyhez hibridizált, míg a másik három antiszensz oligó NdeI helyet hordozott az MscI-től különböző távolságra. A három deléciós PCR fragmentet visszaklónoztuk a *RAD18* gént tartalmazó pUC19 konstruktba, majd az így kapott szubklónból a már deléciós *RAD18* gént NarI-PstI-gyel az eredeti vad típusú *RAD18* gént tartalmazó élesztő centromeres vektorba klónoztam. A szekvenálás után meggyőződtem arról, hogy nem történt frameshift így a *RAD18* deléciós konstruktok felhasználhatók élesztőbe transzformáláshoz és a genomi *RAD18* gén deléciójának komplementációjához.(8.ábra)

A létrehozott N-terminális deléciós konstruktok:

pID523: Rad18Δ(115-190)

pID524: Rad18Δ(80-190)

pID525: Rad18Δ(155-190)



8.ábra: Rad18 N-terminális deléciók

1.3. A Zn-finger és SAP domén környékén deléciót hordozó mutánsok elkészítése:

1. Zn-finger és SAP domén, valamint csak Zn-finger deléciós törzsek elkészítése

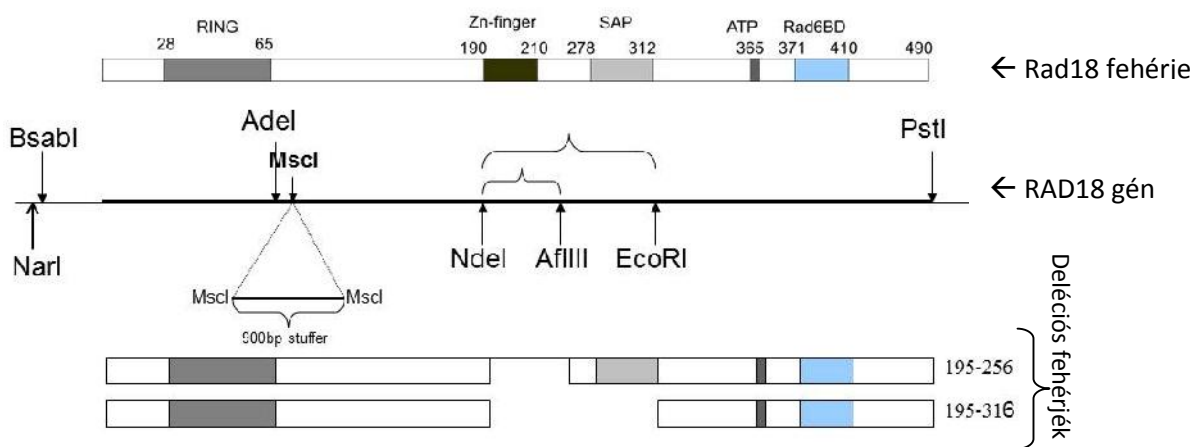
Vad típusú *RAD18* gént tartalmazó élesztő centromeres vektor (pID466) BsaBI-PstI enzimekkel történő emésztése után a *RAD18* gén teljes szekvenciáját, valamint upstream és downstream egyaránt 600bp-os szekvenciárészletet tartalmazó 2700bp-os fragmentet a

pUC19 vektor SmaI-PstI hasítási helyeire klónoztam. Az így létrejött konstrukt MscI hasítási helyére egy 900 bázispár nagyságú szekvencia darabot klónoztam abból a célból, hogy a fehérje leolvasási keretét eltoljam, ezzel megakadályozva a Rad18 termelődését a baktérium sejtben, ugyanis a képződő fehérje toxikus a baktérium sejtnek. Ugyan rendelkezik már egy ilyen szekvencia darabbal a Rad18 konstruktom, de ez a klónozási lépések során eltávolítódik. Ezt a segédkonstruktot NdeI-EcoRI enzimekkel emésztettem, hogy a 195aa-316aa-ig terjedő szakaszt deletáljam, NdeI-AflIII enzimekkel, hogy a 195aa-256aa-ig terjedő szakaszt kivágjam, majd T4 polimerázzal feltöltöttem, úgy hogy a leolvasási keret nem tolódott el. A deléciókat tartalmazó szubklónokat AdeI-PstI enzimekkel emésztettem és a teljes Rad18 szekvenciát tartalmazó pUC19 klónozó vektor AdeI-PstI helyére ligáltam. Ezt követően élesztő vektorba NarI-PstI enzimekkel való emésztés után kapott 2700+900 bázispár nagyságú fragmentet klónoztam ugyanezen hasítási helyekre.(9.ábra)

A létrehozott Zn-finger és SAP domén, valamint csak Zn-finger deléciós konstruktok:

pID753: Rad18 Δ (192-315)

pID754: Rad18 Δ (192-256)



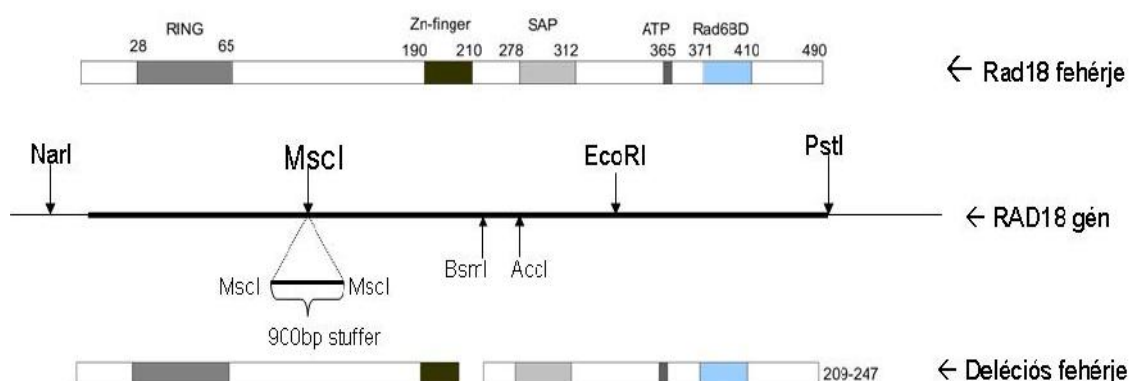
9.ábra: Zn-finger valamint Zn-finger és SAP domén deléciót hordozó Rad18 konstrukciók

2. Zn-finger és SAP domén között deléciót hordozó mutáns elkészítése

A teljes vad típusú *RAD18* gént tartalmazó vektor NarI-EcoRI fragmentjét pUC18 klónozó vektor ugyanezen hasítási helyeire klónoztam. A konstruktot ezután BsmI-AccI enzimekkel emésztettem, T4 polimerázzal feltöltöttem. Szekvenálást követően; amellyel meggyőződtem arról, hogy nem történt frameshift; a plazmid MscI helyére beklónoztam a 900 bázispárnyi „stuffer”, majd NarI-EcoRI hasítással a teljes *RAD18* gént tartalmazó klónozó vektor ugyanezen hasítási helyeire ligáltam. NarI-PstI enzimekkel történő hasítás után kapott 2700+900 bázispár fragmentet vittem tovább élesztő vektorba.(10.ábra)

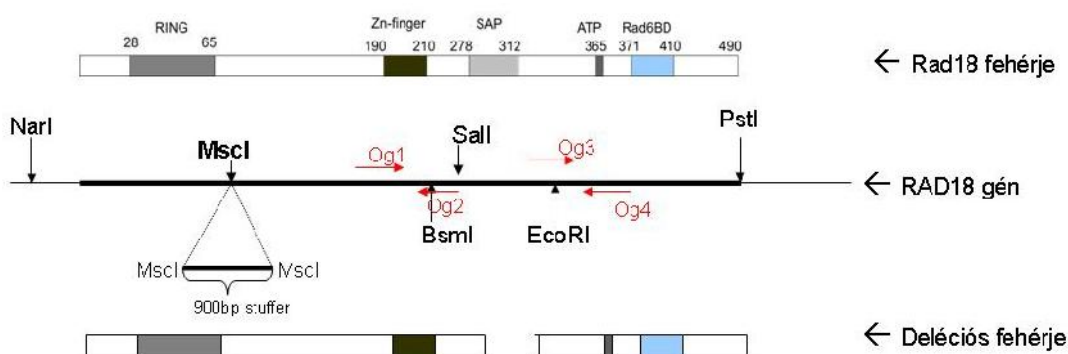
A létrehozott Zn-finger és SAP domén között deléciót hordozó deléciós konstrukt:

pID804: Rad18Δ(208-246)



10.ábra: Zn-finger és SAP domén között elhelyezkedő deléció

3. SAP domén- deléciót tartalmazó mutáns elkészítése:



11.ábra: SAP domén deléció

A *RAD18* gén megfelelő régióihoz hibridizáló oligonukleotidokat terveztem, melyek megfelelő végeire a SalI enzim hasító helyét vittem be (11.ábra Og2,Og3). A felamplifikált fragmenteket SalI enzimmel történő emésztés után összeligáltam. A ligálásból ismét PCR reakciót mértem össze a két különböző fragment szélső oligonuklotidjával (11.ábra Og1, Og4), így a már SalI helynél összekapcsolódott szakaszt amplifikáltam fel. Ezt a fragmentet módosított pUC19 klónozó vektor SmaI helyére ligáltam, majd a BsmI-EcoRI enzimekkel való emésztés után kapott fragmentet a teljes *RAD18* gént tartalmazó pUC19 konstrukt ugyanezen helyeire klónoztam. Szekvenálást követően a konstrukt MscI helyére „stuffert” illesztettem be, majd NarI-PstI emésztéssel kapott 2700+900 bázispárnyi fragmentet élesztő vektor ugyanezen hasítási helyeire klónoztam.(11.ábra)

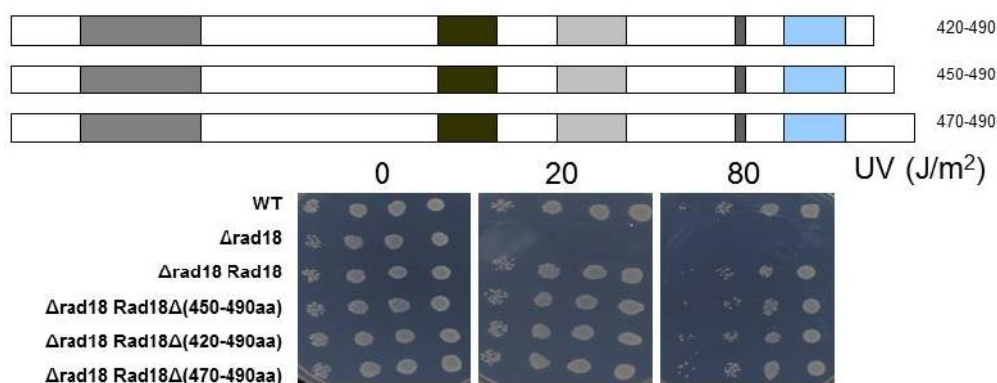
A létrehozott SAP domén deléciós konstrukt:

pID798: Rad18Δ(246-296)

IV.2. A deléció Rad18 fehérjét hordozó törzsek fenotípus vizsgálata

Egy fehérje DNS hibatolerancia útvonalban betöltött szerepének vizsgálatához, az adott deléció fehérjét kódoló törzset DNS károsító hatásoknak tesszük ki. Amennyiben a fehérje részt vesz a hibatolerancia folyamatokban a törzs megnövekedett érzékenységet mutat a használt szerekre a vad típusú kontrollhoz képest. Az általam előállított Rad18 deléció fehérjét hordozó törzset is ilyen vizsgálatoknak vetettük alá.

2.1. C-terminális deléció mutánsok fenotípus vizsgálata:



12.ábra: A Rad18 fehérje C-terminális részén deléciót hordozó mutáns törzsek UV érzékenysége

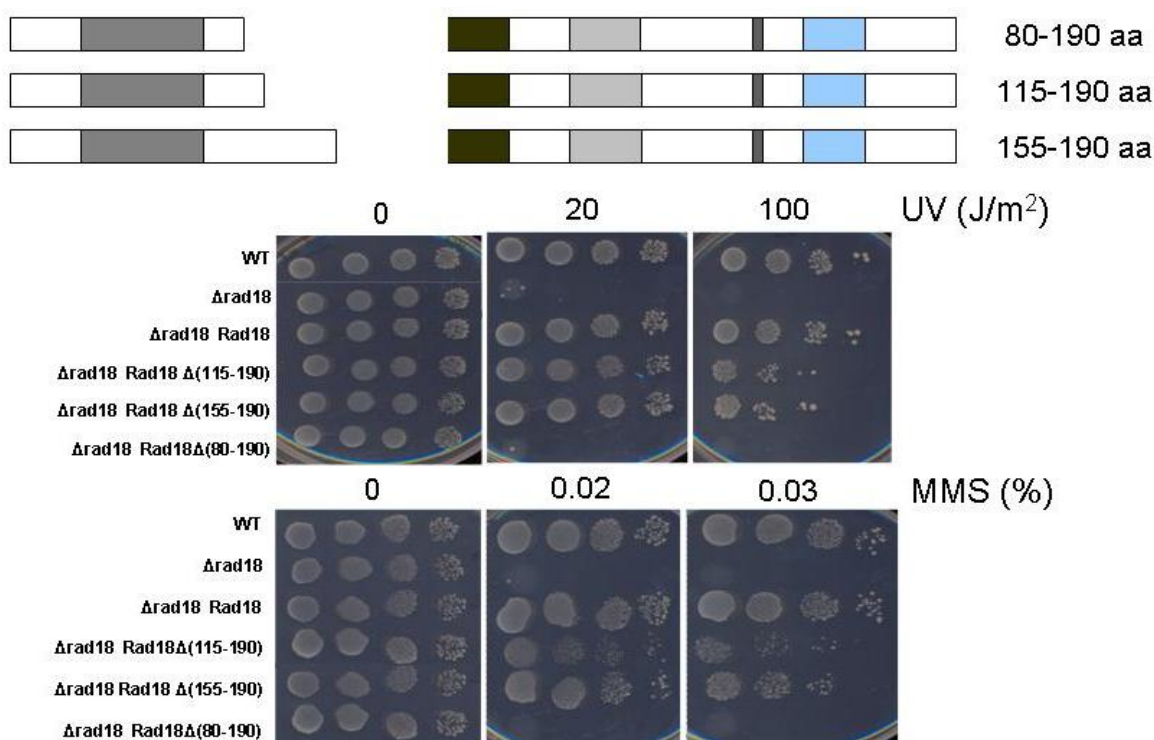
A 12. ábrán a C-terminális *RAD18* deléciót tartalmazó törzsek láthatók, és ahogyan azt az ábra mutatja a teljes *RAD18* delécióval ellentétben nem érzékenyebbek az UVsugárzásra a vad típusú *RAD18* gént hordozó kontrollnál. Ugyanezen eredményeket kaptuk metilmetanoszulfonát (MMS) metiláló ágenssel és hidroxü-urea (HU) replikációt blokkoló vegyülettel való kezelés hatására is, ezért a dolgozatban csak az UV sugárzással végzett kísérleteket mutatom be. Amint a képen is láthatjuk a C-terminális *RAD18* deléciók nem érzékenyítették a törzset UV sugárzásra a vad típusú *RAD18* gént hordozó kontroll törzshöz képest. (12. ábra)

A hydroxi-urea ribonukleotid reduktáz inhibitor és a replikációs apparátust a dCTP szint csökkentésével blokkolva fejt ki károsító hatását. A mutáns törzseket HU kezelésnek vetettük alá és megvizsgáltuk, hogy a *RAD18* gén különböző deléciói hogyan reagálnak a hydroxi-urea kezelésre. Az előállított deléciók nem befolyásolják a Rad18 fehérje replikációban betöltött szerepét.

A következő DNS károsító ágens, melynek alávetettük a Rad18 fehérje C-terminális részén deléciót hordozó mutáns törzseket az MMS, mely a bázisok metilációjával fejt ki

károsító hatását. A C-terminális *RAD18* deléciók ugyanúgy viselkednek MMS kezelésre, mint a vad típusú *RAD18* gént hordozó kontroll törzs. Tehát a Rad18 fehérje C-terminális részének deléciója nem befolyásolja a Rad18 fehérje funkcióját a DNS hibatolerancia útvonalban.

2.2. Rad18 fehérje N-terminális részén (RING és Zn-finger domén között) deléciót hordozó mutánsok vizsgálata:



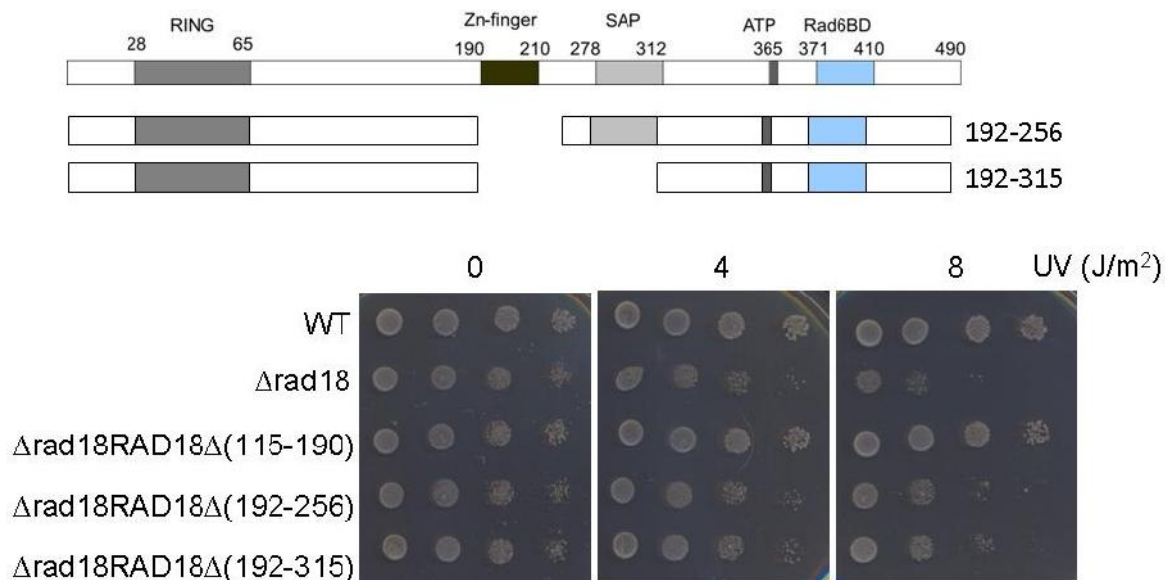
13.ábra: a Rad18 fehérje N-terminális részén a RING és Zn-finger domének között deléciót hordozó mutáns törzsek UV és MMS érzékenysége

Az N-terminális deléciók közül mindhárom különböző mértékben érzékenyíti a törzseket UV sugárzásra a vad típusú *RAD18* gént hordozó kontrollhoz képest. Ugyanezen fenotípusok megfigyelhetők MMS tartalmú lemezen is. Ez azt sugallja, hogy a RING és a Zn-finger domének között található Rad18 régió szerepet játszik az UV és MMS okozta DNS károsodások toleranciájában (13. ábra)

Az N-terminális Rad18 deléciót tartalmazó törzsek a teljes *RAD18* delécióval ellentétben nem érzékenyebbek a HU tartalmú lemezekre a vad típusú *RAD18* gént hordozó kontrollnál. Az előállított deléciók tehát nem befolyásolják a Rad18 fehérje replikációban betöltött szerepét. A Rad18 N-terminális 80-190as-ig terjedő deléciót hordozó mutáns törzs a 110 aminosavnyi hiányzó résznek köszönhetően minden általam használt DNS károsító

kezelésre úgy viselkedik, mint a teljes *RAD18* deléciós törzs, valószínűleg egy esszenciális funkció kieséséhez vezetett a deléció.

2.3. Zn-finger és SAP domén, valamint csak Zn-finger deléciós mutánsok vizsgálata



14.ábra: Zn-finger és SAP domén, valamint csak Zn-finger deléciós mutánsok UV érzékenysége

A Zn-finger és SAP domén, valamint a csak Zn-finger deléció a teljes *RAD18* gén delécióval egyenlő érzékenységgű fenotípust mutatott. Ezek a fenotípusok voltak megfigyelhetők MMS tartalmú lemezen is. Ez azt jelenti, hogy a *RAD18* gén esszenciális funkcióját rontottuk el a Zn-finger domén deletálásával.

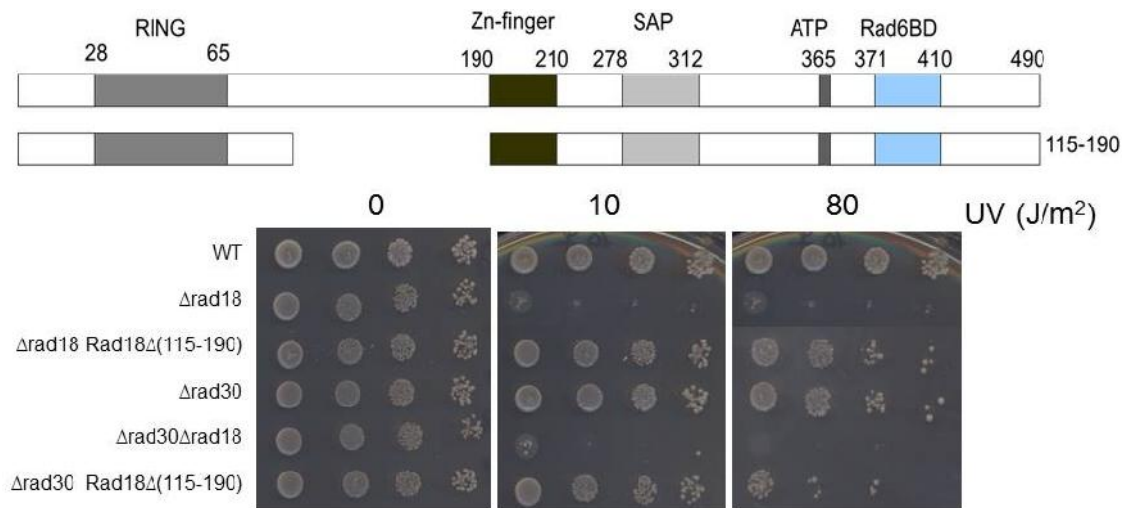
IV.3. *Rad18* $\Delta(115-190)$ törzs genetikai vizsgálata:

Az MMS és UV érzékenység vizsgálata a *Rad18* $\Delta(115-190)$, *Rad18* $\Delta(155-190)$ deléciós törzsek esetében arra utal, hogy a deletált régióknak szerepe van a Rad18 fehérje funkciójában. Annak érdekében, hogy kideríthessük a deletált régió hol kapcsolódik be a Rad18 funkciójának kialakításába, genetikai vizsgálatot, episztázis analízist végeztünk a *Rad18* $\Delta(115-190)$ törzset használva.

Az episztázis analízis lényege, hogy a vizsgálni kívánt gén deléciója mellett ismert funkciójú DNS reparációs géneket távolítunk el a genomról és a kettős deléciós törzsek adott károsító szerekre mutatott érzékenységét összevetjük az egyes deléciós törzsek érzékenységgel. Amennyiben a kettős deléciós törzs érzékenysége nem nő az egyes deléciós törzsszel szemben, akkor a két vizsgált gén egy útvonalban működik, ellenkező esetben két

különálló útvonalban külön helyezkednek el. A Rad18 Δ (115-190) deléciót hordozó mutánsban előállítottam a DDT útvonal három különböző ágát inaktiváló gének (*MMS2*, *REV1*, *RAD30*) delécióját és a fent ismertetett logikát követve megvizsgáltam a kettős deléciók UV sugárzásra és MMS károsításra mutatott érzékenységét.

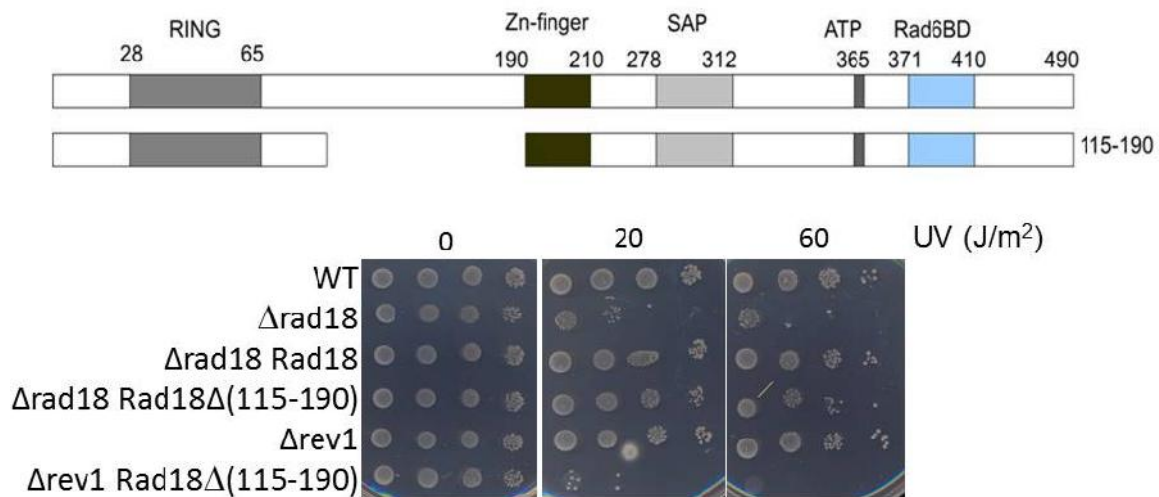
A *RAD30*, mint azt már az I.3. fejezetben részleteztem, a Rad6/Rad18 fehérjekomplex által vezérelt DNS hibatolerancia külön útvonalát alkotja. Érdekesnek tartottuk tehát megvizsgálni, hogy az általam létrehozott Rad18 Δ (115-190) deléciót hordozó mutáns a *RAD30*-cal egy episztázis csoportba sorolható-e. A 15. ábrán jól látható, hogy a Rad18 Δ (115-190) és a *RAD30* gén delécióját tartalmazó kettős deléciós törzs nagyobb mértékben érzékenyíti az élesztő törzset, mint az egyes mutánsok önállóan UV fény és MMS kezelés hatására egyaránt. Ez arra enged következtetni, hogy a 115-190 aminosavig terjedő régió nem a *RAD30* útvonalat károsította, nem tartoznak egy episztázis csoportba.



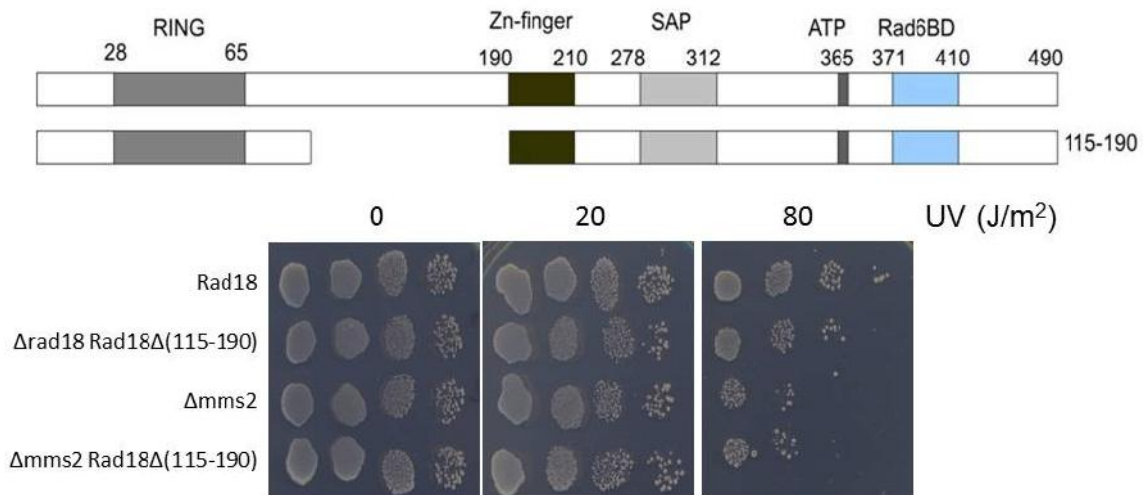
15.ábra: Rad18 Δ (115-190) és $\Delta rad30$ kettős deléciós törzsek UV érzékenysége

A DNS hibatolerancia útvonal transzléziós polimerázok által működő mutagén ágához tartozik a *REV1* gén, mely a következő episztázis analízis vizsgálat szereplőjévé vált. A 16. ábra azt mutatja, hogy az általam előállított 115-190 aminosavig terjedő deléció a *REV1* útvonalat nem károsította, hiszen a kettős mutáns sokkal jobban érzékenyítette az élesztő törzset, mint az egyes mutánsok önállóan.

A *RAD5* út inaktiválását az *MMS2* gén deléciójával hajtottuk végre. Az *MMS2*, mint az I.3. fejezetben említettem, a Rad6/Rad18 fehérjekomplex által vezérelt DDT masináját a hiba mentes átírás felé irányítja. Az Ubc13-mal alkotott dimernek ubikvitin konjugáló szerepe van és egy poliubikvitin láncot hoz létre a PCNA fehérjén, mely aztán a hibamentes átírást eredményezi.



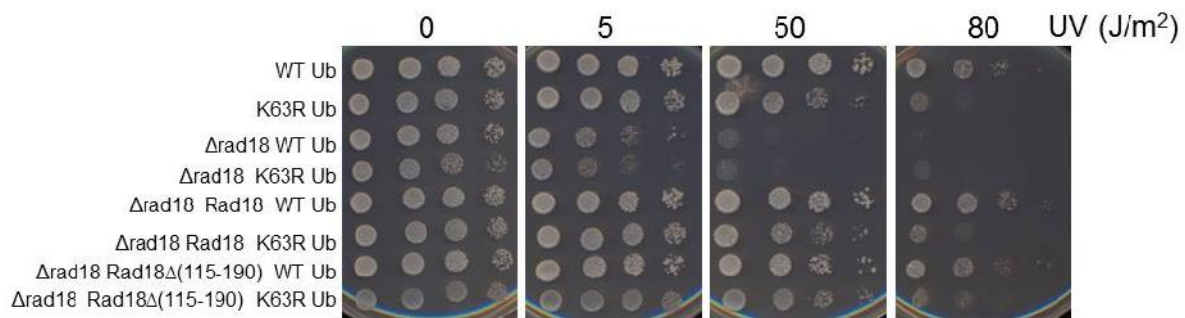
16. ábra: Rad18 $\Delta(115-190)$ és $\Delta rev1$ kettős deléciós törzsek UV érzékenysége



17. ábra: Rad18 $\Delta(115-190)$ és $\Delta mms2$ kettős deléciós törzsek UV érzékenysége

Ahogy az a 17. ábrán láthatjuk, a létrehozott Rad18 $\Delta(115-190)$ deléciót és *MMS2* deléciót egyszerre hordozó mutáns azonos érzékenységet mutat az $\Delta mms2$ mutánsal, tehát kijelenthetjük, hogy az episztázis analízis logikája alapján ugyanazon hibajavítási útvonalba sorolhatóak. Ez számunkra azt jelenti, hogy a kérdéses Rad18 régióknak szerepe van a DNS hibatolerancia útvonal hibamentes ágának működésében.

Tudjuk, hogy az *MMS2* útvonal működéséhez a PCNA molekula poliubikvitilációja szükséges, ezért kíváncsiak voltunk, hogy a Rad18 $\Delta(115-190)$ törzsben a PCNA molekula poliubikvitilációja hibátlanul végbe megy-e, vagy éppen ezt a folyamatot rontottuk el a delécióval. Olyan élesztő törzseket használtunk, amelyekben a vad típusú és K63R mutáns ubikvitin plazmidról fejeződik ki, a genomi ubikvitin kópiákat kideletáltuk.



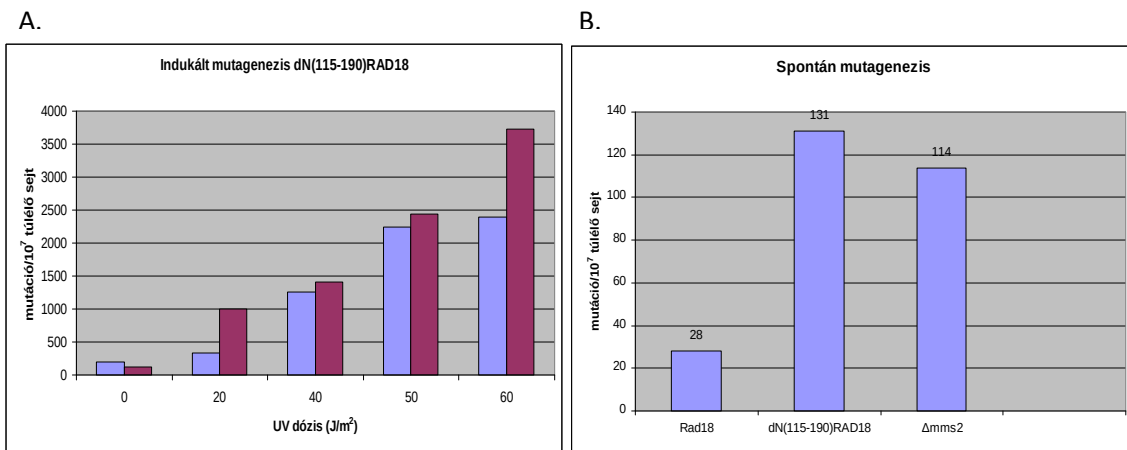
18.ábra: Rad18Δ(115-190) törzs ubiquitilációs képességének vizsgálata

Amint azt a 18. ábrán láthatjuk a K63R mutáns ubikvitint tartalmazó törzsben mind a vad típusú, mind az általam létrehozott N-terminális mutáns Rad18-at kifejező törzs hasonló érzékenységet mutat, a deléció nem növelte a törzs érzékenységét UV kezelés hatására, tehát a Rad18Δ(115-190) törzsben a poliubikvitiláció alaptól gátolt.

IV.4. Indukált és spontán mutagenézis a Rad18Δ(115-190) deléciós törzsekben

Mint azt az előző fejezetekben láthatjuk, a különböző genetikai vizsgálatok szerint az általam létrehozott Rad18Δ(115-190) mutáns a DNS hibatolerancia útvonal *RAD5* és *MMS2-UBC13* alkotta hibamentes javítást biztosító ágába sorolható. A kapott eredmény megerősítésére ellenőriztem a Rad6/Rad18 útvonal mutagén ágának működését az általam előállított Rad18 N-terminális deléciót hordozó törzsben, oly módon, hogy meghatároztam a deléciós törzs spontán illetve indukált mutációs rátáját. Ha a deléció a mutagén útvonal működését érinti, akkor kísérleteimben csökkent mutációs gyakoriságot mutatna. Ha a deletált régió a Rad6/Rad18 útvonal hibamentes ágát inaktiválja, az növeli az UV indukált mutációs gyakoriságot a vad típusú Rad18 törzshöz képest, hiszen az elvesztett hibamentes reparáció szerepét a továbbra is jól működő mutagén ág veszi át.

A Rad18 deléciós konstruktot hordozó törzsben megemelkedett az UV károsodás indukálta mutációk száma a vad típusú *RAD18* gént tartalmazó kontrollhoz képest a teljes *MMS2* gén delécióját hordozó törzzsel összevethető módon. (19.ábra) Ez az episztázis analízis vizsgálataival összhangban további bizonyíték arra, hogy a kérdéses Rad18 régió nélkülözhetetlen a hibamentes DNS hibatolerancia útvonal működéséhez.



19.ábra: UV indukált mutagenézis ■ Rad18, ■ Rad18Δ(115-190) deléciós mutáns (A ábra)
Spontán mutagenézis (B ábra)

IV.5. A Rad18 fehérje által kialakított fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata élesztő kettős hibrid módszerrel

Mint azt az előzőekben láthattuk, a C-terminális deléciós mutánsok kivételével mindegyik deléció valamilyen defektet idézett elő a Rad18 fehérje hibatolerancia útvonalban betöltött szerepében. Megvizsgáltuk, hogy a genetikailag jól jellemzett N-terminális Rad18 deléciós mutánsok kölcsönhatásba tudnak-e lépni a Rad18 fehérje ismert kölcsönható partnereivel, mint a Rad5 és Rad6. Erre alkalmas módszer az élesztő kettős hibrid rendszer.

IV.5.1. N-terminális deléciós mutánsok fehérje kölcsönhatásainak vizsgálata élesztő kettős hibrid rendszerben

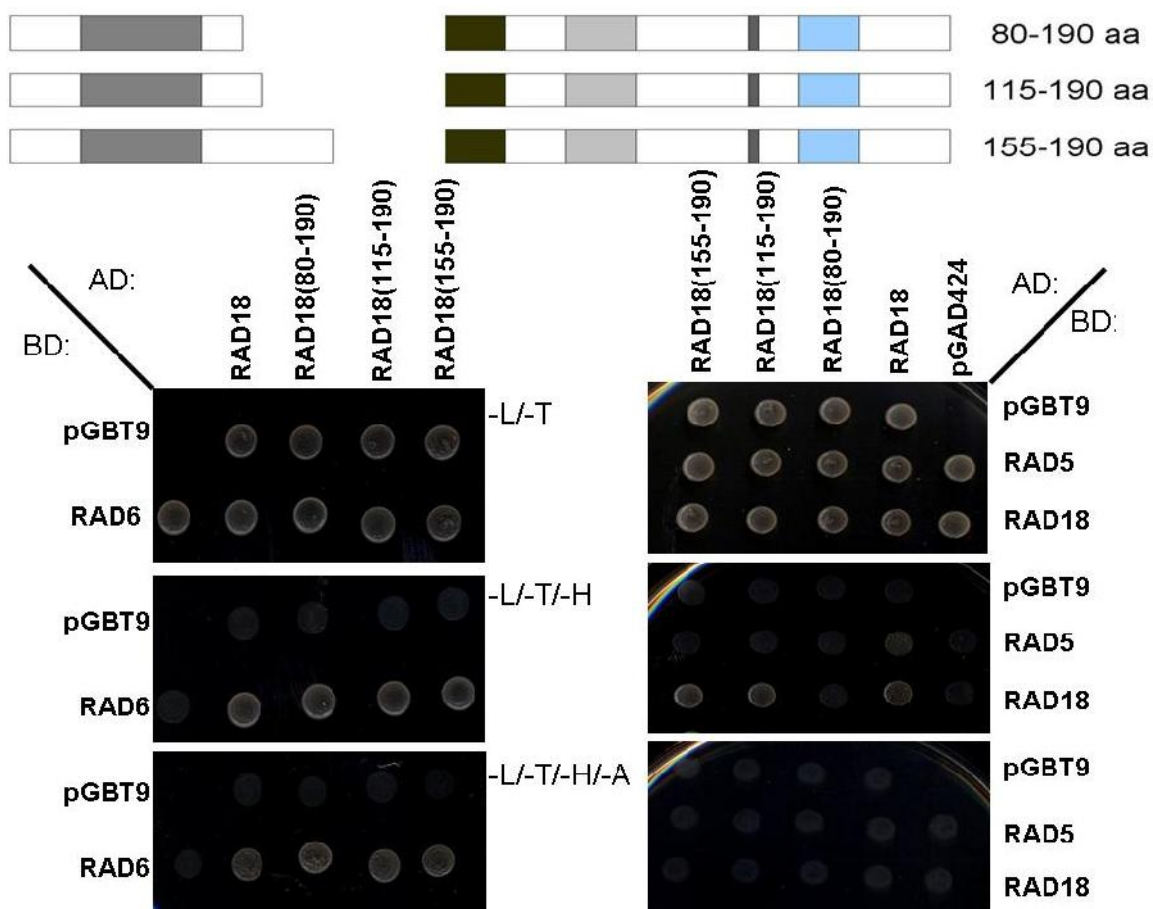
A) Rad18-Rad6 interakció vizsgálata:

A Rad18 legfontosabb interakciós partnere az ubikvitin konjugáz Rad6 fehérje, mellyel együtt a DNS hibatolerancia útvonal masinériáját vezeti. A legkézenfekvőbb volt tehát, hogy megnézzük az N-terminális deléciós mutánsok kölcsön tudnak-e hatni a Rad6-tal. Ahogy azt a 20. ábrán is láthatjuk, a Rad18 fehérje N-terminális régiójában létrehozott deléciók egyike sem befolyásolta a Rad18-Rad6 stabil komplex kialakulását, a két fehérje kölcsön tudott hatni, ezt a –L/-T/-H és –L/-T/-H/-A tartalmú lemezen növény kolóniák mutatják, hiszen itt csak azok képesek felnőni, ahol a fehérjék között kölcsönhatás lép fel.

B) Rad18-Rad5 interakció vizsgálata:

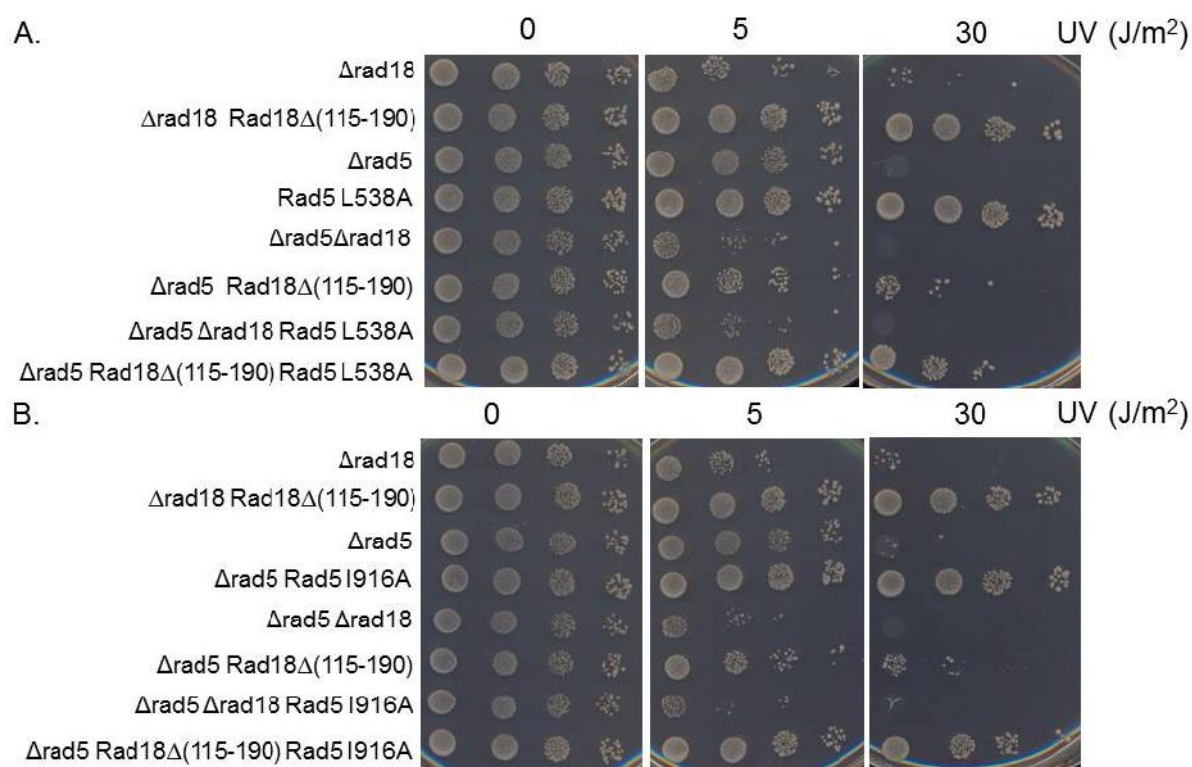
Tudjuk, hogy a Rad18 fehérje a Rad5-tel is kölcsönhatásba kell lépjen, hiszen a hibamentes villa-visszafordító útvonal működése során a Rad5-Mmms2-Ubc13 fehérjék a már Rad6-Rad18 által monoubikvitinált PCNA molekulát poliubikvitinálják. Amint az a 20.ábrán

látható, egyik N-terminális Rad18 mutáns sem tudott kölcsönhatni a Rad5 fehérjével. Míg a kontrol lemezen (–L/-T) a törzsek kivétel nélkül felnőnek, addig a –L/-T/-H lemezen csak azok képesek, ahol interakció van a két fehérje között, esetünkben csak a vad típusú Rad18 és Rad5 fehérje között detektálható kölcsönhatás. Ennek a kölcsönhatásnak a hiánya okozhatja a hibamentes ág inaktiválását a mi mutánsunkban. Élesztő kettős hibrid kísérletekkel így meghatároztuk a Rad18 fehérje Rad5-tel kölcsönható doménjét, mely a 155-190 aminosavig terjedő szakaszra térképezhető.



20.ábra: Élesztő kettős hibrid kísérletek (AD: activation domain, BD: binding domain, L: leucin, H: hisztidin, T: triptofán, A: adenin)

IV.6. A Rad5 fehérje Rad18 független funkciójának vizsgálata a Rad18 Δ (115-190) törzs alkalmazásával



21.ábra: Rad18 Δ (115-190) és Rad5 L538A (A. kép ATPáz mutáns) és Rad5 I916A (B kép RING mutáns) törzsek UV érzékenysége

A teljes *RAD5* deléciót tartalmazó törzs érzékenyebb fenotípust mutat, mint a Rad18 Δ (115-190) törzs, melyben a poliubikvitiláció folyamata gátolt. Ez nem meglepő, hiszen az irodalomból ismert, hogy a Rad5-nek más feladata is van a DNS hibatolerancia útvonalban, mint a PCNA poliubikvitinálása. A mi mutánsunk így alkalmas lehet a Rad5 egyéb funkcióinak vizsgálatára. Annak kiderítésére, hogy az egyéb funkcióhoz a Rad5-nek mely doménjei szükségesek, az ATPáz és RING doménben mutáns Rad5 fehérjét fejeztettünk ki élesztőben. Ehhez a genomi *RAD5* gént eltávolítottuk és különböző *RAD5* mutáns konstruktokat juttattunk vissza a sejtbe, mint az ATPáz funkcióban mutáns L538A és a RING domén funkcióban mutáns I916A. Amint az a 21. ábrán is láthatjuk a kettős mutánsok (Rad18 Δ (115-190) Rad5 I916A és Rad18 Δ (115-190) Rad5 L538A) ugyanolyan érzékeny fenotípust mutattak, mint az egyedüli Rad18 Δ (115-190) deléció, tehát a Rad5 egyéb szerepéhez sem a RING sem az ATPáz aktivitás nem szükséges.

V. Konklúzió

A Rad6/Rad18 fehérjekomplex által vezérelt DNS hibatolerancia útvonal egyike a számos evolúciósan rögzült mechanizmusnak, mely a sejtek túlélését biztosítja a különböző károsodásokkal szemben. Ez egy olyan útvonal, mely a károsodott szálon is továbbjuttatja a replikációs villát a károsodott bázisok eltávolítása nélkül. Három al-útvonalra különül el, a transzléziós polimerázokon keresztül megvalósuló mutagén (*REV1*, *REV3*, *DEF1* és *REV7*) és hibamentes (*RAD30*) al-útvonalra, valamint részét képezi még egy a replikációs villa visszafordítását végző al-útvonal is, melyben a *RAD5*, *MMS2*, *UBC13* gének működnek.

Kutatásaim ezen útvonal fontos fehérjéjéhez, a Rad18-hoz kapcsolódnak, mely rendelkezik öt, már azonosított régióval, ezek a RING, Zn-finger, SAP, ATP és Rad6 kötő domének. Marad azonban a fehérjén két szakasz is, amelyhez funkciót még nem társítottak. A feladatom a Rad18 fehérje még nem karakterizált régióinak analízise volt, azaz annak vizsgálata, hogy a helyes térszerkezet kialakításán túl van-e specifikus funkciójuk. Ehhez a Rad18 fehérje különböző deléciós mutánsait hoztam létre, melyeket plazmidokról fejeztettünk ki, mint egyedüli Rad18 forrást a sejtekben. Három C-terminális, három az N-terminális régióban a RING és Zn-finger domének között elhelyezkedő, valamint négy a Zn-finger és SAP domén körül található deléciós mutánst vizsgáltam meg.

1. A C-terminális deléciót hordozó mutánsok vizsgálatából megállapítottuk, hogy a Rad6 kötő domén mögött található C-terminális véghez funkció nem rendelhető. UV és MMS kezelés hatására is a vad típusú *RAD18* gént hordozó kontrollal megegyező érzékenységet mutattak, valamint a Rad18 fehérje replikációban betöltött szerepére sincsenek hatással a deléciók, amint azt a HU kezelés mutatja.
2. Az N-terminális deléciót hordozó Rad18 mutánsok gátolják a Rad6/Rad18 útvonal DNS hibatoleranciában betöltött szerepét, UV és MMS kezelés hatására. Az érzékeny N-terminális deléciós törzsek közül a 115-190 aminosav deléciót hordozót episztázis vizsgálatnak vetettük alá és bizonyítottuk, hogy az általam létrehozott kérdéses deléció az *MMS2* génnel egy episztázis csoportba tartozik, így a Rad6/Rad18 útvonal hibamentes ágának működését csökkenti.
3. Élesztő kettős hibrid kísérletekkel bebizonyítottuk, hogy a Rad18 155-190 aminosavig terjedő szakasza a Rad5 fehérjével való interakcióért felelős.
4. A Zn-finger és SAP domén körül elhelyezkedő deléciók vizsgálata még folyamatban van, de annyit sikerült kiderítenünk, hogy a Zn-finger domén jelenléte esszenciális a Rad18 fehérje hibatolerancia útvonalban betöltött szerepében.

VI. Rövidítések

BER	– bázis kivágó hibajavítás
DDT	– DNS hibatolerancia
DNS	– dezoxi-ribonukleinsav
dNTP	– deoxiribonukleotid trifoszfát
E1	– ubikvitin aktiváló enzim
E2	– ubikvitin konjugáz enzim
E3	– ubikvitin ligáz enzim
EDTA	– etilén-diamin-tetraecetsav
HU	– hidroxý urea
HRR	– homológ rekombinációs hibajavítás
LiAC	– lítium acetát
MMR	– nem párosodó bázisokat eltávolító hibajavítás
MMS	– metil-metanoszulfát
MMS2	– metil-metanoszulfát érzékeny fehérje 2
NER	– nukleotid kivágó hibajavítás
NHEJ	– nem homológ végek összekapcsolása
OD	- optikai denzitás
PEG	– polietilén-glikol
Rad	– radáció érzékeny fehérje
Rev	- REVersionless protein
SDS	– Sodium dodecyl sulfate - nátrium dodecil szulfát
TLS	- transzléziós szintézis
Ubc13	- Ubikvitin carrier protein 13
UV	– ultraviolet light - ultraviola fény

VIII. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Unk Ildikónak, témavezetőmnek, hogy csoportjában dolgozhattam és munkám során szakértelmével, hasznos magyarázataival segítette a dolgozat elkészülését. Köszönettel tartozom Vamsi Krishna Galinak, hogy türelemmel és odafigyeléssel tanított. Hálával tartozom Halmai Miklósnak és Dr. Bálint Évának, akik a dolgozat megírásához tanácsaikkal, odafigyelésükkel járultak hozzá.

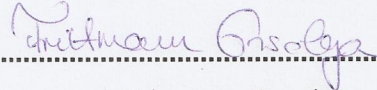
Tiszta szívvel köszönöm családomnak a sok gondoskodást, ami elkísért a tanulmányaim során.

IX. Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Frittmann Orsolya kijelentem, hogy a dolgozatban leírt összes munkafolyamatot én végeztem el:

- élesztő sejtek transzformálását
- élesztő törzsek érzékenységének vizsgálatát UV és mutagén ágensek hatására
- genomi DNS izolálását élesztő sejtekből
- plazmid DNS preparálást
- polimeráz láncreakciót
- *Escherichia coli* kompetens sejtek transzformálását
- spontán mutagenézis mérését
- indukált mutagenézis mérését
- irányított génkiütést
- fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatását élesztő kettős hibrid rendszerrel

Szeged, 2014. május 12.


.....
Frittmann Orsolya