

MTA doktori értekezés

A mutagenesis mechanizmusai

Dr. Szüts Dávid

Természettudományi Kutatóközpont

Enzimológiai Intézet

Budapest

2020

Tartalomjegyzék

ÖSSZEFOGLALÁS.....	4
1 BEVEZETÉS.....	5
1.1 A mutagenézis bemutatása.....	5
1.2 DNS-hibajavító folyamatok	6
1.3 DNS-hibaelkerülő útvonalak	8
1.4 Mutációs mintázatok daganatokban	9
1.5 DNS-hibajavítás hiányát kiaknázó tumorterápiák.....	10
2 MÓDSZEREK	11
2.1 Kísérletes módszerek	11
2.2 Bioinformatikai módszerek.....	12
3 EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	13
3.1 A mutagenézis vizsgálata sejtvonalakon genomszekvenálással.....	13
3.1.1 A DT40 sejtvonal genomja	13
3.1.2 Mutációk hatékony detektálása izogenikus mintákban.....	13
3.1.3 Sejtvonalak spontán mutációs folyamatainak feltérképezése	14
3.2 Rákellenes terápiák mutagenikus hatása	15
3.2.1 A leggyakrabban használt citotoxikus terápiák mutagenikus hatásai.....	15
3.2.2 PARP inhibitorral történő hosszú távú kezelés nem mutat mutagenikus hatást sejtvonalakban és betegből származó xenograftokban	15
3.2.3 A tumorterápiák genomi lenyomata felhasználható a metasztázisok kialakulási idejének meghatározására	16
3.3 A homológ rekombináció hiányának hatása a mutagenézisre és a terápiákra mutatott érzékenységre	17
3.3.1 A homológ rekombináció hiányában fellépő mutagenikus folyamatok	17
3.3.2 A homológ rekombináció hiányának hatása a terápiás érzékenységre	18
3.3.3 A doxorubicin pegilált liposzómás formulációja segítségével elkerülhető a rezisztencia kialakulása egy BRCA1 mutáns tumormodellben	19

3.4	A daganatok mutációs mintázatainak rendszerezése kísérletes és bioinformatikai megközelítéssel	19
3.4.1	A homológ rekombináció hiánya egységes bázisszubsztitúciós mutációs folyamatot indukál	19
3.4.2	Mutagenikus folyamatok egy <i>BRCA1</i> mutáns egér emlőtumorból izolált sejtvonalban	20
3.4.3	Két fő mutációs folyamat működik az MMR hiányában.....	20
3.5	A mutációk kialakulásának molekuláris mechanizmusai.....	21
3.5.1	A ciklobutil pirimidin dimer ultraibolya fototermékek átírásának mechanizmusai.....	21
3.5.2	A PCNA ubikvitilációjának szerepe a hibaelkerülő folyamatokban	21
3.5.3	A BRCA fehérjék hiányában megnövekszik a DNS-sérülések száma	22
3.5.4	A HR fehérjék szerepe elhanyagolható a kettős DNS száltörések mutagenikus javításában.....	23
4	AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	24
	RÖVIDÍTÉSEK	25
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	25
	IRODALOMJEGYZÉK	26
	A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	29

ÖSSZEFOGLALÁS

A mutagenesis folyamata alapvető szerepet tölt be az evolúcióban, az öregedésben és a rák kialakulásában. A mutációk kialakulását okozhatják a sejt rendes működési folyamatai vagy külső DNS-károsító hatások, de hozzájárulhat a DNS-javító mechanizmusok hiányos működése is. Kutatásaink célja a mutagenikus folyamatok megismerése, elkülönítése és mechanizmusuknak részleges feltárása volt.

A mutációs folyamatok feltérképezéséhez elsősorban genomikai megközelítéseket alkalmaztunk. Nagy áteresztőképességű újgenerációs DNS-szekvenálás segítségével feltérképeztük a kísérleteinkhez használt sejtvonal-modellek genomját. Kifejlesztettünk egy IsoMut nevű bioinformatikai módszert, amely izogenikus genomi mintákban gyorsan és pontosan detektálja a mutációkat. Egy összehasonlító tanulmányban meghatároztuk a gyakran alkalmazott kemoterápiás szerek mutagenikus hatását, és a mutációs spektrum alapján értelmeztük a cisplatin mutagenikus mechanizmusát. Sejtvonalak és betegből származó xenograftok szekvenálásával megmutattuk, hogy a homológ rekombináció deficiens sejteket szelektíven pusztító poli-ADP-polimeráz gátlószerek nem rendelkeznek számottevő mutagenikus hatással. A homológ rekombináció génjeiben mutáns csirke limfoblasztóma sejtvonalak genomszekvenálásával feltártuk az ezen hibajavító útvonal hiányában fellépő mutagenikus folyamatokat, és citotoxicitási mérések segítségével elemeztük a mutációs spektrumok felhasználhatóságát tumordiagnosztikai célokra. Kísérleti és tumorszekvenálási adatok összehasonlításával meghatároztuk a nem összeillő bázispárok javításának hiányában fellépő mutagenikus folyamatok két fő komponensét.

A sérült DNS szakaszok másolásának mechanizmusát és mutagenikus hatását genetikai megközelítésekkel vizsgáltuk mutáns DT40 sejtvonalakon. Érzékenységi mérésekkel, valamint ultraibolya fény által okozott DNS lézióknak a sejtbe juttatásával megmutattuk a transzléziós DNS szintézis fehérjéinek szerepét a DNS-hibatoleranciában és a mutagenesisben, és részletesen feltártuk a PCNA fehérje ubikvitilációjának szerepét a sérült DNS replikációjában.

Eredményeink hozzájárultak a mutagenesis folyamatainak megismeréséhez, a genomikai megközelítések elterjedéséhez, és a genomi tumordiagnosztika fejlődéséhez.

1 BEVEZETÉS

1.1 A mutagenézis bemutatása

A mutagenézis fogalma a sejtekben található DNS szekvenciájának megváltozását takarja. A szekvencia-változás leggyakrabban a bázisok cseréjét jelenti. Ezen felül előfordul teljes nukleotidok kitörlődése, és ezáltal a szekvencia rövidülése (deléción), vagy extra nukleotidok beépülése (inzerción). Az inzerción és deléción, együttes nevükön indelek, egy nukleotidtól sok ezer vagy millió nukleotid hosszúságig terjedhetnek. Végezetül keletkeznek komplex események is, mint egy DNS-szakasz megfordulása (inverzió), vagy más kromoszómális helyre kerülése (transzlokáció).

A mutáción képesek megváltoztatni a gének funkcióját. A bázisszubsztitúción kódoló régiókba kerülve megváltoztathatnak egy aminosavat a fehérjékben, vagy ritkábban korai stop kodont hozhatnak létre. A fehérje-kódoló régiókban keletkező indelek, amennyiben a hosszuk nem osztható hárommal, megváltoztatják a leolvasási keretet, és az ilyen frameshift mutáción szintén korai stop kodonokat és trunkált fehérjét okoznak. A nagyobb átrendeződések, strukturális variáción hatására pedig egymás mellé kerülhetnek távoli kromoszómaregiók, és így létrejöhetnek fúziós fehérjét kódoló gének, vagy közel került szabályozó régiók által kontrollált, megváltozott expressziójú gének.

A mutáción egyik generációról másikra történő megjelenése természetesen az evolúción hajtóereje, hozzájárulva a szelekción alapjául szolgáló variációnhoz. Az evolúción mellett azonban az egyed életében is lényeges szerepet játszanak a sejtekben keletkező mutáción. A többsejtű élőlényekben a szomatikus sejtekben keletkező genetikai változások bizonyos sejtek megváltozott működését okozhatják. Egyes sejtek funkcionyeréses jellegű változása a sejt kontrollálatlan osztódásához, ezáltal a daganatok kialakulásához vezet. Ennek megfelelően a genomi instabilitás, azaz a mutáción felgyorsult akkumulációja a rákos sejteknek is az egyik alapvető jellemzője (Hanahan és Weinberg, 2011). Mivel a daganatok egyetlen megváltozott sejt klonális expanziójával jönnek létre, a kialakulásukhoz vezető genetikai változások megtalálhatók a tumormintákban, és részben meghatározzák a daganat tulajdonágait. Ezért a mutagenézis tanulmányozása alapvető fontosságú a rákkutatásban a daganatok kialakulási folyamatának és tulajdonságainak megértéséhez.

A mutáción kialakulásának megismeréséhez három folyamatot kell figyelembe vennünk: a DNS-en kialakuló sérüléseket, ezeknek a javítását, illetve a kromoszómális DNS másolását a sejtosztódást megelőzően.

A DNS sérülései a DNS kémiai szerkezetének megváltozását jelentik. A DNS egy igen stabil makromolekula, amely ennek ellenére képes kémiai reakciókba lépni a sejt vagy sejtmag egyéb alkotórészeivel, vagy a sejtbe bejutott exogén molekulákkal. A kialakuló szerkezeti változások (léziók) korlátozódhatnak egyetlen nukleotidra, illetve több bázist érintő komplex léziók is keletkezhetnek, például az ultraibolya fény (UV) által okozott fototermékek, melyek szomszédos pirimidin bázisok közötti keresztkötéseket tartalmaznak (Ravanat et al., 2001). A DNS cukor-foszfát gerincén a foszfodiészter kötések hidrolízise a DNS szálának szakadásához, avagy töréséhez vezet, mely érintheti csak az egyik szálát, vagy egy rövid régió belül mindkettőt. A léziók keletkezése még nem jelenti mutációk kialakulását. Mutáció esetében a DNS kémiai szerkezete ép, csak a bázissorrendje különbözik az eredetitől. Léziókból javítás vagy másolás útján rögzülhet mutáció.

1.2 DNS-hibajavító folyamatok

Mivel a fent említettek szerint igen gyakoriak a DNS endogén sérülései, minden élő szervezet rendelkezik DNS-javító mechanizmusokkal. Ezek az esetek többségében képesek visszaállítani a DNS eredeti szerkezetét és szekvenciáját, ritkábban viszont eltérő bázisok beépüléséhez, vagy indelek kialakulásához vezetnek. A sérült DNS másolásakor a sérült templátról nem minden esetben sikerül az eredetinek megfelelő pontos másolatot létrehozni.

A sejtekben többféle DNS-hibajavító és replikatív hibaelkerülő útvonal működik. A leggyakoribb léziókat, a megváltozott szerkezetű bázisokat tartalmazó DNS-t javítja a báziskivágó hibajavítás (base excision repair, BER). A nukleotidkivágó hibajavítás (nucleotide excision repair, NER) tipikusan olyan DNS léziókat javít, amelyek egy szálát érintenek, de torzítják a DNS szerkezetét. A NER főként az UV fototermékek javítása miatt ismert, mivel a NER génekben hordozott örökletes mutációk jelenléte az extrém UV-érzékenységgel és bőrrákra való hajlammal járó xeroderma pigmentosum betegség okozója (Lehmann et al., 2011).

A nem összeillő bázispárok javítása (mismatch repair, MMR) annyiban lényegesen eltér az előbbi javító folyamatoktól, hogy a szubsztrátjául szolgáló lézió nem tartalmaz valódi DNS-sérülést, hanem csak egy össze nem illő bázispárt, vagy esetleg egy-két extra bázist az egyik szálban, melyek főként pontatlan replikáció következtében jöhetnek létre. Az MMR hiányos sejtekre jellemző a magas mutációs ráta mellett az úgynevezett mikroszatellit instabilitás, mely

a genomban rövid ismétlődő egységek számának változékonyságát jelenti. Az *MSH2* és *MLH1* gének öröklött mutációi elsősorban vastagbélrákra hajlamosítanak (Plotz et al., 2006).

Végül fontos áttekinteni a DNS-száltörések javítási mechanizmusait. Az egyszálú töréseket, melyek főként oxidatív hatások következtében keletkeznek, lényegében a BER mechanizmusa javítja, mivel ezek a törések a BER egyik köztes állapotának felelnek meg. Az egyszálú törések detektálásában és a BER aktiválásában fontos szerepet tölt be a poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP) enzim, elsősorban a PARP-1 (Pascal, 2018). A kijavítatlan egyszálú törések a repliszóma szétesését, a replikációs villánál kétszálú törések kialakulását okozzák. A DNS kettős száltörései ritka, de potenciálisan súlyos következményeket hordozó léziók. A legtöbb élő sejt kétféle mechanizmussal is rendelkezik a kettős száltörés javítására. Egyik a nem homológ végek összekapcsolása (non-homologous end joining, NHEJ), mely a törött DNS-végeket a szekvenciától függetlenül képes összeligálni. A kettős száltörések másik, konzervált mechanizmusa a homológ rekombinációs hibajavítás (HR). A HR lényege, hogy a törést DNS szintézisen alapuló mechanizmussal, egy nem sérült alternatív templát segítségével javítja (Jasin és Rothstein, 2013). A kézenfekvő alternatív templát a DNS replikáció után jelen lévő testvérkromatid, amely a sérült szakasszal teljesen azonos szekvenciájú. A HR első lépése a reszekció, melynek keretében nukleázok visszavágják a kétszálú törött vég 5' szálát. A reszekció fontos szabályozó faktorai a BRCA1 és a CtIP fehérjék. A homológiakeresés kulcsfehérjéje magasabb eukariótákban a RAD51. A BRCA1 köt a PALB2 fehérjén keresztül az igen hosszú BRCA2 fehérjéhez (Zhang et al., 2009), amely egyszerre több RAD51-et kötve ezeket az egyszálú DNS-szakaszhoz szállítja. Sok RAD51 fehérje kooperatív kötésén alapuló nukleoprotein filamentum kialakulását a RAD51 paralóg fehérjék (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3) segítik (Taylor et al., 2015). A RAD51 filamentum katalizálja a homológiakeresést. A HR folyamat befejezésére több mechanizmus is létezik.

Mivel az NHEJ és a HR képes ugyanazt a sérülést javítani, a kettős száltöréseknél dedikált mechanizmus segíti a javító útvonal kiválasztását. A sejtciklus fázisán túl a törött végek állapota és száma is befolyásolja az útvonalak közötti választást (Scully et al., 2019).

A DNS-hibajavítással kapcsolatban végül szükséges megemlíteni a DNS-sérülés esetén a sejt normál működésének bizonyos aspektusait leállító checkpoint mechanizmusokat. Az ATM és a CHK2 kinázok a DNS-törések jelenlétét jelzik, míg az ATR és a CHK1 kinázok a replikációs problémákat, itt az ATR fő aktivátora a hosszú egyszálú DNS-szakaszok jelenléte (Cliby et al., 1998; Hekmat-Nejad et al., 2000). Az ATM és ATR kinázok szubsztrátjai között szerepel a H2AX hiszton, melynek foszforilált formája (γ H2AX) a DNS-törések fontos markere.

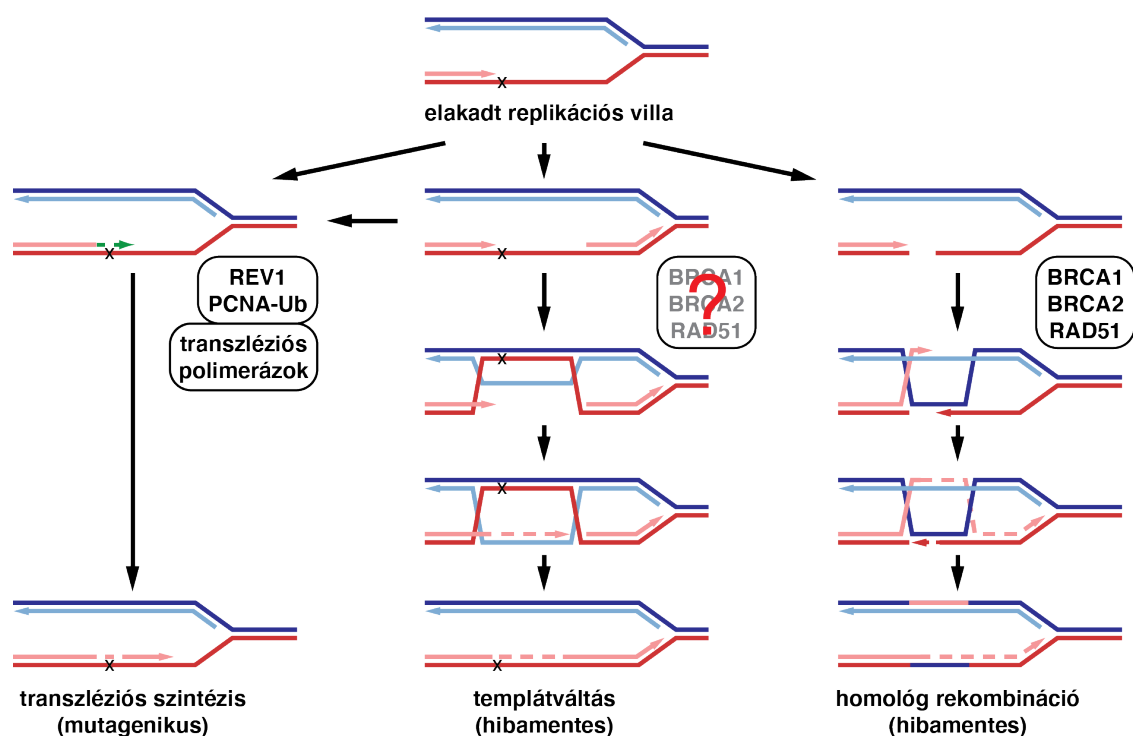
1.3 DNS-hibaelkerülő útvonalak

Mivel a replikáció során a két rendkívül pontos replikatív polimeráz (pol δ és pol ϵ) valamelyikének a genom minden nukleotidján végig kell haladnia, elkerülhetetlen a polimerázok elakadása sérült templát szakaszoknál. A teljes kromoszómális DNS-állomány megkettőzése azonban elengedhetetlen a sikeres sejtosztódáshoz, ezért többféle mechanizmus is létezik, amely lehetővé teszi a replikáció továbbhaladását a replikatív polimeráz elakadása esetén. Két alapvetően különböző megoldás létezik a problémára, melyek konzerváltak a teljes élővilágban: vagy polimerázt, vagy templátot szükséges váltani.

Az első megoldás tehát a sérült templát használata, azaz „transzléziós DNS szintézis” (TLS). Az erre képes speciális transzléziós polimerázok többsége szerkezetileg az Y polimeráz családba tartozik: a pol η , pol ι , pol κ és a REV1 fehérje, és lényeges még a replikatív polimerázokkal együtt a B polimeráz családba tartozó pol ζ . A transzléziós polimerázok toborzásának kétféle mechanizmusa ismert. Ezek közül egyik a PCNA replikációs fehérje monoubikvitilációja, azonban a transzléziós polimerázok a REV1 fehérjén keresztül is képesek az elakadt replikációt jelző PCNA-hoz kötni, a PCNA ubikvitilációjától függetlenül.

A sérült DNS replikációjának másik megoldása egy alternatív, a sérült szakasszal homológ templát használata. Ilyen templát közvetlenül rendelkezésre áll a replikációs villa mögött: a testvérkromatid újonnan szintetizált szála, melynek használata megoldást jelent a sérült szakaszon történő nem mutagenikus áthaladásra (1. ábra). A templátváltás szabályozásában kiemelt szerepe lehet a PCNA fehérjének az ubikvitin lizin 63 (K63) oldalláncán keresztül történő poliubikvitilálásának, melyet élesztőben genetikailag sikerült egy, a testvérkromatidot használó templátváltó hibaelkerülő útvonalhoz kötni (Zhang és Lawrence, 2005). Ez a folyamat a RAD51 fehérjétől is függ, rámutatva a HR és a templátváltás közötti átfedésekre (Branzei et al., 2008).

Az elakadt villák helyzetének feloldására létezik egy harmadik, drasztikusabb megoldás is: a sérült szál eltörése vagy elhasítása, a villa szétesése, majd a replikáció újraindítása az így képződött kettős szálú DNS végről. Ez a folyamat nagyon hasonlít a DNS kettős szál-törésének homológ rekombinációs javításához, és ugyanazokat a fehérjéket is használja (Hashimoto et al., 2012). A templátváltás, illetve a törött replikációs villák homológ rekombinációs újraindítási mechanizmusainak genetikai elkülönítését megnehezíti a résztvevő fehérjék közötti nagyszintű átfedés.



1. Ábra: Hibaelkerülő útvonalak

Az ábra a replikációs villa elakadását feloldani képes legfontosabb hibaelkerülő mechanizmusokat mutatja be. A replikációs villa sematikus rajzán az eredeti DNS-szálak sötétkékkel és sötétpirossal, az újonnan szintetizált szálak halványkékkel és halványpirossal vannak jelölve. A DNS-szintézist megakasztó léziót X jelzi. A dolgozat tárgyalja a kérdőjellel jelölt fehérjék szerepét.

A sérült templátot felhasználó, sok esetben az eredeti bázisokat felismerhetetlenné tévő léziókat másoló transzleziós szintézis szükségszerűen mutációk előállítására hajlamos. A templátváltás és a homológ rekombináció elvben nem mutagenikus, azonban a folyamatok közben képződő komplex szerkezetek helytelen feloldása DNS-törésekhez, genomi átrendeződésekhez vezethet. Munkánk egyik fő célja volt meghatározni a DNS-hibaelkerülő útvonalak szerepét a spontán és a környezeti hatások által indukált mutagenikus folyamatokban, beleértve a rákos daganatok kialakulását okozó szomatikus mutagenézist.

1.4 Mutációs mintázatok daganatokban

A daganatok kialakulásának megértése közvetlen relevanciát biztosít a mutagenézis vizsgálatának. Ennek megfelelően a publikált újgenerációs szekvenálási adatok nagy része daganatokból származik, és a kutatók komoly erőfeszítéseket tesznek a mutációk mintázatokba

rendezésére, értelmezésére (Helleday et al., 2014). A tumorsejtek megváltozott viselkedéséért igen kevés ún. 'driver' génmutáció felelős. A tipikusan instabil genommal rendelkező tumorsejtek genomjának a beteg normál DNS-szekvenciájához való hasonlítása azonban akár százezerig terjedő számú mutációt is mutathat (Lawrence et al., 2013). Ezek túlnyomó része nem változtatja meg a sejt működését; az ilyen mutációkat az irodalom 'passenger' mutációknak nevezi. Fontos felismerés, hogy a passenger mutációk is hasznos információt hordoznak a tumor tulajdonságairól. Ezeket okozhatták olyan mutagenikus folyamatok, amelyek a normál szomatikus sejtekben is működnek, vagy olyan mutagenikus folyamatok, amelyek valamely DNS-javító mechanizmus elromlásának a következményei. Végül pedig okozhatták a mutációkat környezeti mutagén hatások, melyeket ezáltal karcinogénnek tekinthetünk. Amennyiben a különböző kategóriákba eső mutációhalmazok a szekvencia alapján megkülönböztethetők, a tumorgenom passenger mutációi információt szolgáltathatnak a daganat kialakulásának okairól és molekuláris tulajdonságairól. Ez a felismerés vezetett a daganatok mutációs spektrumának általános elemzéséhez, és a spektrumok komponenseiként szolgáló mutációs szignatúrák azonosításához (Alexandrov et al., 2013). A szignatúrák okai között megfigyelhetők voltak a különféle várható mutagenikus folyamatok, pl. a dohányzás hatása, vagy bizonyos DNS-javító folyamatok rossz működése.

A daganatok mutációs spektrumainak valódi haszna a tumordiagnosztikában rejlik. Például az MMR hiányos daganatok jellemzően jobb prognózissal bírnak, mint az azonos szövet működő MMR-rel rendelkező tumorai (Kato et al., 2015). A prognózison túl a mutációs spektrumok információt szolgáltathatnak a DNS-javítást célzó vagy hiányát kiaknázó kezelések hatékonyságának előrejelzésére is, amennyiben megállapíthatók a tumor DNS-javító képességei és hiányosságai a genomszekvencia alapján.

1.5 DNS-hibajavítás hiányát kiaknázó tumorterápiák

A DNS-hibajavítás defektusait két különböző megközelítéssel sikerült kiaknázni tumorterápiákhoz. A szintetikus letalitáson alapuló célzott kezelések olyan útvonalat gátolnak, amely önmagában nem eszenciális, de egy alternatív hibajavítási útvonal hiánya esetén gátlása a sejtek halálához vezet. Erre jelenleg egy jó példa van: a BRCA mutáns daganatok célzása PARP-1 inhibitorokkal (O'Connor, 2015). Egy merőben más megközelítésben pedig immunterápiákat alkalmaznak olyan daganatokban, amelyekben DNS-hibajavítási problémák miatt nagyon sok a szomatikus mutáció (Cristescu et al., 2018).

2 MÓDSZEREK

2.1 Kísérletes módszerek

A felhasznált génkiütött vagy génmódosított DT40 sejt vonalakat korábbi publikációkban leírták. A *RAD52*^{-/-} mutáns sejt vonalat homológ génkiütéssel állítottuk elő. Az *XPA*⁻ *BRCA1*^{-/-} és *XPA*⁻ *XRCC3*^{-/-} sejt vonalak előállításához előbb kiütöttük az *XPA* gént a heterozigóta HR mutáns vonalakban, majd kiütöttük a *BRCA1* illetve *XRCC3* második allélját.

Különböző vad típusú, mutáns és fúziós csirke PCNA variánsokat expresszáló csirke sejt vonalak előállításához az expressziós konstrukciókat elektroporálással juttattuk DT40 sejt vonalakba, és antibiotikumokkal szelektáltuk a stabilan beépült konstrukciókat tartalmazó sejt klónokat (Gervai et al., 2017). A DLD-1 sejt vonal forrása az American Type Culture Collection (ATCC). A SUM149PT sejt vonalat az Asterand cégtől szereztük be.

A sejt vonalakat RPMI-1640 tápoldatban (DT40 és DLD-1) illetve Ham's F12 tápoldatban (SUM149PT) tenyésztettük az ajánlott adalékok hozzáadása mellett, 37°C-on 5% CO₂ alatt.

Citotoxicitási esszéket 384-lyukú lemezekon végeztünk hígítási sorban alkalmazott citotoxikus szerekkel. A viabilitást 72 óra után mértük PrestoBlue reagens (Thermo Fisher) segítségével. Kolóniatúlélési esszékhez csirke DT40 sejteket kezelés után 1% metilcellulóz tartalmú tápoldatra helyeztünk, és 10-14 nap múlva megszámoltuk a kifejlődő telepeket.

Western blot-hoz teljes sejtextraktokat SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel frakcionáltunk, PVDF membránra transzferáltunk, majd először elsődleges γ H2AX vagy α -tubulin, majd másodlagos anti-egér IgG vagy anti-nyúl IgG peroxidáz-csatolt ellenanyagokkal inkubáltunk. Immunfluoreszcenciás elemzéshez a sejteket fedőlemezekon 4% paraformaldehid oldattal fixáltuk. Blokkolás után a mintákat anti- γ H2AX ellenanyaggal, majd fluoreszcens anti-egér IgG másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk 1-1 órán át 37°C hőmérsékleten. A fluoreszcens szignált egy Zeiss LSM 710 konfokális mikroszkóppal detektáltuk.

Szintetikus DNS lézió kereszttüli DNS replikáció vizsgálatához a léziót tartalmazó plazmid transzfekciója után 40 órával a plazmidokat kivontuk a sejtekből egy egyszerűsített Hirt protokollnak megfelelően, majd Dpn I-el emésztettük a korábban leírtak szerint (Szűts et al., 2008). A visszanyert plazmidkeveréket PCR templátként használtuk egy 1369 bp hosszú régió amplifikálásához, a reakciótermékeket hasított plazmidba klónoztuk és szekvenáltuk.

A genomi mutagenézis vizsgálatához a sejt vonalakon egysejttest klónozást végeztünk. Egy kiindulási klónból genomi DNS-t izoláltunk, és ugyanezt a klónt továbbtenyésztettük egy vagy

több tenyészetben, és a kísérletnek megfelelő kezelést alkalmaztunk. Meghatározott időtartam elteltével a kezelt és a kontroll populációkat újra egysejtes klónozásnak vetettük alá, majd kezelésenként több felnőtt klónból is genomi DNS-t preparáltunk genomszekvenáláshoz.

2.2 Bioinformatikai módszerek

A teljes genomszekvenálást Illumina vagy BGISEq berendezésen végeztettük, 2x150 bázispáros leolvasásokkal. A sejtklónok esetében 30x átlag lefedettséget alkalmaztunk, a tumorminták esetében 60x lefedettséget. A leolvasásokat a megfelelő referenciagenomhoz illesztettük a BWA illesztőprogrammal. Izogenikus mintákban SNV-ket és rövid indeleket az általunk erre a célra kifejlesztett IsoMut program segítségével azonosítottunk (Pipek et al., 2017). Strukturális variációkat a CREST programmal (Wang et al., 2011) azonosítottunk.

CRISPR alapú géncélzáshoz a PX458 plazmidot használtuk. A plazmidot tranziensen transzfektáltuk DT40 sejtvonalakba. A GFP pozitív sejteket 24 h múlva szortoltuk, majd újabb 24 óra múlva a célzott lókuszok régióit genomi DNS preparátumokból indexelt PCR primerekkel felamplifikáltuk, és az amplikonokat Illumina technológiával, 2x150 bázispáros leolvasásokkal szekvenáltuk. A szekvenciaváltozásokat egy saját Python scripttel ábrázoltuk.

A TCGA adatbázisban található tumorminták exomszekvenálásból származó mutációs katalógusait az Alexandrov et al. (2013) közlemény alapján töltöttük le. Klinikai adatokat a GDC portálon keresztül értünk el a *TCGAbiolinks* R csomag segítségével. Tumor genomszekvenálási adatokat a PCAWG adatbázisból töltöttünk le, köztük 60 colorektális adenokarcinóma, 75 gyomor adenokarcinóma és 51 méhtest adenokarcinóma mintával.

A szekvenciakontextust, azaz a megelőző és következő bázist minden bázisszubsztitúciós mutációhoz meghatároztuk, humán mintákban a *BSgenome.Hsapiens.UCSC.hg19* R csomag segítségével. Az egyedi minták spektrumait genotípusonként átlagoltuk. Az így származtatott SNV spektrumokat a COSMIC rák mutációs adatbázisban publikált szignatúrákhoz hasonlítottuk (COSMIC, 2019). A kísérleti mintázatok felbontásához a *deconstructSigs* R csomagot használtuk, a minimális kontribúciót 6%-ra állítva.

De novo mutációs szignatúrákat NMF módszerrel állítottunk elő, a *MutationalPatterns* R csomag használatával. A komponensek optimális számát a Brunet módszer szerint becsültük meg.

3 EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

3.1 A mutagenézis vizsgálata sejtvonalakon genomszekvenálással

3.1.1 A DT40 sejtvonal genomja

A DNS-szekvenálás technológiájának és bioinformatikai feldolgozásának fejlődése megteremtette a lehetőséget a mutagenézis genomszintű tanulmányozásának. Azonban sejtvonalaknak genomi elemzésekhez való kísérleti felhasználásához szükséges a genomjuk megismerése, és a megfelelő modell kiválasztása. Kutatásaink kezdetekor még gyakorlatilag nem voltak ismert sejtvonal-genomok. Mivel a DNS-hibajavítás kutatása nagymértékben támaszkodik a DT40 csirke sejtvonalra, elvégeztük a DT40 sejtvonal genomjának feltérképezését (Molnár et al., 2014). A DT40 sejtvonal egy madárleukózis vírussal megfertőzött házi tojó tyúkból kifejlődött burzális limfómából származik. A szekvenáláshoz egy általunk már évek óta használt vadtypusú DT40 vonal újonnan izolált sejtklonját használtuk. Az 55x átlagos lefedettséggel szekvenált genomban 6251553 SNV-t találtunk, melyek közül 3320786 volt homozigóta. A mutációk spektrumának elemzése nem tárt fel semmiféle DT40-specifikus mutációs folyamatot. A 2-es és 24-es kromoszóma elvártnál magasabb lefedettsége extra kópiaszámot sugallt, melyet SNP hibridizációs array elemzéssel is igazoltunk. Összességében a genom 26%-át fedték heterozigóta állapotvesztéses régiók, amely nem több, mint amennyit publikált csirke fajták genomjában detektáltunk, tehát ezek többsége valószínűleg nem a sejtvonalban jött létre. A sejtvonalban találtunk egy humán tumorokra is jellemző mutációt a *PIK3RI* génben, valamint megtaláltuk a *MYC* gén első intronjába beépült madárleukózis vírust, mely fokozza a gén expresszióját. Ismert továbbá a *TP53* gén mutációja a sejtvonalban (Abe és Branzei, 2014), de ezt elemzésünk során nem észleltük, mivel a gén nem szerepel a csirke referenciagenomban.

3.1.2 Mutációk hatékony detektálása izogenikus mintákban

A sejtvonal-genomok mutációs folyamatainak feltérképezéséhez szükség van olyan bioinformatikai eszközökre, melyek a sejtvonal-genomokban hatékonyan azonosítanak mutációkat. Ez legegyszerűbben mintapárok összehasonlításával lehetséges, ahol az egyik minta a kísérlet elejéről, egy kiindulási sejtből származik, a másik pedig egy leszármazottjából egy későbbi időpontból. Megpróbáltuk erre a célra a tumorgenomokon általánosan használt szoftvereket alkalmazni, azonban teljesítményüket nem találtuk megfelelőnek a sejtvonalakból

származó mintákon. Ezért kidolgoztunk egy új mutációdetektálási módszert, melyet specifikusan sok hasonló, izogenikus minta különbségeinek megtalálására fejlesztettünk ki. Új megközelítésünk nem mintapárokban detektálja a mutációt, hanem egyszerre vizsgálja az egy kísérletben vagy szekvenálásban keletkezett összes mintát. A módszer alapvetően klonális, tipikusan heterozigóta mutációkat keres, és kiszűri azokat a pozíciókat, ahol több minta is eltér a referencia genomtól. A megközelítés garantálja kiindulási klónban vagy sejtvonalban levő 'öröklött' mutációk kiszűrését, hiszen ezek több mintában is jelen lesznek, így SNP adatbázis használata nélkül sem fognak fals pozitív 'szomatikus' mutációként jelentkezni. A fals pozitív mutációk másik fő forrásai az illesztési hibák. Viszont mivel ezek tipikusan azonos régiókban jelentkeznek az összes mintában, a sok mintás szűrés ezeket is könnyen eltávolítja.

Az IsoMut program három állítható paraméterrel szűri a mutációkat, avagy futtatható alapbeállításokkal is, és a megtalált mutációk listája utószűrhető egy hozzájuk rendelt valószínűségi érték alapján, melyet úgy kell hangolni, hogy a belső kontroll kiindulási klónokban nagyon kevés fals pozitív mutáció legyen. Az IsoMut elsődleges felhasználása a mutációk gyors és pontos detektálása 20-60 izogenikus minta kb. 30x lefedettségű diploid genomjában, azonban a paraméterek megfelelő optimalizálásával más izogenikus mintahalmazokon is kiválóan használható (Pipek et al., 2017).

3.1.3 Sejtvonalak spontán mutációs folyamatainak feltérképezése

A sejtvonal-genomok mutagenézis eszkéként való felhasználásához fontos megismerni az adott sejtvonalakban működő spontán mutációs mechanizmusokat. Elsők között mutattuk meg, hogy egy kísérlet során elegendő spontán mutáció keletkezik a mutációs folyamat megismeréséhez. Meghatároztuk három sejtvonal spontán mutációs folyamatait. A DT40 sejtvonal spontán mutációs rátája hasonlóan alacsony, mint különféle fajok normál spontán mutációs rátája. A DLD-1 vastagbél karcinóma sejtvonal ismertén MMR hiányos és mikroszatellit instabilitást mutat, míg a SUM194PT tripla negatív emlőrák eredetű sejtvonal a *BRC1* gén mutációját hordozza. Mindkét sejtvonal spontán mutációs rátáját sokkal magasabbnak találtuk a DT40-nél, mely a DNS-hibajavítási folyamataik hiányosságainak lehet a következménye, és eltérő triplet mutációs spektrumokat mutattak (Póti et al., 2018).

3.2 Rákellenes terápiák mutagenikus hatása

3.2.1 A leggyakrabban használt citotoxikus terápiák mutagenikus hatásai

Az izogenikus sejtklónok genomszekvenálása és a mutációk hatékony detektálása megteremtette a lehetőséget különféle környezeti hatások mutagenicitásának átfogó elemzéséhez. Fontos kérdés a citotoxikus tumorterápiák mutagenikus hatásának megismerése, mivel amennyiben a kezelés mutagenikus hatású, a tumorban indukált mutációk növelhetik a rezisztencia kialakulásának esélyét, egészséges szövetekben pedig másodlagos daganatok keletkezését indukálhatják.

Vadtípusú DT40 sejteket nyolc különböző, általánosan használt citotoxikus szerrel kezeltünk. Cisplatin esetén találtunk legtöbb mutációt SNV-k, inzerciók és deléciók tekintetében is. Szintén számottevő mennyiségű bázisszubsztitúciót okozott a ciklofoszfamid kezelés. Megmutattuk, hogy elsősorban a DNS-t közvetlenül károsító citotoxikus szereknek van számottevő mutagenikus hatása. A kezelés mutagenicitásának mérlegelése tehát fontos szempont, különösen gyermekkori daganatok kezelésében.

A cisplatin-kezelés hatására igen specifikus bázisszubsztitúciós spektrumot észleltünk, melyben C>A mutációk domináltak. A mutációkat egy replikatív folyamat okozhatja, amely a hibás templát másolásakor tévesen adenozint illetve a cisplatin által okozott léziókkal szembe. A cisplatinkezelés nagyszámú inzerciót és deléciót is generált, melyek kialakulása szintén a szálon belüli cisplatin keresztkötések replikációjához, a transzléziós szintézis folyamatához volt köthető (Szikriszt et al., 2016).

3.2.2 PARP inhibitorral történő hosszú távú kezelés nem mutat mutagenikus hatást sejtvonalakban és betegből származó xenograftokban

A PARP gátlószer niraparib szelektíven öli a *BRCA1* és *BRCA2* mutáns sejteket. A niraparib klinikai alkalmazását 30 napi folyamatos kezeléssel modelleztük sejtvonalakon. Vadtípusú és *BRCA1*^{-/-} mutáns DT40 sejtvonalakat, valamint DLD-1 és *BRCA1* mutáns SUM149PT sejteket alkalmaztunk. Eredményeink szerint nem volt szignifikáns különbség egyik sejtvonal esetében sem a keletkezett SNV-k és inzerciók számában a niraparib és a mock kezelés között, míg a deléciók esetében csak a *BRCA1*^{-/-} mutáns DT40 sejtvonal esetében találtunk enyhe, de szignifikáns emelkedést niraparib kezelés hatására. Sejtvonalakon tehát a PARP inhibitor kezelés mutagenikus hatásának hiányát tapasztaltuk. Az eredmények *in vivo* igazolása céljából

emlőrák eredetű xenograftokkal implantált egereket kezeltünk niraparibbal 28 napig, és a kezelés után a beültetett tumorszöveten exomszekvenálást végeztünk. Egyik xenograft modellen sem észleltünk szignifikáns mutagenikus hatást a niraparib kezelt állatokban a kontroll kezeléshez képest. Eredményeink szerint a PARP inhibitor kezelések valószínűleg nem generálnak mutációkat normás sejtekben, ezért biztonságos lehet hosszú távú használatuk HR hiányos daganatok kezelésére (Póti et al., 2018).

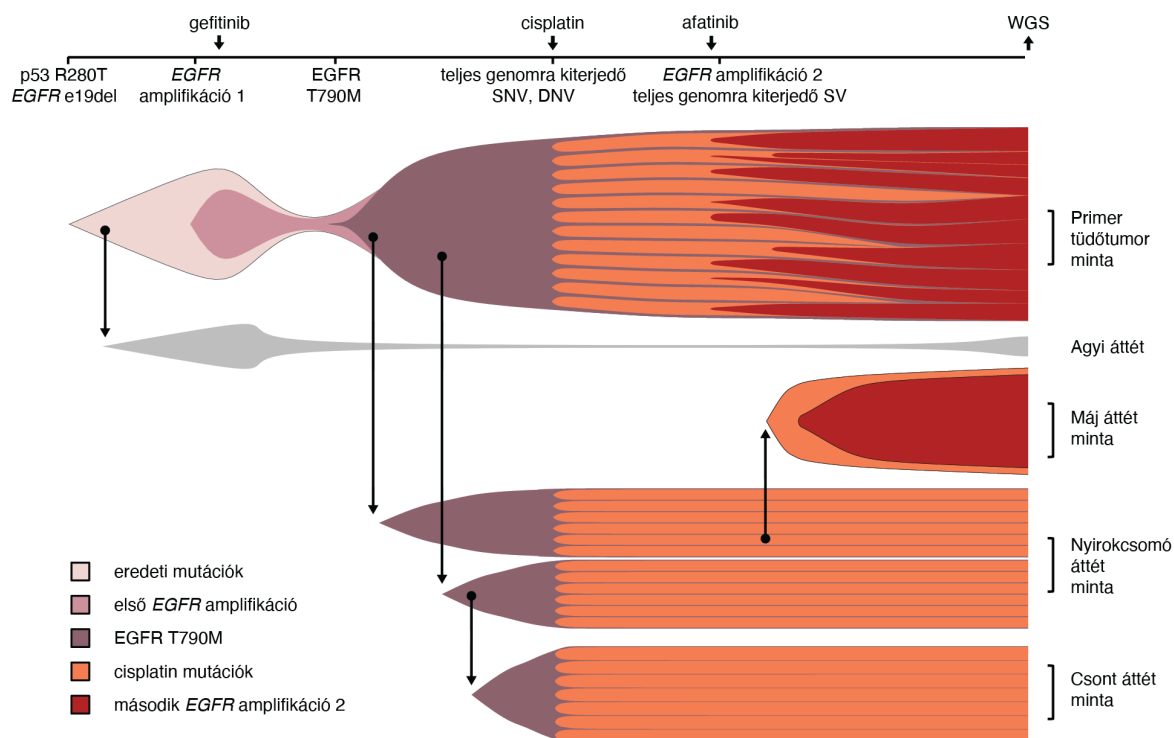
3.2.3 A tumorterápiák genomi lenyomata felhasználható a metasztázisok kialakulási idejének meghatározására

A metasztázisok igen lényegesek sok daganattípus mortalitása szempontjából, azonban a klinikai képalkotás kevés információt szolgáltat a kialakulásuk idejéről, illetve hogy már léteznek-e az első kezelés időpontjában. Genomi elemzések segíthetnek a tumorevolúció visszamenőleges megértésében, és korai vagy késői áttétek elkülönítésében. Amennyiben a beteg mutagenikus kezelésekben részesül, a kezelés lenyomata észlelhető lehet a tumor genomjában, és segíthet az áttétek kialakulási idejének visszamenőleges megértésében. Ha egy adott metasztázis a cisplatin-kezelés előtt jött létre, sejtjeiben különböző cisplatin-indukált mutációkat kell találnunk. A kezelés után keletkezett áttéteknek azonban, mivel tipikusan egyetlen sejtből jönnek létre, klonális mutációkat kell tartalmazniuk.

A kezelés által okozott mutációk vizsgálata céljából genomszekvenálást végeztünk egy elhunyt fiatal nemdohányos tüdő adenokarcinóma beteg boncolásból származó primer tumorából és három különböző szöveti áttétből származó mintáján. A projektet az Országos Korányi Intézzel kollaborációban végeztük. A beteg a tumor *EGFR* aktiváló mutációja miatt (*EGFR* exon 19-es deléción) célzott kezelésként gefitinib tirozin kináz inhibitor kezelésben részesült, melyet követően kapott egyetlen ciklus cisplatin kezelést.

A genomszekvenciák elemzéséhez szükség volt a mutációdetekciós módszerek részletes továbbfejlesztésére. Cisplatinnal asszociált mutációkat főleg a primer tüdőtumor mintában és a csont, illetve nyirokcsomó áttét egyedi mutációi között találtunk, alacsony allélfrekvenciával. A dinukleotid mutációk elemzése szintén arra utalt, hogy a primer tumorban valamint a csont és nyirokcsomó áttétben szubklonális cisplatin mutációk voltak, míg a máj áttétben főleg klonálisak. Eredményeink a mutációk allélfrekvenciáit is figyelembe véve arra utalnak, hogy a májáttét a kezelés után keletkezett, míg a csont- és nyirokcsomó-áttét a kezelés előtt is létezett (2. ábra). Ez különösen azért figyelemreméltó, mert az áttétek még a cisplatinkezelés után

hónapokkal sem voltak detektálhatók. Az EGFR gén amplifikációját és egyéb genomi átrendeződéseket is figyelembe véve egy átfogó modellt tudtunk készíteni a tumor evolúciójáról és az áttétek kialakulásáról (2. ábra) (Németh et al., 2019).



2. Ábra: A betegség lefolyásának és a metasztázisok kialakulásának kvalitatív modellje az elemzések eredményei alapján. A cisplatin által indukált mutációkat tartalmazó szubklónokat narancssárga szín jelöli.

3.3 A homológ rekombináció hiányának hatása a mutagenézisre és a terápiákra mutatott érzékenységre

3.3.1 A homológ rekombináció hiányában fellépő mutagenikus folyamatok

A daganatok genomi instabilitását okozhatja a tumorsejtek DNS-hibajavító folyamatainak hiányos működése. Ennek megfelelően egy nem felügyelt NMF algoritmus által talált bázisszubsztitúciós spektrum, a COSMIC 3-as szignatúra megjelenése is asszociálható a *BRCA1/2* génhibákkal (Alexandrov et al., 2013). A *BRCA* mutációk teljes mutagenikus hatásának feltárása és a fenti összefüggés bizonyítása céljából izogenikus vad típusú, illetve *BRCA*^{-/-} és *BRCA2*^{-/-} null mutáns DT40 sejtekben térképeztük fel a spontán mutagenikus

folyamatokat teljes genomszekvenálás segítségével (Zámborszky et al., 2017). Tanulmányunk folytatásaként a HR útvonalban biztosan vagy feltételezhetően szintén szerepet játszó egyéb gének mutagenikus hatását is vizsgáltuk DT40 sejtvonalon. A vadtypushoz képest átlagosan kb. nyolcszoros SNV mutációs rátát tapasztaltunk a *BRCA1*^{-/-} és *BRCA2*^{-/-} mutánsok esetében, a *RAD51* paralóg mutánsokban (*RAD51C*^{-/-}, *XRCC2*^{-/-} és *XRCC3*^{-/-}) valamint a *PALB2*^{-/-} mutáns sejtvonalon. Szintén jelentősen megemelkedett SNV mutagenezist láttunk a *RAD54*^{-/-} mutáns sejtvonalon, míg a *RAD52* mutációnak nem volt SNV fenotípusa. Érdekes módon a két tesztelt checkpoint fehérje (ATM, CHK2) hiánya csak minimálisan emelte meg a spontán mutagenikus rátát, bár öröklött mutációik szintén emlő- és petefészekrákra hajlamosítanak.

A spontán deléciók spektrumai eltérők voltak, a *BRCA2*^{-/-} és *PALB2*^{-/-} mutánsok esetében több nagy deléció keletkezett. A sejtvonalakon szerzett eredmények validálása céljából összehasonlításként megvizsgáltunk olyan publikált tumormintákat is, amelyekben a vizsgált HR gének valamelyikének biallélikus inaktivációja látható. A talált deléciók méreteloszlása rendkívül pontosan reprodukálta a DT40 sejtvonalból származó eredményeket, igazolva a *BRCA2* és *PALB2* kitüntetett szerepét a kettős szálú DNS-törések javításában vagy kialakulásuk megakadályozásában (Póti et al., 2019).

3.3.2 A homológ rekombináció hiányának hatása a terápiás érzékenységre

A HR gének hiányában fellépő mutagenikus folyamatok feltérképezésével fő célunk annak vizsgálata volt, hogy a mutációs mintázatok felhasználhatók-e a terápiás hatás előrejelzésére. A mutációs szignatúrák és a terápiák összekapcsolásához megmértük a fentiekben felhasznált kísérleti sejtvonalak számos gyakran használt kemoterápiás vagy célzott terápiás szerre mutatott érzékenységét. A legnagyobb relatív érzékenységeket az olaparib és talazoparib PARP inhibitorok esetén mértük, de a legtöbb HR mutáns sejtvonalon platinaalapú szerekre is érzékenységet mutatott. Az érzékenységeknek a mutációs mintázat alapján történő predikciója szempontjából jól látható volt, hogy egyik terápiás hatóanyag esetében sincsen tökéletes korreláció. Az SNV mintázatok jól jelzik a PARP inhibitor érzékenységet, azonban a *RAD51* paralóg mutánsok esetében ez az érzékenység egy nagyságrenddel kisebb, mint a *BRCA1*, *BRCA2* esetén. Ez a megfigyelés különösen releváns, mert jelenleg zajlanak olyan klinikai vizsgálatok, amelyek a PARP inhibitorok nem-*BRCA* HR mutációkat hordozó daganatokra kifejtett hatását tesztelik. Megfigyeléseink alapján a kezelések csökkent hatékonysága várható a *RAD51* paralóg mutáns tumorok esetén (Póti et al., 2019).

A fentiekben teljes funkcióvesztéses génmutációkat vizsgáltunk, azonban a gének expressziójának változása is befolyásolhatja a terápiákra mutatott érzékenységet. Egy kollaborációs projektben tripla negatív emlőrák esetekben kerestünk olyan géneket, amelyeknek az expressziója szignifikánsan korrelál a cisplatin kezelés hatékonyságával. Kísérletesen is sikerült igazolni, hogy megnövelt *BLM* expresszió érzékenyíti a sejteket cisplatin-kezelésre. A *BLM* fehérje esetében a HR-t segítő és gátló funkciókat is leírtak. Eredményeink szerint megnövekedett *BLM* expresszió esetén a fehérje HR-t ellenző funkciói dominálhatnak, cisplatin érzékenységet okozva (Birkbak et al., 2018).

3.3.3 A doxorubicin pegilált liposzómás formulációja segítségével elkerülhető a rezisztencia kialakulása egy *BRCA1* mutáns tumormodellben

A kemoterápiás kezelések sikerét általában a rezisztencia kialakulása korlátozza, melyet számos hatóanyag esetében a P-glycoprotein (Pgp/ABCB1) transzporter fehérje megnövekedett expressziója okoz (Gottesman et al., 2002). A doxorubicin egy ismert Pgp szubsztrát. Szakács Gergely kutatócsoportjával együtt azt vizsgáltuk, hogy a doxorubicin klinikailag használt liposzómás formulációja (PLD) képes-e csökkenteni a rezisztencia kialakulását. Eredményeink szerint a doxorubicin és a PLD szelektivitása a *BRCA1* génmutációra DT40 sejtvonalak esetében hasonló, kb. 3-szoros. Ezzel ellentétben egy *Brcal* mutáns egér tumormodellben a PLD számottevően hatékonyabbnak bizonyult. A különbséget magyarázhatja, hogy a PLD doxorubicin rezisztens tumorokon is hatásosnak bizonyult, és a PLD-re is rezisztens tumorokban a Pgp sokkal magasabb szintje volt mérhető, mint a doxorubicin rezisztens mintákban (Füredi et al., 2017).

3.4 A daganatok mutációs mintázatainak rendszerezése kísérletes és bioinformatikai megközelítéssel

3.4.1 A homológ rekombináció hiánya egységes bázissubsztitúciós mutációs folyamatot indukál

A HR hiányában fellépő mutagenikus folyamat jobb megértéséhez nemnegatív mátrix faktorizációval matematikailag elemeztük a detektált mutációk triplet spektrumait. Azt találtuk, hogy már két komponens is kis hibával leírja mind a 11 HR mutáns genotípusban mért mutációs folyamatokat. A kapott szignatúrák biológiailag is értelmezhetőnek bizonyultak. Az

egyik (BG, 'background') szignatúra hasonlított a vadttípus mutációs mintázatára, és hasonló mennyiségben volt jelen az összes vizsgált mutáns sejtvonalban is. A másik (HRD, 'HR deficiency') szignatúra pedig lefedte a HR mutánsokban keletkezett extra mutációkat, ezért egy valódi HR-hiányra specifikus szignatúrának tekinthető.

A COSMIC tumorspecifikus szignatúrákhoz hasonlítva a HRD szignatúra nagyon hasonlít a 3-as szignatúrához, amelyet gyakran észleltek *BRCA1/2* mutációt hordozó daganatokban. Eredményeink tehát igazolják az összefüggést a *BRCA1/2* hiánya és a 3-as szignatúra között, valamint bizonyítják, hogy a *RAD51* paralóg gének, a *PALB2* és a *RAD54* funkcióvesztése is ugyanezt a bázisszubsztitúciós folyamatot indukálja (Póti et al., 2019).

3.4.2 Mutagenikus folyamatok egy *BRCA1* mutáns egér emlőtumorból izolált sejtvonalban

A 3.3.3 alfejezetben említett *Brca1* mutáns egér emlőtumorból Szakács Gergely csoportja izolált egy stabil sejtvonalat (CST), amely egérbe visszaültetve újra daganatokat formál. Egy sejtklón szekvenálásával megvizsgáltuk a *Brca1* mutáció befolyását a sejtekben zajló mutagenikus folyamatokra. A mutációs spektrum felbontásával detektáltuk a HR hiánnyal asszociált 3-as és 8-as szignatúrák kontribúcióját, valamint egyéb mutációs folyamatok hozzájárulását. Továbbá igen nagyszámú kópiaszám-változást találtunk, hasonlóan a *BRCA1/2* mutáns humán emlődaganatok genomjához. A CST sejtvonal és tumormodell tehát különösen alkalmas a *BRCA1*-asszociált genomi instabilitás vizsgálatára (Hámori et al., 2020).

3.4.3 Két fő mutációs folyamat működik az MMR hiányában

A daganatok mutációs folyamatainak értelmezése mutációs szignatúrák tükrében igen sikeresnek bizonyult, azonban az MMR hiányával asszociált mutagenézis esete kérdéseket vet fel. Míg a HR hiánya alapvetően egyetlen bázisszubsztitúciós szignatúrához köthető, addig az MMR hiányával hat vagy hét szignatúrát is összekapcsoltak (Alexandrov et al., 2020; Alexandrov et al., 2013). Ez meglepő, mivel az MMR egy aránylag egyszerű, kevés fehérjét használó folyamat.

A kérdés vizsgálatához meghatároztuk az *MSH2* gén kiütésének hatását a spontán mutagenézisre DT40 sejtvonalban, valamint a homozigóta *MSH6* mutációt hordozó DLD-1 sejtvonal spontán mutációs spektrumát. Az MMR hiányos sejtvonalak spontán triplet mutációs spektruma majdnem tökéletes egyezést mutatott. A kísérletes spektrumok azonban csak több

COSMIC szignatúra keverékére voltak felbontható. Megkíséreltük tehát újradefiniálni az MMR hiánnyal kapcsolatos mutációs folyamatok szignatúráit. A TCGA és PCAWG adatbázisokból letöltött MMR hiányos minták alapján két új szignatúrát definiáltunk. Megmutattuk, hogy ezek jobban teljesítenek a hat MMR hiánnyal asszociált COSMIC szignatúránál az MMR hiány azonosításában.

Összességében tehát a mutációs adatok gondos elemzésével egyszerűsítettük a mutációs szignatúrák rendszerét, és azonosítottunk két olyan MMR hiányában fellépő mutációs folyamatot, amelyek valószínűleg a mechanizmusra utaló valódi biológiai relevanciával bírnak (Németh et al., 2020).

3.5 A mutációk kialakulásának molekuláris mechanizmusai

3.5.1 A ciklobutil pirimidin dimer ultraibolya fototermékek átírásának mechanizmusai

A mutagenézis egyik fő mechanizmusa a téves bázisok beillesztése az adduktokat tartalmazó templát DNS-szál másolásakor. Két szempont határozza meg a DNS adduktok mutagenikus hatását: (1) a replikációjukat a sérült templátot felhasználó transzléziós szintézis (TLS), vagy az alternatív templátot felhasználó folyamatok végzik, (2) a TLS az eredeti bázisokkal komplementer vagy helytelen nukleotidokat illeszt be. A kérdést az ultraibolya fény által okozott leggyakoribb léziók, a ciklobutil pirimidin dimerek (CPD) esetében vizsgáltuk, léziókat tartalmazó, sejtekbe juttatott plazmidok replikációjával. A TLS és a templátváltó útvonal közötti választás genetikáját TLS mutánsok alkalmazásával vizsgáltuk *XPA*⁻ genetikai háttérben. A *REV3* gén kiütése esetén, mely a polimeráz ζ katalitikus alegységét kódolja, csökkent a TLS aránya, és a TLS polimerázok toborzását akadályozó *REV1* mutánsban, valamint az ubikvitilációra képtelen *PCNA*^{K164R} pont mutánsban úgyszintén.

A kontroll sejtekben a TLS események 11% volt mutagenikus, mely magyarázhatja a COSMIC v3-ban szereplő, UV hatáshoz kötött T>A mutációkat tartalmazó SBS7D szignatúrát (Alexandrov et al., 2020). A TLS mutáns genetikai háttérű kísérletek elemzése a pol ζ kitüntetett szerepére utalt a T-T(CPD) mutagenikus átírásában (Varga et al., 2012).

3.5.2 A PCNA ubikvitilációjának szerepe a hibaelkerülő folyamatokban

A PCNA fehérje poszttranszlációs módosításai fontos szerepet töltenek be a sérült DNS replikációjának szabályozásában. A poliubikvitiláció szerepe különösen érdekes. A kérdés

vizsgálatára egy genetikai esszét használtunk, melyben PCNA-ubikvitin fúziós fehérjék stabil expressziójával különítettük el a mono- és poliubikvitilációs folyamatok szerepét. A PCNA módosítások hatását elsőként a sejtvonalak DNS-károsító szerekre mutatott érzékenységén keresztül vizsgáltuk. A *PCNA^{K164R}* mutációt hordozó sejtvonal a várakozásnak megfelelően túlérzékenységet mutatott. A vad típusú PCNA-hoz hasonlóan a *PCNA^{K164R}-Ub* és a nem poliubikvitilálható *PCNA^{K164R}-Ub^{K63R}* fúziós fehérjék expressziója egyaránt menekítette a *PCNA^{K164R}* sejtvonal érzékenységét, a PCNA monoubikvitilációja tehát elegendő a vad típusú sejtvonallal ekvivalens DNS-hibatolerancia eléréséhez.

A fent említett, léziót tartalmazó plazmid replikációs esszével azt találtuk, hogy a *PCNA^{K164R}-Ub* és *PCNA^{K164R}-Ub^{K63R}* fúziós fehérjék expressziója a normál PCNA expressziójához hasonlóan menekítette a TLS arányának csökkenését az *XPA⁻* sejtvonalban mért szintre, tehát PCNA monoubikvitilációja elegendő a TLS és a templátváltás/HR hibaelkerülő útvonalak működéséhez. Elvégeztük az esszét két HR génhiányos sejtvonalban is, és azt tapasztaltuk, hogy mind a *BRCA1*, mind az *XRCC3* gén kiütése jelentősen csökkentette a templátváltást mutató szekvenciák arányát. A kísérletsorozat tehát azt mutatja, hogy a DT40 sejtvonalban a PCNA poliubikvitilációja nem szükséges, a klasszikus HR fehérjék viszont szükségesek a templátváltáshoz (Gervai et al., 2017).

3.5.3 A BRCA fehérjék hiányában megnövekszik a DNS-sérülések száma

A HR fehérjék tehát szükségesek az egy szálát érintő DNS léziók alternatív templátot használó átírásához. Itt a replikációs villa összeomlása nélküli templátváltó reakcióban, és az eltörött replikációs villák újraindításában is szerepet játszhatnak (1. ábra). A H2AX hiszton foszforilációja a kettős szálú DNS szál töréseknek és az elakadt replikációs villáknál keletkező hosszú egyszálú DNS-szakaszoknak is korai markere. Immunfluoreszcenciás és western blot mérésekkel azt találtuk, hogy kezeletlen vad típusú DT40 sejtekben is észlelhető a foszforilált H2AX (γ -H2AX) alacsony szintje, azonban *BRCA1^{-/-}* sejtekben szignifikánsan magasabb szinten van jelen, különösen DNS károsító kezelést követően. A megemelkedett és tartós γ -H2AX szignál a replikációs villák gyakoribb összeomlására, illetve az így keletkezett törött villák hiányos javítására utal *BRCA2^{-/-}* és *BRCA1^{-/-}* sejtekben (Zámborszky et al., 2017).

3.5.4 A HR fehérjék szerepe elhanyagolható a kettős DNS száltörések mutagenikus javításában

A HR fehérjék hiányában kialakuló deléciókat okozhatja a HR tökéletlen működése, vagy a HR hiányában fellépő helyettesítő folyamatok. Kettős száltörések esetén az NHEJ pótolhatja a HR-alapú javítás kieső funkcióit. Felállítottunk egy kísérletes rendszert annak vizsgálatára, hogy jól definiált kettős DNS száltöréseknél milyen mutációk, deléciók keletkeznek, melyhez CRISPR/Cas9 nukleázzal célzott genomi lókuszoknál elemeztük a kettős száltörés javítását amplikonszekvenálással. Érdekes módon nem találtunk számottevő különbségeket a keletkező deléciók méreteloszlásában a vad típusú és a különféle HR mutáns sejtek között, azonban egy *KU70*^{-/-} génkiütött sejt vonalban, amelyben az NHEJ hibajavító folyamat működésképtelen, sokkal kevesebb deléciót találtunk a célzott lókuszoknál, melyeknek méreteloszlása is erősen eltért a többi sejt vonalban tapasztalttól. Következésképpen megállapíthatjuk, hogy a kettős DNS száltörés mutagenikus javításáért kizárólag az NHEJ felelős, és a *BRCA2* és *PALB2* mutáns sejtekben a kettős száltörések megnövekedett száma okozhatja a spontán megjelenő deléciók többségét, azonban ez más HR gének esetén nincs így. Valószínű tehát, hogy a *BRCA1* és egyéb HR mutánsokban keletkező nagyon rövid deléciókat egy az NHEJ-től és a kettős száltörés javításától különböző mechanizmus okozza, mely valószínűleg a transzléziós szintézis (Póti et al., 2019).

4 AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Nagy áteresztőképességű újgenerációs DNS-szekvenálás segítségével elsőként térképeztük fel több kísérletes sejtvonal-modell genomját.
2. Kifejlesztettünk egy IsoMut nevű bioinformatikai módszert, amely izogenikus genomi mintákban gyorsan és pontosan detektálja a mutációkat, így megteremtettük a lehetőségét a genomszekvenálás mutagenézis eszkéként való felhasználásának.
3. Meghatároztuk és összehasonlítottuk a legfontosabb kemoterápiás szerek mutagenikus hatását, és a mutációs spektrum alapján értelmeztük a cisplatin mutagenikus mechanizmusát.
4. Kezelt beteg tumormintáiban kimutattuk a terápia mutagenikus hatását, és a mutációk allélfrekvenciáját felhasználtuk az áttétek kialakulási idejének utólagos meghatározására.
5. Sejtvonalak és betegből származó xenograftok szekvenálásával megmutattuk, hogy a homológ rekombináció deficiens sejteket szelektíven pusztító poli-ADP-polimeráz gátlószer nem rendelkezik számottevő mutagenikus hatással.
6. A homológ rekombináció génjeiben mutáns csirke limfoblasztoma sejtvonalak genomszekvenálásával feltártuk az ezen hibajavító útvonal hiányában fellépő mutagenikus folyamatokat, és citotoxicitási mérések segítségével elemeztük a mutációs spektrumok felhasználhatóságát tumordiagnosztikai célokra.
7. Kísérleti és tumorszekvenálási adatok összehasonlításával meghatároztuk a nem összeillő bázispárok javításának hiányában fellépő mutagenikus folyamatok két fő komponensét.
8. A sérült DNS szakaszok másolásának mechanizmusát és mutagenikus hatását genetikai megközelítésekkel vizsgáltuk mutáns DT40 sejtvonalakon. Érzékenységi mérésekkel, valamint ultraibolya fény által okozott DNS lézióknak a sejtbe juttatásával megmutattuk a transzléziós DNS szintézis fehérjéinek szerepét a DNS-hibatoleranciában és a mutagenézisben, és részletesen feltártuk a PCNA fehérje ubikvitilációjának szerepét a sérült DNS replikációjában.

RÖVIDÍTÉSEK

BER	base excision repair, báziskivágó hibajavítás
CPD	ciklobutil pirimidin dimer
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
HR	homológ rekombináció
MMR	mismatch repair, nem összeillő bázispárok javítása
NER	nucleotide excision repair, nukleotidkivágó hibajavítás
NHEJ	non-homologous end joining, nem homológ végek összekapcsolása
NMF	nemnegatív mátrix faktorizáció
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCAWG	Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes
SNP	single nucleotide polymorphism, egynukleotidos polimorfizmus
SNV	single nucleotide variation, egynukleotidos variáció
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TLS	transzléziós szintézis
Ub	ubikvitin
UV	ultraviolett, ultraibolya

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A bemutatott eredmények a teljes Genomstabilitás Kutatócsoport munkájából származnak, ezért elsősorban köszönettel tartozom a csoport volt és jelenlegi tagjainak, és a velünk szorosan együttműködő további fiatal kutatóknak: Baunoch Judit, Berta Kinga, Chen Dan, Gálicza Judit, Gervai Judit, Guóth-Nagy Csenge, Gyergyák Hella, Gyüre Zsolt, Kovácsné Csenger, Lovrics Anna, Lózsa Rita, Molnár János, Németh Eszter, Pipek Orsolya, Póti Ádám, Ruzs Orsolya, Szeltner Zoltán, Szikriszt Bernadett, Varga Ágnes és Zámboreszky Judit.

Külön köszönettel tartozom fő hazai és külföldi együttműködő partnereinknek, kiknek tanácsai igen sokat segítettek elsősorban a bioinformatikai megközelítések kidolgozásában, valamint a klinikai relevancia szem előtt tartásában: Csabai István, Moldvay Judit, Andrea L. Richardson, Szakács Gergely, Szállási Zoltán, Charles Swanton és Tusnády Gábor.

Végül köszönöm az Enzimológiai Intézetnek és a Magyar Tudományos Akadémiának, hogy 2011-ben befogadta és Lendület pályázattal támogatta kutatócsoportomat.

IRODALOMJEGYZÉK

Abe, T., and Branzei, D. (2014). High levels of BRC4 induced by a Tet-On 3G system suppress DNA repair and impair cell proliferation in vertebrate cells. *DNA Repair (Amst)* 22, 153-164.

Alexandrov, L.B., Kim, J., Haradhvala, N.J., Huang, M.N., Tian Ng, A.W., Wu, Y., Boot, A., Covington, K.R., Gordenin, D.A., Bergstrom, E.N., *et al.* (2020). The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature* 578, 94-101.

Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Borresen-Dale, A.L., *et al.* (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500, 415-421.

Birbak, N.J., Li, Y., Pathania, S., Greene-Colozzi, A., Dreze, M., Bowman-Colin, C., Sztupinszki, Z., Krzystanek, M., Diossy, M., Tung, N., *et al.* (2018). Overexpression of BLM promotes DNA damage and increased sensitivity to platinum salts in triple-negative breast and serous ovarian cancers. *Ann Oncol* 29, 903-909.

Branzei, D., Vanoli, F., and Foiani, M. (2008). SUMOylation regulates Rad18-mediated template switch. *Nature* 456, 915-920.

Cliby, W.A., Roberts, C.J., Cimprich, K.A., Stringer, C.M., Lamb, J.R., Schreiber, S.L., and Friend, S.H. (1998). Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *Embo J* 17, 159-169.

COSMIC (2019). COSMIC: Signatures of mutational processes in human cancer. <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures>

Cristescu, R., Mogg, R., Ayers, M., Albright, A., Murphy, E., Yearley, J., Sher, X., Liu, X.Q., Lu, H., Nebozhyn, M., *et al.* (2018). Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science* 362.

Füredi, A., Szabó, K., Tóth, S., Cserepes, M., Hámori, L., Nagy, V., Karai, E., Vajdovich, P., Imre, T., Szabó, P., *et al.* (2017). Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer. *J Control Release* 261, 287-296.

Gervai, J.Z., Gálicza, J., Szeltner, Z., Zámorszky, J., and Szüts, D. (2017). A genetic study based on PCNA-ubiquitin fusions reveals no requirement for PCNA polyubiquitylation in DNA damage tolerance. *DNA Repair (Amst)* 54, 46-54.

Gottesman, M.M., Fojo, T., and Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2, 48-58.

Hámori, L., Kudlik, G., Szabó, K., Kucsma, N., Szeder, B., Póti, A., Uher, F., Várady, G., Szüts, D., Tóvári, J., *et al.* (2020). Establishment and Characterization of a Brca1(-/-), p53(-/-) Mouse Mammary Tumor Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences* 21.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hashimoto, Y., Puddu, F., and Costanzo, V. (2012). RAD51- and MRE11-dependent reassembly of uncoupled CMG helicase complex at collapsed replication forks. *Nat Struct Mol Biol* *19*, 17-24.

Hekmat-Nejad, M., You, Z., Yee, M.C., Newport, J.W., and Cimprich, K.A. (2000). *Xenopus* ATR is a replication-dependent chromatin-binding protein required for the DNA replication checkpoint. *Curr Biol* *10*, 1565-1573.

Helleday, T., Eshtad, S., and Nik-Zainal, S. (2014). Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat Rev Genet* *15*, 585-598.

Jasin, M., and Rothstein, R. (2013). Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *5*, a012740.

Kato, M., Takano, M., Miyamoto, M., Sasaki, N., Goto, T., Tsuda, H., and Furuya, K. (2015). DNA mismatch repair-related protein loss as a prognostic factor in endometrial cancers. *J Gynecol Oncol* *26*, 40-45.

Lawrence, M.S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G.V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S.L., Stewart, C., Mermel, C.H., Roberts, S.A., *et al.* (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* *499*, 214-218.

Lehmann, A.R., McGibbon, D., and Stefanini, M. (2011). Xeroderma pigmentosum. *Orphanet J Rare Dis* *6*, 70.

Molnár, J., Póti, A., Pipek, O., Krzystanek, M., Kanu, N., Swanton, C., Tusnády, G.E., Szállási, Z., Csabai, I., and Szüts, D. (2014). The Genome of the Chicken DT40 Bursal Lymphoma Cell Line. *G3 (Bethesda)* *4*, 2231-2240.

Németh, E., Krzystanek, M., Reiniger, L., Ribli, D., Pipek, O., Sztupinszki, Z., Glasz, T., Csabai, I., Moldvay, J., Szallasi, Z., *et al.* (2019). The genomic imprint of cancer therapies helps timing the formation of metastases. *Int J Cancer* *145*, 694-704.

Németh, E., Lovrics, A., Gervai, J.Z., Seki, M., Rospo, G., Bardelli, A., and Szüts, D. (2020). Two main mutational processes operate in the absence of DNA mismatch repair. *DNA Repair (Amst)* *89*, 102827.

O'Connor, M.J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell* *60*, 547-560.

Pascal, J.M. (2018). The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* *71*, 177-182.

Pipek, O., Ribli, D., Molnár, J., Póti, A., Krzystanek, M., Bodor, A., Tusnády, G.E., Szallasi, Z., Csabai, I., and Szüts, D. (2017). Fast and accurate mutation detection in whole genome sequences of multiple isogenic samples with IsoMut. *BMC Bioinformatics* *18*, 73.

Plotz, G., Zeuzem, S., and Raedle, J. (2006). DNA mismatch repair and Lynch syndrome. *J Mol Histol* *37*, 271-283.

Póti, A., Berta, K., Xiao, Y., Pipek, O., Klus, G.T., Ried, T., Csabai, I., Wilcoxon, K., Mikule, K., Szallasi, Z., *et al.* (2018). Long-term treatment with the PARP inhibitor niraparib does not

increase the mutation load in cell line models and tumour xenografts. *Br J Cancer* 119, 1392-1400.

Póti, A., Gyergyák, H., Németh, E., Rusz, O., Tóth, S., Kovácsné, C., Chen, D., Szikriszt, B., Spisák, S., Takeda, S., *et al.* (2019). Correlation of homologous recombination deficiency induced mutational signatures with sensitivity to PARP inhibitors and cytotoxic agents. *Genome Biol* 20, 240.

Ravanat, J.L., Douki, T., and Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B* 63, 88-102.

Scully, R., Panday, A., Elango, R., and Willis, N.A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 698-714.

Szikriszt, B., Póti, A., Pipek, O., Krzystanek, M., Kanu, N., Molnár, J., Ribli, D., Szeltner, Z., Tusnády, G.E., Csabai, I., *et al.* (2016). A comprehensive survey of the mutagenic impact of common cancer cytotoxics. *Genome Biol* 17, 99.

Szüts, D., Marcus, A.P., Himoto, M., Iwai, S., and Sale, J.E. (2008). REV1 restrains DNA polymerase zeta to ensure frame fidelity during translesion synthesis of UV photoproducts in vivo. *Nucleic Acids Res* 36, 6767-6780.

Taylor, M.R.G., Špírek, M., Chaurasiya, K.R., Ward, J.D., Carzaniga, R., Yu, X., Egelman, E.H., Collinson, L.M., Rueda, D., Krejci, L., *et al.* (2015). Rad51 Paralogs Remodel Pre-synaptic Rad51 Filaments to Stimulate Homologous Recombination. *Cell* 162, 271-286.

Varga, A., Marcus, A.P., Himoto, M., Iwai, S., and Szüts, D. (2012). Analysis of CPD Ultraviolet Lesion Bypass in Chicken DT40 Cells: Polymerase eta and PCNA Ubiquitylation Play Identical Roles. *PLoS One* 7, e52472.

Wang, J., Mullighan, C.G., Easton, J., Roberts, S., Heatley, S.L., Ma, J., Rusch, M.C., Chen, K., Harris, C.C., Ding, L., *et al.* (2011). CREST maps somatic structural variation in cancer genomes with base-pair resolution. *Nat Methods* 8, 652-654.

Zámborszky, J., Szikriszt, B., Gervai, J.Z., Pipek, O., Póti, A., Krzystanek, M., Ribli, D., Szalai-Gindl, J.M., Csabai, I., Szallasi, Z., *et al.* (2017). Loss of BRCA1 or BRCA2 markedly increases the rate of base substitution mutagenesis and has distinct effects on genomic deletions. *Oncogene* 36, 746-755.

Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B., and Yu, X. (2009). PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr Biol* 19, 524-529.

Zhang, H., and Lawrence, C.W. (2005). The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15954-15959.

A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Eltérő szenior szerző esetén a doktori értekezés csak a kutatócsoportunk hozzájárulását tárgyalja, amelyet alább tételesen is feltüntetek.

Varga A, Marcus AP, Himoto M, Iwai S, Szüts D. (2012). Analysis of CPD ultraviolet lesion bypass in chicken DT40 cells: Polymerase η and PCNA ubiquitylation play identical roles. *PLoS One* 7, e52472. (D1, IF: 3.730)

Molnár J, Póti A, Pipek O, Krzystanek M, Kanu N, Swanton C, Tusnády GE, Szállási Z, Csabai I, Szüts D. (2014). The genome of the chicken DT40 bursal lymphoma cell line. *G3 (Bethesda)* 4, 2231-2240. (D1, IF: 3.198)

Szikriszt B, Póti Á, Pipek O, Krzystanek M, Kanu N, Molnár J, Ribli D, Szeltner Z, Tusnády GE, Csabai I, Szállási Z, Swanton C, Szüts D. (2016). A comprehensive survey of the mutagenic impact of common cancer cytotoxics. *Genome Biol.* 17, 99. (D1, IF: 11.908)

Zámborszky J, Szikriszt B, Gervai J, Pipek O, Póti Á, Ribli D, Krzystanek M, Szalai-Gindl JM, Swanton C, Szallasi Z, Csabai I, Richardson AL, Szüts D. (2017). Loss of BRCA1 or BRCA2 markedly increases the rate of base substitution mutagenesis and has distinct effects on genomic deletions. *Oncogene* 36, 746-755. (D1, IF: 6.854)

Pipek O, Ribli D, Molnár J, Póti Á, Krzystanek M, Bodor A, Tusnády GE, Szallasi Z, Csabai I, Szüts D. (2017). Fast and accurate mutation detection in whole genome sequences of multiple isogenic samples with IsoMut. *BMC Bioinformatics* 18, 73. (D1, IF: 2.213)

Füredi A, Szabó P, Tóth S, Cserepes M, Hámori L, Nagy V, Karai E, Vajdovich P, Imre T, Szabó P, Szüts D, Tóvári J, Szakács G. (2017). Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer. *J Control Release* 261, 287-296. (D1, IF: 7.877)

Hozzájárulás: DT40 sejtvonal alapú érzékenységi kísérletek tervezése, értékelése.

Gervai JZ, Gálicza J, Szeltner Z, Zámborszky J, Szüts D. (2017). A genetic study based on PCNA-ubiquitin fusions reveals no requirement for PCNA polyubiquitylation in DNA damage tolerance. *DNA Repair (Amst)*. 54, 46-54. (D1, IF: 4.461)

Birkbak NJ, Li Y, Pathania S, Greene-Colozzi A, Dreze M, Bowman-Colin C, Sztupinszki Z, Krzystanek M, Diossy M, Tung N, Ryan PD, Garber JE, Silver DP, Iglehart JD, Wang ZC, Szüts D, Szallasi Z, Richardson AL. (2018). Overexpression of BLM promotes DNA damage and increased sensitivity to platinum salts in triple negative breast and serous ovarian cancers. *Ann Oncol.* 29, 903-909. (D1, IF: 14.196)

Hozzájárulás: a BLM helikázzal kapcsolatos eredmények értelmezése a homológ rekombináció mechanizmusának tükrében.

Póti Á, Berta K, Xiao Y, Pipek O, Klus GT, Ried T, Csabai I, Wilcoxon K, Mikule K, Szallasi Z, Szüts D. (2018). Long-term treatment with the PARP inhibitor niraparib does not increase the mutation load in cell line models and tumour xenografts. *Br J Cancer* 119, 1392-1400. (D1, IF: 5.416)

Németh E, Krzystanek M, Reiniger L, Ribli D, Pipek O, Sztupinszki Z, Glasz T, Csabai I, Moldvay J, Szallasi Z, Szüts D. (2019). The genomic imprint of cancer therapies helps timing the formation of metastases. *Int J Cancer* 145, 694-704. (D1, IF: 4.982)

Póti Á, Gyergyák H, Németh E, Rusz O, Tóth S, Kovácsházi C, Chen D, Szikriszt B, Spisák S, Takeda S, Szakács G, Szallasi Z, Richardson AL, Szüts D. (2019). Correlation of homologous recombination deficiency induced mutational signatures with sensitivity to PARP inhibitors and cytotoxic agents. *Genome Biol.* 20, 240. (D1, IF: 14.028)

Hámori L, Kudlik G, Szebényi K, Kucsma N, Szeder B, Póti Á, Uher F, Várady G, Szüts D, Tóvári J, Füredi A, Szakács G. (2020). Establishment and Characterization of a *Brcal*^{-/-}, *p53*^{-/-} Mouse Mammary Tumor Cell Line. *Int J Mol Sci.* 21, E1185. (D1, IF: 4.183)

Hozzájárulás: a sejtvonal genomjának jellemzése.

Németh E, Lovrics A, Gervai JZ, Seki M, Rospo G, Bardelli A, Szüts D. (2020). Two main mutational processes operate in the absence of DNA mismatch repair. *DNA Repair (Amst).* 89, 102827. (Q1, IF: 3.711)