

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT
Genetikai Intézet

36. OTDK BIOLÓGIA SEKCIÓ

Rad6 és Rad18 fehérjék kölcsönhatását célzó kismolekula inhibitor jelöltek hatásának vizsgálata a Rad6-Rad18 interakcióra és PCNA ubikvitinációra humán sejtekben

Sánta Ádám Tamás
Biológia MSc. II. évfolyam

Témavezetők: Prof. Dr. Haracska Lajos
tudományos tanácsadó, csoportvezető

Dr. Kiss Ernő
tudományos főmunkatárs

SZBK Genetikai Intézet
HCEMM-SZBK Mutagenesis és
Karcinogenesis Csoport

Belső konzulens: Dr. Huliák Ildikó
egyetemi adjunktus
SZTE TTIK
Biokémiai és Molekuláris Biológiai
Tanszék

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Rövidítések jegyzéke	4
3. Bevezetés	6
3.1. A genomstabilitás fenntartása.....	6
3.2. A TLS polimerázok	6
3.3. A DNS-hibatolerancia útvonalak	9
3.4. A TLS szerepe a rákban és a kemoterápiában	11
3.5. <i>In vivo</i> fehérje-fehérje interakciót vizsgáló rendszerek.....	11
3.6. Bimolekuláris Fluoreszcencia komplementációs assay	13
4. Célkitűzések	16
5. Anyagok és módszerek.....	17
5.1. Oldatok	17
5.2. Antibiotikumok, szelekciós reagensek	17
5.3. Tápoldatok.....	17
5.4. Transzfekciós reagensek	17
5.5. Ellenanyagok	17
5.6. Sejtkultúrák.....	18
5.7. Plazmidok	18
5.7.1. A kísérletekhez használt további plazmidok.....	20
5.8. Módszerek	20
5.8.1. HeLa sejtek transzfekciója	20
5.8.2. A sejtek kezelése kismolekulákkal	21
5.8.3. Sejtek UV kezelése	21
5.8.4. Sejtek immunfestése	21
5.8.5. A sejtek fixálása és festése mikroszkópos analízishez.....	22
5.8.6. A minták mikroszkópos analízise.....	22
6. Eredmények	24
6.1. Megfelelő kombinációk kiválasztása.....	24
6.2. NSC 623095-ös kódú kismolekula hatásának vizsgálata a Rad6-Rad18 interakcióra	25
6.3. A Rad6-Rad18 fókuszok kolokalizációja PCNA-val	27
6.4. Az NSC 623095-ös kódú kismolekula hatásának vizsgálata a PCNA-ubikvitin interakcióra	28
6.5. Az NSC 338106 és 338107-es kódú kismolekulák hatásvizsgálata a Rad6-Rad18 interakcióra.....	30

7. Összegzés	32
8. Köszönetnyilvánítás	34
9. Irodalomjegyzék.....	35
10. Tételes szerzői hozzájárulás.....	37

2. Rövidítések jegyzéke

BaP – Benzoapirén

BER – Base Excision Repair (bázis kivágó hibajavítás)

BiFC assay – Bimolecular Fluorescence Complementation assay (Bimolekuláris Fluoreszcens Komplementációs esszé)

BRCT domén – BRCA1 C-Terminális Domén

BSA – Bovine Serum Albumin

DAPI – 4',6'-diamidino-2-phenylindole

DDR – DNA Damage Response (DNS károsodásra adott válasz)

DDT – DNA Damage Tolerance (DNS-hibitolerancia)

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimethyl Sulfoxide (dimetil-szulfoxid)

DNS – Deoxiribonukleinsav

DSB – Double-Strand Break (kettős szálú törés)

E1 – Ubikvitinaktiváló enzim

E2 – Ubikvitinkonjugáló enzim

E3 – Ubikvitin ligáz enzim

FBS – Fetal Bovine Serum

FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer (Förster-féle rezonáns energiaátadás)

GFP – Green Fluorescent Protein (zöld fluoreszcens fehérje)

HLTF – Helicase Like Transcription Factor

HR – Homologous Recombination (homológ rekombináció)

ICL – Interstrand Crosslink (szálközötti keresztkötés)

MLH1 – MutL Homolog 1

Mms2 – Methyl Methanesulfonate Sensitivity Protein 2

MSH2 – MutS Homolog 2

NER – Nucleotide Excision Repair (nukleotid kivágó hibajavítás)

NLD – Nuclear Localization Domain (Nukleáris lokalizációs domén)

PBS – Phosphate Buffered Saline (foszfát pufferelt sóoldat)

PCA - Protein Complementation Assay (fehérje komplementációs esszé)

PCNA – Proliferating Cell Nuclear Antigen (replikatív polimeráz processzivitási faktora)

PFA – Paraformaldehid

PIP – PCNA Interacting Protein Domain (PCNA interakciós domén)

Pol ζ – DNS Polimeráz Zéta

Pol η – Polimeráz Éta

Pol ι – Polimeráz Iota

Pol κ – Polimeráz Kappa

PPI - Protein-Protein Interaction (fehérje-fehérje interakció)

Rad6 – Radiation Sensitivity Protein 6

Rad18 – Radiation Sensitivity Protein 18

Rev1 – Reversionless 1

Rev3 – Reversionless 3

Rev7 – Reversionless 7

RIR – Rev1 Interaction Region (Rev1 interakciós régió)

ROS – Reactive Oxygen Species (reaktív oxigén gyökök)

SHPRH – SNF2 Histone Linker PHD RING Helicase

SNP – Single Nucleotid Polimorphism

SSB – Single-Strand Break(egyese szálú törés)

TLS – Translesion Synthesis (transzléziós szintézis)

Ub – Ubikvitin

Uba1 – Ubiquitin-Like Modifier Activating Enzyme 1

Ubc13 – Ubiquitin Carrier Protein 13

UBM – Ubiquitin-Binding Motif (ubikvitinkötő motívum)

UBZ – Ubiquitin-Binding Zinc Finger (ubikvitinkötő cink ujj)

XPV – Xeroderma Pigmentosum V

YFP – Yellow Fluorescent Protein (sárga fluoreszcens fehérje)

3. Bevezetés

3.1. A genomstabilitás fenntartása

Az információ a genomban dezoxiribonukleinsav (DNS) formájában tárolódik minden élő organizmusban; a DNS-t a genom integritásának megőrzése érdekében szükséges fenntartani és védeni (Knobel and Marti, 2011). Genomunk épségét folyamatosan érik károsító hatások, amelyek rendkívül sokfélék lehetnek. Ennek következtében a DNS sérülése elkerülhetetlen, egyetlen egy sejtben akár több tízezer hiba jöhet létre naponta. Ezeket a hibákat okozhatják endogén, a sejt metabolizmusából, mint például lipid peroxidációból származó vegyületek, valamint különféle reaktív oxigén gyökök (ROS), illetve exogén, a környezetből származó hatások és anyagok, mint például az UV és ionizáló sugárzások, karcinogén vegyületek (Shaheen et al., 2010). Ezek hatására különféle DNS-hibák jöhetnek létre, mint például abázikus helyek, rosszul párosodott bázisok, egyes (SSB) és kettős szálú törések (DSB), valamint szálon belüli és szálak közti keresztkötések (ICL). Ezek kijavítására számos, konzervált hibajavító útvonal fejlődött ki, mint a nukleotid- (NER), illetve báziskivágó javítómechanizmus (BER), vagy a homológ rekombinációs hibajavítás (HR). Ezekkel a folyamatokkal kerülnek el a sejtek a folyamatos bázisvesztést vagy módosítást, illetve a különféle mutációk létrejöttét. Vannak olyan esetek, mikor a DNS-hiba nem kerül kijavításra és a DNS-szintézis során a replikációs villa elakad a sérülés helyénél (Shaheen et al., 2010). A megakadt replikációs villák könnyen össze is omlhatnak, melynek eredményeképp SSB-k és DSB-k jöhetnek létre, melyek kromoszómaátrendeződésekhez, ezáltal genomi instabilitáshoz vezethetnek. Megfigyelték, hogy ezek a hibák nem mindig javítódnak ki, így a következő sejtgenerációban már mutációként fognak öröklődni. Ez azt jelenti, hogy bizonyos esetekben az organizmusoknak fontosabb, hogy tolerálják a DNS-hibákat és folytassák a replikációt, mint hogy engedjék a replikációs villák összeomlását. Ezért a DNS hibamentes javítására szolgáló mechanizmusok mellett kialakultak olyanok is, melyek biztosítják a DNS-szintézis folyamatosságát DNS-hibák mellett is, ezzel fenntartva a genom stabilitását. Ennek egyik legismertebb példája a transzléziós szintézis (TLS), mely a sejtciklus S fázisában aktiválódik, mikor a replikatív polimeráz elakad a DNS-szintézis során egy DNS-hiba okozta torzió miatt. Ezt a jelenséget DNS hiba toleranciának (DDT) nevezik (Andersen et al., 2008).

3.2. A TLS polimerázok

A DNS polimerázokat az 1900-as évek második felében fedezték fel, elsőként az *Escherichia coli* DNS Polimeráz I (PolI) enzimét. A 70-es években, amikor már ismerték az *E. coli* mindhárom replikatív polimerázát (PolI, PolII és PolIII), publikálták az SOS DNS-hibajavító modellt, ami egy mutációhagyó mechanizmust javasol. Ennek nyomán sikerült szintén a 70-es

években felfedezni élesztőben az első, transzléziós szintézisben részt vevő polimerázokat. Napjainkban már számos replikatív és TLS polimeráz ismert. Habár a DNS polimerázok általános harmadlagos szerkezete erősen konzervált, a két típus között vannak jellegzetes eltérések. A TLS polimerázok aktív régiója sokkal nyitottabb, mint a replikatív polimerázoké, így azok könnyebben haladnak át a DNS-hibákon, ugyanakkor nagyobb valószínűséggel építhetnek be rosszul párosodott bázisokat is. Ez magyarázatként szolgál a két polimeráz típus pontossága közti eltérésre is, hiszen míg a replikatív polimerázok hibaráta 10^{-6} - 10^{-8} , melyet a replikációt segítő fehérjék és a posztreplikatív, hibás bázispárosodást javító mechanizmusok lecsökkentenek 10^{-8} - 10^{-10} -re, addig a TLS polimerázok hibaráta 10^{-1} - 10^{-3} közt van. Ez a különbség azonban nem csak az aktív centrum nyitottságának köszönhető, mivel a replikatív polimerázokkal ellentétben a TLS polimerázok nem rendelkeznek önjavító 3'-5' exonukleáz (proofreading) aktivitással.

A polimerázok szerkezetük és működésük alapján négy családba sorolhatók: A, B, X és Y. Mivel dolgozatomban szempontjából a transzléziós szintézishez kapcsolt polimerázok a legfontosabbak, így alább ezek kerülnek részletes bemutatásra.

Az „A” családba tartozik a replikatív DNS polimeráz gamma ($\text{Pol}\gamma$), valamint a TLS polimeráz theta ($\text{Pol}\theta$) és nu ($\text{Pol}\nu$) (Knobel and Marti, 2011).

A polimerázok „B” családjába tartozó nagy pontosságú polimerázok a DNS polimeráz delta ($\text{Pol}\delta$), alfa ($\text{Pol}\alpha$) és epsilon ($\text{Pol}\epsilon$), valamint a TLS polimeráz zeta ($\text{Pol}\zeta$).

A család többi tagjától eltérően a $\text{Pol}\zeta$ nem rendelkezik proofreading aktivitással. Két alegységből álló heterodimer fehérje, katalitikus alegysége a REV3, melynek génje a 6-os kromoszóma q karján, strukturális alegysége a REV7, melynek génje az 1-es kromoszóma p karján helyezkedik el. A DNS-sérülések hibahagyó áthidalásának egyik legfontosabb résztvevője, emellett szerepe van az IgG izotípusváltásban is.

A polimerázok „X” családja csak TLS polimerázokat tartalmaz, melynek tagjai a polimeráz béta ($\text{Pol}\beta$), lambda ($\text{Pol}\lambda$), mü ($\text{Pol}\mu$) és a terminális dezoxinukleotidil-transzferáz (TdT) (Knobel and Marti, 2011; Yamanaka et al., 2017).

A DNS polimerázok „Y” családja kizárólag TLS polimerázokból áll: Rev1, Polimeráz éta ($\text{Pol}\eta$), kappa ($\text{Pol}\kappa$) és iota ($\text{Pol}\iota$). A család minden tagjára jellemző a konzervált N-terminális polimeráz domén, míg a C-terminális felük variábilis. A család egyetlen tagja sem rendelkezik proofreading aktivitással.

A Rev1 génje a 2. kromoszómán található. A fehérje a tipikus, „Y” családra jellemző konzervált doméneket leszámítva tartalmaz még egy N-terminális BRCT domént, valamint C-terminális felén rendelkezik két ubikvitinkötő motívummal (UBM), melyeket egy polimeráz interakciós

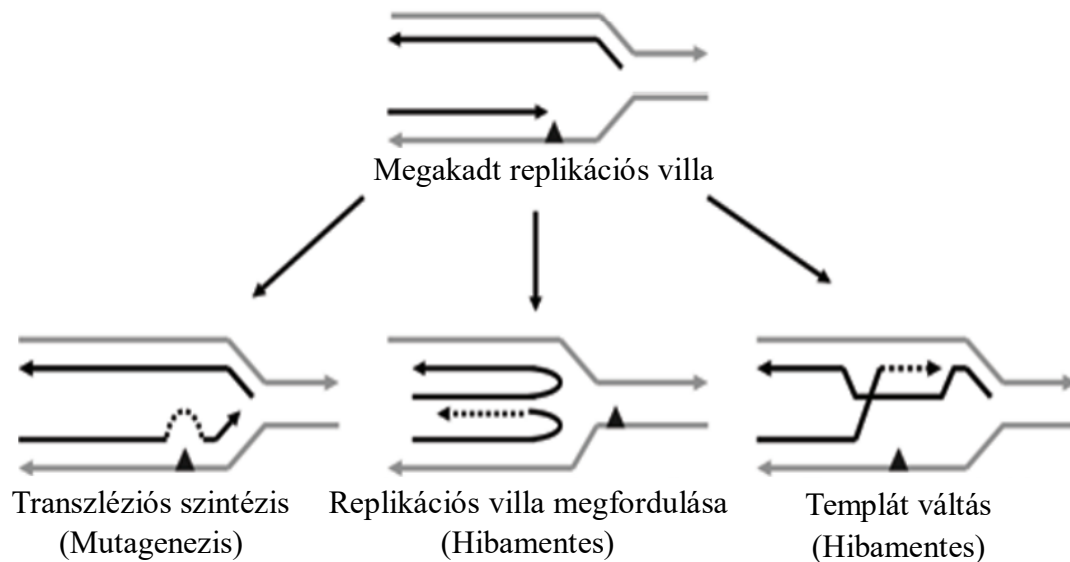
régió követ. A Rev1 fehérje polimeráz aktivitása csak az abázikus helyeken való áthaladásra korlátozódik, ez alapján a fő funkciója nem a nukleotidok beépítése, hanem a monoubikvitinált PCNA jelére történő polimerázváltás koordinációja és elősegítése. C-terminális régiója képes interakcióba lépni számos TLS polimerázzal, ami arra enged következtetni, hogy a Rev1 állványfehérjeként működik számos TLS polimeráz számára. Továbbá kimutatták, hogy a Rev1 csendesítése rontja a G-kvadruplex (G4) struktúrák replikációját, ezáltal egyrészt limitálva a hisztonok újrafelhasználását, másrészt kedvezve a frissen szintetizáltak beépülésének, ezzel változásokat okozva az epigenetikai mintázatban (Knobel and Marti, 2011; Ohashi et al., 2004). A Polimeráz éta (Pol η) aktivitásának elvesztése egy rákra erősen hajlamosító szindrómát, Xeroderma pigmentosum V-t (XPV) okoz, mely gyakran jár együtt fokozott napfény-érzékenységgel és a bőrrák kialakulásának megnövekedett kockázatával. UV sugárzás hatására a Pol η nagymértékű kolokalizációt mutat a PCNA-val a replikációs fókuszokban. A fehérjét a POLH gén kódolja, mely a 6-os kromoszómán található. A konzervált N-terminális doménje mellett rendelkezik egy Rev1 interakciós régióval (RIR), egy ubikvitinkötő cink ujj (UBZ), egy nukleáris lokalizációs (NLD) és két PCNA interakciós (PIP) doménnel is (Knobel and Marti, 2011). Az XPV sejtek érzékenyek az UV sugárzásra és emelkedett mutációs rátát mutatnak annak ellenére, hogy a NER működik ezekben a sejtekben. Ebből arra következtethetünk, hogy a Pol η úgy képes áthaladni az UV okozta DNS-hibákon, hogy nem hagy mutációkat. Hiányában a Pol ι veszi át a feladatát, ez azonban csak hibahagyó mechanizmussal képes áthidalni az UV okozta sérüléseket (Kannouche and Strydom, 2003) (Masutani et al., 1999). A Pol η PIP és UBZ doménjei fontosak a monoubikvitinált PCNA-hoz való kötésben, mely indukálja a transzlációs szintézist. Amennyiben mutációk jönnek létre ebben a két doménben, a sejtek UV sugárzással szembeni érzékenysége megnő (Knobel and Marti, 2011).

Az 5-ös kromoszómán elhelyezkedő POLK gén kódolja a TLS polimeráz kappát. A fehérje N-terminális felén helyezkedik el a konzervált polimeráz domén, míg C-terminálisán rendelkezik egy RIR, két UBZ és egy PIP doménnel. Aktivitása a Rad18-tól és a monoubikvitinált PCNA-tól függ. UV sugárzás hatására kisebb mértékben kolokalizál a PCNA-val a replikációs fókuszokban, mint a polimeráz éta. Kimutatták, hogy Pol κ deficiens őssejtek érzékenyebbek benzoapirén (BaP) kezelésre, ami egy erősen karcinogén vegyület, valamint kezelés után a sejtek nagyságrendekkel több mutációt halmoznak fel, jelezve, hogy Pol κ hibamentesen képes áthidalni a BaP okozta DNS-módosításokat. Emellett a Pol κ képes áthaladni UV indukált DNS-károsodásokon is, bár hibahagyó módon (Ogi et al., 2005)(Knobel and Marti, 2011).

A polimeráz iota-t a 18-as kromoszómán található POLI gén kódolja. A fehérje a többi „Y” családba tartozó polimerázhoz hasonlóan rendelkezik egy N-terminális konzervált polimeráz doménnel, C-terminálisán pedig egy RIR, két UBM és egy PIP doménnel. A PIP és UBM domének fontosak a replikációs villához való lokalizációban és a monoubikvitinált PCNA kötésében. Lokalizációja és felhalmozódása nagyban függ a Pol η -val való interakciójától. Pol η hiányában csökken a BER aktivitása, és megnő a sejtek érzékenysége oxidáló ágensekkel szemben (Petta et al., 2008)(Knobel and Marti, 2011).

3.3. A DNS-hibatolerancia útvonalak

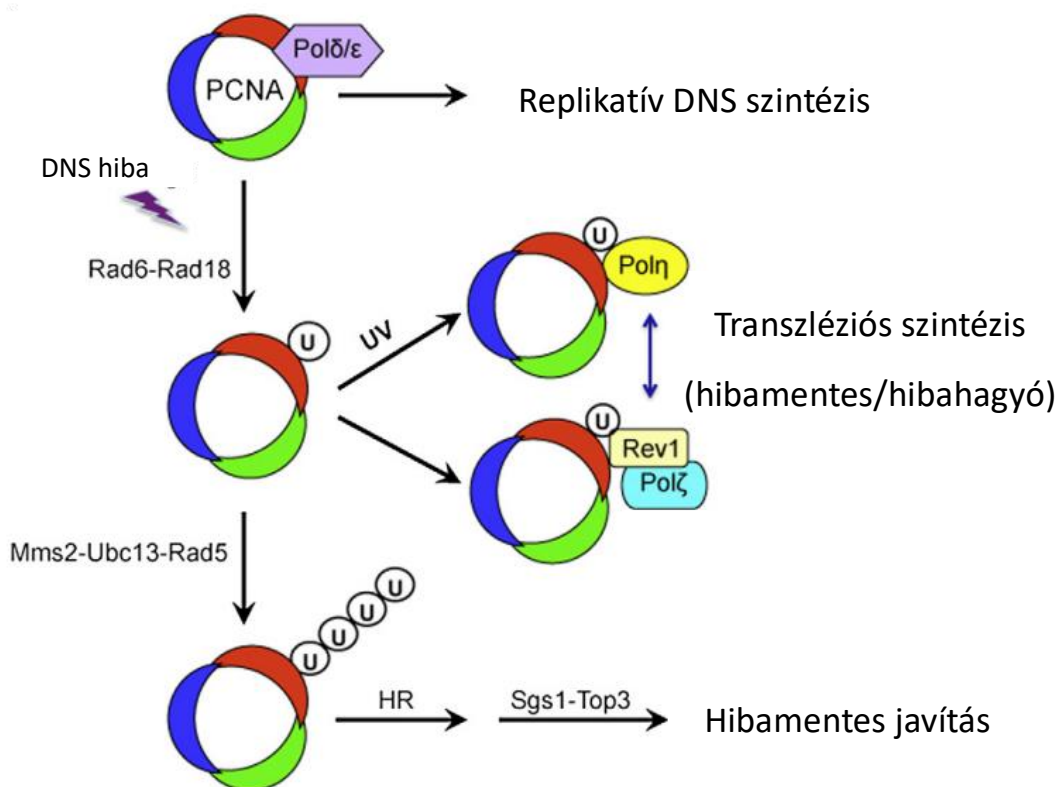
Ha egy hiba a DNS-ben nem kerül javításra a sejtciklus S-fázisáig, akkor az meg fogja akasztani a replikációs villát a DNS szintézis során, mivel a replikatív polimerázok nem képesek tovább haladni a DNS szerkezetének torzulása miatt. Ilyenkor aktiválódnak a DNS hibatolerancia (DDT) útvonalak, melyek feladata, hogy a replikáció folytatódjon (Li et al., 2021). A különböző DDT mechanizmusok egyik fő mediátora a replikatív polimeráz processzivitási faktora (PCNA). A PCNA egy homotrimer fehérje, amely gyűrűt formál a DNS körül. Normál replikáció esetén a replikációs komplex processzivitási faktoraként segíti annak előrehaladását, azonban ha megakad a replikációs villa, poszttranszlációs módosításokon eshet át, ezzel aktiválva a DNS hibatolerancia útvonalakat (Andersen et al., 2008).



1. ábra: DNS hibatolerancia útvonalak (Andersen et al., 2008)

Ennek egyik lehetséges mechanizmusa a polimerázváltás. A replikációs komplex megakadásakor a PCNA monoubikvitinálódik. Az ubikvitináció egy konzervált, széles körben elterjedt folyamat, melynek során az ubikvitin (Ub) - egy konzervált, 76 aminosavból álló fehérje - a célfehérje lizin aminosavához képes kovalensen kapcsolódni. Első lépésben az

ubikvitinaktiváló enzim (E1) megköti az ubikvitint, majd átadja egy ubikvitinkonjugáló (E2) enzimnek. Az E2 ezután kölcsönhat egy ubikvitin ligáz (E3) enzimmel, ami összekapcsolja az ubikvitint hordozó E2 enzimet a célfehérjével. Ezután az ubikvitin az E3 ligáz típusától (HECT vagy RING) függően vagy közvetlenül az E2 enzimről, vagy az E3 enzimen keresztül a célfehérjére kerül. Polimerázváltás esetén az ubikvitinációs kaszkád enzimek az Uba1 (E1), a Rad6 (E2) és a Rad18 (E3). A Rad18 a PCNA 164. lizin aminosavát (K164) ubikvitinálja. Ez a módosítás nagyban megnöveli a TLS polimerázok affinitását a PCNA-hoz azok UBM és UBZ doménjei miatt, elősegítve toborzásukat a DNS-hibához (Shaheen et al., 2010). Ezután a megakadt replikatív polimeráz egy TLS polimerázra cserélődik ki, amely képes nukleotidokat beépíteni a hibával szemben. A DNS-hiba típusától függően ezután vagy ugyanaz, vagy egy másik TLS polimeráz egy rövid szakasszal meghosszabbítja a szintetizálódó DNS-szálat, majd újabb csere történik és az eredeti replikatív polimeráz folytatja a DNS-szintézist. Attól függően, hogy ugyanaz a TLS polimeráz végzi-e el az extenziós lépést, mint a bázisinszerciót vagy egy másik, beszélünk egy polimeráz, illetve két polimeráz mechanizmusról (Knobel and Marti, 2011).



2. ábra: A PCNA-ubikvitináció formái (Zhang et al., 2011)

A PCNA monoubikvitin jele módosulhat poliubikvitin láncná, a MMS2-UBC13 (E2) és a HLTF vagy a SHPRH (E3) fehérjék segítségével (Li et al., 2021). Ez a poliubikvitin lánc különbözik attól, ami a fehérjéket a proteozómális lebontásra jelöli ki, mivel ezesetben az

ubikvitinek nem a 48. lizin aminosavukon, hanem a K63-on keresztül kapcsolódnak egymáshoz. Ez a jelölés egy hibamentes DDT mechanizmust indukál, a templát váltást. A folyamat során megfordul a replikációs villa, az újonnan szintetizálódott szálak hibridizálnak egymással és a hibamentes új szál fog templátként szolgálni a replikációban (Andersen et al., 2008).

3.4. A TLS szerepe a rákban és a kemoterápiában

Vannak olyan típusai a rákos megbetegedéseknek, melyek rezisztensek bizonyos kemoterápiás szerekre, de a terápia során is szerezhetnek rezisztenciát. A két rezisztencia közös pontja a TLS. Mivel a genomi instabilitás a daganatos megbetegedések egyik fő jellemzője, fontos kérdés, hogy a TLS polimerázok expressziójának és aktivitásának változása milyen hatással van a karcinogenezis mértékére. Egyre több kutatás mutatja ki, hogy a TLS polimerázok csökkent aktivitása gyorsabb tumorgenezissel párosul (Yamanaka et al., 2017). Például Pol η hiányában (XPV betegek) a pirimidin dimereket egy másik TLS polimeráz, a Pol ι hidalja át hibahagyó módon. Továbbá megfigyelték, hogy bizonyos Pol ι mutációk megnövelik a tüdőrák kockázatát ugyanúgy, mint specifikus SNP-k jelenléte Rev1-ben, valamint a Pol θ mutációi gyakran fordulnak elő mellrákos eseteknél. Ezek alapján a TLS aktivitás hosszú távú gátlása számos negatív hatással jár, ugyanakkor tranziens inhibíciója előnyös lehet a daganat kezelésében. Erre példa a szintetikus letalitás jelensége, ahol két útvonal defektusa külön-külön nem, viszont együttesen letális hatású a tumor sejtekre (Knobel and Marti, 2011). A Pol β inhibíciója szintetikus letalitást mutat MSH2 és MLH1 deficiens rákos sejtekben is. Emellett a TLS polimerázok kitűnő célpontjai lehetnek adjuváns terápiáknak is, mert a TLS együttes gátlása érzékennyé teheti a tumorokat a kemoterápiás kezelésre, ennek következményeként a fő kezelés effektív dózisa is csökkenthető (Yamanaka et al., 2017). Összegezve, a TLS polimerázok expressziójának és aktivitásának gátlása emelheti a rákos sejtek genotoxikus kezelésekre való érzékenységét és jobb klinikai kimenetelt biztosíthat a betegek számára. Az azonban még nem ismert, hogy a TLS gátlása a kezelés során hogyan hat a normál, nem rákos sejtekre. Ahhoz, hogy a kezelés folyamán a normál sejtekben elkerülhetőek legyenek a magas genomi instabilitás miatt kialakuló malignus transzformációk, a TLS polimerázokat csak tranziensen célszerű gátolni, például lentivirális alapú megközelítés helyett specifikus kismolekulák használatával (Knobel and Marti, 2011).

3.5. In vivo fehérje-fehérje interakciót vizsgáló rendszerek

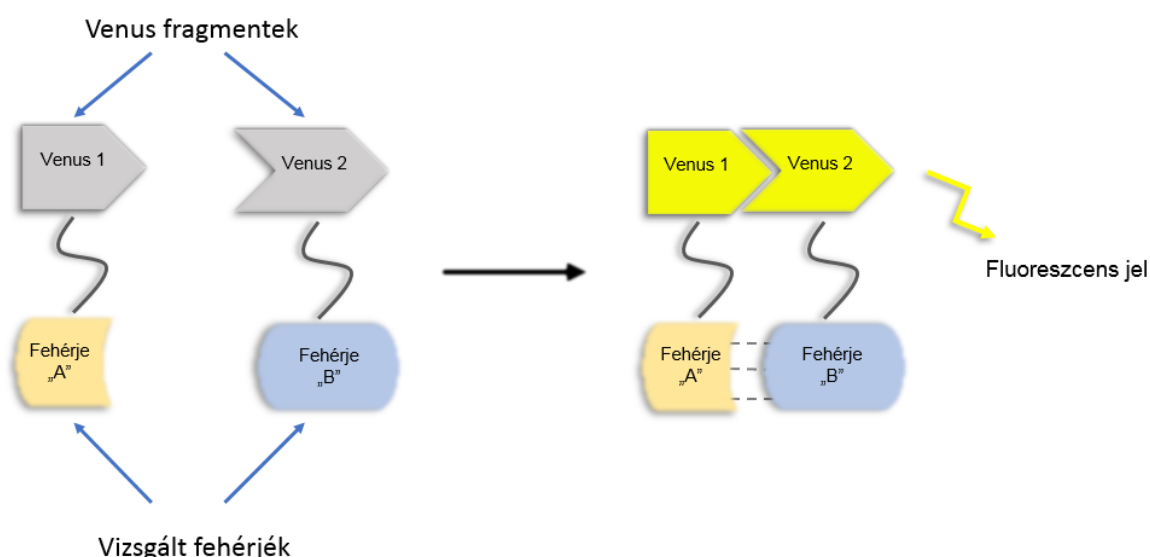
A fehérje-fehérje interakciók (PPI-k) fontos szerepet töltenek be számos biológiai folyamatban, például egyesíthetik különböző jelátviteli útvonalak szignáljait ezáltal koordinálva a sejt szabályozó mechanizmusait. A különféle kölcsönhatások láthatóvá tétele lehetővé teszi az

eltérések megfigyelését különféle körülmények között (mint például: eltérő sejttípusok, különböző környezeti hatások) (Kerppola, 2008). A PPI-k vizsgálatára számos módszert fejlesztettek ki, amelyek mind más-más oldalról vizsgálják ezeket a kölcsönhatásokat, például segítenek új interakciós partnereket felfedezni, vagy leírást adnak az adott kölcsönhatás kinetikájáról. Ezen technikák közt találunk *in vitro* (protein microarray, röntgen krisztallográfia) és *in vivo* (élesztő két-hibrid, fehérje komplementációs assay) módszereket is (Stynen et al., 2012a). Az *in vivo* módszerek előnye, hogy az élő, intakt sejteken végzett kísérletezés segít elkerülni azokat a lehetséges változásokat a kölcsönhatásokban, melyeket például a sejtlízis okozhat, továbbá a fehérje komplexek direkt vizualizációja natív környezetükben értékes kiegészítése lehet más vizsgálati módszereknek is. Napjainkban a két legelterjedtebb *in vivo* fehérje-fehérje interakciót vizsgáló módszer az élesztő két-hibrid rendszer, illetve ennek továbbfejlesztett változatai, valamint a fehérje komplementáción alapuló technikák (PCA-k). A protein komplementációs módszerek egyik nagy előnye a két hibriddel szemben, hogy viszonylag könnyen átvihetők más organizmusokba, például prokariótákba, növényi, illetve emlős sejtekbe, sőt akár élő állatokba is (Kerppola, 2008). A fehérje komplementáció jelenségét már vagy fél évszázada kutatják. Az enzim fragmentek közti komplementációt először Richards fedezte fel, mikor a szubtilizinhasított Ribonukleáz A-t vizsgálta. A hasítás eredményeképp egy S-fehérje és egy S-peptid jött létre. Megfigyelte, hogy a hasítás után is megmaradt a fehérje enzimatis aktivitása, ami azonban elveszik, ha valamelyik fragmentet eltávolítja az oldatból. Napjainkban már tudjuk, hogy számos fehérje hasítható két olyan darabra, melyek később képesek összeállni spontán, kovalens kötés kialakítása nélkül egy működőképes fehérjévé. Ez a hasítási hely általában két jól definiált másodlagos struktúra közti hurokban található. A komplementációs tesztekhez felhasználható fehérjefragmenteknek három fő jellemzője van: a különálló daraboknak ellenállónak kell lenniük a proteolitikus lebontással szemben, emellett a fragmentek külön-külön nem mutathatnak aktivitást, ha azonban mindkét fél jelen van és megtörténik a komplementáció, visszaáll az eredeti fehérje funkciója, aktivitása. Különösen jelentős lépés volt a fehérjeinterakciók vizsgálatának fejlődésében, amikor felfedezték, hogy bizonyos protein fragmentek asszociációja elősegíthető, ha a két, N- és C-terminális felet specifikus interakciós partnerekhez fúzionáltatják. Ez az alapja a ma is használt hasított-fehérje komplementációs esszéknek (Romei and Boxer, 2019). Az első rendszert élesztőben hozták létre. A kísérletben szereplő ubikvitin fragmentek csak akkor alkottak aktív proteáz tag-et, ha azokat egymással kölcsönhatásba lépő fehérje párhoz (leucin-cipzár homodimer két tagjához) kapcsolták (Johnsson and Varshavsky, 1994). Ezt a kísérleti elrendezést tovább gondolva hozták létre

később a split-luciferáz rendszert, amely *in vitro* és *in vivo* is alkalmazható. Ezt a biolumineszcencián alapuló módszert emlős sejtekben fejlesztették ki, humán fehérje-fehérje interakciók vizsgálatához. Fénykibocsátás akkor jön létre, amikor a luciferáz enzim a luciferin nevű szubsztrátját oxidálja. A luciferáz fragmentek asszociációja reverzibilis, ami közel valós idejű interakciós vizsgálatokat tesz lehetővé. További előnye, hogy természetes állapotukban az emlős, például humán sejteknek minimális a lumineszcens háttérük, magas jel/zaj arányt eredményez, ami kedvező a kísérlet kiértékelése tekintetében. Az ubikvitinen és luciferázon kívül a leggyakrabban használt riporter fehérjék közé tartozik még a béta-galaktoszidáz, a torma peroxidáz, valamint különféle fluoreszcens fehérjék (Stynen et al., 2012b).

3.6. Bimolekuláris Fluoreszcencia komplementációs assay

Napjainkra az egyik legerjedtebb és talán leggyorsabban fejlődő típusa a fehérje komplementációs assay-knek a split-fluoreszcens protein rendszer. Ez a típus annyira elterjedt, hogy egyedi nevet is kapott: bimolekuláris fluoreszcencia komplementációs assay (BiFC assay). Ezen megközelítés alapja hasonló a korábbi verziókhoz, egy fluoreszcens fehérje N- és C-terminális fele van összekapcsolva egy egymással kölcsönható fehérje pár egy-egy tagjával. Külön-külön egyik fragment sem mutat fluoreszcenciát, azonban ha interakció jön létre a vizsgált fehérjék közt, és a két fél elég közel kerül egymáshoz, képesek összeállni és visszanyerni fluoreszcenciájukat. A fluoreszcens fehérjét alkotó fragmentek maguktól is kapcsolódhatnak kis gyakorisággal, azonban ha egymással kölcsönható fehérjékhez fúzionáltatjuk azokat, az asszociáció mértéke nagyságrendekkel megnő (Kodama, 2010).



3. ábra: A Split-Venus rendszer sematikus ábrája

Az első felfedezett fluoreszcens fehérje a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) volt, fragmentjeinek komplementációját először Regan és munkatársai detektálták *E. coli*-ban (ref). A rendszernek számos előnye van, például a kiértékeléséhez elegendő egy fluoreszcens mikroszkóp, és nem kell a mintákat jelölni exogén fluorofórokkal vagy festékekkel. A módszer számos proteintípus közti interakció kimutatására képes, lehetővé teszi specifikus fehérjekomplexek sejten belüli lokalizációjának vizsgálatát természetes körülmények között, emellett mindehhez nem szükséges mélyebb információkkal rendelkezni a vizsgált fehérjék struktúrájáról. A BiFC assay további előnyei: segítségével direkt módon vizsgálhatjuk a fehérjék közti kölcsönhatásokat, emellett mivel élő sejtekben működik a rendszer, elkerülhetjük a műhibákat, melyeket a sejtlyzisz, illetve a fixálás okoz, továbbá a vizsgált fehérjék természetes környezetükben termelődnek és oszlanak el a sejt-kompartmentek között. Emellett ahhoz, hogy a fluoreszcens jelet lássuk, nem szükséges a fehérjék nagy részének kölcsönhatnia, sőt nem szükséges a fragmenteknek sem pontos helyzetben lenniük egymáshoz képest, csak elég közel kell kerülniük egymáshoz (Kerppola, 2008). További előnye, hogy a fluoreszcens protein fragmentek kis méretűek, kevésbé zavarják be a vizsgált fehérjék szerkezetébe és lokalizációjába. Ezenkívül a fluoreszcens fragmentek asszociációja irreverzibilis folyamat, ezért a rendszerrel képesek vagyunk gyenge, illetve tranziens PPI-k vizualizációjára is. Az emlős sejtek többsége minimális fluoreszcens háttérrel rendelkezik, ami magas jel/zaj arányt jelent, így könnyű megkülönböztetni a valódi jeleket a háttértől (Romei and Boxer, 2019). A módszernek ugyanakkor hátrányai is vannak. A fragmentek irreverzibilis asszociációjának negatív oldala, hogy nem ad lehetőséget valós idejű vizsgálatokra, mert stabilizálja a kialakult interakciókat, ezáltal nem szolgáltat információt azok kinetikájáról. Emellett a fluoreszcens fehérje kromofórja sem alakul ki azonnal a kölcsönhatás következtében, a lassabb érés is a fluoreszcens jel felhalmozódásához vezet. További probléma, hogy két fehérje esetén nyolc fúziós kombináció lehetséges, amelyeknél nem jósolható meg előre, hogy melyik fogja a legerősebb fluoreszcens jelet adni, így ezt empirikus úton kell meghatározni (Kerppola, 2008). Emellett a rendszer szintén szenved azoktól a nehézségektől, amiktől a tradicionális fluoreszcens kísérletek is, mint a jel kifakulása, a fototoxicitás, illetve az autofluoreszcencia jelensége (Romei and Boxer, 2019). Jó hír azonban, hogy a felmerülő nehézségek többségére már találtak megoldást. A legelsőnek felfedezett fluoreszcens fehérje a GFP volt, így a BiFC technikában is ez terjedt el. A protein extrém toleráns a mutációkkal szemben, napjainkra már rengetegféleképp módosították, számos aminosavcserét hajtottak létre, ezáltal számos problémát megoldva, hisz sikerült megváltoztatniuk az expresszió szintjét, a fehérje stabilitását, színét, érzékenységét a fakulásra, illetve a kromofór maturációs rátáját. Humán sejtekben a

sárga fluoreszcens fehérje (YFP) használata a legelterjedtebb, valamint a belőle származtatott Venus proteiné, melynek intenzitása megközelítően tízszerese elődjének, valamint gyorsabb a kromofór érése és kevésbé érzékeny a környezet változásaira, azonban a háttére is számottevően magasabb (Kodama, 2010).

Napjainban a rendelkezésre álló fluoreszcens fehérjék lefedik a látható spektrum nagy részét, ez lehetővé teszi, hogy több fehérjepár interakcióját vizsgálhassuk egyszerre (Miller et al., 2015). Emellett lehetőségünk van kombinálni a BiFC rendszert a Förster-féle rezonáns energiaátadással (FRET) is, így több fehérjéből álló komplexek, esetleg jelátviteli utak nagyobb szakaszai is könnyedén vizsgálhatók egy kísérleti elrendezésen belül (Wang et al., 2018). Manapság a módszert már nem csak interakciós partnerek keresésére használják, egyre elterjedtebb, hogy adott interakciót katalizáló, illetve gátló gyógyszerjelöltek után kutatnak. Eme kutatásokban különféle molekulakönyvtárakat tesztelnek végig, két kölcsönható fehérjére már optimalizált rendszerben (Dai et al., 2013); (Shekhawat and Ghosh, 2011).

4. Célkitűzések

Bizonyos tumorok rezisztensek, vagy rezisztenssé válhatnak az alkalmazott kemoterápiás szerrel szemben. Ezen rezisztenciák egy közös pontja a transzléziós szintézis, mely időleges inhibíciójával növelhető a tumorok érzékenysége a genotoxikus ágensekkel való kezelésre, azonban a TLS folyamatos, hosszan tartó gátlása megnövelheti a genomi instabilitást az egészséges sejtekben.

Csoportunkban olyan kismolekulákat kerestünk és vizsgáltunk *in vitro* biokémiai reakciókban, melyek képesek a PCNA fehérje ubikvitinációját gátolni, ami a TLS aktiválásának egyik fő előfeltétele. Korábbi kísérleteink alapján az NSC 623095-ös és az NSC 338106-os kismolekulák képesek gátolni ezt az interakciót, a Rad6 és a Rad18 fehérjék kölcsönhatásának inhibícióján keresztül. Ugyanakkor az NSC 338107-es kismolekula, amely az NSC 338106-os izomere, egyik interakcióra sem mutatott gátló hatást. Munkánk következő lépéseként ezen kismolekula inhibitorok hatását humán sejtekben is vizsgálni kívántuk, mely megvalósításához a következő kísérleteket terveztük:

- Split-Venus protein-protein interakciót vizsgáló rendszer optimalizálása a Rad6-Rad18 interakcióra és a PCNA ubikvitinációra
 - megfelelő kombinációk kiválasztása
 - mikroszkópos szkennelés és analízis optimalizálása
- Az NSC 623095-ös kismolekula hatásának vizsgálata Split-Venus rendszerrel:
 - Rad6-Rad18 fehérjék közti interakcióra
 - Rad6-Rad18 fókuszok kolokalizációjának vizsgálata PCNA-val
 - PCNA ubikvitinációra
- Az NSC 338106-os és NSC 338107-es kódú kismolekulák hatásának vizsgálata Split-Venus rendszerrel:
 - Rad6-Rad18 fehérjék közti interakcióra
 - PCNA ubikvitinációra

5. Anyagok és módszerek

5.1. Oldatok

- 10xPBS puffer (foszfát puffereelt sóoldat): 80 g/l NaCl; 2 g/l KCl; 6,1 g/l Na₂HPO₄; a kísérletekhez 10x hígított oldat (1xPBS puffer)
- Fixáló oldat: 40 g/l paraformaldehid (PFA), 1xPBS-ben oldva, pH=6,9
- Tripszin oldat: 0,25% Tripszin-EDTA (1X), Gibco, katalógusszám: 25200-072
- DAPI oldat: 4 µl 4',6-diamidino-2-fenilindol (gyártó: Sigma-Aldrich, katalógusszám: 28718-90-3), 100 µl penicillin-streptomycin oldat (100x, Corning, katalógusszám: 30-002-Cl), 2,5 ml glicerol, 7,5 ml 1xPBS; kísérletekhez 1000× hígítva 1×PBS oldatban
- Blokkoló oldat immunfestéshez: (50 ml) 5 ml FBS; 45 ml 0,1%-os TritonX oldat 1xPBS-ben oldva
- Preextrakciós oldat: 0,5% TritonX-100; 20 mM HEPES (pH 7,4); 3 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 300 mM szukróz;

5.2. Antibiotikumok, szelekciós reagensek

- penicillin-streptomycin oldat (1 g streptomycin, 10⁶ NE penicillin/100 ml oldatban, 100x, Corning, katalógusszám: 30-002-Cl)

5.3. Tápoldatok

- komplett/szelekciómentes tápoldat: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich, katalógusszám: D6429), 10% FBS (Fetal bovine serum, Gibco, katalógusszám: 10270-106), 1% penicillin-streptomycin oldat (1 g streptomycin, 10⁶ NE penicillin/100 ml oldatban, 100x, Corning, katalógusszám: 30-002-Cl)
- Lipofectamin 2000 transzfekcióhoz használt tápoldat: OptiMEM (Gibco, katalógusszám: 31985062)

5.4. Transzfekciós reagensek

Lipofectamine 2000 (Invitrogen, katalógusszám: 11668019)

5.5. Ellenanyagok

- nyúl anti-hPCNA (Santa Cruz Biotechnologies, katalógusszám: sc7907), immunfestéshez: 200x-os hígításban használva
- kecske anti-nyúl IgG Alexa Fluor 568 konjugált (Invitrogen, katalógusszám: A11011), immunfestéshez 200x-es hígításban használva

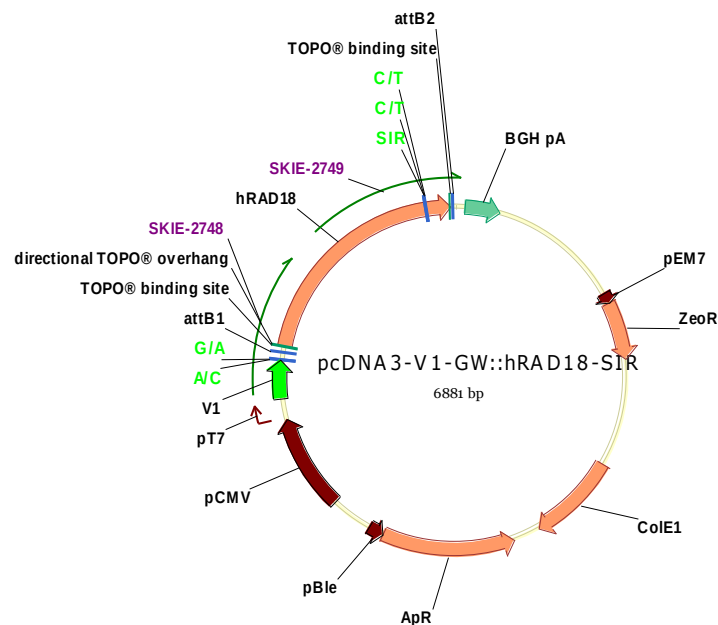
5.6. Sejtkultúrák

- HeLa: ATCC, Cat#CCL-2

A HeLa sejteket inkubátorban 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett, komplett médiumban növesztettük.

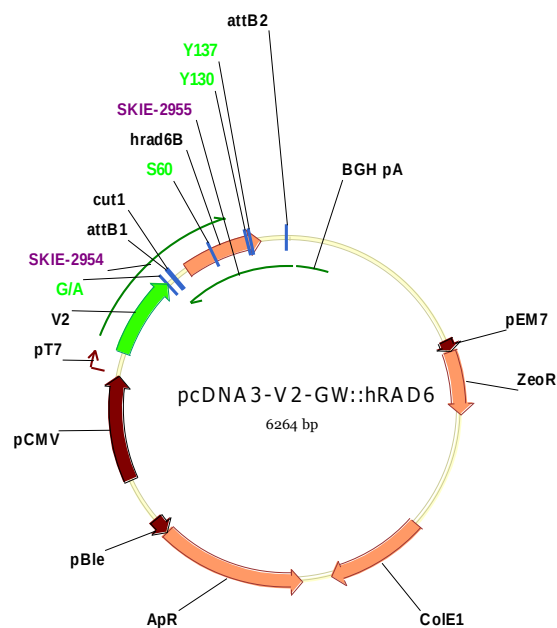
5.7. Plazmidok

- pcDNA3-V1-GW::hRad18: A Venus1-Rad18 fúziós fehérje folyamatos termelődését biztosító emlős expressziós vektor (4. ábra).



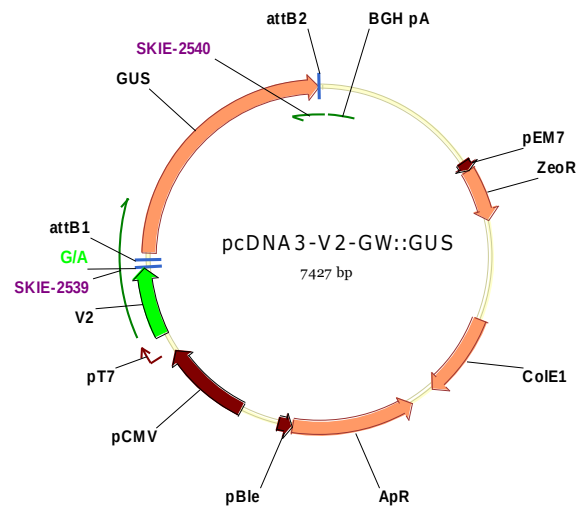
4. ábra: A pcDNA3-V1-GW::hRad18 plazmid térképe

- pcDNA3-V2-GW::hRad6: A Venus2-Rad6 fúziós fehérje folyamatos termelődését biztosító emlős expressziós vektor (5. ábra).



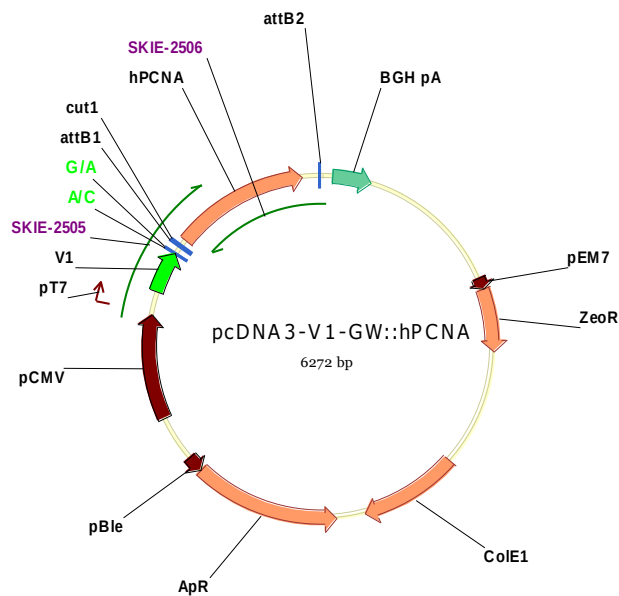
5. ábra: A pcDNA3-V2-GW::hRad6 plazmid térképe

- pcDNA3-V2-GW::GUS: Venus2-GUS fúziós fehérje folyamatos termelődését biztosító emlős expressziós vektor, melyet kísérleteinkben kontrollként használtunk (6. ábra).



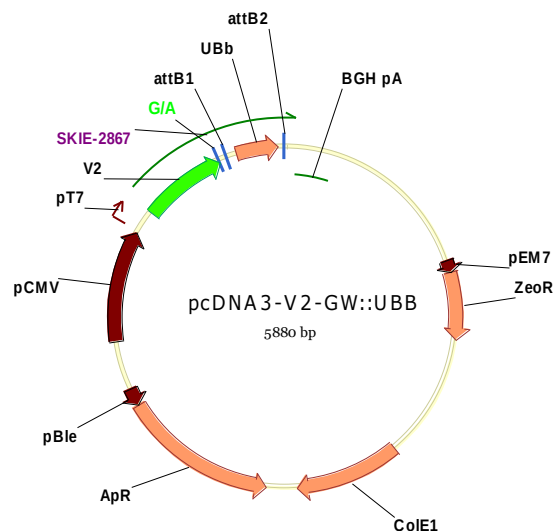
6. ábra: A pcDNA3-V2-GW::GUS plazmid térképe

- pcDNA3-V1-GW::PCNA: A Venus1-PCNA fúziós fehérje folyamatos termelődését biztosító emlős expressziós vektor (7. ábra).



7. ábra: A pcDNA3-V1-GW::PCNA plazmid térképe

- pcDNA3-V2-GW::Ubikvitin: A Venus2-Ubikvitin fúziós fehérje folyamatos termelődését biztosító emlős expressziós vektor (8. ábra).



8. ábra: A pcDNA3-V2-GW::Ubikvitin plazmid térképe

5.7.1. A kísérletekhez használt további plazmidok

- pcDNA3-GW-V1::mMEK-1
- pcDNA3-GW-V2::hTRB-1
- pCDNA3-V1-GW::GUS
- pcDNA3-V1-GW::hRad6
- pcDNA3-V2-GW::hRad18
- pcDNA3-GW-V1::hRad18
- pcDNA3-GW-V2::hRad6
- pcDNA3-GW-V1::hRad6
- pcDNA3-GW-V2::hRad18
- pcDNA3-V1-GW::UBB
- pcDNA3-V2-GW::hPCNA
- pcDNA3-GW-V1::hPCNA
- pcDNA3-GW-V2::hPCNA

5.8. Módszerek

5.8.1. HeLa sejtek transzfekciója

A HeLa sejteket 6 lyukú lemezen elhelyezett fedőlemezekben növesztettük, megközelítően 70%-os sejtsűrűségig. A transzfekciót Lipofectamine 2000 reagenssel végeztük a gyártó ajánlása alapján. A plazmid DNS-t ($\Sigma 4 \mu\text{g}$), valamint a Lipofectamin 2000 reagenst (10 μl) két külön 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőben mértük össze OptiMEM-mel, 250-250 μl végtérfogatban. Vortexelést és 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubációt követően egy csőbe mértük össze a DNS-OptiMem és a transzfekciós reagens-OptiMem elegyet, majd egy újabb vortexelést követően 20 percig inkubáltuk szobahőn. Ezalatt leszívtuk a sejtekről a tápoldatot, helyére 2 ml

OPTIMEM-et mértünk. Az inkubáció letelte után a transzfekciós elegyet a sejtekre csepegtettük, lyukanként eltérő plazmidkombinációkat alkalmazva, majd 4 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on, végül a transzfekciós tápoldatot friss, komplett tápoldatra cseréltük.

5.8.2. A sejtek kezelése kismolekulákkal

24 órával a transzfekciót követően a fedőlemezeket áthelyeztük 24 lyukú lemezre úgy, hogy minden fedőlemez külön lyukba került. A sejtekre kismolekulával kiegészített komplett tápoldat került. A Rad6-Rad18 interakció vizsgálatánál minden kismolekula esetén 4 különböző koncentrációt (100-400 μM) és egy kismolekula nélküli, a molekulák oldószerét (DMSO) tartalmazó kontrollt használtunk párhuzamosan. A PCNA ubikvitináció vizsgálatnál a DMSO kontroll mellett csak egy koncentrációban (300 μM) alkalmaztuk az adott kismolekulát. A kismolekula tartalmú tápoldatokban 6 órát inkubáltuk a sejteket, majd az inkubáció lejártakor a tápoldatot friss, komplettre cseréltük.

5.8.3. Sejtek UV kezelése

A sejtek UV kezelését a transzfekciót követő napon végeztük el (kismolekulával is kezelt minták esetén 3 óra kismolekulával való inkubáció után végeztük az UV kezelést, majd a besugárzás után a sejtekre visszamértük a kismolekula tartalmú tápoldatot újabb 3 órára). Ehhez először eltávolítottuk róluk a tápoldatot, majd 1xPBS-sel történő mosást követően a sejteket 20 J/m^2 intenzitású UV fénnel sugároztuk be. A kezelés után a sejtekre friss, komplett tápoldatot mértünk, majd a sejtenyésző termosztátban inkubáltuk azokat 3 órán keresztül. A mintákat az inkubáció lejárta után fixáltuk mikroszkópos analízishez.

5.8.4. Sejtek immunfestése

A kismolekula kezelést követően 1x PBS-sel mostuk, majd 1-1 ml preextrakciós pufferben permeabilizáltuk a sejteket 4 °C-on 5 percig. A puffer leszívása után 4%-os PFA oldatban inkubáltuk a mintákat 4 °C-on 20 percig, amit egy 1x PBS-el való mosás követett. Ezután metanolos fixálás következett 20 percig -20°C-on, majd a sejteket háromszor mostuk 1xPBS-sel. Ezt követően lyukanként 2-2 ml blokkoló oldatot mértünk a mintákra. Másfél óra blokkolást követően leszívtuk a sejtekről az oldatot. Ezután helyeztük a mintáinkra az elsődleges ellenanyagot (anti-PCNA) 200x-os hígításban, blokkoló oldatban, fedőlemezenként 100 μl -t. 45 perc szobahőn történő inkubációt követően eltávolítottuk az ellenanyagot a sejtekről, majd 5-ször mostuk őket 0,1%-os TritonX oldattal. A mosás után helyeztük a sejtekre a másodlagos ellenanyagot (Alexa Fluor 568 konjugált anti-nyúl) szintén 200x-os hígításban, fedőlemezenként 100 μl -t, majd 45 percet inkubáltuk a sejteket szobahőmérsékleten. Az ellenanyag eltávolítását követően a mintákat 5-ször mostuk 0,1%-os TritonX oldatban. Ezután

a sejteket DAPI-val festettük, végül körömlakk segítségével rögzítettük a fedőlemezeket a tárgylemezekre.

5.8.5. A sejtek fixálása és festése mikroszkópos analízishez

A tápoldat leszívása után 1x PBS-sel mostuk a sejteket, majd 4%-os fixáló oldatban (4%-os paraformaldehid oldat) inkubáltuk 10 percet. A fixáló oldat leszívása után kétszer alaposan átmostuk a sejteket 1xPBS-sel, majd DAPI oldatot mértünk rájuk a sejtmagok festéséhez. 5 perc inkubációt követően eltávolítottuk a DAPI oldatot a sejtekről, majd egy 1xPBS-sel történő mosást követően a fedőlemezeket körömlakk segítségével tárgylemezeken rögzítettük.

5.8.6. A minták mikroszkópos analízise

A minták vizsgálatát az ImageXpress Micro Confocal mikroszkóp (Molecular Devices) segítségével végeztük. Minden fedőlemezről 100 képet készítettünk, melyeken 2-4000 sejt volt átlagosan. A lemezeket két hullámhosszon szkenneltük: DAPI: 447 nm és FITC: 536 nm. Excitációs/gerjesztési idők: DAPI: 100 ms, FITC: 100 ms. A PCNA immunfestett mintákat harmadik hullámhosszon (Texas Red: 624 nm) is szkenneltük, a gerjesztési idő 100 ms volt. A szkenneléshez Plan Apo λ 40X-es objektívet használtunk. A szkennelés során készített fotókat az Egyedi modul szerkesztő segítségével általunk létrehozott „BiFC with transfluor” nevű programmal analizáltuk, mellyel a Venus+ fókuszok számát vizsgáltuk a sejtmagok területén. PCNA immunfestett minták esetén a „BiFC with Transfluor+immunostaining” nevű programot használtuk. A programokban használt paraméterek az alábbiak:

Név: „BiFC with transfluor”

- Minimum sejtmagméret (DAPI): 5 μm (= 30 pixel)
- Maximum sejtmagméret (DAPI): 25 μm (= 150 pixel)
- Minimum fókuszméret (FITC): 0,5 μm (= 3 pixel)
- Maximum fókuszméret (FITC): 2 μm (= 12 pixel)
- Minimum intenzitás a környező háttérhez képest (DAPI): 1000 graylevel (pixelintenzitás)
- Minimum intenzitás a környező háttérhez képest (FITC): 3000 graylevel (pixelintenzitás)

Név: „BiFC with transfluor+immunostaining”

- Minimum sejtmagméret (DAPI): 5 μm (= 30 pixel)
- Maximum sejtmagméret (DAPI): 25 μm (= 150 pixel)
- Minimum fókuszméret (FITC): 0,5 μm (= 3 pixel)

- Maximum fókuszméret (FITC): 2 μm (= 12 pixel)
- Minimum fókuszméret (Texas Red): 0,5 μm (= 3 pixel)
- Maximum fókuszméret (Texas Red): 2 μm (= 12 pixel)
- Minimum intenzitás a környező háttérhez képest (DAPI): 1000 graylevel (pixelintenzitás)
- Minimum intenzitás a környező háttérhez képest (FITC): 3000 graylevel (pixelintenzitás)
- Minimum intenzitás a környező háttérhez képest (Texas Red): 300 graylevel (pixelintenzitás)

A kapott értékeken varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk a GraphPad Prism 7.0 programcsomag segítségével.

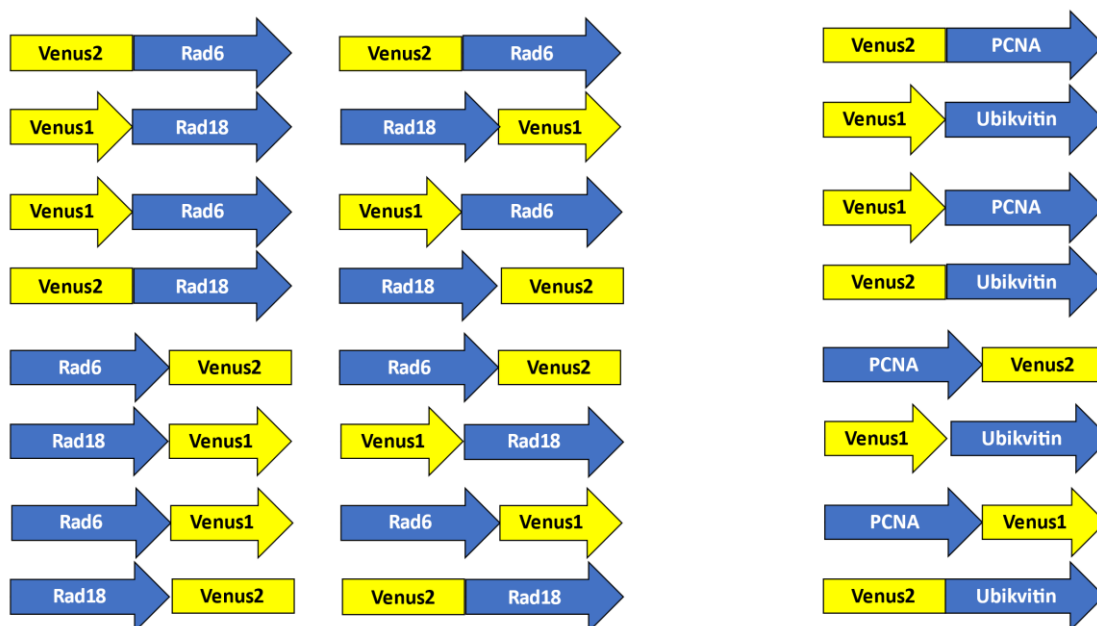
(nem szignifikáns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$)

A grafikonokon a hibasávok az átlag standard hibáját (SEM: Standard Error of Mean) jelölik.

6. Eredmények

6.1. Megfelelő kombinációk kiválasztása

Annak érdekében, hogy humán sejtekben is vizsgálhassuk az *in vitro* biokémiai előkísérletek alapján kiválasztott ígéretes kismolekulák hatását, létrehoztunk egy rendszert, amely a bimolekuláris fluoreszcencia komplementáció (BiFC) jelenségén alapszik. Első lépésként a Rad6 és Rad18 cDNS szekvenciákat olyan emlős expressziós vektorokba klónoztuk, amelyek a Venus gén N- és C-terminális darabjával hoznak létre N- illetve C-terminális fúziókat, majd meghatároztuk azt a kombinációt a lehetséges nyolcból (9. ábra), mellyel a Rad6-Rad18 interakciót legjobban vizsgálhattuk. Erre a lépésre azért volt szükség, mert a Venus fragmentek befolyásolhatják a vizsgált fehérjék interakcióját, attól függően, hogy a fehérjék N- vagy C-terminálisához vannak fűzionáltatva. Az eltérő kombinációk különböző erősségű jelet adhatnak, továbbá a Venus fragment elhelyezkedése a minták fluoreszcens hátterének mértékét is befolyásolhatja. Kísérleteinkben HeLa sejteket transzfektáltunk Lipofectamine 2000 reagens segítségével, a már említett nyolcféle kombinációban. Mellettük pozitív kontrollként a MEK1-TRIB1 fehérjepárt használtuk, melyek bizonyított interakciós partnerek, az általunk használt rendszerben homogén jelet adnak a sejtmag területén (Yokoyama and Nakamura, 2011). Negatív kontrollként a GUS fehérje szolgált, mindig a vizsgált fehérjék egyikével kombinálva. Mivel a GUS egyik általunk vizsgált fehérjével sem lép kölcsönhatásba, ezért nem látható Venus pozitív jel a GUS-t tartalmazó kontrollban. 24 órával a transzfekciót követően 4%-os PFA oldattal fixáltuk és DAPI oldattal festettük a mintákat, előkészítve azokat mikroszkópos analízishez. A sejtmagokban UV kezelés nélkül is láthatóak voltak a Venus+ fókuszok. A vizsgált kombinációk közül a Venus1-Rad18 + Venus2-Rad6 párosítás adta a legerősebb jelet, minimális háttérrel, ezért a további kísérletekben ezt a kombinációt használtuk.



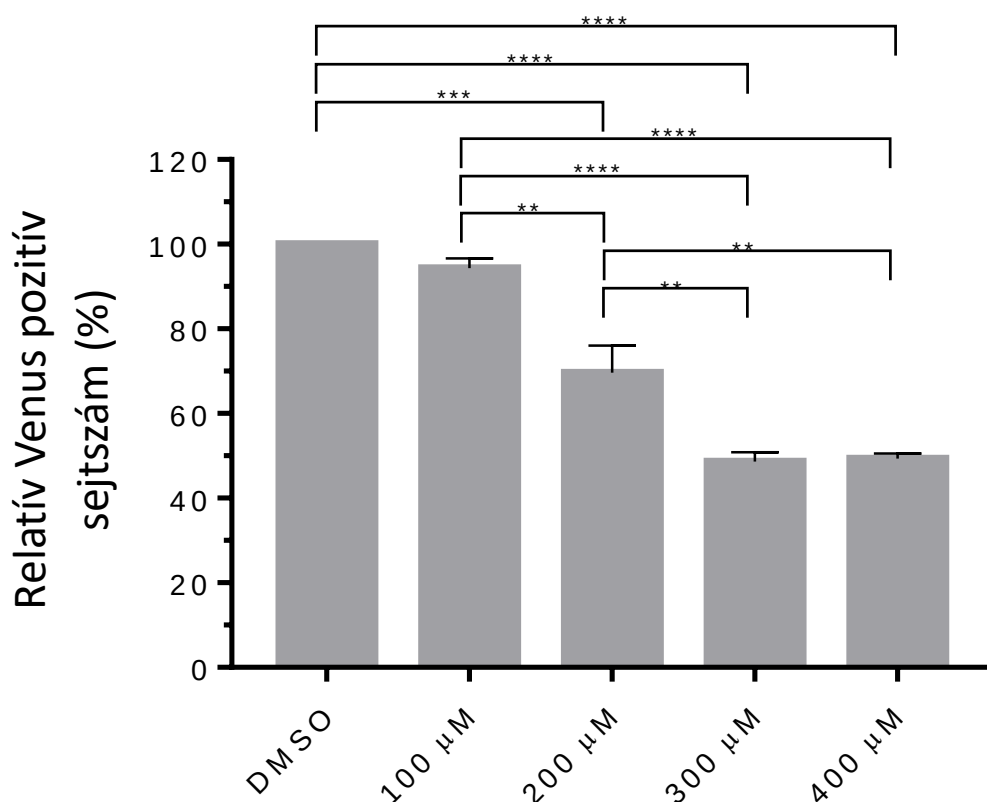
9. ábra: A Rad6-Rad18 és PCNA-Ubikvitin fehérjepárok lehetséges kombinációi a BiFC rendszerben

A PCNA és az ubikvitin fehérjepár esetében is hasonlóan jártunk el. E két fehérje esetén feleannyi különböző kombináció lehetséges, mint a Rad6-Rad18 esetén, mert az ubikvitin nem tud a célfehérjéhez kötődni, ha a C-terminális feléhez kapcsolunk egy másik fehérjét (Haas et al., 1983). A lehetséges kombinációk a korábban is említett 9. ábrán láthatóak. Továbbá mind a pozitív, mind a negatív kontroll megegyezett a korábban használtakkal. A megfelelő kombinációt hasonlóan határoztuk meg, mint a Rad6-Rad18 fehérjepár esetén, a PCNA-ubikvitin pár esetén azonban az egyedi fókuszok csak UV kezelés után voltak láthatóak. A mintákat ugyanazzal a programmal analizáltuk, mint a Rad6-Rad18 kombinációkat. A legjobb párosításnak a Venus1-PCNA + Venus2-Ubikvitin bizonyult, ezért a további kísérletekben ezt a kombinációt használtuk.

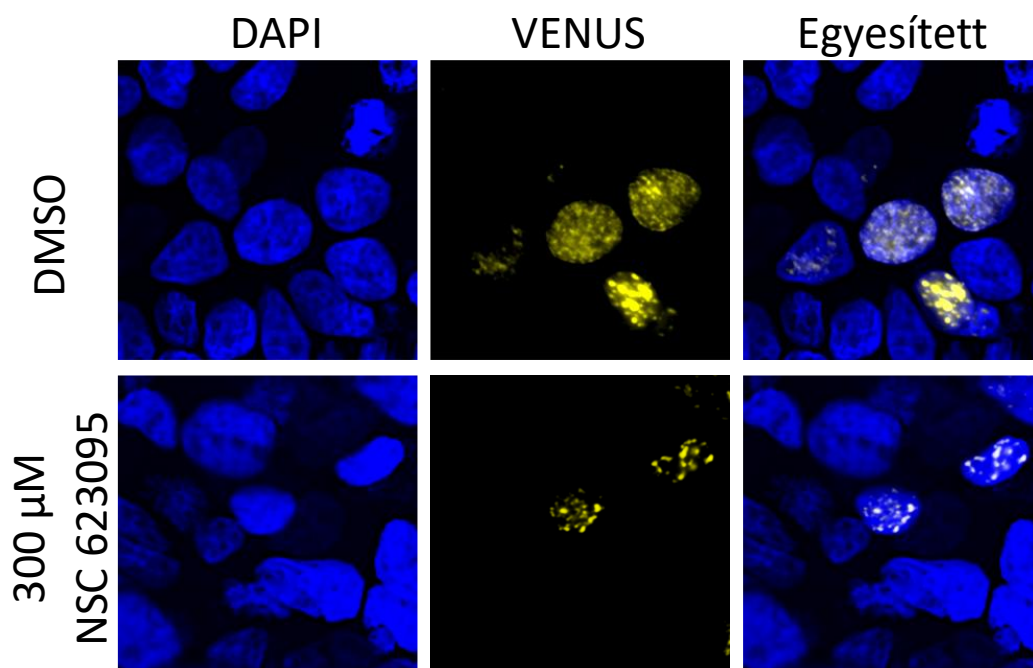
6.2. NSC 623095-ös kódú kismolekula hatásának vizsgálata a Rad6-Rad18 interakcióra

HeLa sejteket 1 cm átmérőjű kis fedőlemezekben növesztettünk, melyeket 6 lyukú lemezben helyeztünk el, lyukanként 5-5 darabot, majd 70%-os konfluenciánál a sejteket kotranszfectáltuk Venus1-Rad18-at és Venus2-Rad6-ot kódoló plazmidokkal 1:1 arányban, Lipofectamine 2000 reagenst használva. A transzfectiót követő napon a fedőlemezeket 24 lyukú lemezre helyeztük át, minden fedőlemezt külön-külön lyukba. Ezzel biztosítottuk, hogy a későbbiekben a különböző koncentrációjú kismolekula kezelésnek kitett sejtek egy transzfectációs elegyből származzanak, így a kvantitálás során nem okoznak gondot a transzfectációs hatékonyság esetleges eltérései. A fedőlemezek áthelyezése után a sejtekre a kismolekulát tartalmazó tápoldatot mértünk, melyek koncentrációja rendre 100, 200, 300 és 400 μM -os volt, emellett

kontrollnak az ötödik fedőlemezen levő sejtekre DMSO-val kiegészített tápoldat került, ami azért volt megfelelő kontroll a kísérletben, mert a kismolekulákat hatásuk vizsgálatához DMSO-ban oldva használtuk. Hat óra inkubációt követően a sejteket 1xPBS-sel mostuk, majd fixáltuk, és DAPI-val festettük mikroszkópos analízishez. A mintákat ImageXpress Micro Confocal mikroszkóppal szkenneltük. A fotókat az ImageXpress programcsomag segítségével dolgoztuk fel. A programba beépített Custom Modul Editor segítségével létrehoztuk a feladatra optimalizált „BiFC with transfluor” nevű modult, aminek a segítségével analizáltuk a képeket. Az eredmények kiértékelése során azokat a sejtmagokat számoltuk Venus pozitívnak, melyekben 15 vagy több fókusz volt jelen, ezzel kizárva a háttér és az esetleges műhiba okozta jeleket a statisztikából. A 10. ábrán láthatóak a mikroszkópos analízis eredményei, ahol a különböző kismolekul- koncentrációk hatását a DMSO kontrollhoz viszonyítva ábrázoltuk.



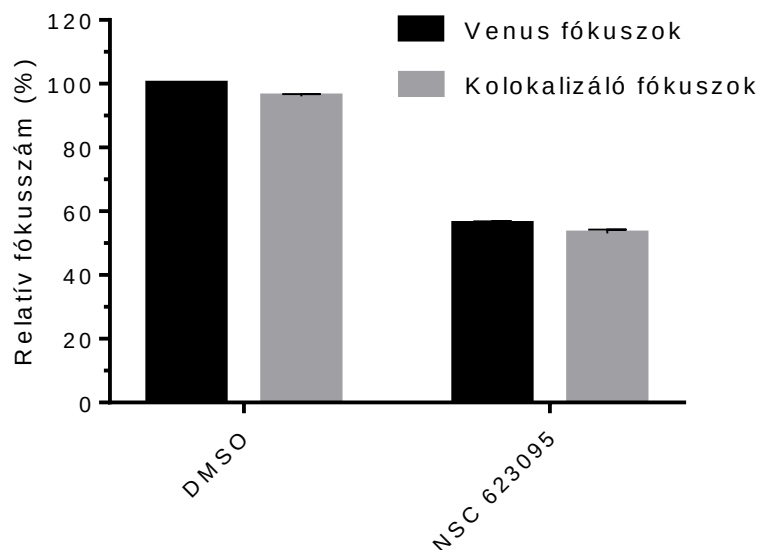
10. ábra: Az NSC 623095-ös kismolekula hatása a Rad6-Rad18 interakcióra különböző koncentrációkban
Az eredményekből arra következtethetünk, hogy az NSC 623095-ös kismolekula humán sejtekben is képes gátolni a Rad6-Rad18 interakciót, valamint hatása dóziszfüggő. A legnagyobb mértékű inhibíciót 300 µM-os koncentrációnál tapasztaltuk, 400 µM esetén a molekula enyhén, felette már erősen toxikus volt a sejtekre nézve. A kismolekula hatására mind a Venus pozitív sejtek aránya, mind az egyedi sejtekben lévő Venus fókuszok száma csökkent (11. ábra).



11. ábra: Az NSC 623095-ös kismolekula gátló hatása a Rad6-Rad18 interakcióra humán sejtekben

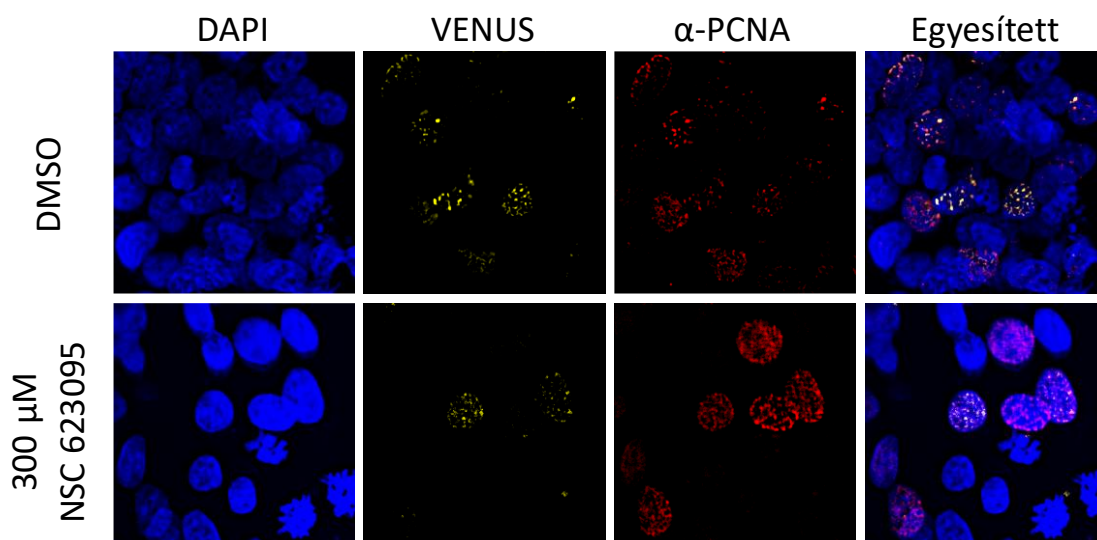
6.3. A Rad6-Rad18 fókuszok kolokalizációja PCNA-val

A szakirodalom szerint a Rad6 és Rad18 fehérjék heterotrimert formálnak (Huang et al., 2011). Ez a fehérjekomplex kapcsolja az ubikvitint a PCNA-ra. Ez alapján azt feltételeztük, hogy a kísérleteinkben látott Rad6-Rad18 komplexeket jelző Venus+ fókuszok kolokalizálnak a PCNA fehérjével. Hogy erről megbizonyosodjunk, a mintáinkat immunfestettük anti-PCNA ellenanyaggal. A mikroszkópos szkennelést követően az analízist a korábban említett Custom Module Editor segítségével erre a célra létrehozott „BiFC with transfluor+immunostaining” nevű programmodullal végeztük. Az eredmények alapján a Venus+ fókuszok majdnem 100%-a kolokalizált PCNA fókuszokkal. Ez az arány akkor sem változott, amikor a sejteket az NSC 623095-ös kismolekulával kezeltük, mely gátolta a Rad6 és Rad18 közti interakciót (12. ábra).



12. ábra: PCNA-val kolocalizáló Venus+ fókuszok aránya NSC 623095 kezeléssel és anélkül

Az inhibitor hozzáadása után, mint korábbi kísérleteinkben is, mind a Venus+ sejtek, mind a fókuszok száma lecsökkent (13. ábra).

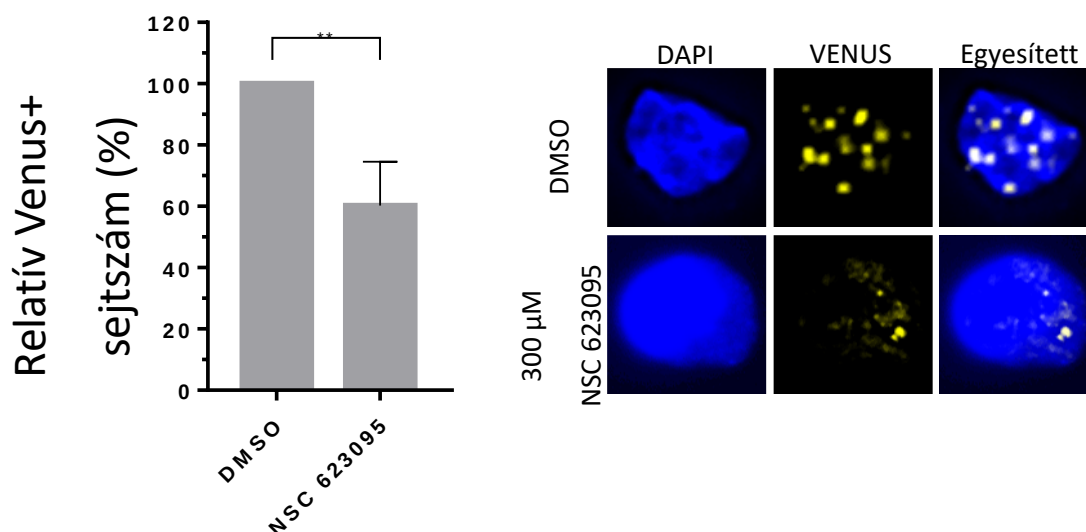


13. ábra: Venus+ fókuszok kolocalizációja PCNA-vel humán sejtekben NSC 623095 kezelés mellett, illetve anélkül

6.4. Az NSC 623095-ös kódú kismolekula hatásának vizsgálata a PCNA-ubikvitin interakcióra

Miután kísérleteinkből kiderült, hogy a vizsgált kismolekula élő sejtekben is képes gátolni a Rad6-Rad18 interakciót, következő lépésként azt bizonyítottuk, hogy az előbb említett inhibíció eredményeképp a PCNA ubikvitináció is gátolt. A kísérleti elrendezés a Rad6-Rad18 interakciót vizsgáló munkamenethez hasonló volt. A sejteket először kotranszfectáltuk

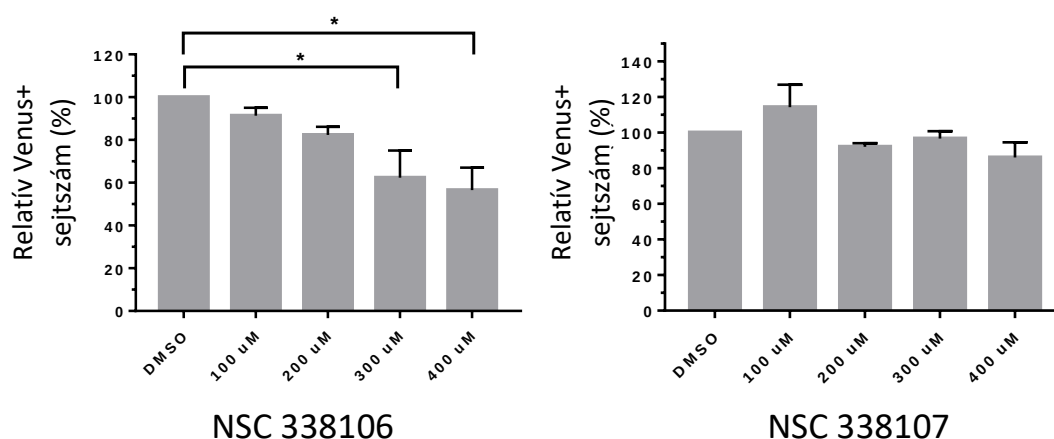
Lipofectamine 2000-rel a Venus1-PCNA-t és Venus2-Ubikvitint kódoló plazmidokkal, a korábbiakban ismertetett protokoll alapján, viszont ebben az esetben a plazmidokat 1:7 (PCNA:ubikvitin) arányban alkalmaztuk. 24 órával a transzfekciót követően a sejteket a kis fedőlemezekkel áthelyeztük 24 lyukú lemezre. A fedőlemezek felére DMSO, másik felére 300 μ M-os kismolekula koncentrációjú tápoldatot mértünk. Három óra inkubáció után leszívtuk a sejtekről a tápoldatot, 1xPBS-sel mostuk azokat, majd mind a kontroll, mind pedig a kismolekulával kezelt minták felét UV sugárzásnak tettük ki (20 J/m²). Az UV kezelés után a sejtekre visszahelyeztük a korábban leszívott tápoldatot, majd további 3 órát inkubáltuk azokat. Az inkubáció lejárta után fixáltuk és festettük a sejteket mikroszkópos analízishez. A minták szkennelését és analízisét a 6.2. fejezetben leírt módon végeztük. Venus+ sejteknek csak azokat számoltuk, melyek 15, vagy több PCNA-ubikvitin fókuszt tartalmaztak. A kísérletek alapján kijelenthetjük, hogy várakozásainknak megfelelően a kismolekula gátolta a PCNA ubikvitinációt, megközelítően 40%-kal csökkentve a Venus+ sejtek arányát (14. ábra), továbbá csökkentette az egy sejtmagban kialakuló fókuszok mennyiségét is. Emellett az NSC 623095-tel kezelt mintákban látható fókuszok jóval kisebb méretűek és alacsonyabb intenzitásúak voltak, mint a DMSO kontrollban láthatóak. Összesítve az eredményeink alapján, az NSC 623095-ös kódú kismolekula az *in vitro* biokémiai kísérletekhez hasonlóan élő sejtekben is effektíven képes gátolni a PCNA és az ubikvitin fehérjék közti kölcsönhatást.



14. ábra: Az NSC 623095-ös kismolekula hatása a PCNA ubikvitinációra humán sejtekben

6.5. Az NSC 338106 és 338107-es kódú kismolekulák hatásvizsgálata a Rad6-Rad18 interakcióra

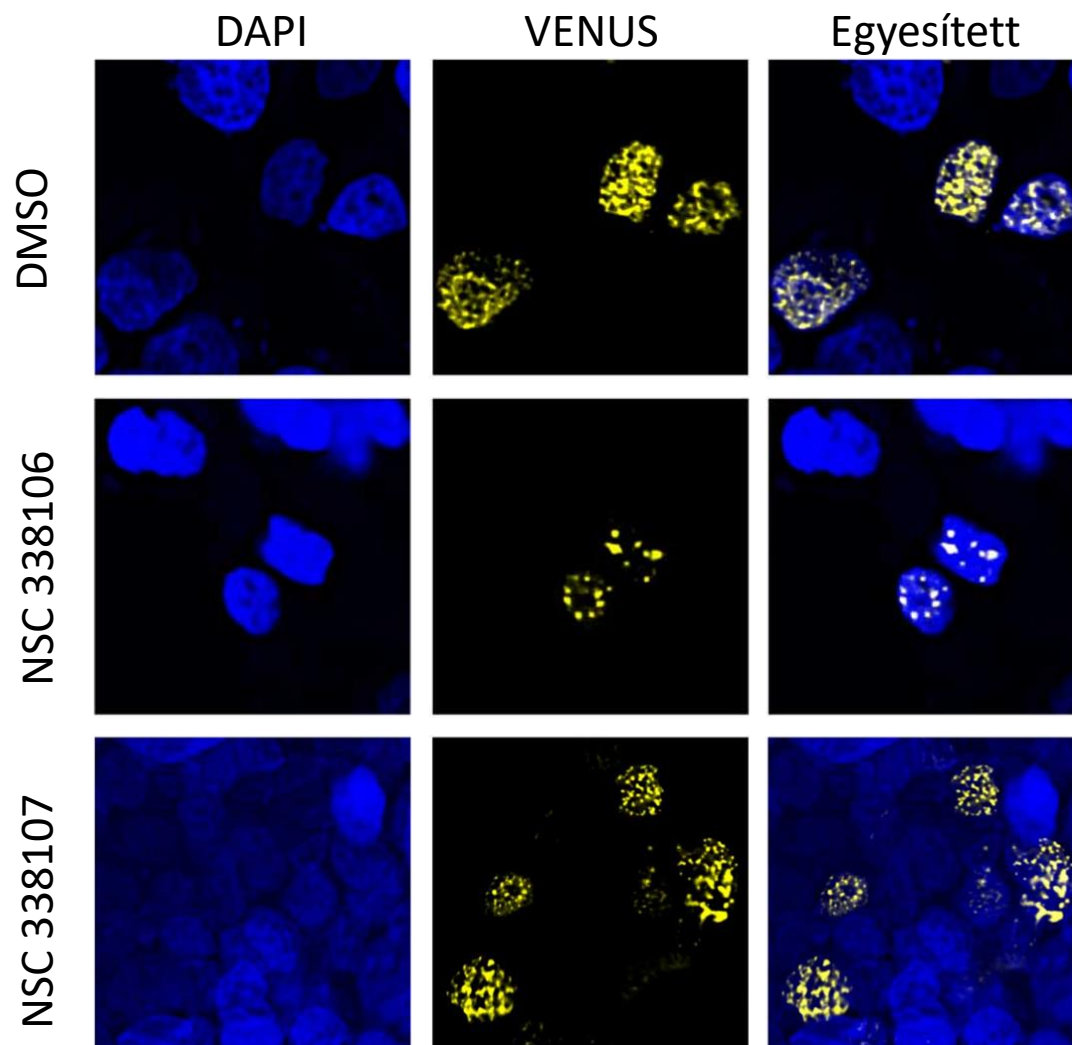
Az NSC 338106-os és 338107-es kismolekulák egymás izomerei, *in vitro* azonban eltérő hatást mutattak, ezért a Rad6-Rad18 interakcióra kifejtett hatásukat humán sejtekben egyszerre vizsgáltuk, a 623095-ös kódúval megegyező módon. Először HeLa sejteket kotranszfektáltunk 70%-os konfluenciánál, Lipofectamine 2000 reagens segítségével. A transzfekciót követő napon 24 lyukú lemezre helyeztük át, majd kismolekulát tartalmazó (100, 200, 300 és 400 μ M koncentrációjú), illetve DMSO-val kiegészített tápoldatot mértünk a sejtekre, melyben 6 órát inkubáltuk a mintákat. A sejteket az inkubációt követően előkészítettük mikroszkópos analízishez, először fixáltuk, majd DAPI-val festettük azokat. A mintákat a 6.2. fejezetben leírt módon szkenneltük és analizáltuk. Ez esetben is csak azokat a sejteket számoltuk Venus pozitívnak, melyek sejtmagjában 15 vagy több fókusz volt látható. Ezekben a kísérletekben is a DMSO kontrollhoz viszonyítottuk a különböző koncentrációjú kismolekulák hatását. Az eredmények alapján az NSC338106-os kódú kismolekula humán sejtekben is képes volt a Rad6-Rad18 interakciót gátolni. Az NSC 623095-ös kismolekulához hasonlóan a hatása dózisfüggő, attól eltérően azonban a legnagyobb inhibíciót 400 μ M-os koncentráció esetén láttuk, efelett a molekula már toxikus volt a sejtekre nézve. Ugyanakkor az NSC 338107-es kódú kismolekula ahogy a korábbi, *in vitro* biokémiai kísérleteinkben sem, élő sejtekben sem volt képes gátolni a Rad6 és Rad18 fehérjék közötti interakciót, mivel még 400 μ M-os koncentrációnál sem tapasztaltunk szignifikáns változást (15. ábra).



15. ábra: Az NSC 338106-os és az NSC 338107-es kismolekulák hatása a Rad6-Rad18 interakcióra különböző koncentrációkban

Előbbi kismolekula esetén mind a Venus fókuszokat tartalmazó sejtek, mind a sejtmagi fókuszok száma lecsökkent, míg utóbbinál egyik hatás sem volt detektálható, még a

legmagasabb, 400 μ M-os koncentráció esetén sem, továbbá a fókuszok mérete és intenzitása sem mutatott változást a kismolekula hatására (16. ábra).



16. ábra: Az NSC 338106-os és az NSC 338107-es kismolekulák hatása a Rad6-Rad18 interakcióra humán sejtekben

7. Összegzés

Sejtjeink örökítő anyagát folyamatosan érik külső és belső hatások, hibákat okozva a DNS-ben és torzítva annak szerkezetét, melyek kijavítására többféle, specifikus útvonal alakult ki. Ezen mechanizmusok folyamatosan monitorozzák a genomot hibákat keresve, de ha ezek a sejtciklus S fázisáig nem javítódnak ki, a replikációs villa elakad a DNS-hibák okozta torzió miatt. Az elakadt replikációs villák összeomolhatnak, kettős szálú töréseket okozva, melyek genomi átrendeződésekhez, genomi instabilitáshoz, karcinogenezishez is vezethetnek. Ennek elkerülése végett többféle mechanizmus alakult ki az élőlényekben, melyek fő feladata a genom integritásának és stabilitásának fenntartása. Az egyik legismertebb ilyen hibajavító útvonal a transzléziós szintézis, mely során az elakadt replikatív polimeráz időlegesen lecserélődik egy alacsony fidelitású transzléziós polimerázra, mely képes áthaladni a hibán, majd az eredeti polimeráz visszakerül a DNS szálra és folytatja a szintézist. A TLS polimerázok pontatlanságuk miatt azonban pontmutációkat hagyhatnak a DNS-ben, amik genomi instabilitáshoz, tumorheterogenitáshoz, másodlagos tumorok kialakulásához, valamint kemorezisztenciához vezethetnek. Ezért a TLS folyamatának gátlása ígéretes gyógymód lehet akár önmagában is, avagy adjuváns terápiaként DNS-károsító ágensek mellett, csökkentve a kemorezisztenciát és apoptózist indukálva. Több kutatás is kimutatta azonban, hogy a transzléziós szintézis gátlása gyorsabb, nagyobb fokú tumorgenezissel párosul. Ennek okán hosszabb távú gátlása nem javasolt, hiszen, ha az egészséges sejtekben is gátolt a TLS folyamata, az nagyban megnöveli a genomi instabilitás mértékét. Ezért kezelésként tranzienst inhibíciója ajánlott.

Napjainkra már számos fehérje-fehérje interakciót célzó kismolekula inhibitorral találtak, és a vizsgálatukra és felfedezésükre használt módszerek és technikák is folyamatosan fejlődnek. A klinikumban azonban csak kevés inhibitorjelölt használható, mivel a gyógyszerként használt anyagoknak nemcsak *in vitro*, hanem *in vivo* is hatásosaknak kell lenniük, még hozzá alacsony koncentrációban, továbbá fontos, hogy a lehető legnagyobb szelektivitásúak legyenek, ezzel is csökkentve a lehetséges mellékhatásokat (Villafañe et al., 2019).

Csoportunk olyan kismolekulákat keresett, melyek képesek a transzléziós szintézist gátolni a TLS aktiválásának fő lépésén, a PCNA ubikvitináció folyamatának inhibícióján keresztül. Különböző kismolekula könyvtárak *in vitro* vizsgálata során több olyan jelöltet is találtunk, melyek képesek voltak a két fehérje interakcióját gátolni. A két legígéretesebb gátlószer az NSC 623095-ös, valamint az NSC 338106-os kódúak voltak, melyek az előzetes *in vitro* eredmények alapján képesek megakadályozni a Rad6-Rad18 fehérjék együttműködését. Előbbi a Rad18, utóbbi a Rad6 fehérjéhez kötődik. Ezen kismolekulák hatását humán sejtekben is vizsgálni

kívántuk, továbbá az NSC 338106-os molekula mellett az NSC 338107-eset is elemeztük, mely az előbbi izomere, *in vitro* azonban nem mutatott gátló hatást. Ahhoz, hogy ezen kismolekulák hatását humán sejtekben is kimutassuk, először optimalizáltuk a laboratóriumunkban használt Split-Venus protein-protein interakciót vizsgáló rendszert a Rad6-Rad18 és PCNA-ubikvitin fehérje párokra. Ennek keretében meghatároztuk mindkét fehérjepár esetén a megfelelő kombinációkat (Venus N- és C-terminális fragment fúziók), a transzfekciók, UV- és kismolekula kezelések paramétereit, valamint optimalizáltuk a minták szkennelését és analízisét ImageXpress mikroszkóppal. Ezután mind az NSC 623095-ös, mind az NSC 338106 és 338107-es kismolekulák hatását megvizsgáltuk humán HeLa sejtekben mind a Rad6-Rad18 interakcióra, mind a PCNA ubikvitinációjára. Ahogy az *in vitro* kísérletekben, az utóbbin kívül a másik két molekula humán sejtekben is képes volt mind a Rad6-Rad18, mind a PCNA-ubikvitin interakciók gátlására, továbbá hatásuk dóziszfüggőnek bizonyult. Eredményeink alapján HeLa sejtekben az NSC 623095-ös kismolekula hatásának maximuma 300 μ M-os koncentrációnál található, míg az NSC 338106-os inhibitorjelölt hatása 400 μ M-nál volt a legmagasabb, ahol megközelítően 50%-kal csökkentették a vizsgált fehérje-fehérje interakciók miatt kialakuló Venus fókuszok számát. Magasabb koncentrációban már mindkét molekula toxikusnak mutatkozott.

Eredményeink alapján a két legígéretesebb kismolekula *in vitro* és humán sejtekben is képes gátolni a PCNA ubikvitinációját a Rad6 és Rad18 fehérjék kölcsönhatásának inhibícióján keresztül. Azon kismolekula inhibitorok, melyek gátolják a transzléziós szintézist, hasznosak lehetnek kemorezisztens tumorok (például PARP-rezisztens, BRCA1 mutáns tumorok) kezelésében is, apoptózist indukálva a rákos sejtekben (Taglialatela et al., 2021). Tehát az NSC 623095-ös, valamint az NSC 338106-os kismolekulák lehetséges gyógyszerjelöltek lehetnek daganatellenes terápia során, ehhez azonban még számos további vizsgálat szükséges.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Haracska Lajosnak, a Mutagenesis és Karcinogenesis Kutatócsoport vezetőjének, amiért a csoport tagja lehetek és lehetőséget kaptam a szakdolgozatomhoz szükséges kísérletek elvégzésére. Szeretném külön megköszönni Gráf Alexandrának és Dr. Kiss Ernőnek a sok szakmai segítséget és a tanácsokat, melyekkel folyamatosan segítettek a munkámat, továbbá folyamatos és türelmes szupervíziójukat. Továbbá köszönöm Vincze-Kontár Katalin, Illésné Kovács Katalin, Hegedűs Lili és Dudás Kata tanácsait, melyekkel a munkámat segítették.

Legvégül szeretném megköszönni a Mutagenesis és Karcinogenesis Csoport minden tagjának a segítséget és támogatást, melyet a munkám során nyújtottak.

9. Irodalomjegyzék

- Andersen, P.L., Xu, F., and Xiao, W. (2008). Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res.* 18, 162–173.
- Dai, J.P., Zhao, X.F., Zeng, J., Wan, Q.Y., Yang, J.C., Li, W.Z., Chen, X.X., Wang, G.F., and Li, K.S. (2013). Drug Screening for Autophagy Inhibitors Based on the Dissociation of Beclin1-Bcl2 Complex Using BiFC Technique and Mechanism of Eugenol on Anti-Influenza A Virus Activity. *PLoS One* 8.
- Haas, A.L., Warms, J.V.B., and Rose, I.A. (1983). Ubiquitin Adenylate: Structure and Role in Ubiquitin Activation. *Biochemistry* 22, 4388–4394.
- Huang, A., Hibbert, R.G., De Jong, R.N., Das, D., Sixma, T.K., and Boelens, R. (2011). Symmetry and asymmetry of the RING-RING dimer of Rad18. *J. Mol. Biol.* 410, 424–435.
- Johnsson, N., and Varshavsky, A. (1994). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10340–10344.
- Kannouche, P., and Stary, A. (2003). Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases. *Biochimie* 85, 1123–1132.
- Kerppola, T.K. (2008). Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis as a Probe of Protein Interactions in Living Cells.
- Knobel, P.A., and Marti, T.M. (2011). Translesion DNA synthesis in the context of cancer research. *Cancer Cell Int.* 11, 1–19.
- Lafayette, W. (2010). Reports.
- Li, Q., Dudás, K., Tick, G., and Haracska, L. (2021). Coordinated Cut and Bypass: Replication of Interstrand Crosslink-Containing DNA. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 1–8.
- Miller, K.E., Kim, Y., Huh, W.K., and Park, H.O. (2015). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis: Advances and recent applications for Genome-Wide interaction studies. *J. Mol. Biol.* 427, 2039–2055.
- Ogi, T., Kannouche, P., and Lehmann, A.R. (2005). Localisation of human Y-family DNA polymerase κ : Relationship to PCNA foci. *J. Cell Sci.* 118, 129–136.
- Ohashi, E., Murakumo, Y., Kanjo, N., Akagi, J.I., Masutani, C., Hanaoka, F., and Ohmori, H. (2004). Interaction of hREV1 with three human Y-family DNA polymerases. *Genes to Cells* 9, 523–531.
- Petta, T.B., Nakajima, S., Zlatanou, A., Despras, E., Couve-Privat, S., Ishchenko, A., Sarasin, A., Yasui, A., and Kannouche, P. (2008). Human DNA polymerase iota protects cells against oxidative stress. *EMBO J.* 27, 2883–2895.
- Romei, M.G., and Boxer, S.G. (2019). Split Green Fluorescent Proteins : Scope , Limitations , and Outlook.
- Shaheen, M., Shanmugam, I., and Hromas, R. (2010). The role of PCNA posttranslational modifications in translesion synthesis. *J. Nucleic Acids* 2010.
- Shekhawat, S.S., and Ghosh, I. (2011). Review Split-protein systems : beyond binary protein – protein interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 789–797.

Stynen, B., Tournu, H., Tavernier, J., and Van Dijck, P. (2012a). Diversity in Genetic In Vivo Methods for Protein-Protein Interaction Studies: from the Yeast Two-Hybrid System to the Mammalian Split-Luciferase System . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 331–382.

Stynen, B., Tournu, H., Tavernier, J., and Van Dijck, P. (2012b). Diversity in Genetic In Vivo Methods for Protein-Protein Interaction Studies: from the Yeast Two-Hybrid System to the Mammalian Split-Luciferase System. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 331–382.

Taglialatela, A., Leuzzi, G., Sannino, V., Cuella-Martin, R., Huang, J.W., Wu-Baer, F., Baer, R., Costanzo, V., and Ciccia, A. (2021). REV1-Pol ζ maintains the viability of homologous recombination-deficient cancer cells through mutagenic repair of PRIMPOL-dependent ssDNA gaps. *Mol. Cell* 81, 4008-4025.e7.

Villafañez, F., García, I.A., Carbajosa, S., Pansa, M.F., Mansilla, S., Llorens, M.C., Angiolini, V., Guantay, L., Jacobs, H., Madauss, K.P., et al. (2019). AKT inhibition impairs PCNA ubiquitylation and triggers synthetic lethality in homologous recombination-deficient cells submitted to replication stress. *Oncogene* 38, 4310–4324.

Wang, S., Ding, M., Xue, B., Hou, Y., and Sun, Y. (2018). Live Cell Visualization of Multiple Protein – Protein Interactions with BiFC Rainbow.

Yamanaka, K., Chatterjee, N., Hemann, M.T., and Walker, G.C. (2017). Inhibition of mutagenic translesion synthesis: A possible strategy for improving chemotherapy? *PLoS Genet.* 13, 1–16.

Yokoyama, T., and Nakamura, T. (2011). Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Sci.* 102, 1115–1122.

Zhang, W., Qin, Z., Zhang, X., and Xiao, W. (2011). Roles of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance. *FEBS Lett.* 585, 2786–2794.

10. Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Sánta Ádám Tamás nyilatkozom, hogy a 2022-es Biológia TDK tavaszi fordulójára benyújtott „Rad6 és Rad18 fehérjék kölcsönhatását célzó kismolekula inhibitor jelöltek hatásának vizsgálata a Rad6-Rad18 interakcióra és PCNA ubikvitinációra humán sejtekben” című dolgozatomban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Rész	Felkészítés után önállóan végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)	Folyamatos segítséggel végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)
Megfelelő kombinációk kiválasztása a Split-Venus kísérletekhez	50	0
Kismolekulák hatásának vizsgálata a Rad6-Rad18 interakcióra (sejtek fenntartása, transzfektálása és kezelése kismolekulákkal)	75	0
Kismolekulák hatásának vizsgálata a PCNA ubikvitinációra (sejtek fenntartása, transzfektálása, valamint kezelése UV sugárzással és kismolekulákkal)	75	0
Minták mikroszkópos analízise	100	0

Szeged, 2022. 06. 11.

.....
Pályamunkát benyújtó hallgató

.....
Témavezető