

Spontaniczne mutacje DNA pełnią fundamentalną rolę w ewolucji, ale także w procesach starzenia, nowotworzenia i w chorobach genetycznych. Dlatego poznanie mechanizmów utrzymujących niski poziom mutagenyzy spontanicznej ma istotne znaczenie medyczne. Celem proponowanych badań jest poznanie mechanizmów zaangażowanych w odkryty przeze mnie proces prowadzący do wzrostu mutagenyzy spontanicznej w wyniku zwiększenia komórkowej zawartości białka Mms2. Wiadomo, że ilość tego białka w komórce wzrasta w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Stwierdzono także podwyższony poziom informacji mRNA, kodującej Mms2 w ludzkich liniach komórek rakowych. Proponowane badania będą wykorzystywały modelowe komórki *S. cerevisiae*, w których Mms2 zostało odkryte i dla których wykazano, że białko to pełni funkcję strukturalną w procesach poliubikwitynacji w kompleksie z enzymem koniugującym ubikwitynę Ubc13. Podstawowe mechanizmy angażujące ten kompleks w komórkach drożdży, funkcjonują podobnie w komórkach organizmów wyższych potwierdzając przydatność modelu *S. cerevisiae*.

Wzrost częstości mutacji spontanicznych związany z wzrostem komórkowego poziomu białka Mms2 jest interesujący, ponieważ białko to nie posiada samo w sobie aktywności enzymatycznej. Pomimo wysokiego podobieństwa do koniugazy ubikwityny nie posiada ono kanonicznego aminokwasu w potencjalnym centrum aktywnym co uniemożliwia Mms2 funkcjonowanie jako koniugaza ubikwityny i jest określane jako pseudoubikwitynaza. Aktywność pseudoubikwitynazy jest zależna od jej współdziałania z kanoniczną koniugazą ubikwityny i jedynym znanym dotychczas enzymem tego typu współdziałającym z Mms2 jest Ubc13. Kompleks Ubc13-Mms2 bierze udział w bezbłędnym procesie tolerancji uszkodzeń DNA blokujących powielanie materiału genetycznego. Aktywność tej ścieżki prowadzi do bezbłędnego powielenia informacji genetycznej, w przeciwieństwie do obserwowanego przeze mnie efektu związanego z nadprodukcją Mms2 prowadzącego do wzrostu poziomu mutagenyzy spontanicznej. Moje dotychczasowe badania wykazały, że ten nowy efekt mutatorowy nie zależy od znanego interaktora Mms2, Ubc13, lecz wymaga obecności koniugazy Ubc4 i ligazy Rad5. Ustaliłem także, że mutagenna funkcja Mms2 całkowicie zależy od wyspecjalizowanej polimerazy DNA, zdolnej do syntezy DNA poprzez uszkodzenia, Pol zeta. Wyniki te sugerują istnienie w komórkach drożdży nieznanego dotychczas mechanizmu regulacji mutagennej aktywności Pol zeta zależnego od zaangażowanych w procesy ubikwitynacji białek Mms2 i Ubc4.

W przedstawionym projekcie planuję scharakteryzować mechanizm związany z nową, promutagenną funkcją Mms2 poprzez analizę aktywności białek, których udział w badanym efekcie już wykazałem oraz identyfikację współdziałających z nimi enzymów. Zarówno Ubc4 jak i Rad5 posiadają kilka domen, które związane są z różnymi aktywnościami, w związku z czym wykorzystując mechanizmy mutagenyzy celowanej skonstruuję szczepy niosące specyficzne mutacje inaktywujące poszczególne aktywności badanych białek by określić, które z nich biorą udział w mutagenyzie związanej z Mms2. Sprawdzę też udział potencjalnych interaktorów Mms2 w tym procesie. Ustalę warunki determinujące udział Pol zeta i zbadam, wykorzystując metody genetyczne i immunochemiczne, udział modyfikacji czynnika procesywności replikacji PCNA w mutagenyzie zależnej od Mms2.

Uwzględniając, że białko Mms2 występuje powszechnie w komórkach wyższych eukariontów, w tym w komórkach ludzkich, wyniki uzyskane dla drożdżowego białka Mms2 mogą sugerować nowe funkcje tego białka w innych organizmach. Podobnie, polimeraza zeta jest enzymem o uniwersalnym znaczeniu. Co więcej aktywność tej polimerazy wskazano jako jeden z mechanizmów przeciwdziałających terapiom antynowotworowym opierającym się na generowaniu uszkodzeń w DNA aktywnie dzielących się komórek, a więc poznanie czynników regulujących aktywność tego enzymu może być istotne z punktu widzenia nie tylko badań podstawowych ale także dla projektowania nowych terapii.