

Streszczenie

Stres replikacyjny, wywołany zablokowaniem polimerazy DNA na uszkodzeniu matrycy, występuje praktycznie w każdej rundzie powielania materiału genetycznego. Jednym z głównych mechanizmów, pozwalającym na ominięcie uszkodzenia, zarówno w komórkach drożdży jak i ludzkich, jest proces syntezy DNA przez uszkodzenia matrycy przy udziale wyspecjalizowanych polimeraz niereplikacyjnych – polimeraz TLS (*ang.* TransLesion Synthesis). Głównymi enzymami odpowiedzialnymi za proces TLS są polimerazy z rodziny Y. W komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* obecne są dwie takie polimerazy: białko Rad30 (polimeraza eta) i Rev1.

Gen *RAD30* koduje drożdżowy homolog ludzkiej polimerazy eta, której defekty związane są z syndromem predyspozycji rakowej Xeroderma pigmentosum-variant (XP-V). Polimeraza ta posiada zdolność powielania, często w sposób bezbłędny, DNA zawierającego szereg uszkodzeń, w tym indukowanych promieniowaniem UV dimerów pirymidynowych, stanowiących blok dla polimeraz replikacyjnych. Z drugiej jednak strony, w trakcie replikacji nieuszkodzonej matrycy polimeraza eta charakteryzuje się bardzo niską wiernością replikacji, która może być źródłem powstawania mutacji. Natomiast Rev1, będący transferazą deoksycytydylową, wstawia dCMP naprzeciw wielu uszkodzeń DNA, takich jak miejsca apurynowe i apirymidynowe, jak również naprzeciw G lub A. Ponadto, oprócz aktywności katalitycznej, Rev1 pełni również istotną funkcję regulatorową dla oddziałujących z nim polimeraz TLS. Ze względu na niższą od polimeraz replikacyjnych wierność, aby nie doprowadzić do zwiększonej niestabilności genomu, dostęp polimeraz TLS do widełek replikacyjnych musi podlegać ścisłej kontroli.

W warunkach normalnej, niepoddanej stresowi hodowli drożdży, poziom i stabilność dwóch drożdżowych polimeraz TLS - polimerazy eta oraz Rev1 regulowane są w cyklu komórkowym, prowadząc do ich akumulacji w fazie G2 [1, 2]. W przypadku polimeraz TLS szczególnie istotna wydaje się ich regulacja w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad regulacją obu drożdżowych polimeraz TLS z rodziny Y na poziomie mRNA i białka, w różnych etapach cyklu komórkowego, w odpowiedzi na stres replikacyjny. Badano wpływ promieniowania UV, indukującego powstawanie uszkodzeń będących naturalnym substratem dla polimerazy eta, jak również hydroksymocznika, który hamując aktywność reduktazy rybonukleotydowej, obniża poziom prekursorów syntezy DNA, tym samym blokując replikację, nie wprowadzając jednak bezpośrednio uszkodzeń do DNA.

Uzyskane wyniki wskazują na wspólną regulację poziomu polimerazy eta i Rev1, w odpowiedzi na zaburzenia metabolizmu DNA na różnych etapach cyklu komórkowego. Regulacja dotyczy głównie komórek będących w fazie S cyklu komórkowego. Stwierdzono, że poziom badanych polimeraz w tej fazie cyklu jest wypadkową dwóch różnych tendencji wywołanych naświetlaniem komórek

promieniowaniem UV. Z jednej strony, ekspozycja na promieniowanie UV prowadzi do spowolnienia progresji fazy S nie wpływając na harmonogram czasowy akumulacji polimeraz, co skutkuje stopniowym przesunięciem akumulacji białek polimerazy eta i Rev1 z fazy G2 do fazy S. Z drugiej strony, im wyższa jest zastosowana dawka promieniowania UV, tym niższy jest maksymalny poziom akumulacji badanych polimeraz, tak, że dla wysokich dawek akumulacja polimerazy eta i Rev1 jest w dużym stopniu limitowana.

Dodatkowo, określono wpływ aktywacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego na poziom białek polimerazy eta i Rev1. Stwierdzono, że w szczepach z delecją genu *MRC1* lub *RAD9*, blokującego alternatywne ścieżki aktywacji punktów kontrolnych fazy S, regulacja poziomu badanych polimeraz przebiega w różny sposób. Pokazano, że aktywacja ścieżki punktu kontrolnego fazy S zależnej od Rad9, ale nie od Mrc1, hamuje akumulację polimeraz TLS z rodziny Y w komórkach zablokowanych w fazie S w wyniku traktowania wysokimi dawkami promieniowania UV. Zgodnie z tym wykazano brak efektu hamującego w komórkach traktowanych hydroksymocznikiem, który aktywuje w głównej mierze zależną od Mrc1 ścieżkę punktu kontrolnego fazy S.

Uzyskane wyniki pokazują, że wysoki poziom uszkodzeń DNA hamuje akumulację drożdżowych polimeraz z rodziny Y: polimerazy eta i Rev1, w komórkach zatrzymanych w fazie S oraz wskazują na udział zależnej od Rad9 ścieżki odpowiedzi na uszkodzenia DNA w tej regulacji.