



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV –0057–10

Regulácia výberu mechanizmov opravy dvojitých zlomov DNA

Zodpovedný riešiteľ **Mgr. Miroslav Chovanec, PhD.**

Príjemca **Ústav experimentálnej onkológie SAV**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Ústav experimentálnej onkológie SAV
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Národné centrum pre biomolekulárny výskum, Masarykova univerzita v Brne, Česká republika
2. Inštitút vývojovej biológie/Wenner-Gren inštitút, Univerzita v Štokholme, Švédsko
3. Program molekulárnej biológie, Sloan-Kettering centrum výskumu rakoviny, New York, USA

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

- 1.
- 2.
- 3.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Vigašová, D., Sarangi, P., Kolesár, P., Vlasáková, D., Slezáková, Z., Altmannová, V., Nikulenkov, F., Anrather, D., Gith, R., Zhao, X., Chovanec, M., Krejčí, L. (2013) Lif1 sumoylation and its role in non-homologous end-joining. *Nucleic Acids Res.*, 41:5341-5353.
2. Vigašová, D., Sarangi, P., Kolesár, P., Vlasáková, D., Zhao, X., Chovanec, M., Krejčí, L.: Lif1 SUMOylation and its role in DNA double-strand break repair (poster). 6th DNA Repair Workshop, Smolenice, 3.-7. jún 2012.
3. Vigašová, D., Sarangi, P., Kolesár, P., Vlasáková, D., Zhao, X., Krejčí, L., Chovanec, M.: SUMO regulates the ligation step of NHEJ (prednáška). 6th DNA Repair Workshop,

Smolenice, 3.-7. jún 2012.

4. Vigašová, D.: Post-translational modifications of the DNA ligase IV complex and their impact on NHEJ (prednáška). Central European DNA Repair Meeting, Viedeň, Rakúsko, 8. november 2013.

5.

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky majú charakter nových originálnych poznatkov, preto ich uplatnenie mimo oblasť vedy, výskumu a vzdelávania je značne limitované. Avšak oblasť, ku ktorej prináležia, je úzko spätá s onkologickou klinikou, a tak ich potenciál prispieť k novým smerovaniam, inováciám a koncepciám v tejto oblasti nie je vylúčená. Predovšetkým sa nám javí veľmi nádejné ich uplatnenie pri vývoji nových terapeutických stratégií, pretože inhibícia procesu spájania nehomologických koncov DNA (NHEJ) cez nami objavený mechanizmus (viď nižšie), by pri súčasnom podávaní štandardnej chemoterapie, mala výrazne prispieť k lepšej liečiteľnosti nádorov s defektom v homologickej rekombinácii. Takými nádormi sú napríklad nádory s mutáciami v génoch BRCA1 a BRCA2.

CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Ako je spomenuté v Záverečnej správe o riešení projektu, ciele projektu sa nám takmer úplne podarilo splniť. Zmapovali sme Nej1-interakčnú doménu v Srs2 proteíne, ktorá pokrýva oblasť aminokyselín v pozícii 1169-1174. Zistili sme, že Lif1 proteín nie je potrebný pre vytváranie komplexu Nej1-Srs2, hoci o potrebe Nej1 proteínu pre vytváranie Lif1-Srs2 komplexu toto tvrdenie zatiaľ vysloviť nemôžeme. Zmapovali sme interakčné domény v rámci Lif1-Srs2 komplexu, kde aminokyseliny v pozícii 883-906 v Srs2 proteíne sú zodpovedné za interakciu s Lif1 a aminokyseliny v pozícii 169-196 v Lif1 proteíne sú zodpovedné za jeho interakciu s Srs2. Nepodarilo sa nám však zistiť, či dochádza k vytváraniu Nej1-Srs2 a Lif1-Srs2 komplexov aj v prípade, že Nej1 a Lif1 spolu vzájomne neinteragujú. Nezistili sme žiadny vplyv Nej1 a Lif1 proteínov na helicázovú aktivitu Srs2 proteínu. Podrobne sme charakterizovali DNA väzobnú aktivitu Lif1 proteínu, kde sme zistili, že proteín sa viaže aj jednovláknovú DNA, ktorú vie aj anelovať. Zistili sme, že Lif1 proteín podlieha SUMOylácii v podmienkach in vitro a in vivo a identifikovali sme hlavné SUMOylačné miesto, ktorým je lyzín v pozícii 301. Ukázali sme, že SUMOylácia Lif1 prebieha počas všetkých fáz bunkového cyklu a je závislá na Siz E3 SUMO ligázach. Nemá však vplyv na DNA väzobnú aktivitu Lif1 proteínu, ani nezohráva úlohu vo vytváraní komplexov tohto proteínu s ďalšími komponentmi procesu NHEJ, a to Nej1, Dnl4 a Xrs2 proteínmi. Defektná SUMOylácia však vedie k výrazne zvýšenej schopnosti proteínu oligomerizovať a zvýšenej účinnosti procesu NHEJ. Predstavuje teda nový mechanizmus regulácie procesu NHEJ nezávislý od fázy bunkového cyklu.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

As mentioned in the Final report, all the project aims have more or less been accomplished. We mapped the Nej1-interaction domain in the Srs2 protein, which lies between amino acids 1169-1174. We found out that Lif1 is not required for the Nej1-Srs2 complex assembly, although we failed in addressing the question whether Nej1 is required for the Lif1-Srs2 complex assembly. We also mapped the interaction domains within Lif1-Srs2 complex, where amino acids 883-906 in Srs2 are responsible for its interaction with Lif1 and amino acids 169-196 in Lif1 are needed for its interaction with Srs2. We failed in unravelling of possibility that physical interaction between Nej1 and Lif1 is indispensable for Nej1-Srs2 and Lif1-Srs2 complexes formation. We show no impact of Nej1 or Lif1 on the helicase activity of Srs2. We characterized in detail DNA binding activity of Lif1 and report for the first time its single-strand DNA binding and strand annealing activities. We discovered that Lif1 undergoes SUMOylation both in vitro and in vivo and identified lysine 301 as the major conjugation site. Lif1

SUMOylation occurs throughout the cell cycle and requires the Siz E3 SUMO ligases. It has no impact on Lif1 DNA binding activity and on ability of the protein to interact with other NHEJ components, namely Nej1, Dnl4 and Xrs2. Abolition of SUMOylation leads to defective Lif1 self-interaction and increases efficiency of NHEJ. Hence, Lif1 SUMOylation represents a new regulatory mechanism that downregulates NHEJ in a cell cycle phase-independent manner.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

Zodpovedný riešiteľ

Mgr. Miroslav Chovanec, PhD.

V Bratislave 25. 11. 2014

Štatutárny zástupca príjemcu

RNDr. Ján Sedlák, DrSc.

V Bratislave 25. 11. 2014

.....
podpis zodpovedného riešiteľa

.....
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu