

MTA doktori értekezés

A mutagenesis mechanizmusai

Dr. Szüts Dávid

Természettudományi Kutatóközpont

Enzimológiai Intézet

Budapest

2020

Tartalomjegyzék

ÖSSZEFOGLALÁS	7
1 BEVEZETÉS	9
1.1 A mutagenesis jelentősége	9
1.2 A mutagenesis okai	10
1.3 DNS-hibajavító útvonalak	11
1.3.1 Báziskivágó hibajavítás	12
1.3.2 Nukleotidkivágó hibajavítás	12
1.3.3 Nem összeillő bázispárok javítása	12
1.3.4 Egyszálú törések javítása	13
1.3.5 Kétszálú törés javítása: nem homológ végek összekapcsolása	14
1.3.6 Kétszálú törés javítása: homológ rekombináció	14
1.3.7 DNS-sérüléseket jelző mechanizmusok	16
1.4 DNS-hibaelkerülő útvonalak	17
1.4.1 Transzléziós szintézis	18
1.4.2 Templátváltás	18
1.4.3 A replikációs villa újraindítása homológ rekombinációval	19
1.5 A mutagenesis vizsgálatának módszerei	21
1.6 Mutációs mintázatok daganatokban	23
1.7 DNS-hibajavítás hiányát kiaknázó tumorterápiák	27
2 MÓDSZEREK	29
2.1 Kísérletes módszerek	29
2.1.1 Sejttenyészet, transzfekció	29
2.1.2 Sejtvonalak, génkiütés, génmódosítás	29
2.1.3 Érzékenységi vizsgálatok	30
2.1.4 DNS-károsodás észlelése Western blottal és immunfluoreszcenciával	31

2.1.5	Szintetikus DNS lézió keresztüli DNS replikáció vizsgálata élő sejtekben ..	31
2.1.6	Spontán és indukált genomi mutagenézis vizsgálata sejtvonalakban.....	32
2.2	Bioinformatikai módszerek	32
2.2.1	Genomszekvenálás, elemzés, mutációkeresés.....	32
2.2.2	CRISPR alapú in vivo kettős száltörés javítási esszé	33
2.2.3	Humán tumorminták elemzése	34
2.2.4	Mutációs mintázatok összehasonlítása, felbontása.....	34
2.2.5	Nemnegatív mátrix faktorizáció	35
3	EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	37
3.1	A mutagenézis vizsgálata sejtvonalakon genomszekvenálással.....	37
3.1.1	A DT40 sejtvonal genomja.....	37
3.1.2	Mutációk hatékony detektálása izogenikus mintákban	42
3.1.3	Sejtvonalak spontán mutációs folyamatainak feltérképezése.....	45
3.2	Rákellenes terápiák mutagenikus hatása	48
3.2.1	A leggyakrabban használt citotoxikus terápiák mutagenikus hatásai	48
3.2.2	PARP inhibitorral történő hosszú távú kezelés nem mutat mutagenikus hatást sejtvonalakban és betegből származó xenograftokban	51
3.2.3	A tumorterápiák genomi lenyomata felhasználható a metasztázisok kialakulási idejének meghatározására.....	54
3.3	A homológ rekombináció hiányának hatása a mutagenézisre és a terápiákra mutatott érzékenységre	58
3.3.1	A homológ rekombináció hiányában fellépő mutagenikus folyamatok.....	58
3.3.2	A homológ rekombináció hiányának hatása a terápiás érzékenységre.....	61
3.3.3	A doxorubicin pegilált liposzómás formulációja segítségével elkerülhető a rezisztencia kialakulása egy BRCA1 mutáns tumormodellben.....	64
3.4	A daganatok mutációs mintázatainak rendszerezése kísérletes és bioinformatikai megközelítéssel	66

3.4.1	A homológ rekombináció hiánya egységes bázisszubsztitúciós mutációs folyamatot indukál	66
3.4.2	Mutagenikus folyamatok egy <i>BRCAl</i> mutáns egér emlőtumorból izolált sejtvonalban.....	68
3.4.3	Két fő mutációs folyamat működik az MMR hiányában	69
3.5	A mutációk kialakulásának molekuláris mechanizmusai	74
3.5.1	A ciklobutil pirimidin dimer ultraibolya fototermékek átírásának mechanizmusai	74
3.5.2	A PCNA ubikvitilációjának szerepe a hibaelkerülő folyamatokban.....	77
3.5.3	A BRCA fehérjék hiányában megnövekszik a DNS-sérülések száma	80
3.5.4	A HR fehérjék szerepe elhanyagolható a kettős DNS száltörések mutagenikus javításában.....	82
4	KÖVETKEZTETÉSEK, KITEKINTÉS	85
5	AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	89
	RÖVIDÍTÉSEK.....	91
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	93
	IRODALOMJEGYZÉK.....	95
	A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	115

ÖSSZEFOGLALÁS

A mutagenézis 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 ciszplatin 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 fehérjének szerepét a DNS-hibatoleranciában és a mutagenézisben, és részletesen feltártuk a PCNA fehérje ubikvitilációjának szerepét a sérült DNS replikációjában.

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

1 BEVEZETÉS

1.1 A mutagenézis jelentősége

Az örökítőanyag információtartalma nem állandó. Egy emberi genom megközelítőleg 70 új, egyedi mutációt tartalmaz, melyek a szülők genomjában nem találhatók meg (Kong et al., 2012). Ezek a *de novo* mutációk a szülői csíravonalakban jönnek létre. A mutációk hasonló állandó akkumulációja minden élő szervezetben megfigyelhető.

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 (deléció), vagy extra nukleotidok beépülése (inzerció). Az inzerciók és deléciók, 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 mutációk elsődleges jelentősége az, hogy képesek megváltoztatni a gének funkcióját. A bázisszubsztitúciók 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 mutációk szintén korai stop kodonokat és trunkált fehérjéket okoznak. A nagyobb átrendeződések, strukturális variációk hatására pedig egymás mellé kerülhetnek távoli kromoszómaregiók, és így létrejöhetnek fúziós fehérjéket kódoló gének, vagy közel került szabályozó régiók által kontrollált, megváltozott expressziójú gének.

A mutációk egyik generációról másikra történő megjelenése természetesen az evolúció hajtóereje, hozzájárulva a szelekció alapjául szolgáló variációhoz. Az evolúció mellett azonban az egyed életében is lényeges szerepet játszanak a sejtekben keletkező mutációk. A többsejtű élőlényekben a szomatikus sejtekben keletkező genetikai változások bizonyos sejtek megváltozott működését okozhatják, amely funkciónyeréses vagy funkcióvesztéses jellegű is lehet. A funkcióvesztés a sejt működésének gátlásán vagy a sejt pusztulásán keresztül az

öregedési folyamat egyik fő okának tekinthető (López-Otín et al., 2013), melyet az is alátámaszt, hogy a korai öregedéssel járó (progeriás) szindrómák között többet is a mutációk felgyorsult akkumulációja jellemez, mint például a Bloom szindróma, Werner szindróma, Hutchison-Gilford progeria szindróma (Burtner és Kennedy, 2010). Egyes sejtek funkcionyeréses jellegű változása pedig a sejt kontrollálatlan osztódásához, ezáltal a daganatok kialakulásához vezet. Ennek megfelelően a genomi instabilitás, azaz a mutációk 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.

1.2 A mutagenézis okai

A mutációk 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, melyeken belül leggyakrabban a bázisok sérülnek (Bauer et al., 2015). A spontán báziskárosodások között leggyakoribbak az oxidatív károsodások, például a 8-oxoguanin kialakulása, melyet elsősorban a sejt saját metabolizmusa által előállított reaktív oxigénformák okoznak (Cadet et al., 2010). Előfordulnak még alkiláló báziskárosodások, melyek során főként metilcsoportok képeznek adduktokat különféle bázisokkal, a citozin és a metilcitozin deaminációja, illetve a bázis hidrolitikus elvesztése és abázikus hely kialakulása. Becslések szerint naponta akár 100000-nél is több báziskárosodási esemény történhet egyetlen humán sejtben (Lindahl, 1996). Több bázist érintő komplex léziók

is keletkezhetnek, például az ultraibolya (UV) fény által okozott fototermékek, melyek szomszédos pirimidin bázisok közötti keresztkötéseket tartalmaznak (Ravanat et al., 2001). A DNS metabolizmusát különösen gátolják a két szál között létrejövő keresztkötések, melyeket valószínűleg okozhatnak endogén aldehidek (Brooks és Theruvathu, 2005), illetve többféle exogén vegyület. 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. 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 probléma egyértelmű: sérült templátról nem minden esetben sikerül az eredetinek megfelelő pontos másolatot létrehozni. A sejtekben többféle DNS-hibajavító és replikatív hibaelkerülő útvonal működik. Munkánk során ezeknek a mutagenézisre való befolyását és a molekuláris mechanizmusát vizsgáltuk.

1.3 DNS-hibajavító útvonalak

Az élő sejtekben az evolúció során meglepően jól konzervált DNS-hibajavító mechanizmusok működnek, melyek különféle DNS léziókra specializálódtak. Mindegyik mechanizmus hasonló elemekből áll: egy szenzor, amely felismeri a DNS sérülését, egy enzimatikus mechanizmus, amely eltávolítja vagy átalakítja a sérült szakaszt, egy DNS polimerizációs lépés, és végül egy ligációs lépés, amely helyreállítja a DNS szálak integritását.

1.3.1 Báziskivágó hibajavítás

A leggyakoribb léziókat, a megváltozott szerkezetű bázisokat tartalmazó DNS-t javítja a báziskivágó hibajavítás (base excision repair, BER)(Wallace, 2014). Első lépésben sérült (pl. oxidált, alkilált) bázisokra specifikus glikoziláz enzimek felismerik és eltávolítják a módosult bázist. Ezt követi a létrejött abázikus helyen a foszfodiészter lánc hasítása egy AP endonukleáz enzim által. A DNS-lánc megjavításában közreműködik a DNS polimeráz β és a DNS ligáz III az XRCC1 kofaktorral (Bauer et al., 2015). Munkánk során a BER-t közvetlenül nem tanulmányoztuk.

1.3.2 Nukleotidkivágó hibajavítás

A nukleotidkivágó hibajavítás (nucleotide excision repair, NER) tipikusan olyan DNS léziókat javít, amelyek egy szálát érintenek, de torzítják a DNS szerkezetét. A NER útvonalnak két szenzor ága van, ennek megfelelően megkülönböztetünk transzkripcióhoz kötött és globális NER-t (Spivak, 2015; Spivak és Ganesan, 2014). Az előbbi esetén az RNS polimeráz a szenzor, az utóbbinál az XPC fehérje, különféle lehetséges kofaktorokkal. A két útvonal az XPA fehérje megjelenésénél találkozik. Az XPA helikázok működését koordinálja, melyek (XPB és XPD, a TFIIID alegységei) elválasztják a sérült szálát a komplementerétől egy rövid szakaszon. Ezt követően az XPF/ERCC1 és XPG endonukleázok kimetszik a sérült szál elválasztott szakaszát. A keletkezett egyszálú hézagot egy DNS polimeráz betölti (Lehmann, 2011) és végül egy ligáz összeköti az új szakaszt a régivel. A NER főként az UV fototermékek javítása miatt ismert, mivel a NER génekben hordozott örökletes mutációk jelenléte az extrém UV-érzékenységgel és bőr rákra való hajlammal járó xeroderma pigmentosum betegség okozója (Lehmann et al., 2011).

1.3.3 Nem összeillő bázispárok javítása

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 szálaban. Az ilyen jellegű javítandó hibák elsősorban a DNS-replikáció során jönnek létre, amennyiben a polimeráz nem pontosan másolja a templátot. Az MMR egy aránylag egyszerű, kevés, jól konzervált fehérjét felhasználó javítófolyamat (Kunkel és Erie, 2015; Liu et al., 2017). A léziót a MutS α (MSH2 és MSH6) vagy a MutS β (MSH2 és MSH3) heterodimer fehérje ismeri fel. Ezt követően a MutL komplex (MHL1 és PMS1) endonukleáz aktivitásával elvágja az egyik szálat. Többféle, részben még vitatott szabályozó mechanizmus gondoskodik arról, hogy az újonnan szintetizált DNS szál kerüljön elhasításra. Exonukleázok eltávolítják a hibás szakaszt az elhasított szálból, majd a NER-hez hasonlóan egy replikatív folyamat betölti és ligálja az egyszálú hézagot. Az MMR-nek alapvető szerepe van a spontán mutációs ráta alacsonyan tartásában: a replikatív polimerázok kb. 10^{-6} /bp (bázispár) hibáját az MMR kb. 10^{-9} /bp szintre csökkenti (Kunkel és Erie, 2015). Az MMR hiányos sejtekre jellemző a magas mutációs ráta mellett az úgynevezett mikroszatellit instabilitás (MSI), mely a genom rövid, egy-két bázispáros egységeket ismétlő szakaszaiban az ismétlődő egységek számának változékonyságát jelenti. Az *MSH2* és *MLH1* gének öröklött mutációi az elsősorban vastagbélrákra hajlamosító Lynch szindróma okozói (Plotz et al., 2006).

1.3.4 Egyszálú törések javítása

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 kijavíthatlan egyszálú törések a repliszóma szétesését, a replikációs villánál kétszálú törések kialakulását okozzák.

1.3.5 Kétszálú törés javítása: nem homológ végek összekapcsolása

A DNS kettős száltörései ritka, de potenciálisan súlyos következményeket hordozó léziók (Cannan és Pederson, 2016). Replikációtól független keletkezésük ionizáló sugárzás, vagy bizonyos kémiai behatások következménye lehet. Gyakoribb lehet a replikációhoz kapcsolt kettős száltörés, például olyan esetben, amikor a replikációs villa belefut egy javítatlan egyszálú törésbe. Mivel egy kettős száltörés a sejtosztódás során a kromoszóma teljes disztális régiójának elvesztését okozhatja, a legtöbb élő sejt kétféle mechanizmussal is rendelkezik a kettős száltörés javítására. Egyik a nem homológ végek összekapcsolása (non-homologous end joining, NHEJ), mely nevének megfelelően a törött DNS-végeket a szekvenciától függetlenül képes összeligálni. Az NHEJ-nek is több verziója létezik (Pannunzio et al., 2018). A kanonikus NHEJ-ben a szenzorfehérje a DNS-végekhez kötő Ku70/Ku80 heterodimer fehérje a DNA-PKcs kinázzal együtt. A DNS-végek szükség szerinti átalakítása előkészíti őket a DNS ligáz IV és az XRCC4 kofaktor által végzett ligálásra. Amennyiben a törött végek nem komplementerek, a hiányzó szakaszokat a polimeráz λ vagy μ képes pótolni. A kanonikus NHEJ lehet hibamentes is, de a törött végek degradációja esetén mutációkat, főleg deléciókat okozhat. A nem kanonikus, vagy alternatív NHEJ képes már reszekción átesett kettős száltöréseket is javítani, a *POLQ* gén által kódolt pol θ fehérje közreműködésével (Mateos-Gomez et al., 2015). Ez a mechanizmus nem használja a kanonikus NHEJ kulcsfehérjéit, pl. a Ku heterodimert, és a törött DNS végek egyszálú szakaszai közötti néhány bázispáros mikrohomológia segítségével kezdi a javítást.

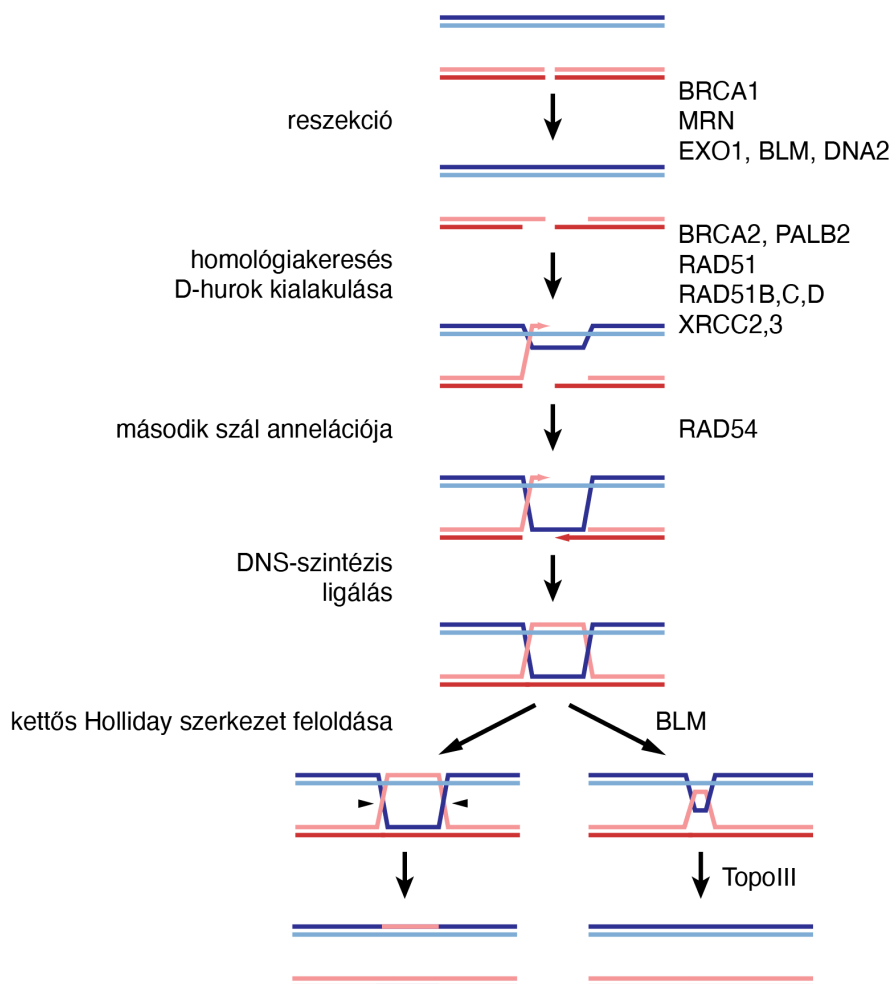
1.3.6 Kétszálú törés javítása: homológ rekombináció

A kettős száltörések másik, minden élőlényben 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 homológ templát megtalálásához egyszálú DNS-re van szükség. Így a HR első lépése a reszekció, melynek keretében nukleázok

visszavágják a kétszálú törött vég 5' szálát. A reszekció egy kétlépéses folyamat, amelyet az MRN komplexben levő MRE11 nukleáz indít el, és vagy az EXO1 vagy a DNA2 exonukleáz folytat a BLM helikáz segítségével (Nimonkar et al., 2011). A reszekció fontos szabályozó faktora a BRCA1 és a CtIP fehérjék (Yu et al., 1998). 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. A RAD51 DNS-kötését, és sok RAD51 fehérje kooperatív kötésén alapuló nukleoprotein filamentum kialakulását a RAD51 paralóg fehérjék segítik (Takata et al., 2001; Taylor et al., 2015). Ez az öt fehérje (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3) a RAD51-gyel homológ szerkezetű. A RAD51 filamentum egy homológ kétszálú DNS-re illeszkedve szálcserén megy át, és kialakul egy D-hurok, melyben a homológ DNS molekula egyik szála felszabadul, a másik szálával párosodott törött szál pedig DNS polimerázok képesek meghosszabbítani. A kettős száltörések kanonikus javítása során a másik törött szál annál a D-hurok felszabadult szálával, így az is meghosszabbíthatóvá válik (1. ábra). A DNS-szintézis eredményeképp egy ligálható, majd ligált szerkezet jön létre, amelyen azonban a két javított DNS-molekula topológiailag nem elválasztható, egy úgynevezett dupla Holliday-szerkezet köti őket össze (Liu és West, 2004). A struktúra feloldásának gyakoribb módja a két Holliday-szerkezet egymáshoz mozgatása a BLM helikáz által, majd a kapcsolódott szálak elválasztása, melyet a topoizomeráz III enzim végez (1. ábra; Bizard és Hickson, 2014; Bocquet et al., 2014). Alternatív módon, vagy a BLM helikáz hiányában a struktúra nukleolitikus módon is feloldható rezolváz enzimek által, melyek a Holliday szerkezetben hasítanak két szemközti szálát, azonban ez az útvonal a résztvevő molekulák rekombinációjához és a testvérkromatidok cseréjéhez (SCE) vezethet (Wyatt és West, 2014).

Mivel az NHEJ és a HR képes ugyanazt a sérülést javítani, a kettős száltöréseknél dedikált mechanizmus segíti a javító útvonal kiválasztását. Az NHEJ a sejtciklus egészében, de elsősorban a G1 fázisban aktív, míg a HR aktivitása az S és G2 sejtciklus fázisokra korlátozódik, mert ez időszak alatt rendelkezésre állhat a testvérkromatid, mint alternatív

templát. A sejtciklus fázisán túl a törött végek állapota és száma (egy vagy kettő) is befolyásolja az útvonalak közötti választást (Scully et al., 2019).



1. Ábra: Kettős száltörés javítása homológ rekombinációval

Az ábra a kettős száltörést javító legfontosabb rekombinációs útvonalat mutatja be, feltüntetve bizonyos, a folyamatban résztvevő fontos fehérjéket.

1.3.7 DNS-sérüléseket jelző mechanizmusok

A DNS-hibajavítással kapcsolatban végül szükséges megemlíteni a DNS-sérülés esetén a sejt normál működésének bizonyos aspektusait leállító checkpoint mechanizmusokat. Ezen jelátviteli útvonalak elsődleges feladata, hogy megakadályozzák a sejt osztódását súlyos

javítatlan DNS-léziók jelenlétében. A checkpoint útvonalak több ponton is képesek gátolni a sejtciklus továbbhaladását. G1 fázisban észlelt DNS-törések esetén az S fázisba belépést gátolják, S/G2 fázisban pedig a mitózis elindulását (Bartek és Lukas, 2001). Az ATM és a CHK2 kinázok a DNS-törések jelenlétét jelzik, melynek keretében a lézió közelében kötött ATM foszforilálja a diffúzibilis CHK2 kinázt (Lee és Paull, 2005; Parameswaran et al., 2015). Hasonló mechanizmussal jelzi az ATR és a CHK1 kináz 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 fontos szerepet tölt be a H2AX hiszton (Burma et al., 2001; Ward és Chen, 2001), amely a H2A hiszton variánsaként a nukleosómákban található. DNS-sérülések esetén a foszforilált H2AX (γ H2AX) megköti az MDC1 fehérjét, amely az RNF8 és az RNF168 ubikvitin ligázok toborzásán keresztül a BRCA1 és 53BP1 fehérjéknek a DNS-törés környezetében való megjelenéséhez vezet (Scully és Xie, 2013). A checkpoint aktivitásnak így egyszerre globális, az egész sejt működésére ható, illetve lokális, a sérülés javítását segítő funkciója is van.

1.4 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 találkozása megváltozott, sérült templát szakaszokkal. A DNS lézióinál a polimerázok általában elakadnak. 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.

1.4.1 Transzléziós szintézis

Az első megoldás tehát a sérült templát használata, azaz „transzléziós DNS szintézis” (TLS). Mivel a replikatív polimerázok pontosan illeszkedő aktív centruma, illetve önmagukat ellenőrző proofreading aktivitása a legtöbb lézió esetében ezt nem teszi lehetővé, a replikáció speciális transzléziós polimerázok segítségével képes a sérült templátról másolatot készíteni. A transzléziós polimerázok többsége (pol η , pol ι , pol κ és a REV1) szerkezetileg az Y polimeráz családba tartozik (Lehmann et al., 2007). Igen lényeges még a replikatív polimerázokkal együtt a B polimeráz családba tartozó pol ζ (Gan et al., 2008). A transzléziós szintézist bizonyos léziókon képes egyetlen polimeráz is elvégezni. Azonban gyakran két polimeráz egymás utáni beavatkozására van szükség, melynek keretében az első polimeráz a sérült szakasszal szemben illeszt be nukleotidokat, a másik pedig az így keletkezett össze nem illő primer-templát csatlakozástól folytatja a szintézist (Hirota et al., 2010; Livneh et al., 2010). Ez utóbbi képességgel elsősorban a pol ζ rendelkezik. Különösen komplex kérdés a transzléziós szintézis szabályozása. A transzléziós polimerázok toborzásának kétféle mechanizmusa ismert. Ezek közül egyik a PCNA replikációs fehérje monoubikvitilációja, melyet Stefan Jentsch csoportja fedezett fel a fehérje degradációt nem okozó ubikvitilációs módosítások egyik első példajaként (Hoege et al., 2002). A monoubikvitilált PCNA képes az Y családba tartozó transzléziós polimerázok (pol η , pol κ , pol ι) toborzására (Bienko et al., 2005; Kannouche et al., 2004; Plosky et al., 2006). Azonban a transzléziós polimerázok a REV1 fehérjén keresztül is képesek az elakadt replikációt jelző PCNA-hoz toborzódni, a PCNA ubikvitilációjától függetlenül (Edmunds et al., 2008; Guo et al., 2006). Fontos kérdés még a polimeráz szabályozott „visszacserélése”, mivel a transzléziós polimerázok alacsonyabb fidelitásuk következtében sérülésmentes templáton is mutációkat okozhatnak (McCulloch és Kunkel, 2008).

1.4.2 Templátváltás

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 (világoskék a 2. ábrán). Ezen templát ideiglenes

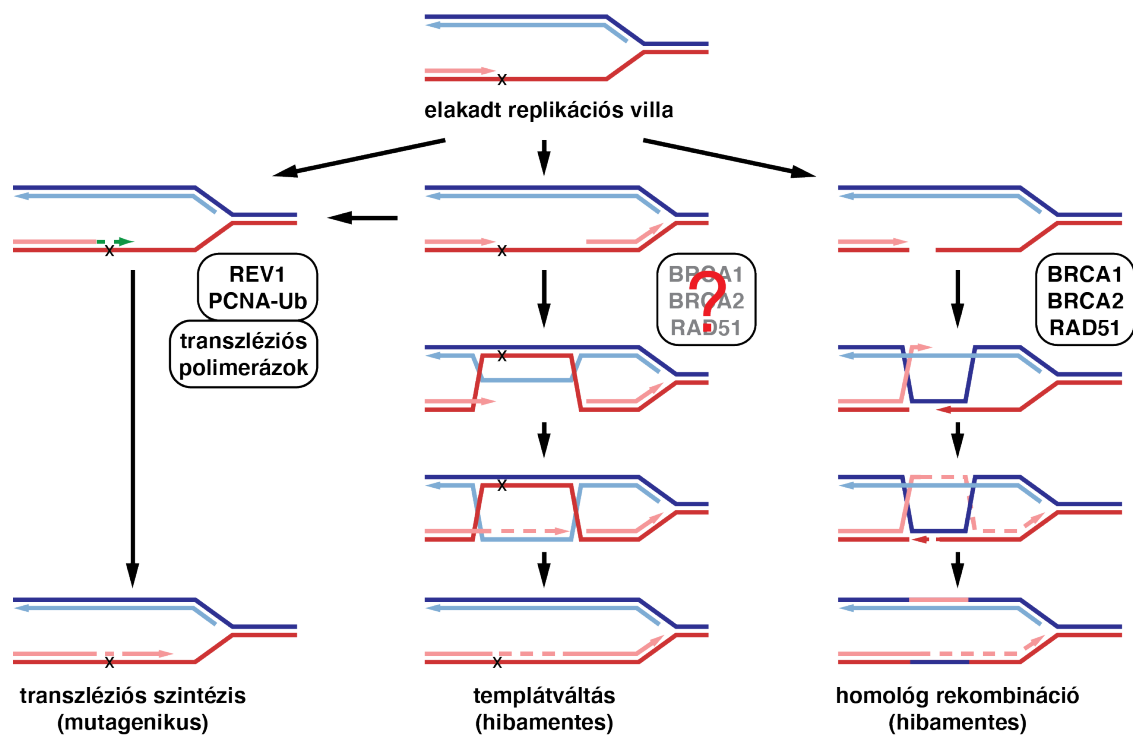
használata megoldást jelent a sérült szakaszon történő nem mutagenikus áthaladásra. A templátváltás többféle topológiával is elképzelhető. Bernard Strauss csoportja már 1976-ban megfigyelte a replikációs villa visszafordulását, melynek keretében a kialakuló „csirkeláb” struktúrában bázispárosodás alakul ki a két új DNS szál között, megteremtve a sérülésmentes templát felhasználásának lehetőségét (Higgins et al., 1976). Később valóban megfigyeltek visszafordult replikációs villákat (Cotta-Ramusino et al., 2005; Grompone et al., 2004; Sogo et al., 2002). Élesztőgenetikával kombinált 2-dimenziós Southern blot kísérletek azonban kimutattak X-alakú DNS struktúrákat, melyek a DNS-sérülések függvényében jönnek létre a replikációs villa mögött, a két testvérkromatidot összefogva (Liberi et al., 2005). Ezek a struktúrák a villa mögötti templátváltásra utalnak (2. ábra).

A templátváltás szabályozásában kiemelt szerepe lehet a PCNA poliubikvitilációjának. A monoubikvitilált PCNA poliubikvitilációját élesztőben az Ubc13-Mms2 és a Rad5 ubikvitin ligáz, human sejtekben a Rad5 ortológ HLTF és SHPRH fehérjék katalizálják, az ubikvitin lizin 63 (K63) oldalláncán keresztül. (Branzei et al., 2004; Hoege et al., 2002; Unk et al., 2008; Unk et al., 2006). A PCNA poliubikvitilálását 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; Minca és Kowalski, 2010). Amennyiben a templátváltás visszafordult replikációs villáknál történik, a folyamatot segítheti a Rad5 struktúra-specifikus helikáz aktivitása (Blastyak et al., 2007). A templátváltás mechanizmusának pontos feltárása további kutatásokat igényel (Branzei és Szakal, 2016).

1.4.3 A replikációs villa újraindítása homológ rekombinációval

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 (2. ábra). Ez a folyamat nagyon hasonlít a DNS kettős száltörésének homológ rekombinációs javításához. Ugyanazokat a fehérjéket is használja, melyek közül magasabb eukariótákban legfontosabb az egyszálú DNS-en nukleofilamentumot

képző, és a homológ kettős szálú szekvenciával szálcserét katalizáló RAD51 (Feng és Zhang, 2012; Hashimoto et al., 2012). A templatváltás illetve a törött replikációs villák homológ rekombinációs újraindítási mechanizmusainak genetikai elkülönítését megnehezíti a résztvevő fehérjék közötti nagyszintű átfedés.



2. 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 léziót templatként használhatja a transzléziós szintézis folyamata, melyet a REV1 fehérje vagy a PCNA fehérje monoubikvitilációja (PCNA-Ub) koordinál (a bal oldalon). Az elakadt villa eltörhet, és a törött villát a homológ rekombináció útvonala javíthatja a jobb oldali séma szerint a BRCA1, BRCA2 és RAD51 fehérjék részvételével. Végül az elakadt szál a villa törése nélkül is képes lehet templatváltásra (középen). A dolgozat tárgyalja a kérdőjellel jelölt fehérjék szerepét ebben a hibaelkerülő útvonalban.

A DNS-hibaelkerülő útvonalak mechanizmusának, aktivitásának és szabályozásának megértése alapvető fontosságú a mutagenézis folyamatának megismerése szempontjából. A sérült templatot felhasználó, sok esetben az eredeti bázisokat felismerhetetlenné tévő léziókat

(pl. abázikus helyeket) másoló transzléziós szintézis szükségszerűen mutációk előállítására hajlamos. A templatváltás 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.

1.5 A mutagenézis vizsgálatának módszerei

Érdemes röviden áttekinteni a sérült DNS replikációjának és a mutagenézis vizsgálatának fő megközelítési módjait, melyeket kutatásainkban alkalmaztunk.

Tisztított fehérjékkel végzett biokémiai kísérletek fontos információt szolgáltatnak főleg az enzimatisz aktivitással bíró fehérjék, például polimerázok és helikázok alapvető tulajdonságairól, képességeiről. Azonban mivel replikációhoz kapcsolt folyamatokról van szó, szükség lenne az eukarióta DNS replikáció teljes komplex folyamatának in vitro reprodukálására. Ez nemrég sikerült John Diffley csoportjának (Yeeles et al., 2015), azonban a reakcióhoz 110 különféle rekombináns fehérjére volt szükség, ezért ez nem egy praktikus háttér a hibaelkerülő útvonalak tanulmányozására. Ehelyett használhatók hipotonikus sejt-lizátumok, melyek a DNS-replikációhoz szükséges összes fehérjét tartalmazzák. Humán sejt-lizátumokban a replikációt bindítható az SV40 vírus nagy T antigénjével, amely a lizátumhoz adott SV40 replikációs origót tartalmazó plazmidokon az MCM replikációs helikázt helyettesítve indítja és vezeti a DNS-replikációt. A rendszer képes pl. UV léziók átírására (Cordeiro-Stone és Nikolaishvili-Feinberg, 2002), így alkalmas lehet a hibaelkerülő útvonalak közül legalábbis a TLS vizsgálatára.

A hibaelkerülő folyamatok komplexitása miatt azonban kézenfekvőek a genetikai megközelítések. A replikációhoz kapcsolt sejt-autonóm folyamatokat ideálisan lehet sejttenyészetekben vizsgálni. Elsősorban génkiütött vagy génmódosított sejt-vonalak használatára van szükség, azonban a sejt-vonal-alapú genetika a szekvenciaspecifikus

nukleázok közelmúltbeli megjelenéséig nem volt elterjedt a génkiütés alacsony hatékonysága miatt. A probléma áthidalására alkalmazta a szakterület a csirke DT40 limfoblasztóma sejtvonalat kísérleti modellként, amelyen hatékonyan működik a homológia alapú génkiütés (Buerstedde és Takeda, 1991). A szekvenciaspecifikus nukleázok, a CRISPR-Cas9 elterjedésével a DT40 sejtvonal a könnyű génkiütés előnyét elveszítette, azonban több hasznos tulajdonsága (majdnem normál kariotípus, alacsony mutációs ráta, életképes DNS-javító mutánsok, immunglobulin gén szomatikus hipermutációja) következtében továbbra is hasznos modellrendszer maradt a DNS-hibajavítás és a mutagenézis kutatására. A CRISPR módszer segítségével azonban ma már humán tumorsejteken, immortalizált normál humán sejteken és indukált pluripotens őssejteken is végezhető génmódosítás (Cong et al., 2013; Ran et al., 2013). A génkiütött sejtvonalak felhasználásának legelső szintje a DNS-károsító kezelésekre mutatott érzékenység mérése, mely szinergisztikus vagy episztatikus viszonyok meghatározására, a hibajavító és -elkerülő útvonalak elkülönítésére nyújt lehetőséget.

A mutagenézis vizsgálatához felmerül az igény ismert, konkrét DNS léziók átírásának követésére élő sejtekben. Erre lehetőséget nyújt egy korábban már *E. coli* baktériumokban és élesztőben használt módszer, melynek keretében a sejtben replikálódó plazmidon lehet léziókat bejuttatni (Ozgenc et al., 2005; Zhang és Lawrence, 2005). Egy replikációra képes plazmid szerkesztésével a módszert sikerült gerincesekből származó sejtekre adaptálni (Szüts et al., 2008). A kémiai előállított léziók szintetikus oligonukleotidokba illeszthetők és plazmidba ligálhatók, és az így előállított konstrukciókat lehet transzfektálni különféle génmódosított sejtvonalakba. A replikált plazmidokat a sejtekből visszanyerve szekvenálással tudjuk meghatározni például az ultraibolya fototermékek átírásának mechanizmusát és mutagenikus hatását, továbbá megkülönböztethető a transzléziós szintézis és a templatváltás (Szüts et al., 2008). Alternatív módszer a léziót tartalmazó DNS transzpozonnal közvetlenül a genomba juttatása, ahol replikáció után szekvenálással szintén meghatározható a lézió hatása (Izhar et al., 2013).

Mindezek mellett a mutagenézis vizsgálatának legátfogóbb módszere a teljes genomban keletkező összes mutáció meghatározása. Ehhez két kihívásra kellett megoldást találni: a

megfelelő mennyiségben és költséggel történő DNS-szekvenálásra, és a keletkezett hatalmas adattömegek informatikai feldolgozására. Az újgenerációs DNS-szekvenálási technológiák a 2010-es évek első felében érték el azt az áteresztőképességet, amely megengedte az ismételt genomszekvenálások alkalmazását. A költségek azonban továbbra is erősen behatárolják a mintaszámokat. A szekvenálási adatok elsődleges processzálására, amely minőségi szűréseket és az adott faj referenciagenomjához való illesztést jelenti, standard programcsomagok alkalmazhatók, pl. a Broad Institute által fejlesztett GATK Toolkit (McKenna et al., 2010). Az illesztett genomok közötti különbségeket keresve találhatók meg a kísérlet során előidézett mutációk. A publikált mutációdetekciós módszereket elsősorban daganatok szomatikus mutációinak elemzésére fejlesztették ki. Ezek nem bizonyultak pontosnak és hatékonyak a jobban kontrollált sejtvonalas kísérletekből származó mintákon, ezért kifejlesztettünk egy kimondottan az izogenikus minták különbségeinek hatékony felismerésére szolgáló módszert (Pipek et al., 2017), melyet egy későbbi fejezetben mutatok be.

1.6 Mutációs mintázatok daganatokban

A mutációk keletkezését kísérletek nélkül is meg lehet figyelni a sejtklónoknak megfelelő rákos daganatokban. A daganatok kialakulásának megértése tehát 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 daganatok egyetlen megváltozott génállományú sejt kontrollálatlan növekedéséből, azaz klonális expanziójából alakulnak ki. A tumoroknak számos közös jellemzőjét, 'fémjelét' azonosították, melyek között szerepel a függetlenedés a növekedési szignáloktól, a korlátlan replikációs potenciál (Hanahan és Weinberg, 2000) és a genomi instabilitás is (Hanahan és Weinberg, 2011). A tumorsejtek megváltozott viselkedését az említett tulajdonságokért felelős génekben található mutációk okozzák (Bailey et al., 2018; Kandoth et al., 2013). Egy adott tumorban csak kisszámú (kb. 2-8) ilyen 'driver' mutáció található, melyek funkcióvesztéses mutációk tumor szuppresszor génekben, vagy funkciónyeréses mutációk onkogénekben. A

gének expresszióját epigenetikai változások is okozhatják, melyek a DNS-szekvenáláson nem látszanak, de hasonló hatást fejtenek ki. Példaként említhető a BRCA1 tumor szuppresszor gén, melynek inaktivációja bekövetkezhet mutáció vagy promóter metiláció következtében is (Moschetta et al., 2016).

A driver mutációk többségben szomatikusak, azaz a tumor kiindulási sejtjének őseiben keletkeztek az egyed élete során. Ennek megfelelően a daganatok kialakulásához a mutációk időbeli akkumulálódása szükséges, így a rák kialakulása életkorral növekszik. Modellek szerint a rák kialakulásának esélye az életkorral polinomiálisan arányos, és a polinom kitevője megmutatja a szükséges szomatikus onkogenikus mutációs események számát (Tomasetti és Vogelstein, 2015). Egyes családokban azonban észlelhető örökletes hajlam meghatározott ráktípusok kialakulására. Ezt a hajlamot vagy azonosított, vagy nem azonosított örökletes driver mutációk okozzák. Ezek jellemzően recesszív inaktiváló mutációk tumor szuppresszor génekben, így a gén második alléljának szomatikus mutációja vagy elvesztése szükséges az onkogenikus transzformáció elindításához.

A daganatok genomi instabilitásának fő indoka valószínűleg az, hogy az instabil, gyorsan mutálódó genom segíti és felgyorsítja a növekedéshez szükséges driver mutációk kialakulását. Az instabil genom azonban a már kifejlődött daganatban további változásokat okoz, különbségeket generálva a tumorsejtek tulajdonságai között. Így egyes sejtek képességet szerezhetnek pl. áttétek kialakítására, immunválasz elkerülésére, vagy citotoxikus kezelések túlélésére. Az intratumor heterogenitást feltétlenül figyelembe kell venni a tumorminták genetikai elemzésénél, hiszen egy minta általában nem reprezentatív a teljes daganatra nézve (Gerlinger et al., 2012).

A szomatikus mutációk természetesen nem csak a driver mutációkat jelentik. A tumorgenomoknak a beteg normál, általában vérmintából vett DNS-szekvenciájához való hasonlítása 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 (Vogelstein et al., 2013). Fontos felismerés, hogy a passenger mutációk is hasznos információt hordoznak a tumor tulajdonságairól.

Érdemes tehát áttekinteni a tumorsejtek genomjában levő szomatikus mutációk kialakulásának főbb okait, melyeket három csoportra oszthatunk. Egyrészt okozhatták ezeket olyan mutagenikus folyamatok, amelyek a normál szomatikus sejtekben is működnek. Másrészt felléphetnek olyan mutagenikus folyamatok, amelyek valamely DNS-javító mechanizmus elromlásának a következményei – ez utóbbi okozhatja a tumorsejtek általános genomi instabilitását is. Harmadrészt pedig okozhatták a mutációkat környezeti mutagén hatások, melyeket ezáltal karcinogénnek is 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 pedig valóban így van: például a karcinogén dohányfüst által létrehozott DNS adduktok tipikusan C>A bázisszubsztitúciókat okoznak, tehát a beteg dohányos múltja valószínű okként felismerhető egy adott tüdőrák genomjában levő nagyszámú szomatikus C>A mutáció alapján (Alexandrov et al., 2016).

Ez a felismerés vezetett a daganatok mutációs spektrumának általános elemzéséhez. Az alapfeltételezés az volt, hogy véges számú elkülöníthető mutagenikus folyamat működik a daganattípusok összességében. Ennek megfelelően Alexandrov és munkatársai összegyűjtötték az összes elérhető tumorszekvenciát (először főleg exomszekvenálás alapú adatokat), és matematikai módszerekkel bontották komponensekre a szomatikus mutációk halmazát. Módszerük alapvetően a bázisszubsztitúciókat vizsgálta, amelyeket a szomszédos két bázis kontextusában katalogizáltak. A komplementer eseményeket összevonták, tehát pl. a TTC>TAC mutáció megegyezik a GAA>GTA mutációval, hiszen nem tudható, hogy melyik DNS-szálon történt az esemény. Így 96 úgynevezett triplet mutációs kategóriát kaptak. Egyes tumorok szomatikus bázisszubsztitúcióinak halmaza tehát egy 96-dimenziós vektorral írható le, és az összes minta ilyen vektorait próbálták kevés komponens különféle arányú összegeire bontani nemnegatív mátrix faktorizációval. Elsőre 21 komponensre sikerült bontani a mutációhalmazokat, amelyeket mutációs szignatúráknak neveztek (Alexandrov et al., 2013). A szignatúrák között megfigyelhetőek voltak a különféle várható mutagenikus folyamatok. A 4-es szignatúra (sig.4) jelenléte tüdőtumorkban a dohányzással függött össze, míg a sig.7

melanómákra volt jellemző, és az UV által indukált pirimidin dimereknél tartalmazott mutációkat. A sig.1 és sig.5 gyakorlatilag minden daganatban megtalálható, és a hozzájuk tartozó mutációk száma összefüggést mutat a beteg életkorával, mely alapján valószínűsíthető, hogy ezek a mutációk részben a normál szomatikus sejtek leszármazási vonalában keletkeztek még a tumorigenezis kezdete előtt (Alexandrov et al., 2015). Végezetül bizonyos szignatúrák valóban a DNS-hibajavítás állapotát jelezhetik. Például a sig.3 jelenléte jellemző a BRCA1 vagy BRCA2 mutációt hordozó daganatokra, míg a sig.6 a mikroszatellit instabilitást mutató, MMR hiányos daganatokra.

Egy nemzetközi kollaboráció alapján a daganatok szomatikus mutációit a COSMIC adatbázis tárolja (Catalogue of somatic mutations in cancer), melynek honlapján megtalálhatóak a fent említett szignatúrák, illetve ezeknek frissített változatai (COSMIC, 2019). A második verzióban a 21 szignatúrát 30-ra bővítették. 2020-ban publikálták a harmadik verziót (COSMIC v3), mely több, mint 60 szignatúrát tartalmaz, és a meglévőket is megváltoztatta kisebb vagy nagyobb mértékben (Alexandrov et al., 2020). A szignatúráknak egy részét sikerült ismert mutagenikus mechanizmusokhoz kötni, de számos szignatúra mechanizmusa továbbra sem ismert. Emellett az ismert folyamatokkal korrelált szignatúrák esetén sem bizonyítottak az okozati összefüggések. Sőt, mivel a szignatúrákat egy nem felügyelt matematikai módszerrel állították elő, nem garantálható, hogy azok a lehető legjobban mutatják a velük korrelált folyamat mutációs spektrumát. Ezért lényeges a mutagenikus spektrumok kísérletes igazolása, melyre a további fejezetekben több példát is bemutatok.

A daganatok mutációs spektrumainak valódi haszna a tumordiagnosztikában rejlik. A diagnosztikában természetesen lényeges a driver mutációk felismerése, és számos célzott terápiás szer alkalmazása adott génnek szomatikus mutációihoz van kötve. Példaként említhetők a tirozin kináz receptor gátlók (pl. gefitinib) alkalmazása EGFR mutáns tüdő adenokarcinómákban (Ono és Kuwano, 2006), vagy PARP inhibitorok alkalmazása BRCA1/2 mutációt hordozó ovárium karcinómák kezelésére (Fong et al., 2009). Azonban a driver mutációkon túl az összes szomatikus mutáció száma vagy spektruma is hordozhat prognosztikus vagy prediktív információt, azaz előrejelezheti a betegség lefolyását, illetve

bizonyos kezelések hatékonyságát. Például az MMR hiányos daganatok jellemzően jobb prognózissal bírnak, mint az azonos szövet működő MMR-rel rendelkező tumorai (Deng et al., 2019; Kato et al., 2015). Mivel ezzel szemben a nagyléptékű genomi instabilitás negatív prediktora a betegség lefolyásának a legtöbb daganattípus esetén (Carter et al., 2006), a mutációs spektrumok több aspektusa is felhasználható lehet prognózis felállítására. Még fontosabb szempont, hogy a mutációs spektrumok információt szolgáltathatnak a DNS-javítást célzó vagy hiányát kiaknázó kezelések hatékonyságának előrejelzésére, amennyiben megállapíthatók a tumor DNS-javító képességei és hiányosságai a genomszekvencia alapján.

1.7 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. Egy merőben más megközelítésben pedig immunterápiákat alkalmaznak olyan daganatokban, amelyekben DNS-hibajavítási problémák miatt nagyon sok a szomatikus mutáció (Cristescu et al., 2018; Samstein et al., 2019).

A szintetikus letalitás alapú megközelítésre jelenleg egy jó példa van: a BRCA mutáns daganatok célzása PARP-1 inhibitorokkal. A HR-ben fontos szerepet betöltő BRCA1 vagy BRCA2 gének mutációja esetén a sejtek rendkívül érzékenyek a PARP-1 gátlószereire (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). Az érzékenység oka még nem teljesen tisztázott, de hozzájárulhat az a jelenség, hogy a PARP egyszálú DNS-törések javításában betöltött szerepének kiesése esetén a DNS-replikáció ezeket kétszálú törésekké konvertálja, amelyeket a HR hiányában a sejt nem képes javítani és a szétesett replikációs villákat visszaállítani. Ezek a megfigyelések alapján fejlesztettek PARP inhibitor hatóanyagokat klinikai használatra, mint az első DNS-hibajavító útvonalat célzó tumorterápiákat (O'Connor, 2015). Az első PARP inhibitorokat (olaparib, rucaparib) BRCA mutáns petefészekrák kezelésére hagyták jóvá, korábbi kemoterápiás kezeléseket követő alkalmazásra. A niraparib nevű PARP inhibitort már BRCA státuszra való tekintet nélkül hagyták jóvá petefészekrákban való felhasználásra. A

szélesebb körű hatékonyság oka, mely a többi PARP inhibitorra is érvényes, a petefészekrákok többségének HR problémája lehet (Konstantinopoulos et al., 2015). A *BRCA1* és *BRCA2* szomatikus és öröklött mutációin kívül ez egyéb HR gének mutációit, valamint a *BRCA1* gén gyakori promóter metiláció következtében fellépő inaktivációját foglalja magába. Nem bizonyított azonban, hogy a *BRCA1/2*-től eltérő HR gének mutációja mennyire érzékenyít a PARP inhibitorokra. Felmerül a kérdés, hogy a sok génben fellépő, bizonyítatlan hatású mutációk elemzése helyett használhatók-e a HR-specifikus mutációs spektrumok a PARP inhibitorok hatásának predikciójára. A probléma kísérletes megközelítését egy későbbi fejezetben mutatom be. További klinikai vizsgálatok is folytak a PARP inhibitorok szélesebb körű felhasználására nem BRCA mutáns petefészekrákban, illetve egyéb tumortípusokban (Ang és Tan, 2017; Livraghi és Garber, 2015; Sonnenblick et al., 2015), melyek alapján használatuk emlőrákban is megkezdődött.

A tumorsejtekben felgyülemlett szomatikus mutációk egy része kódoló régiókban kerül, így megváltoztathatja bizonyos fehérjék aminosav-szekvenciáját. Az így képződött neoantigéneket, amennyiben kikerülnek a sejtfelszínre, T sejtek felismerik és elpusztítják a tumorsejtet. Azonban a daganatos sejtek a PD-L1 transzmembrán fehérje expressziójával képesek gátolni a T sejteket a felszínükön lévő PD-1 receptoron át. A PD-L1 fehérjét célzó immunterápiák jobban működnek az MMR deficiens tumorsejteken (Le et al., 2017), mivel e sok neoantigént expresszáló sejtek túléléséhez lényegesebb a PD-L1 funkciója. Ennek megfelelően az MMR hiányos daganatok mutációs terhe korrelál az immunterápiára adott válasszal (Mandal et al., 2019), így az MMR hiányában fellépő mutációs folyamatok jobb megértése segítheti a kezelési stratégiák kidolgozását (Baretti és Le, 2018; Germano et al., 2018).

2 MÓDSZEREK

2.1 Kísérletes módszerek

2.1.1 Sejttenyészet, transzfekció

A tenyésztett sejteket 37°C hőmérsékleten tartottuk 5% CO₂-t tartalmazó atmoszférában. A DT40 sejtvonalkat RPMI-1640 médiumban tartottuk 7% FBS és 3% csirkeszérum (Sigma), valamint penicillin/streptomycin, és 50 µM β-merkaptotanol hozzáadásával. DLD-1 sejteket RPMI-1640 tápoldatban tartottuk 10% FBS hozzáadásával. SUM149PT sejteket Ham's F12 tápoldatban (Sigma) 10 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 1 µg/ml hydrocortisone és 5 µg/ml insulin jelenlétében, 5% FBS hozzáadásával tenyésztettünk.

Tranziens transzfekciókat Amaxa nukleofector készülékkel (Lonza) végeztünk a gyártó protokolljai szerint. DT40 sejteket a CN-150 programmal transzfektáltunk, 3 millió sejtet 100 µl térfogatban vagy 0.6 millió sejtet 20 µl térfogatban.

2.1.2 Sejtvonalkak, génkiütés, génmódosítás

A következő DT40 sejtvonalkat használtuk: vad típus Clone18 (Buerstedde et al., 1990), *BRCA1*^{-/-} és *BRCA1*^{+/-} mutánsok (Vandenberg et al., 2003), *BRCA2*^{-/-} és *BRCA2*^{+/-} (eredeti megjelölése szerint *BRCA2*^{-con1}) (Qing et al., 2011), *PCNA*^{K164R/K164R} (a továbbiakban *PCNA*^{K164R}) (Arakawa et al., 2006), *PALB2*^{-/-} (Al Abo et al., 2014), *RAD51C*^{-/-}, *XRCC2*^{-/-}, *XRCC3*^{-/-} (Takata et al., 2001), *RAD54*^{-/-} (gén neve *RAD54L*) (Bezzubova et al., 1997), *ATM*^{-/-} (Takao et al., 1999), *CHK2*^{-/-} (gén neve *CHEK2*) (Rainey et al., 2008), *REV1*^{-/-}, *REV1*^{+/-} *PCNA*^{K164R/K164R} (Arakawa et al., 2006); *XPA*^{-/-}, *XPA*^{-/-} *REV1*^{-/-}, *XPA*⁻, *XPA*⁻ *REV3*^{-/-}, *XPA*⁻ *POLH*^{-/-}, *XPA*⁻ *PCNA*^{K164R}/*PCNA*^{K164R} (Szüts et al., 2008).

A *RAD52*^{-/-} mutáns sejtvonalkat homológ génkiütéssel állítottuk elő, helyettesítve a 3-as exon előtti Nde I hasítóhelytől a 7-es exon utáni hasítóhelyig terjedő genomi szakaszt a két allélon blasticidin illetve hygromycin szelekciós kazettákkal. Az *XPA*⁻ *BRCA1*^{-/-} és *XPA*⁻ *XRCC3*^{-/-} sejtvonalkak előállításához előbb kiütöttük az *XPA* gént a heterozigóta HR mutáns vonalakban,

majd a publikált konstrukciók segítségével kiűtöttük a *BRCA1* (Vandenberg et al., 2003) illetve *XRCC3* (Yonetani et al., 2005) második allélját.

Különféle vad típusú, mutáns és fúziós csirke PCNA variánsokat expresszáló csirke sejtvonalak előállításához a konstrukciókat a pIRES2-EGFP vektor Sal I és BamH I hasítóhelyei közé klónoztuk, majd a PCNA-IRES-EGFP szakaszt Sal I és Not I hasítások segítségével áthelyeztük a pExpress-ből származtatott pXPSN2 plazmidba (Arakawa et al., 2001; Ross et al., 2005), onnan kivágtuk Spe I enzimmel, és az Nhe I nukleázzal hasított pLoxBsr vagy pLoxPuro (Arakawa et al., 2001) plazmidokba ligáltuk. Az elkészült konstrukciókat elektroporálással juttattuk DT40 sejtvonalakba, és blasticidin vagy puromycin antibiotikumokkal szelektáltuk a stabilan beépült konstrukciókat tartalmazó sejtklónokat (Gervai et al., 2017).

A DLD-1 sejtvonal forrása az American Type Culture Collection (ATCC). A SUM149PT sejtvonalat az Asterand cégtől szereztük be.

Minden sejtvonalat és génmutációt a genomszekvenálás alapján ellenőriztünk.

2.1.3 Érzékenységi vizsgálatok

Citotoxicitási esszék esetében 384-lyukú lemezekben lyukanként 1000 sejtet inkubáltunk kétszeres vagy háromszoros hígítási sorban alkalmazott citotoxikus szerekkel. A viabilitást 72 óra után mértük PrestoBlue reagens (Thermo Fisher) és egy EnSpire plate reader (Perkin-Elmer) segítségével. Három technikai párhuzamost átlagoltunk kísérletenként. A mért adatokat a kezeletlen mintához normalizáltuk, és egy szigmoid modell szerinti görbét illesztettünk a GraphPad Prism programmal. Az illesztési statisztikákból számoltuk ki az IC_{50} értéket.

Kolóniatúlélési esszékhez csirke DT40 sejteket a megfelelő dózisú és időtartamú kezelés után 1% metilcellulóz tartalmú tápoldatra helyeztünk három tízszeres hígításban, és 10-14 nap múlva megszámoltuk a kifejlődő telepeket. Két technikai párhuzamost átlagoltunk kísérletenként.

2.1.4 DNS-károsodás észlelése Western blottal és immunfluoreszcenciával

Western blothoz teljes sejtextraktokat SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel frakcionáltunk, PVDF membránra transzferáltunk, majd először elsődleges γ H2AX (Millipore 05-636, 1:4000) vagy α -tubulin (Sigma T6199, 1:2000) ellenanyagokkal inkubáltunk, utána másodlagos anti-egér IgG (Sigma A9044, 1:20000) vagy anti-nyúl IgG (Sigma A0545, 1:20000) peroxidáz-csatolt ellenanyagokkal. A blotokat az ECL kemilumineszcenciás reagenssel, és egy Chemidoc MP (Bio-Rad) berendezéssel hívtuk elő. A csíkok intenzitását az azonos membránon detektált α -tubulin jelhez viszonyítottuk.

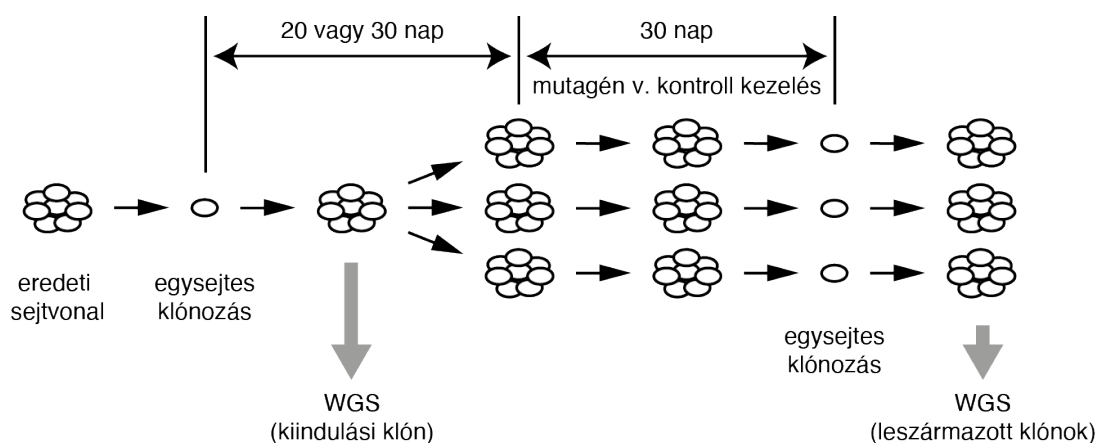
Immunfluoreszcenciás elemzéshez a sejteket poli-L-lizinnel bevont fedőlemezekre centrifugáltuk, és 4% paraformaldehid oldattal fixáltuk. 0.1% Tween 20-t és 0.02% SDS-t tartalmazó PBS oldatban történt blokkolás után a mintákat anti- γ H2AX ellenanyaggal (Millipore 05-636, 1:1000), majd Alexa Fluor 488 anti-egér IgG másodlagos ellenanyaggal (LifeTechnologies A11029, 1:1000) inkubáltuk 1-1 órán át 37°C hőmérsékleten, és végül Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific H3570, 1:10000) festékkel szobahőmérsékleten 10 percig. A fluoreszcens szignált egy Zeiss LSM 710 konfokális mikroszkóppal detektáltuk.

2.1.5 Szintetikus DNS lézió keresztüli DNS replikáció vizsgálata élő sejtekben

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 (Szüts et al., 2008). A visszanyert plazmidkeveréket PCR templátként használtuk egy 1369 bp hosszú régió amplifikálásához a CAGTCGACTTTTGATTAGAAATTGTCCAC és CAGCGGCCGCTTTGCAAGCAGCAGATTACG primerekkel. Az amplifikált régió tartalmazza a léziók helyét és 12 Dpn I hasítóhelyet. A reakciótermékeket tisztítás után Sal I és Not I enzimekkel emésztettük, és a pBluescript (Stratagene) plazmid megfelelő hasítóhelyeibe klónoztuk. Egyedi transzformált baktériumtelepekből kivont plazmidokat szekvenáltunk M13 primerrel.

2.1.6 Spontán és indukált genomi mutagenézis vizsgálata sejtvonalakban

A vizsgált sejtvonalakon egysejtest klónozást végeztünk. Egy kiindulási klónból genomi DNS-t izoláltunk, amint a megfelelő sejtszám rendelkezésre állt. Ugyanezt a kiindulási klónt továbbtenyésztettük egy vagy több tenyészetben, és a kísérletnek megfelelő kezelést alkalmaztunk (tipikusan heti egy mutagénkezelést 4 cikluson át, vagy 30 nap folyamatos kezelést). Meghatározott időtartam (az első klónozástól 50 vagy 60 nap) elteltével a kezelt és a kontroll populációkat újra egysejtes klónozásnak vetettük alá, majd kezelésként több felnőtt klónból is genomi DNS-t preparáltunk a 3. ábrának megfelelően. A kiindulási és a leszármazott klónokból kivont DNS-t teljes genomszekvenálással elemeztük.



3. Ábra: A teljes genomszekvenáláson (WGS) alapuló mutációdetektálás kísérleti sémája

2.2 Bioinformatikai módszerek

2.2.1 Genomszekvenálás, elemzés, mutációkeresés

A teljes genomszekvenálást Illumina HiSeq 2500 vagy Illumina HiSeq X Ten berendezésen (Novogene, Kína) vagy BGISEq berendezésen (BGI, Kína) végeztük, 2x150 bázispáros leolvasásokkal. A sejtklónok esetében 30x átlag lefedettséget alkalmaztunk, a tumorminták esetében 60x lefedettséget.

A leolvasásokat (read-eket) a Galgal4.73 csirke referenciagenomhoz, vagy a GRCh37 humán referenciagenomhoz illesztettük a BWA illesztőprogrammal. A duplikátum readeket a samblaster (Faust és Hall, 2014) segítségével eltávolítottuk, majd az illesztett readeket újraillesztettük a GATK IndelRealigner (McKenna et al., 2010) felhasználásával.

Izogenikus mintákban SNV-eket és rövid indeleket az általunk erre a célra kifejlesztett IsoMut program segítségével azonosítottunk (Pipek et al., 2017). Az IsoMut eredménylistáját úgy szűrtük, hogy a kiindulási klónokban maximum öt SNV és egy indel legyen, mivel az ezen mintákban észlelt egyedi mutációk belső kontrollként mutatják a fals pozitívokat. A rövid deléciókat szekvenciakontextus szerint osztályoztuk. Strukturális variációkat a CREST programmal (Wang et al., 2011) azonosítottunk, utószűrési lépéseket alkalmazva.

2.2.2 CRISPR alapú in vivo kettős száltörés javítási esszé

CRISPR alapú gencélzáshoz a PX458 plazmidot (Addgene plazmid #48138) (Ran et al., 2013) használtuk, mely tranziensen expresszálja a Cas9 és GFP fehérjéket, valamint egy guide RNS-t. A plazmidot 600000 DT40 sejtbe transzfektáltuk egy Lonza Nukleofector 4D berendezés segítségével, a CN-150 programmal. A GFP pozitív sejteket 24 h múlva szortoltuk, majd újabb 24 óra múlva, amikor a mutációs spektrum már várhatóan stabil (Taheri-Ghahfarokhi et al., 2018), a célzott lókuszok régióit genomi DNS preparátumokból indexelt PCR primerekkel felamplifikáltuk.

Az ampikonok szekvenálását Illumina technológiával, 2x150 bázispáros leolvasásokkal végeztük. A két célzott lókusz a *HMBS* gén 3. exonja (gRNS célpontja: chr24:40917-40636) és az *XPC* gén első exonja (gRNS célpontja: chr12:10787326-10787346) volt. A CRISPR célpont körüli régió amplifikálásához a gacNNNNNNCCACACTGCAAAACATTAAGTCC és gacNNNNNNCTGTTCAAGTGTGACTGC (lókusz 1) illetve gacNNNNNNGTCCGCCATCTTTCAAACC és gacNNNNNNCCGGGCCGCCTTTTGC (lókusz 2) primereket használtuk, melyekben az N-ek mintaspecifikus index szekvenciákat jelölnek. A kapott szekvenciákból először a Trimmomatic (Bolger et al., 2014) segítségével

eltávolítottuk a szekvenáló adaptereket és a gyenge minőségű read-eket. A read-párokat FLASH2 (Magoč és Salzberg, 2011) segítségével egyesítettük, majd az EMBOSS csomag Needle programjával (Rice et al., 2000) illesztettük egymásra, és a szekvenciaváltozásokat egy saját Python scripttel ábrázoltuk.

2.2.3 Humán tumorminták elemzése

A TCGA adatbázisban található tumorminták exomszekvenálásból származó mutációs katalógusait az Alexandrov et al. (2013) közlemény alapján töltöttük le. 200-nál több szomatikus mutációt tartalmazó mintákat választottunk ki további elemzésre. Klinikai adatokat, pl. MSI státusz, a GDC portálon keresztül értük el a *TCGAbiolinks* R csomag segítségével (Mounir et al., 2019). Potenciális onkogenikus driver mutációk azonosításához a MMR és HR génekben az InterVar szoftvert (Li és Wang, 2017) használtuk.

Tumor genomszekvenálási adatokat a PCAWG adatbázisból töltöttünk le az Alexandrov et al. (2019) közlemény alapján, köztük 60 kolorektális adenokarcinóma, 75 gyomor adenokarcinóma és 51 méhtest adenokarcinóma mintával.

2.2.4 Mutációs mintázatok összehasonlítása, felbontása

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). Páros összehasonlításokhoz koszinusz távolságot, vagy Spearman rangkorrelációt használtunk. A kísérleti mintázatok felbontásához a *deconstructSigs* R csomagot (Rosenthal et al., 2016) használtuk, a minimális kontribúciót 6%-ra állítva. Referencia szignatúra halmaznak vagy a COSMIC második verziójában levő 30 szignatúrát (COSMIC v2) vagy a COSMIC harmadik verziójában levő 67 szignatúrát (COSMIC v3) használtuk. Ettől eltérő referenciahalmazokat a szövegben jelöltünk.

2.2.5 Nemnegatív mátrix faktorizáció

De novo mutációs szignatúrákat NMF módszerrel állítottunk elő, a *MutationalPatterns* (Blokzijl et al., 2018) R csomag használatával. A komponensek optimális számát a Brunet módszer szerint becsültük meg a kofenetikus korrelációs együttható alapján, 50 ciklusban. Ezután az NMF-et a kiválasztott komponensszámmal 200 ciklusban végeztük.

3 EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

3.1 A mutagenézis vizsgálata sejtvonalakon genomszekvenálással

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, a rendkívül széles körben használt HeLa sejtvonal genomját is csak 2013-ban publikálták (Adey et al., 2013; Landry et al., 2013). A tanulmányok megerősítették, hogy a HeLa sejtvonal rendkívül aneuploid, amely nagyrészt alkalmatlanná teszi genetikai megközelítésekre. Mivel a DNS-hibajavítás kutatása nagymértékben támaszkodik a DT40 csirke sejtvonalra, a fenti publikációval egyidőben megkezdtuk a DT40 sejtvonal genomjának feltérképezését.

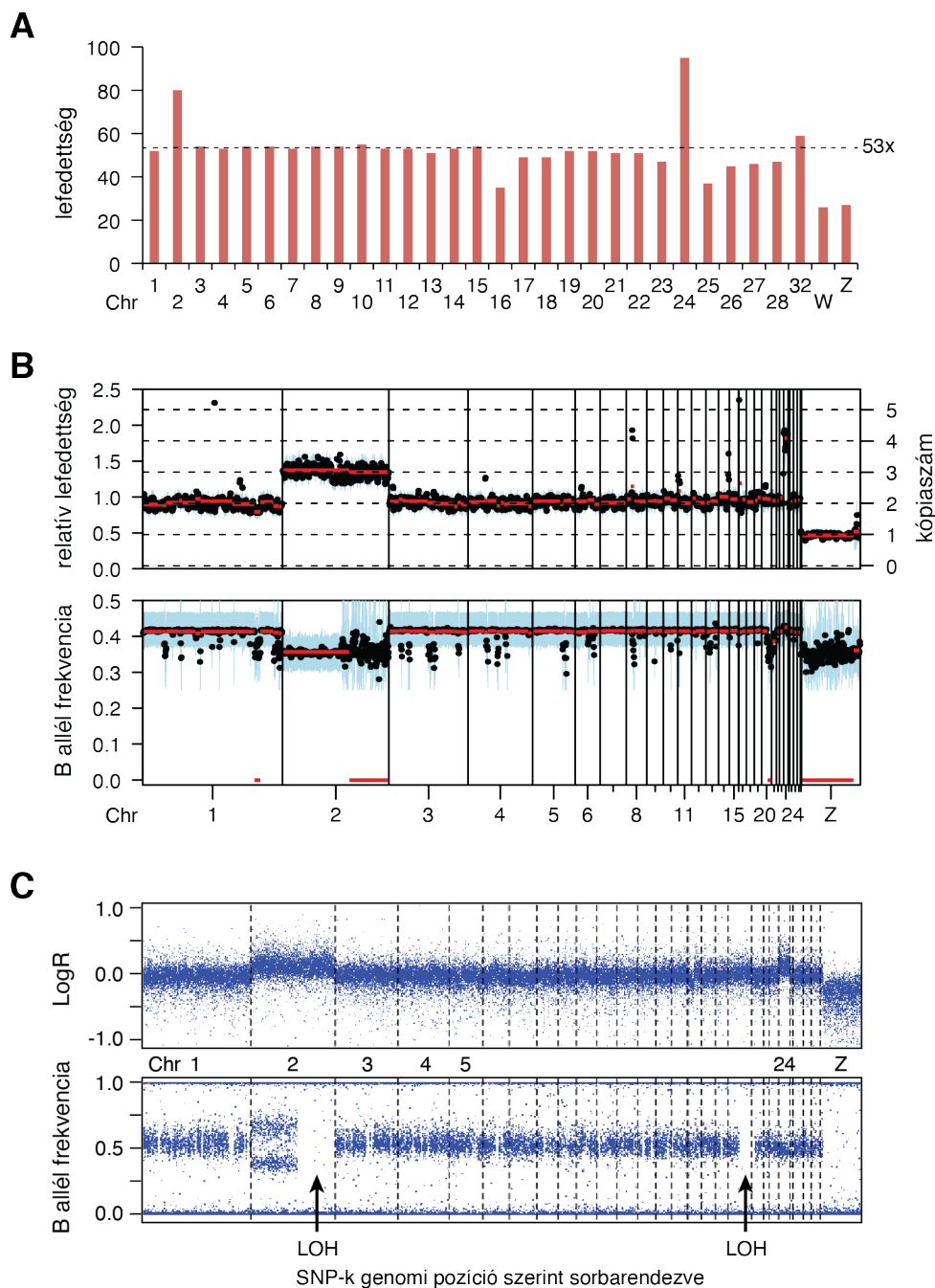
3.1.1 A DT40 sejtvonal genomja

A DT40 sejtvonal egy madárleukózis vírussal (ALV) megfertőzött házi tojó tyúkban kifejlődött burzális limfómából származik (Baba et al., 1985; Baba és Humphries, 1984). Kariótípusát stabilnak írák le (Sonoda et al., 1998), amely előnyös a genetikai kísérletekhez. A sejtvonalon használt gécélző konstrukciók tervezését jelentősen megkönnyítette a csirkegenom első verziójának publikálása 2004-ben (ICGSC, 2004). A genom 4. verziója (Gallus_gallus-4.0) 1.072×10^9 bázispárnyi szekvenciát tartalmaz a 37 autoszóma közül 29-en, a W és Z ivari kromoszómákon, valamint további kontigokon. A referenciagenom hiányossága a madarakra jellemző mikrokromoszómák gyenge lefedettsége. A felhasználhatóságot tovább korlátozza a referenciaként szekvenált ázsiai vadtyúk és a DT40 eredetű szolgáló házasított fajták közötti különbség: kb 6 millió SNV különbséget találtak két házasított fajta és a referenciagenom között (Fan et al., 2013).

A szekvenáláshoz egy általunk már évek óta használt vad típusú DT40 vonal (Szüts et al., 2006) újonnan izolált sejtklónját használtuk. Az Illumina HiSeq2000 berendezésen végzett szekvenálásból 2x100 bp hosszúságú páros leolvasásokat illesztettünk a referenciagenomra, 55x átlagos lefedettséggel. A genomban 6251553 SNV-t találtunk, melyek közül 3320786 volt homozigóta. Az SNV-k 68%-a már ismert volt a dbSNP adatbázisban, háziasított fajták két korábbi szekvenálásából (Fan et al., 2013; Rubin et al., 2010). Mivel nem elérhető annak az állatnak a genomja, amelyből a DT40 vonal származik, nem tudjuk megmondani, hogy a mutációk közül melyek keletkeztek a sejt vonal izolálását követően. Azonban a mutációk spektruma hasonló, mint az egyéb fajokban talált SNV-k spektruma. CG>TA és TA>GC mutációk a leggyakoribbak és hasonló számban vannak jelen, melyeket valószínűleg az elvált evolúció során a szekvenált fajtában és a referenciában egyaránt keletkező C>T mutációk okoztak. Az SNV-k elemzése tehát nem tárt fel semmiféle DT40-specifikus mutációs folyamatot.

A kromoszómák lefedettsége jól mutatta a kópiaszámokat (4A ábra). A W és Z ivari kromoszómák kb. az átlag felének megfelelő lefedettsége mutatja az egyes kópiaszámukat és a sejt vonal nőstény eredetét. A 2-es és 24-es kromoszóma elvártnál magasabb lefedettsége extra kópiaszámot sugall. A kópiaszámot a Sequenza R programcsomaggal is elemeztük, (Favero et al., 2014), amely a lefedettség alapján a 2-es kromoszómára három, a 24-es kromoszómára négy kópiát jelzett (4B ábra). A kópiaszámok független meghatározása érdekében a szekvenált mintát egy 60000 próbás SNP hibridizációs array-en is elemeztük (Groenen et al., 2011). A teljes szignálintenzitás (4C ábra, felső panel) megerősítette a 2-es és 24-es kromoszómák megnövekedett kópiaszámát. Az SNP allélfrekvenciák is jól jelezték a 2-es kromoszóma triszómiás állapotát. A genom több szakaszán is hiányoztak a 0 és 1 közötti allélfrekvenciák, például a 2-es és 20-as kromoszóma kb. felén, de számos rövidebb szakaszon is. Ez heterozigóta állapotvesztésre (LOH), azaz az egyik haplotípus elvesztésére utal. Összességében a genom 26%-át fedték ilyen LOH régiók, amely nem több, mint amennyit a publikált L2 és Silkie fajták (Fan et al., 2013) genomjában detektáltunk, tehát ezek többsége

valószínűleg nem a sejtvonalban jött létre. Több szubklónt is elemeztünk SNP hibridizációs array-en, amelyek megegyeztek az eredeti klónnal.



4. Ábra: Egész kromoszómák kópiaszám-változása

(A) A kromoszómák (Chr 1-28, 32, W, Z) lefedettsége a DT40 genom szekvenálásban. A szaggatott vonal 53x lefedettségénél a nagyobb, diszómiát mutató kromoszómák (1, 3-10) átlagos lefedettségét mutatja. (B) Kópiaszám-változás és heterozigóta állapotvesztés (LOH) elemzés a Sequenza programcsomag segítségével. A felső panel a relatív lefedettséget, az alsó panel a B

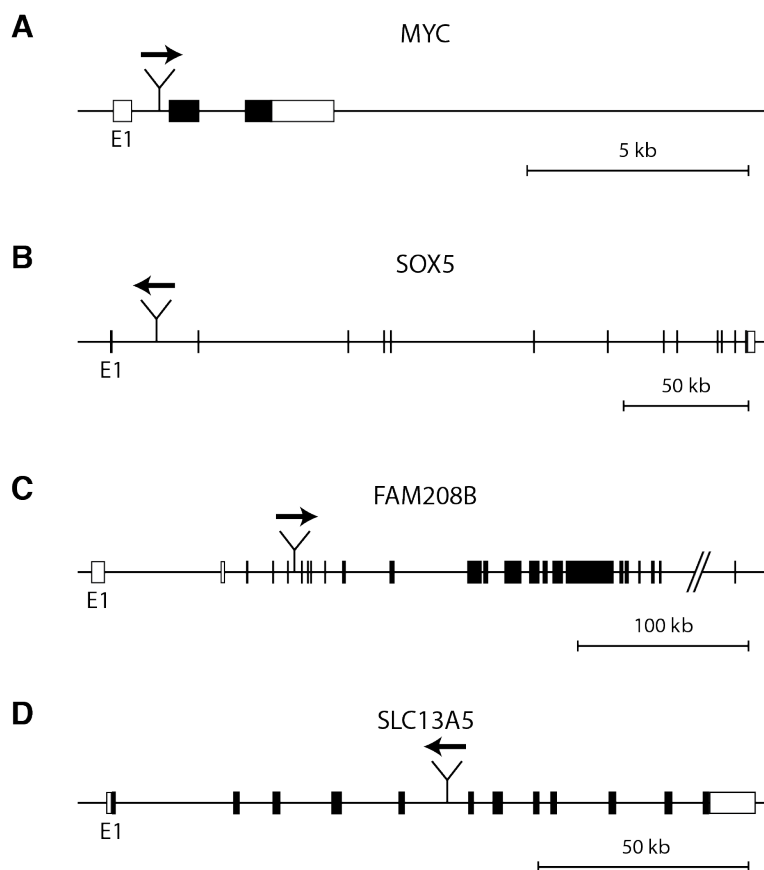
allél frekvenciáját mutatja 1 Mb méretű, 0.5 Mb távolsággal átfedő szakaszokon (feketével). A halványkék vonalak a kiátlagolt szakaszok interkvartilis tartományát mutatják, pirossal 10 szomszédos szakasz átlaga van ábrázolva. Az x tengelyen a kromoszómák (1-28, 32, W, Z) vannak sorba rendezve. Láthatók az LOH régiók a 2-es és 20-as kromoszómán, valamint kópiaszám-változások a teljes 2-es és 24-es kromoszómán. (C) SNP array hibridizációs elemzés a szekvenált mintán. 60000 SNP látható genomi pozíció szerint sorba rendezve az x tengelyen. A kromoszómahatárokat szaggatott vonalak jelzik, kromoszómaszámok a két panel között vannak feltüntetve. A felső panel a relatív szignálintenzitás logaritmusát mutatja (LogR), látható a 2-es és 24-es kromoszóma megnövekedett kópiaszáma. Az alsó panel a B allél frekvenciát mutatja, nagyobb LOH régiók nyíllal jelölve.

A sejtvonal jobb megismerésének érdekében megvizsgáltuk a fehérjekódoló régiókat érintő SNP-ket és indeleket. Az SNP-k fehérjeszerkezetre gyakorolt hatását a Coovar programmal, a Grantham mátrix alapján modelleztük (Grantham, 1974; Vergara et al., 2012). 1251 'radikális' hatású SNP-t találtunk, mely hasonló volt az L2 és Silkie fajták genomjában talált mennyiséghez, így nem valószínű, hogy ezen mutációk közül sok keletkezett a sejtvonal izolálását követően. Az indelekkel együtt összesen 485 olyan homozigóta kódoló mutációt találtunk, amely valószínűleg befolyásolja bizonyos gének funkcióját. Fontos megjegyezni, hogy ezen a listán sok olyan mutáció lehet, amely hibásan annotált, kódolónak jelölt genomi szakaszba esik, de valójában pl. intronban található.

Az érintett gének listáját összehasonlítottuk a daganatokban gyakran mutálódó gének listájával (Kandoth et al., 2013), és azonosítottunk mutációkat a *PIK3RI* génben. DNS-javításban ismert funkciójú génekben nem találtunk mutációt. A *PIK3RI* mutáció hat bázispárt, azaz két aminosavat töröl ki egy foszfatidilinozitol 3-kináz szabályozó alegységéből. Hasonló mutációk, melyek a két fehérje interakciójának akadályozásával a *PIK3CA* katalitikus alegység aktivációját okozzák, gyakoriak tumorgenomokban (Kandoth et al., 2013). Így ez a mutáció fontos szerepet tölthetett be a DT40 sejtvonal onkogenikus transzformációjában.

Mivel a DT40 sejtvonalat ALV vírustranszformációval hozták létre, megkerestük a vírus integrációs helyeit a genomban. Négy integrációt találtunk. Egy a várákozásnak megfelelően a *MYC* proto-onkogénbe integrálódott, annak első intronjába (5A ábra). Mivel a gén transzlációs starthelye a második exonban található, a vírusgenom promóter aktivitása képes lehet megnövelni a *MYC* fehérje expresszióját a korábbi megfigyeléseknek megfelelően (Baba et

al., 1985). További vírusintegrációt észleltünk a *SOX5*, *FAM208B* és *SLC13A5* génekben, melyeknek nincs nyilvánvaló funkciója az onkogenikus transzformációban (5. ábra).



5. Ábra: ALV integrációs helyek

Az ALV genom szekvenálás alapján feltérképezett integrációs helyei a megjelölt génekben. A beépült vírusgenom irányát nyíl jelzi. A gének kódoló exonjait teli, nem kódoló exonjait üres téglalapok ábrázolják.

Összességében elmondható, hogy a DT40 sejtvonal majdnem normális és stabil kariotípussal rendelkezik és genomja nem mutatja semmilyen jelét abnormális DNS-hibajavítási képességeknek, mely jellemzők alkalmassá teszik genetikai kutatásokra különösen a DNS-hibajavítás területén. Onkogenikus transzformációja kevés, tipikus változás (megnövekedett MYC expresszió, PIK3R1 mutáció) következménye, melyek csak a növekedési útvonalakat befolyásolják, így egy egyszerű tumorsejt-modellnek is tekinthető. Fontos megjegyezni, hogy tumorsejtekre jellemzően a DT40 sejtvonal a *TP53* gén mutációját is hordozza (Abe és Brnzei,

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. A két genom különbsége mutatja a kísérlet során keletkezett mutációkat. Mivel a DNS preparáció nem egy sejtből történik, a klónozott sejtet fel kell szaporítani mintavétel előtt, majd ugyanezt az egysejtes klónozást és felszaporítást kell ismételni a kísérlet végén (lásd a Módszerek fejezetet). A kísérlet során keletkezett mutációk így a végső mintában klonálisak lesznek, allélfrekvenciájuk diploid régióban általában 0.5 körüli.

A feladat analóg a tumormutációk detektálásával, hiszen a tumor is egy sejtklón, a tumorhoz hasonlított normál szöveti minta pedig a kísérletes kiindulási mintának felel meg. Így megpróbáltuk a tumorgenomokon általánosan használt szoftvereket alkalmazni, mint a VarScan 2 (Koboldt et al., 2012) és a MuTect (Cibulskis et al., 2013), azonban teljesítményüket nem találtuk megfelelőnek a sejtvonalakból származó mintákon, elfogadhatatlan volt a fals pozitívok száma. Emellett a MuTect nem volt képes indeleket detektálni, csak a később megjelent MuTect2 verziója. Ezért kidolgoztunk egy új mutációdetektálási módszert, melyet specifikusan sok hasonló, izogenikus minta különbségeinek megtalálására fejlesztettünk ki.

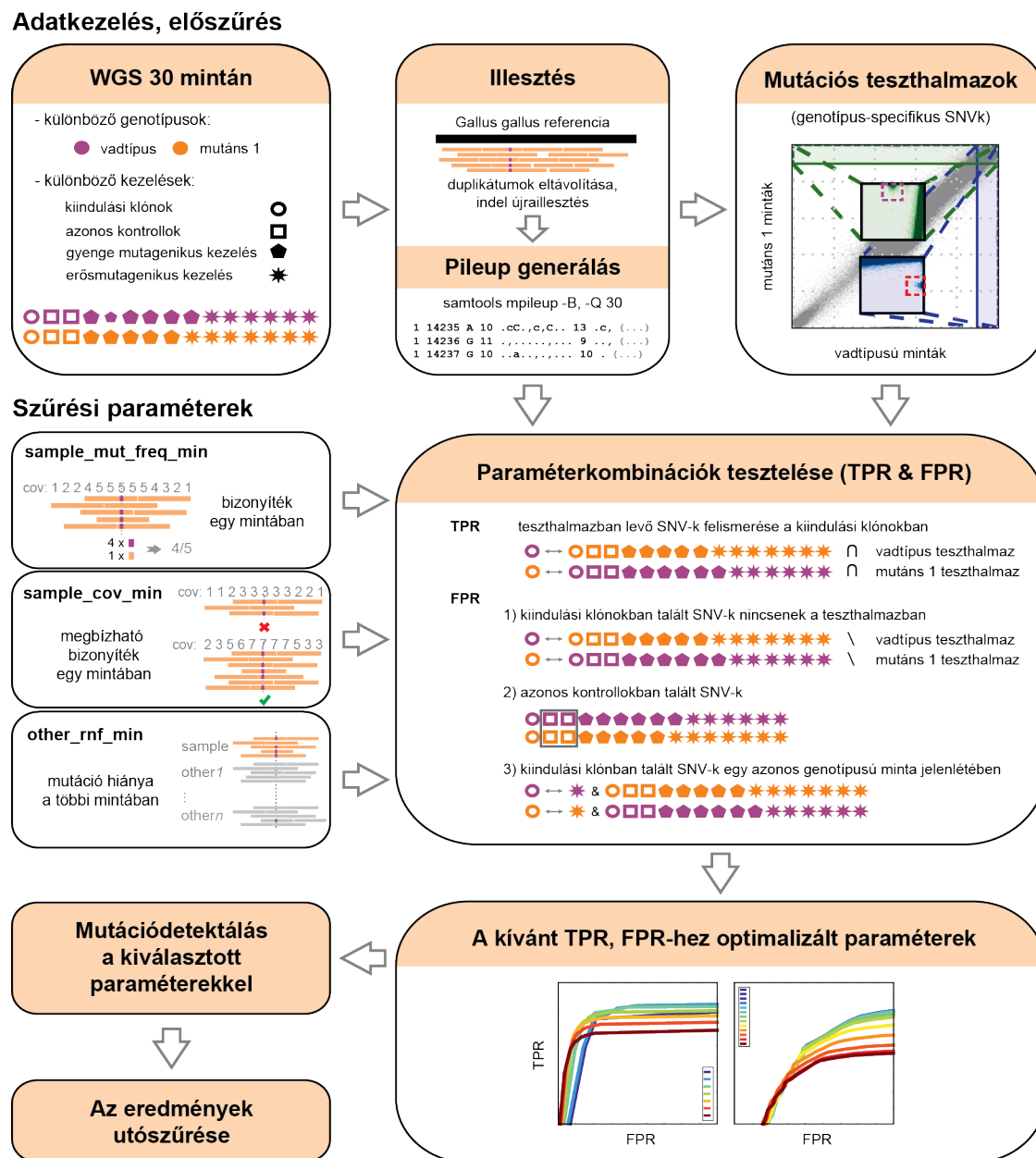
Új megközelítésünk nem mintapárokban detektálja a mutációt, hanem egyszerre vizsgálja az egy kísérletben vagy szekvenálásban keletkezett összes mintát. A módszer alapvetően klonális, tipikusan heterozigóta mutációkat keres, és kiszűri azokat a pozíciókat, ahol több minta is eltér a referencia genomtól. 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.

A szűréshez három egyszerű paramétert vezettünk be, melyeket minden genomi pozícióra kiszámolunk: a referenciától eltérő read-ek hányadának minimumát (*sample_mut_freq_min*) a legnagyobb mutált allélfrekvenciát mutató mintában, a referenciától való maximális eltérést a következő legnagyobb mutált allélfrekvenciát mutató ('legzajosabb') mintában (*other_rnf_min*) és egy lefedettségi minimumot a kiválasztott mutációt tartalmazó mintában (*sample_cov_min*). A paraméterek beállításait egy mutációs teszhalmazon teszteltünk, melyet 15 vad típusú és 15 azonos mutáns DT40 sejtklónból származó genomszekvenálásból határoztunk meg, a nagy mintaszám miatt rendkívül pontosan. Sokféle paraméterkombináció tesztelését követően (6. ábra) sikerült olyan kombinációkat találni, ahol nagyon alacsony fals pozitív ráta mellett a valódi mutációk 92%-át találtuk meg (Pipek et al., 2017). 30 mintán esetén végeztük a tesztelést, azonban azt találtuk, hogy kb 14-ig csökkenthető a mintaszám 30 átlaglefedettségű 150 bp páros végű Illumina szekvenálás esetén úgy, hogy 50/Gb fals pozitív ráta mellett a valódi pozitívok aránya 85% felett maradjon.

Mivel egy ismert teszhalmaz a legtöbb kísérletben nem áll rendelkezésre a paraméterek kísérletenkénti optimalizálásához, az IsoMut programot általában egyszerűsített formában használjuk és használják mások is. Itt fontos, hogy a kísérlet tartalmazza belső kontrollként a többi minta őset, tehát egy olyan mintát, amelyben egyedi mutációkra nem lehet számítani (3. ábra). A mintahalmazon relatíve megengedő paraméterekkel futtatjuk a programot (*sample_mut_freq_min*=0.21, *other_rnf_min*=0.93, *sample_cov_min*=5). Minden megtalált potenciális mutációhoz egy minőségi értéket rendelünk. Ez a mutáció hamissága statisztikai valószínűségének negatív logaritmus (S), amelyet Fisher's exact teszt segítségével a két legzajosabb minta referencia és mutáns read-számaiból számolunk ki. Végül az S küszöbértékét az egész mintahalmazra úgy hangoljuk, hogy a belső kontroll kiindulási klónokban nagyon kevés fals pozitív mutáció legyen. Az S küszöbértéket külön hangoljuk az

SNV-kre, inzerciókra és deléciókra. Az alábbiakban minden sejtvonalas kísérletben maximum öt SNV-t, egy inzerciót és egy deléciót engedtünk meg a kiindulási klónokban.



6. Ábra: Az IsoMut mutációdetekciós módszer működésének és optimalizálásának áttekintése

TPR: true positive rate (valós pozitívok aránya), FPR: false positive rate (hamis pozitívok aránya)

A MuTect2 páros összehasonlítás helyett képes a kiválasztott mintát egy normál panelhez hasonlítani, amely hasonlít az IsoMut működési elvéhez. Kellő optimalizálás után sikerült egy mintahalmazon a MuTect2-vel az IsoMut-hoz hasonlóan alacsony FPR-t elérni (0,7 SNV/Gb a MuTect2, 0,5 SNV/Gb az IsoMut esetén), azonban így a MuTect2 futási ideje 170-szerese volt az IsoMut-hoz szükségesnek. Egy 12-magú processzorral és 23 GB memóriával felszerelt komputeren tesztjeink szerint a fenti futtatás az IsoMut esetében 5 órát, a MuTect2 esetében 35 napot vett igénybe.

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. Például haploid élesztőgenomok esetén jóval alacsonyabb lefedettség mellett is nagy pontossággal képes mutációkat azonosítani, vagy nagyobb lefedettség mellett szubklonális, a populációnak csak egy részében jelen lévő mutációk detekciójára is alkalmas.

3.1.3 Sejtvonalak spontán mutációs folyamatainak feltérképezése

A sejtvonal-genomok mutagenézis eszkéként való felhasználásához fontos megismerni az adott sejtvonalakban működő spontán mutációs mechanizmusokat. Mivel az IsoMut-tal történő mutációdetektálás igen alacsony FPR-rel rendelkezik, felmerült a lehetősége annak, hogy egy kísérlet során elegendő spontán mutáció keletkezik a mutációs folyamat megismeréséhez. Először a DT40 sejtvonal spontán mutációit vizsgáltuk meg, egy kiindulási klón és három 50 nappal később izolált leszármazott szubklón szekvenálásával. Az utóbbiakban átlag 47 új SNV-t, 4,5 inzerciót és 3 deléciót találtunk (Szikriszt et al., 2016), míg a kiindulási klónban nem volt egyedi mutáció.

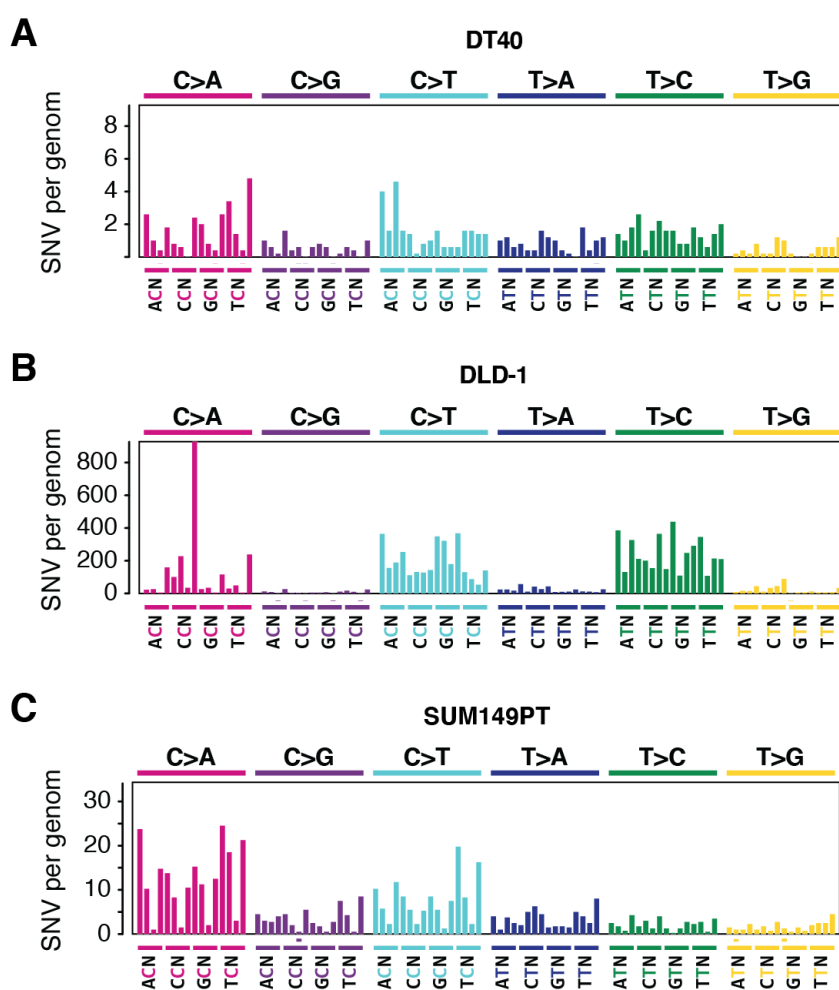
A DT40 sejtvonal növekedési sebességével és genomi méretével számolva az SNV mutációs ráta $2,3 \times 10^{-10}$ mutációnak felel meg bázispáronként és sejtosztódásonként. Ez figyelemre méltó módon hasonlít az *S. cerevisiae* sarjadzó élesztő ($3,6 \times 10^{-10}$ (Serero et al., 2014); $1,67 \times 10^{-10}$ (Zhu et al., 2014)) vagy a *C. elegans* ($6,7 \times 10^{-10}$ (Meier et al., 2014)) esetében mért spontán

mutációs rátához. A human apai csírvonalban a mutációs ráta kb. 2 SNV évente, és összesen átlag 14 új mutáció keletkezik az anyai csírvonalban (Kong et al., 2012). Becslések szerint az apai csírvonalban 15-16 naponta történik sejtosztódás, és összesen 22-23 osztódás van az anyai csírvonalban (Campbell és Eichler, 2013), melyből $0,17 \times 10^{-10}$ illetve $1,1 \times 10^{-10}$ mutáció becsülhető bázispáronként és sejtosztódásonként. A mutációs ráták hasonlósága azt a meglepő eredményt adja, hogy a DT40 sejtvonalt (és valószínűleg bizonyos más sejtvonalak is) igen jól modellezi a természetes és fiziológiai folyamatokat, és a tenyésztési körülmények, pl. a légköri oxigénkoncentráció nincsenek lényeges befolyással a spontán mutagenézisre.

A DT40 SNV mutációk triplet spektruma aránylag egyenletes eloszlást mutatott a különböző mutációtípusok között (7A ábra). A CpG dinukleotidok hasonlóan alulreprezentáltak a csirke és a humán genomban, így a tripletgyakoriságra normálva az NCG>NTG tripletek az átlagnál kb. 15x magasabb mutációs rátát mutattak, valószínűleg a metilált CpG szekvenciáknál bekövetkező C>T szubsztitúciók következtében (Pfeifer, 2006).

Egy következő projektben alkalmunk nyílt két humán sejtvonalt spontán mutagenikus folyamatait is felmérni. A DLD-1 vastagbél karcinóma sejtvonalt ismerten MMR hiányos és mikroszatellit instabilitást mutat (Umar et al., 1997), míg a SUM149PT tripla negatív emlőrák eredetű sejtvonalt a *BRCA1* gén mutációját hordozza és nem észlelhető benne a BRCA1 fehérje (Elstrodt et al., 2006; Thompson et al., 2012). A szekvenálás lefedettségi adatainak megfelelően a DLD-1 sejtvonalt alapvetően diploid, míg a SUM149PT nagymértékben aneuploid. A DLD-1 sejtvonaltban igen nagyszámú, 9799 ± 1910 SNV keletkezését észleltük a 60 napos kontroll kezelést követően, míg a SUM149PT sejtvonaltban 608 ± 146 SNV-t találtunk (Póti et al., 2018). Az osztódási rátát is figyelembe véve mindkét sejtvonalt spontán mutációs rátája sokkal magasabb a DT40-nél, mely a DNS-hibajavítási folyamataik hiányosságainak lehet a következménye, és eltérő triplet mutációs spektrumokat mutattak (7. ábra). Valóban, a DLD-1 sejtvonaltban elsősorban C>A, C>T és C>T mutációkat találtunk (7B ábra), így a spontán mutációs spektrum hasonlít a MMR hiányos daganatok mutációs spektrumára (további elemzést a 3.4.3 alfejezet tartalmaz).

A mutagenézis tudományterületén elsőként vezettük be a kísérleti modell sejtvonalak spontán mutagenikus folyamatainak rutinszerű feltérképezését. A közelmúltban megjelent egy átfogó tanulmány, amely 1001 sejtvonal genomszekvenálása mellett 28 sejtvonal esetén kiindulási és leszármazott klónok összehasonlításával kísérleteinkhez hasonlóan a kultúrában folyamatban levő mutagenikus folyamatokat is meghatározta (Petljak et al., 2019). Jól látható, hogy a sejtvonalak genomstabilitása fontos információt hordoz a molekuláris tulajdonságaikról, és befolyásolja a kísérleti felhasználhatóságukat.



7. Ábra: Különböző sejtvonalak spontán mutagenikus folyamatainak bázisszubsztitúciós mintázata

(A) csirke limfoblasztóma DT40, (B) humán kolorektális karcinóma DLD-1, (C) humán BRCA1 mutáns emlőkarcinóma SUM149PT sejtvonalak 50 napos tenyésztése után detektált bázisszubsztitúciós mutációk. Sejtvonalanként három szekvenált klón átlaga van ábrázolva. A bázisszubsztitúciók (a panelek tetején ábrázolt kategóriákban) a két szomszédos nukleotid szerint

kerültek csoportosításra, amint az a panel alatt látható. A mutációt követő nukleotid helyhiány miatt nincsen feltüntetve (N), ezek abc-sorrendben vannak ábrázolva.

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. Citotoxikus terápiák az 50-es évek óta léteznek, és általában ma is első vonalbeli kezelésként használatosak. Több különböző mechanizmussal gátolják a sejtek proliferációját, melyek között legfontosabb a DNS közvetlen károsítása, a DNS-metabolizmussal való egyéb kölcsönhatás, vagy a mitotikus folyamatok gátlása. A sikeres kezelések elpusztítják a tumorsejteket, de az egészséges szövetekre is antiproliferatív hatást fejtenek ki. Amennyiben a kezelés mutagenikus hatású, a tumorban indukált mutációk növelhetik a rezisztencia kialakulásának esélyét, egészséges szövetekben pedig másodlagos daganatok keletkezését indukálhatják (Choi et al., 2014).

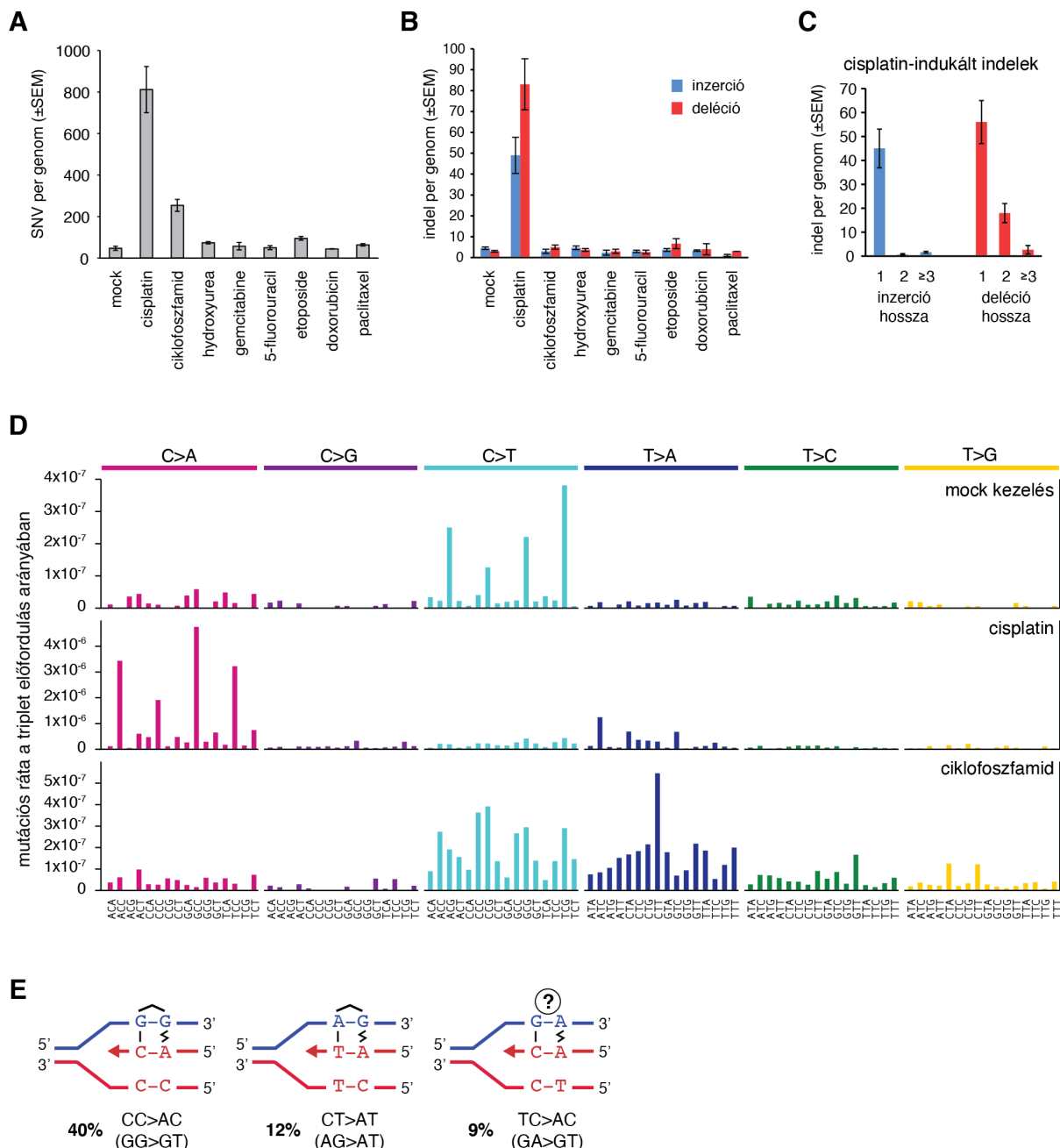
Vadtípusú DT40 sejteket nyolc különböző, általánosan használt citotoxikus szerrel kezeltünk. A kezeléseket a klinikai felhasználás modellezése érdekében heti ciklusokban alkalmaztuk; összesen négy kezelést kaptak a sejtek olyan koncentrációban, amely a populáció felét pusztítja el (IC_{50}). A kezeléseket követően a kontroll mock-kezelt sejtekkel egyidőben a populációból sejtklónokat izoláltunk, és a kiindulási klón valamint 3-3 kezelés utáni klón genomszekvenciáját meghatároztuk. Cisplatin esetén találtunk legtöbb mutációt SNV-k, inzerciók és deléciók tekintetében is (8A, 8B ábra). Számottevő mennyiségű bázisszubsztitúciót okozott a ciklofoszfamid-kezelés is, melyek főleg C>T és T>A mutációk voltak, a szomszédos bázisok szekvenciájától nagyrészt függetlenül (8D ábra). Észleltünk továbbá egy enyhe, de a mock kezeléssel összehasonlítva szignifikáns emelkedést az SNV-k számában az etoposide-kezelt sejtklónokban ($p=0,017$, t-teszt). A replikációt gátló hydroxyurea, a nukleozid analóg gemcitabine és 5-fluorouracil, a DNS bázisai közé

interkalálódó topoizomeráz II gátló antraciklin vegyület doxorubicin, illetve a mikrotubulusokat stabilizáló paclitaxel egyike sem mutatott mutagenikus hatást (8. ábra A, B). A cisplatin és ciklofoszfamid egyaránt kovalens DNS adduktokat formál (Eastman, 1986; Lemaire et al., 1991; Povirk és Shuker, 1994). Összességében tehát megmutattuk, hogy elsősorban a DNS-t közvetlenül károsító citotoxikus szereknek van számottevő mutagenikus hatása.

A cisplatin-kezelés hatására igen specifikus bázisszubsztitúciós spektrumot észleltünk, melyben C>A mutációk domináltak (8D ábra). A szomszédos bázisok kontextusában nézve az NCC>NAC mutációk voltak a leggyakoribbak (az összes SNV 40%-a, az N tetszőleges bázist jelöl). Szintén gyakoriak voltak az NCT>NAT és NTC>NAC mutációk (az SNV-k 12 és 9%-a). Mivel a cisplatin főleg szomszédos purinok között okoz keresztkötéseket, elsősorban GG dinukleotidoknál (Eastman, 1986; Lemaire et al., 1991), az észlelt mutációk minden bizonnyal a komplementer DNS-szálon levő léziókkal szemben jöttek létre. A mutációkat így egy replikatív folyamat okozhatja, amely a hibás templát másolásakor tévesen adenozint illeszt a lézió 3' pozíciójával szembe (8E ábra). A cisplatinkezelés nagyszámú inzerciót és deléció is generált, melyek többnyire egy bázispár, illetve a deléciók esetében két bázispár hosszúak voltak (8C ábra). Ezen rövid inzerciók és deléciók szekvencia-kontextusát megvizsgálva azt találtunk, hogy túlnyomó többségük GG dinukleotidoknál keletkezett, így kialakulásuk szintén a szálon belüli cisplatin keresztkötések replikációjához, a transzléziós szintézis folyamatához köthető (Szikriszt et al., 2016). A cisplatin képes szálak közötti keresztkötéseket is okozni főleg szemközti guaninok esetében GC szekvenciáknál (Huang et al., 1995), de nem találtunk ilyen szekvenciákhoz köthető mutációs kategóriát. Összességében elmondható, hogy bár a szálak közötti, ritka keresztkötéseknek komoly szerepe lehet a cisplatin citotoxikus hatásában, a mutagenikus hatást szinte kizárólag a szálon belüli, gyakori keresztkötések okozzák.

A négy ciklus cisplatin kezelés kb. 0,8 mutációt indukált megabázisonként, és egy újabb publikációban még több mutációt találtak cisplatinnal kezelt humán sejtvonalakban (Boot et al., 2018). Az ismert környezeti mutagének által indukált daganatok, mint melanóma vagy dohányzással kapcsolatos tüdőrák kb. 10 genomi mutációt tartalmaznak megabázisonként. Így

érthető, hogy egy hosszabb citotoxikus kezelés cisplatinnal vagy hasonlóan mutagén hatóanyaggal másodlagos daganatokat indukálhat. A kezelés mutagenicitásának mérlegelése tehát fontos szempont, különösen gyermekkori daganatok kezelésében.



8. Ábra: Citotoxikus kezelések mutagenikus hatása DT40 sejtvonalon

(A) Kontroll (mock) kezelés, illetve a feltüntetett citotoxikus szerekkel történt, a szövegben leírt kezelést követően detektált bázisszubsztitúciók (SNV-k) átlaga. (B) Ugyanezen mintákban a detektált inzerciók, illetve deléciók számának átlaga. (C) Az inzerciók és deléciók méret szerinti eloszlása a cisplatinnal kezelt mintákban. Az (A-C) paneleken a hibavonalak a standard hibát jelölik kezelésként három sejtklón átlagán. (D) A mock, cisplatin illetve ciklofoszfamid-kezelt

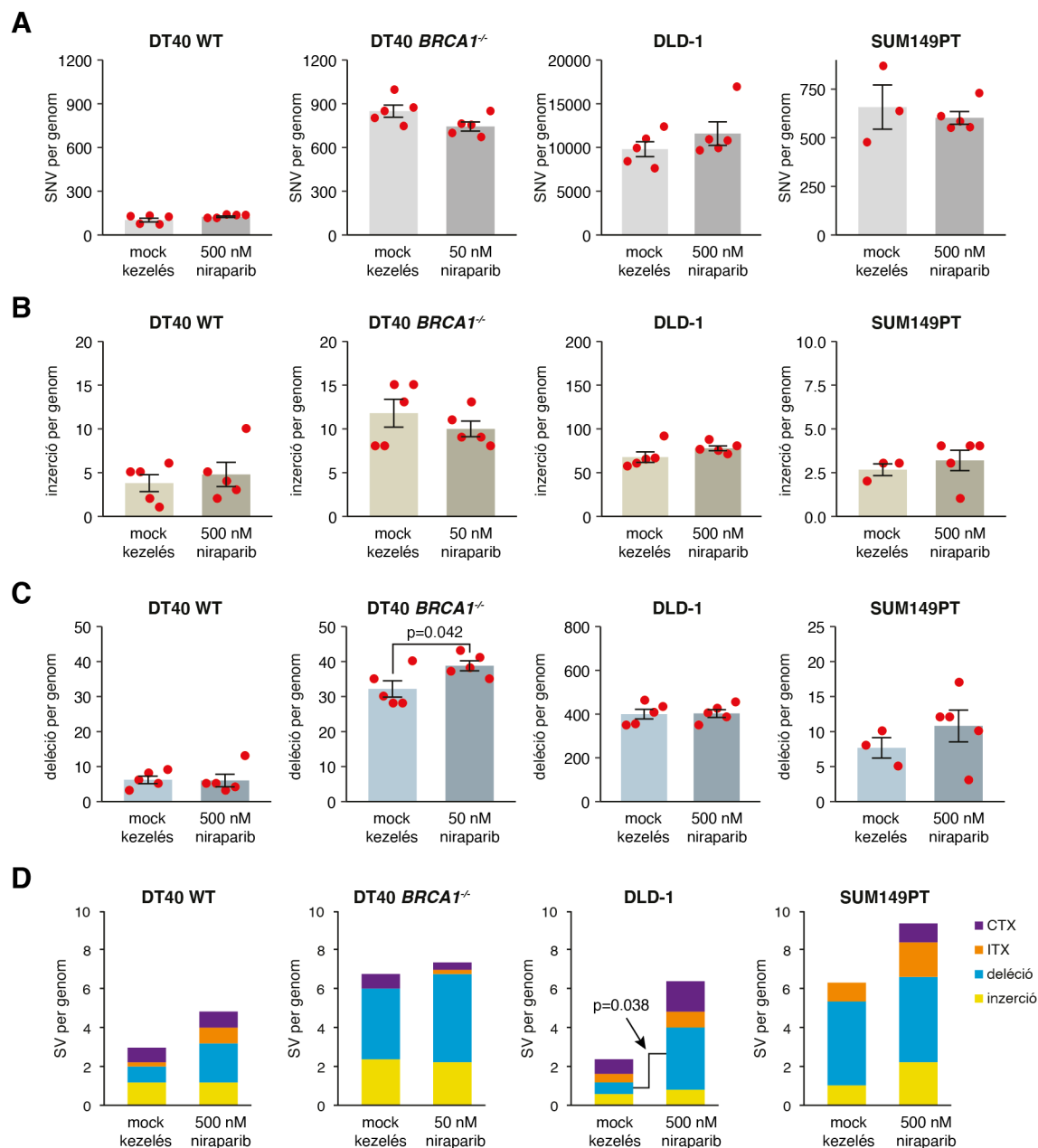
sejtek bázisszubsztitúciós spektruma. A bázisszubsztitúciók (a panel tetején feltüntetve) a két szomszédos nukleotid szerint kerültek csoportosításra, amint az a panel alatt látható. (E) Sematikus modell a leggyakoribb ciszplatin által indukált bázisszubsztitúciók keletkezésére. A valószínűsíthető szálon belüli keresztkötéseknél (G-G, A-G, esetleg G-A, jelölve) a DNS polimeráz tévesen adenozint illeszt az új szálba.

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

A célzott tumorterápiák tipikusan konkrét fehérjék funkcióját gátolják vagy módosítják, így közvetlen DNS-károsító és mutagenikus hatásuk nem várható. Azonban a korábban bemutatott PARP inhibitor hatóanyagok egy konkrét DNS-javító útvonalat gátolnak, így elképzelhető, hogy használatukat megnövekedett mutagenézis kíséri. A PARP gátlószerek az enzimaktivitás gátlásán túl a PARP enzimet DNS-kötött állapotban 'csapdába ejtik' (Helleday, 2011), és az így kötött PARP-1 fehérjék akadályozhatják a DNS-törések javítását, ezáltal szelektíven pusztítva a BRCA mutáns sejteket. A niraparib alacsony nanomólos koncentrációban gátolja a PARP-1 és PARP-2 enzimeket, szelektíven öli a *BRCA1* és *BRCA2* mutáns sejteket, és az olaparibnál hatékonyabba csapdázza a PARP-1 fehérjét (Jones et al., 2009; Murai et al., 2012). Tanulmányunkat megelőzően a PARP gátlás hatását főleg *BRCA1/2* mutáns sejteken vizsgálták, megnövekedett kromoszómális instabilitást találva (Bunting et al., 2010; Farmer et al., 2005; Patel et al., 2011). Aktív HR útvonallal rendelkező sejtekben csak megnövekedett SCE-t tapasztaltak, amely nem mutagenikus hatású (Ito et al., 2016).

A niraparib klinikai alkalmazását 30 napi folyamatos niraparib-kezeléssel modelleztük sejtvonalakon. Vadttípusú és *BRCA1*^{-/-} mutáns DT40 sejtvonalakat, valamint DLD-1 és *BRCA1* mutáns SUM149PT sejteket alkalmaztunk. A kezelési koncentrációkat úgy választottuk meg, hogy azok az ötnapos kezelés IC₅₀ értéke közelében legyenek, ez a niraparib-érzékeny *BRCA1*^{-/-} mutáns DT40 sejtvonal esetében 50 nM, a többi sejtvonal esetében 500 nM volt. A kezelést több párhuzamos populáción végeztük, és a kezelés végén mindegyik populációból egy sejtklont izoláltunk genomszekvenáláshoz. A kiindulási klón és 3-5 niraparib vagy mock kezelt klón genomszekvenciájának IsoMut-analízisével (Pipek et al., 2017) azonosítottuk a kezelés során keletkezett új mutációkat. 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 (9. ábra A-C). A



9. Ábra: PARP inhibitor kezelés mutagenikus hatásának vizsgálata

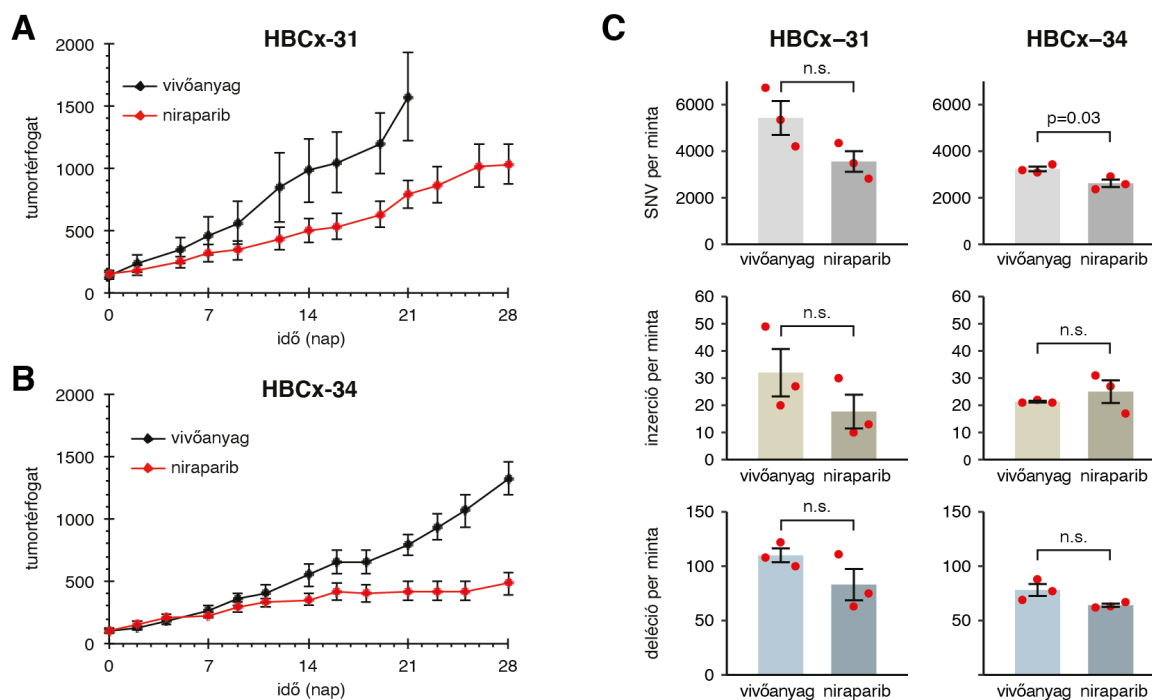
Csirke DT40 vadttípusú (WT) és *BRCA1*^{-/-} génkiütött sejtvonal, valamint humán kolorektális karcinóma DLD-1 és humán *BRCA1* mutáns emlőkarinóma SUM149PT sejtvonalak 50 napos tenyésztése után detektált genomi mutációk. (A) bázisszubsztitúciós mutációk, (B) rövid inzerciók, (C) rövid deléciók, (D) nagy átrendeződések (strukturális variációk, SV; CTX:

kromoszómák közötti transzlokáció, ITX: kromoszómán belüli transzlokáció). Sejtvonalanként 3-5 szekvenált klón átlaga van ábrázolva. Az egyedi minták értékeit piros pontok jelzik, a hibavonalak a standard hibát mutatják. A $p < 0.05$ szignifikancia értékek fel vannak tüntetve (*t*-teszt).

deléciók megnövekedett számát a HR hiányában megnövekedett NHEJ aktivitás okozhatja. Kevés nagyléptékű átrendeződést találtunk, és általában nem volt különbség a mock és a niraparib kezelés hatása között, kivéve a nagyobb deléciók megnövekedett számát niraparib-kezelt DLD-1 sejtekben (9D ábra).

Sejtvonalakon tehát a PARP inhibitor kezelés mutagenikus hatásának hiányát tapasztaltuk. Az eredmények *in vivo* igazolása céljából emlőrák eredetű xenograftokkal (PDX) implantált egereket kezeltünk niraparibbal 28 napig, és a kezelés után a PDX szöveten exomszekvenálást végeztünk. Annak ellenére, hogy a két alkalmazott PDX modell nem hordoz BRCA mutációt, a niraparib kezelés valamelyest lassította a növekedésüket (10. ábra A, B). Mivel nem sejtklont, hanem egy teljes szövetmintát szekvenáltunk, a kezelés mutagenikus hatása várhatóan szubklonális mutációkat eredményez. A mutációdetektlást úgy végeztük tehát, hogy a kis allélfrekvenciájú szubklonális mutációkat is megtaláljuk, de egyik PDX modellen sem észleltünk szignifikáns mutagenikus hatást a niraparib kezelt állatokban a kontroll kezeléshez képest (10C ábra).

Eredményeink szerint a PARP inhibitor kezelések valószínűleg nem generálnak mutációkat normás sejtekben, ezért biztonságos lehet hosszú távú használatuk HR hiányos daganatok kezelésére. Ez különösen azért szignifikáns, mert a PARP inhibitor kezelések tipikusan platinaszerekkel történő kezeléseket követnek (Ledermann et al., 2013), melyek erős mutagenikus hatást mutatnak (Boot et al., 2018; Németh et al., 2019; Szikriszt et al., 2016). A platinaalapú kezelések helyettesítése PARP gátlószerekkel vagy hasonló nem mutagenikus kezelésekkel csökkenthetné a daganat és a normál szövetek mutációs terhelését.



10. Ábra: A niraparib kezelés hatása szubklonális tumor-specifikus mutációk kialakulására PDX modellekben

(A, B) Tumornövekedés a megjelölt human emlőkarinóma PDX tumoral implantált állatokban. Négy minta átlaga és standard hibája van feltüntetve a kontroll és a niraparibbal kezelt állatok esetében egyaránt. (C) A teljes exomszekvenálásból (WES) detektált egyedi bázisszubsztitúciók (felső panelek), inzerciók (középső panelek) és deléciók (alsó panelek). Az egyedi minták értékeit piros pontok jelzik, a hibavonalak a standard hibát mutatják. A $p < 0.05$ szignifikancia értékek fel vannak tüntetve (t -teszt), n.s. nem szignifikáns.

3.2.3 A tumorterápiák genomi lenyomata felhasználható a metasztázisok kialakulási idejének meghatározására

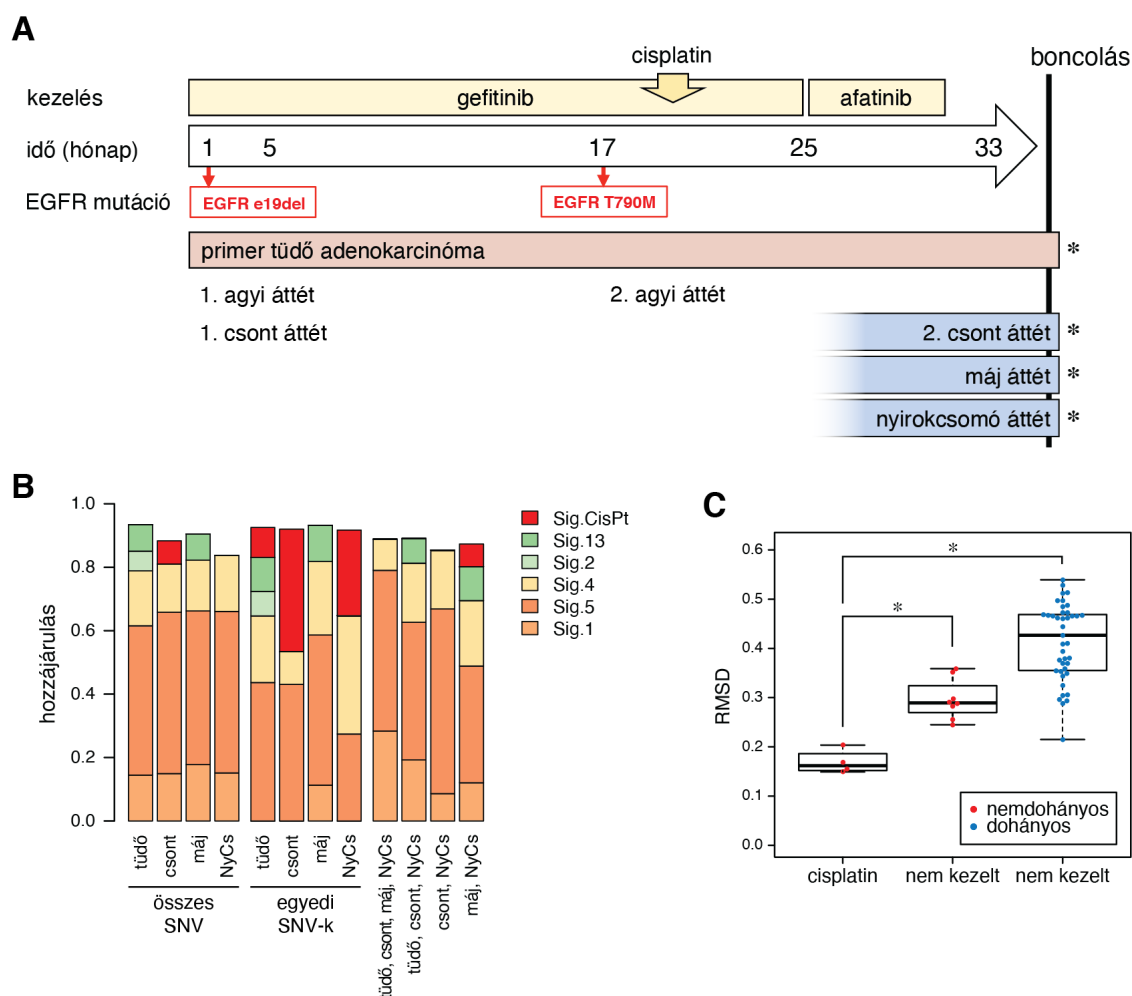
A metasztázisok igen lényegesek sok daganattípus mortalitása szempontjából, azonban a klinikai képalkotás kevés információt szolgáltat a kialakulásuk idejéről, illetve hogy már léteznek-e az első kezelés időpontjában. Genomi elemzések segíthetnek a tumorevolúció visszamenőleges megértésében, és korai vagy késői áttétek elkülönítésében (Naxerova és Jain, 2015; Turajlic és Swanton, 2016). Amennyiben a beteg mutagenikus kezeléseket részesül, a kezelés lenyomata észlelhető lehet a tumor genomjában, és segíthet az áttétek kialakulási idejének visszamenőleges megértésében.

Korábbi munkánk bizonyította a ciszplatin-kezelés mutagenikus hatását sejtenyészetekben (Szikriszt et al., 2016), és kísérletileg definiált mutációs spektrumokat később ciszplatinnal kezelt nyelőcső- és májdaganatok genomjában is sikerült azonosítani (Boot et al., 2018). Amennyiben egy adott metasztázis a ciszplatin-kezelés előtt jött létre, sejtjeiben különböző ciszplatin-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 Intézettel kollaborációban végeztük. A beteg a tumor *EGFR* aktiváló mutációja miatt (*EGFR* exon 19-es deléción) célzott kezelésként gefitinib tirozin kináz inhibitor kezelésben részesült, melyre jól reagált az *EGFR* T790M ismert rezisztencia-mutáció megjelenéséig (Pao et al., 2005). Ezt követően kapott egyetlen ciklus ciszplatin kezelést, melyet a mellékhatások miatt nem folytattak. A gefitinib kezelést később a második generációs irreverzibilis TKI afatinibre cserélték, de folytatódott a tumor progressziója. A boncoláskor talált csont, máj és nyirokcsomó áttéteket korábbi klinikai vizsgálatok során nem észlelték (11A ábra).

Mutációdetektláshoz a MuTect2 (Cibulskis et al., 2013) programot használtuk, amely azonban sokkal kevesebb mutációt talált az alacsony tumortartalmú mintákban. A minták közös eredetét figyelembe véve további alacsony allélfrekvenciájú mutációkat találtunk a nyers adatokban, és végül összesen 9832 SNV-t, 330 inzerciót és 485 deléciót találtunk. Az ismert *EGFR* mutációkon felül csak egy homozigóta *TP53* R280T driver mutációt találtunk, melyet már többször észleltek tüdő adenokarcinómában és egyéb daganatokban (Zehir et al., 2017). A kapott SNV spektrumokat felbontottuk COSMIC szignatúrákra, plusz a kísérletileg meghatározott ciszplatin mutációs spektrumra, mely azóta a COSMIC SBS31 szignatúra elnevezést nyerte (Alexandrov et al., 2020). Külön elemeztük a minták egyedi mutációit, illetve a kettő, három vagy négy tumorminta közös mutációinak halmazát. Ciszplatinnal asszociált mutációkat főleg a primer tüdőtumor mintában és a csont, illetve nyirokcsomó áttét egyedi mutációi között találtunk, alacsony allélfrekvenciával. Találtunk még ciszplatin mutációkat a

máj és nyirokcsomó áttét közös mutációinak halmazában is (11B ábra). A dinukleotid mutációk (DNV) elemzése, melyek között a ciszplatin főleg CC>AA és CT>AA mutációkat okoz, szintén arra utalt, hogy a primer tumorban valamint a csont és nyirokcsomó áttétben szubklonális

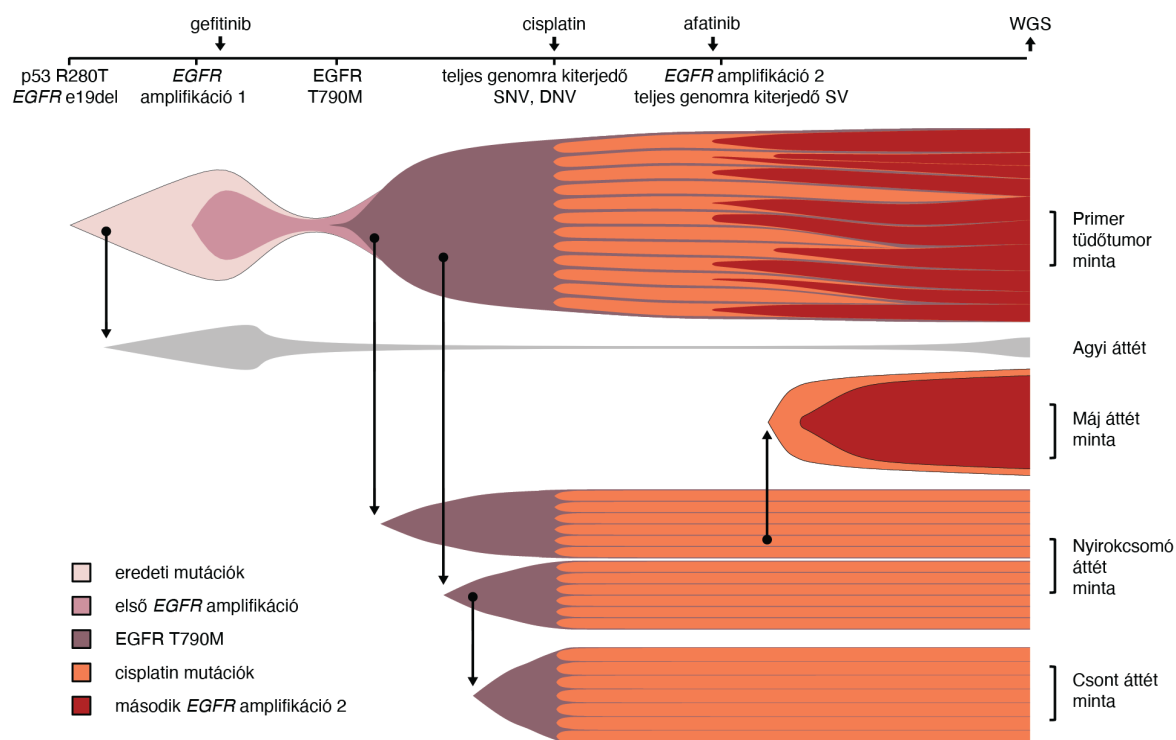


11. Ábra: Ciszplatin-kezelés mutagenikus lenyomata primer és áttétes tüdőrákban

(A) A fiatal, nemdohányzó tüdőrákos beteg kórtörténete. A fő diagnosztikai események és a releváns kezelések az időskála alatt, illetve felett vannak feltüntetve. A begyűjtött és elemzett mintákat csillag jelöli. (B) A külön mintákban, illetve a feltüntetett közös halmazokban észlelt SNV-k spektrumának dekompozíciója a feltüntetett COSMIC szignatúrákra, plusz a Boot et al.(Boot et al., 2018). tanulmány által definiált ciszplatin szignatúrára. (C) Az elemzett ciszplatin-kezelt mintákban talált dinukleotid mutációk (DNV) spektrumának eltérése a TCGA adatbázisból származó, ciszplattinnal nem kezelt nemdohányos illetve dohányos betegek tüdő adenokarcinóma vagy kissejtes tüdőrák mintáinak teljes genomszekvenálással azonosított DNV spektrumától. A ciszplatin-kezelt beteg négy mintájának adatait hasonlítottuk a nemdohányos és a dohányos betegből származó mintákhoz. * $p < 0.05$, t -teszt. RMSD: root mean squared deviation.

cisplatin mutációk voltak, míg a máj áttétben főleg klonálisak, melyek jórészt a nyirokcsomó mintában is megtalálhatók voltak. Az elemzés specificitásának igazolására összehasonlítottuk a kísérletileg meghatározott cisplatin DNV spektrumot az általunk elemzett tumorminták, valamint a TCGA adatbázisból letöltött tüdő adenokarcinóma minták DNV spektrumával. A cisplatin-kezelt beteg mintáinak DNV spektruma szignifikánsan jobban hasonlított a kísérleti spektrumra, mint akár a dohányos, akár a nemdohányos betegek tumormintáinak DNV spektruma (11C ábra).

Eredményeink a mutációk allélfrekvenciáit is figyelembe véve arra utalnak, hogy a klonális cisplatin mutációkat tartalmazó májáttét a kezelés után keletkezett, míg a szubklonális cisplatin mutációkat tartalmazó csont- és nyirokcsomó-áttét a kezelés előtt is létezett (12. ábra). Ez különösen azért figyelemreméltó, mert az áttétek még a cisplatinkezelés után hónapokkal sem



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

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 (12. ábra). Eredményeink támogatják azt a megfigyelést, hogy a T790M mutáns EGFR gátlása a mutáns EGFR allél kópiaszámának növekedését indukálhatja (Ercan et al., 2010), és így az EGFR amplifikáció is a kezelés időpontjához köthető eseménynek tekinthető. Több kezeléstípus genomi lenyomata is felhasználható tehát az áttétek kialakulási idejének meghatározásához.

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

3.3.1 A homológ rekombináció hiányában fellépő mutagenikus folyamatok

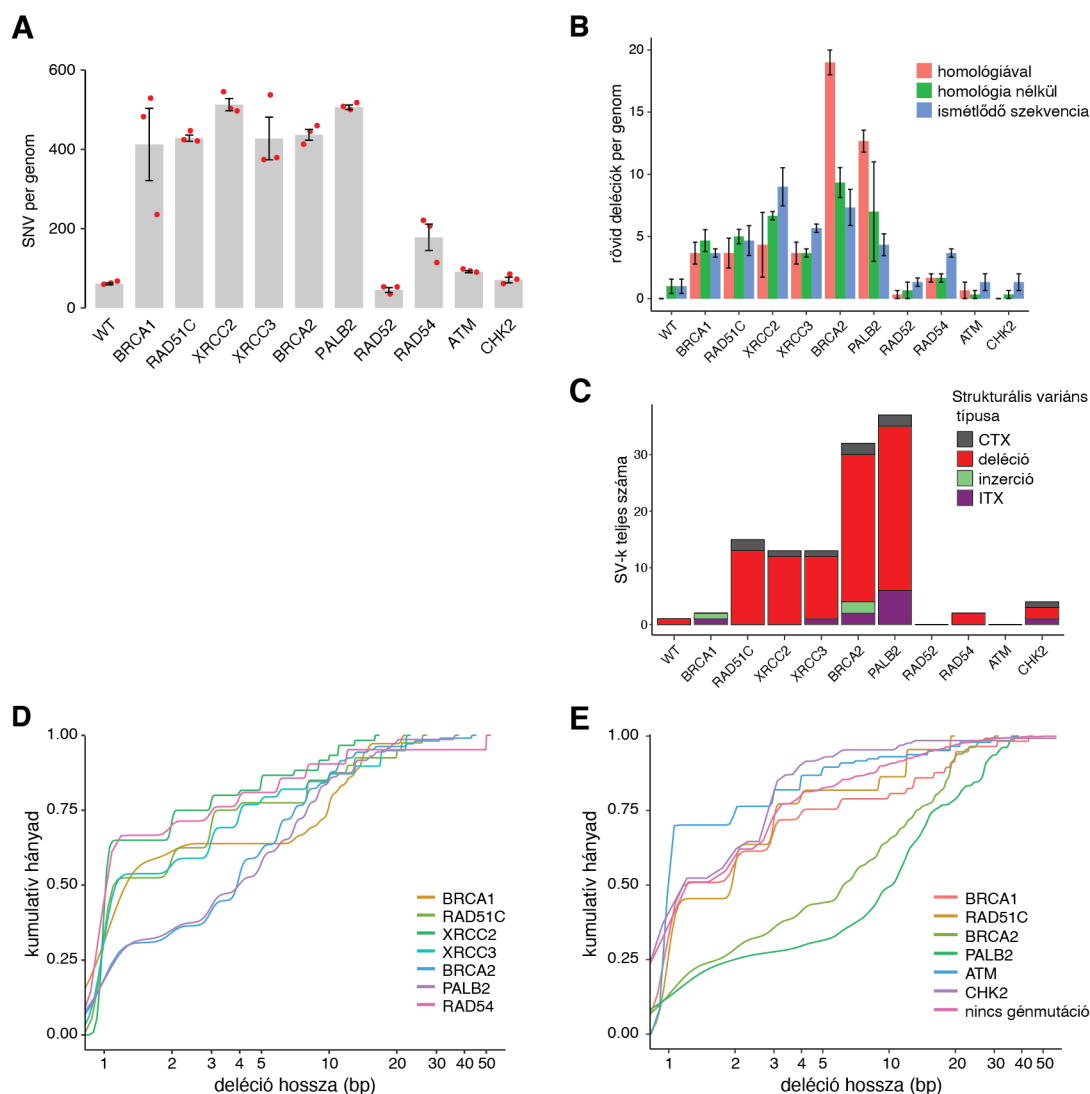
A daganatok genomi instabilitását okozhatja a tumorsejtek DNS-hibajavító folyamatainak hiányos működése. Ennek megfelelően a HR útvonalban szerepet játszó *BRCA1* és *BRCA2* génekben mutációt hordozó daganatok nagyléptékű genomi instabilitás jeleit mutatják (Abkevich et al., 2012; Birkbak et al., 2012; Popova et al., 2012), melyek prediktív diagnosztikai tesztként is használhatók (Timms et al., 2014). 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 sejtvonalban; az eredményeket itt együtt tárgyalom a *BRCA1/2* mutánsokkal. Teszteltük három *RAD51* paralóg, a *RAD51C*, *XRCC2* és *XRCC3* mutációjának hatását, valamint a *PALB2*, *RAD52* és *RAD54* géneket. Teszteltünk továbbá *ATM* és *CHK2* génkiűtött sejtvonalakat, mivel a DNS-töréseket jelző ATM-CHK2 útvonalnak szerepe lehet a HR folyamatában (Lee és Paull, 2005; Parameswaran

et al., 2015). A vizsgált gének közül a *RAD51C*, *PALB2*, *ATM* és a *CHK2* örökletes mutációi is megemelik az emlő- és petefészekrák kialakulásának kockázatát (Antoniou et al., 2014; Kurian et al., 2017; Song et al., 2015), így különösen érdekes, hogy a mutációkat hordozó daganatok a *BRCA1/2* mutánsokhoz hasonló genomi mutációs mintázatokat mutatnak-e, illetve hasonlóan válaszolnak-e célzott terápiákra.

A génkiütött DT40 sejtvonalat két klónozási lépés között 50 napig tenyésztettük, majd összehasonlítottuk a kiindulási klónok és 3-3 leszármazott klón genomszekvenciáját. 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 sejtvonaltban (13A ábra). Szintén jelentősen megemelkedett SNV mutagenézist láttunk a *RAD54*^{-/-} mutáns sejtvonaltban, 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 (13A ábra). A HR mutáns sejtvonaltak triplet SNV spektrumai nagyon hasonlítottak egymásra, és szintén hasonlóságot mutattak a COSMIC 3-as szignatúrával (lásd a 3.3.3 fejezetben).

A rövid deléciókat három kategóriába soroltuk aszerint, hogy ismétlődő szakaszból törlődött-e ki egy kópia, illetve hogy látható-e az elveszett és a deléciót követő szekvenciák között rövid, akár egy bázispáros homológia. A deléciók esetében ugyanazon sejtvonaltknál tapasztaltunk a vadtypusnál magasabb mutációs rátát, mint az SNV-k esetében. Azonban jelentős különbségeket is észleltünk a HR fehérjék hiányában keletkező deléciók számában és típusában (13B ábra). A *BRCA2* és *PALB2* esetében, mely fehérjék egymás kötőpartnerei, a mutáns sejtvonaltokban kiemelkedően magas volt a spontán deléciók száma, melyek között a mikrohomológiával rendelkező események domináltak. Ezzel ellentétben a *BRCA1* és a *RAD51* paralógok minden deléciós kategória egyenletes dúsulását mutatták. A nagyobb átrendeződések katalógizálása még határozottabban csoportokra különítette a HR géneket: a *BRCA1*^{-/-} mutánsban nem tapasztaltuk az SV-k számának emelkedését, míg a *RAD51* paralógokban kevesebb, a *BRCA2*^{-/-} és *PALB2*^{-/-} mutánsok esetében több nagy deléció keletkezett (13C ábra).



13. Ábra: A homológ rekombináció hiányában fellépő mutagenikus folyamatok.

(A) A feltüntetett vadtypusú (WT) és génkiütött DT40 sejtvonalak genomjában keletkezett SNV mutációk száma (átlag és standard hiba, a piros pontok az egyedi minták értékeit jelzik). (B) Az ugyanezen mintákban észlelt rövid deléciók, szekvenciakontextus szerint három kategóriára osztva. A mikrohomológiák minimális hossza 1 bp. a hibavonalak a standard hibát mutatják. (C) A strukturális variációk (SV) teljes száma genotípusonként három mintában, a CREST szoftver elemzése szerint osztályozva mint interkromoszomális transzlokáció (CTX), intrakromoszomális transzlokáció (ITX), deléció vagy inzerció. (D) A deléciók kumulatív méreteloszlása mindazon genotípusú DT40 mintákban, ahol a deléciók összes száma 10-nél nagyobb volt. (E) A deléciók kumulatív méreteloszlása a feltüntetett gén biallélikus mutációját tartalmazó tumorgenomokban.

A deléciók hosszának kumulatív eloszlása is tisztán mutatja a *BRCA2*^{-/-} és *PALB2*^{-/-} sejtvonalaknak a többi HR mutánstól elkülönülő fenotípusát, mivel ezekre a sejtvonalakra

hosszabb deléciók jellemzők (18D ábra). A hosszabb, mikrohomoológiát mutató deléciók jelenléte a NHEJ javítóútvonal aktivitására utal. Így eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a BRCA2 vagy a PALB2 hiányában nagyobb számú DNS kettős szál törés keletkezik.

A sejtvonalakon szerzett eredmények validálása céljából összehasonlításként megvizsgáltunk olyan publikált tumormintákat is, amelyekben a vizsgált HR gének valamelyikének biallélus inaktivációja látható (Riaz et al., 2017). A minták exomszekvenálása alapján talált deléciók kumulatív méreteloszlása rendkívül pontosan reprodukálta a DT40 sejtvonalból származó eredményeket (13E ábra), igazolva a BRCA2 és PALB2 kitüntetett szerepét a kettős szálú DNS-törések javításában vagy kialakulásuk megakadályozásában.

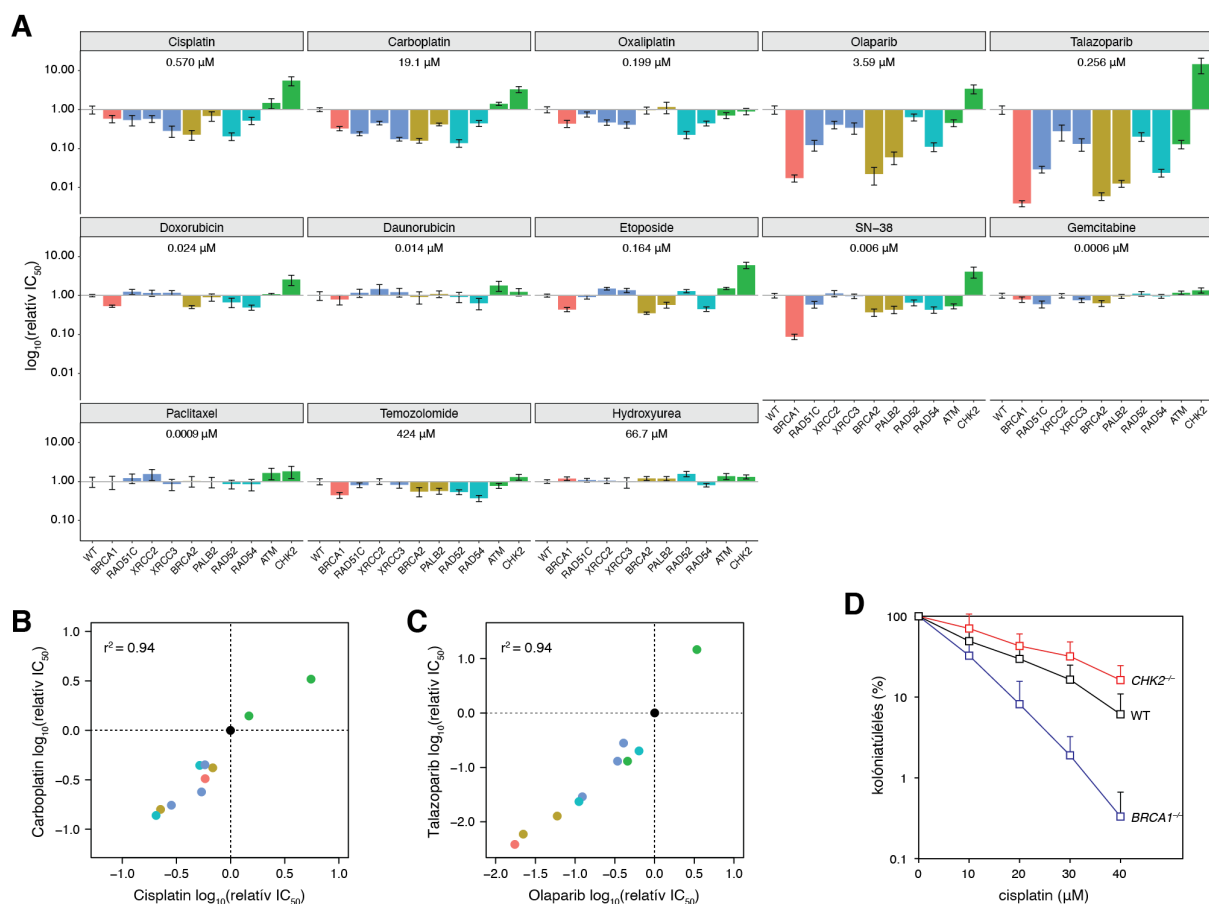
3.3.2 A homológ rekombináció hiányának hatása a terápiás érzékenységre

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 (14A ábra). A legnagyobb relatív érzékenységeket az olaparib és talazoparib PARP inhibitorok esetén mértük, de a legtöbb HR mutáns sejtvonal platinaalapú szerekre is érzékenységet mutatott. Bizonyos sejtvonalak, főként a *BRCA1*^{-/-}, *BRCA2*^{-/-} és *PALB2*^{-/-}, doxorubicinre, a topoizomeráz II gátlószer etoposide-ra, a topoizomeráz I gátlószer SN-38-ra (az irinotecan aktív formája), és a temozolomid alkilálószerre is érzékenységet mutatott. A RAD51 paralógok is érzékenységet mutattak PARP inhibitorokra, de a *BRCA* géneknél csekélyebb mértékben, és nem voltak érzékenyek a topoizomeráz gátlószerekre. A *RAD52*^{-/-} mutáns főleg platinavegyületekre volt érzékeny. A DNS-töréseket jelző checkpoint útvonal hiánya az ATM mutánsokban nem érzékenyítette a sejteket a legtöbb tesztelt hatóanyagra. Még meglepőbb módon a *CHK2*^{-/-} mutáns sejtek a vadtypusnál kevésbé voltak érzékenyek platinavegyületekre, PARP gátlószerekre és topoizomeráz inhibitorokra. A *CHK2*^{-/-} sejtek csökkent ciszplatin-érzékenységét kolóniatúlélési esszével is igazoltuk, amelyet nem befolyásol a sejtvonalak eltérő növekedési sebessége (14D ábra). A mérések megbízhatóságát

mutatja az azonos hatásmechanizmusú anyagokra mutatott érzékenységek kiváló korrelációja (14. ábra B, C).

Eredményeinkből többféle következtetés is levonható. Az oxaliplatinra mutatott érzékenységek eltérése a cisplatintól és carboplatintól megerősíti azt az elméletet, hogy az oxaliplatin legalábbis részben más hatásmechanizmussal pusztítja a sejteket (Bruno et al., 2017). Az ATM és a CHK2 esetében tapasztaltak, az érzékenység hiánya és a rezisztencia arra utal, hogy a checkpoint elsődleges funkciója nem a DNS-javítás elősegítése, hanem a sejtciklus leállítása és bizonyos esetekben az apoptotikus útvonalak indukálása (Pabla et al., 2008). A *BRCA1*^{-/-}, *BRCA2*^{-/-} és *PALB2*^{-/-} mutánsok hasonló érzékenységet mutattak PARP inhibitorokra, tehát a PARP gátlás minden bizonnyal egy közös funkciójukkal mutat szintetikus letalitást, amely lehet a törött replikációs villák javítása. A *RAD51* paralóg mutánsok kisebb érzékenysége lehet redundancia következménye, bár az SNV fenotípusuk nem különbözött a *BRCA1/2* génekétől. Eredményeink érdekes kérdéseket vetnek fel a vizsgált HR gének eltérő szerepéről a kettős száltörések és a törött replikációs villák javításában, valamint a templatváltásban, melyeknek megválaszolása további kutatást igényel.

Az érzékenységeknek a mutációs mintázat alapján történő predikciója szempontjából jól látható, 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 (trial azonosítók: NCT03344965, NCT02286687, NCT03375307). Megfigyeléseink alapján a kezelések csökkent hatékonysága várható a *RAD51* paralóg mutáns tumorok esetén.



14. Ábra: HR-hiányos DT40 sejtvonalak érzékenysége citotoxikus hatóanyagokra

(A) Citotoxicitási mérések eredményei a feltüntetett genotípusú DT40 sejtvonalakban, a vadtypushoz viszonyított relatív IC_{50} érték szerint ábrázolva. Az ábra három mérés átlagát és standard hibáját mutatja. A vadtypusú sejtvonala abszolút IC_{50} értékét feltüntettük. (B, C) a cisplatin és carboplatin (B) illetve az olaparib és talazoparib (C) relatív IC_{50} értékeinek korrelációja. Minden pont külön sejtvonalat jelöl, az (A) panel szerint színezzve, a vadtypust feketével ábrázoltuk. A lineáris regresszió r^2 értékét feltüntettük. (D) Kolóniatúlélési esszé a feltüntetett sejtvonalak egyorás cisplatin kezelést követően, három független mérés átlagát és szórását ábrázolva.

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 (Birkbak et al., 2018). Két gén esetében találtunk korrelációt két független betegkohorszban is, a Bloom helikáz (*BLM*) és a Fanconi anémia I komplementációs csoportjáért felelős *FANCI*. Mindkét gén esetében magasabb kópiaszám és magasabb expresszió jellemezte a cisplatin

érzékeny sejteket. Kísérletesen is sikerült igazolni, hogy megnövelt *BLM* expresszió érzékenyíti a sejteket ciszplatin-kezelésre (Birkbak et al., 2018). A *BLM* helikáz HR fehérjének tekinthető, azonban a megfigyelt hatás ellentétes irányú az egyéb HR génekhez képest. A *BLM* fehérje esetében azonban a HR-t segítő és gátló funkciókat is leírtak. A törött vég reszekciójában betöltött és a D-hurkokban történő DNS szintézist segítő szerepe támogatja a HR-t, míg a *RAD51* filamentum kialakulásának gátlása és a D-hurkok szétszedése a HR folyamatot akadályozza (Bugreev et al., 2007; Cejka et al., 2010; Karow et al., 2000; Nimonkar et al., 2011). Eredményeink szerint megnövekedett *BLM* expresszió esetén a fehérje HR-t ellenző funkciói dominálhatnak, ciszplatin érzékenységet okozva.

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/Doxil®/Caelyx®) képes-e csökkenteni a rezisztencia kialakulását. Mivel a doxorubicin gyakran használatos emlőrák kezelésére, a kísérletek egy *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} mutáns egér emlőrák modellben történtek (Rottenberg et al., 2007). Ennek megfelelően, az előző alfejezetben bemutatottakhoz hasonló előkísérleteinkben vad típú és *BRCA1*^{-/-} mutáns DT40 sejteken teszteltük a doxorubicin tiszta és PLD formulációjának, valamint más kemoterápiás szereknek a toxicitását (1. táblázat). Eredményeink szerint a doxorubicin és a PLD szelektivitása a *Brcal* génmutációra egy sejtvonal esetében hasonló, kb. 3-szoros.

1. Táblázat

Hatásmechanizmus	vegyület	vadtípus	<i>BRCAl</i> ^{-/-}	szelektivitás
PARP inhibitor	Olaparib	3080	30	104.1**
topoizomeráz II inhibitor	PLD	229.4	82.9	2.8**
	Doxorubicin	8.45	2.57	3.3**
	Daunorubicin	4.68	2.51	1.9*
	Etoposide	51.0	29.3	1.7*
topoizomeráz I inhibitor	SN-38	4.60	0.49	9.4**
antimetabolit	5-FU	2.86	2.98	0.96
mikrotubulus stabilizáló szer	Paclitaxel	384.5	448.2	0.86

1. táblázat. Emlőrák kezelésére használt kemoterápiás szerek citotoxikus hatása (IC₅₀, nM)

1-nél nagyobb szelektivitás azt jelzi, hogy a vegyület hatékonyabban pusztítja a *BRCAl*^{-/-} mutáns DT40 sejteket a vadtípusnál. **p*<0.05; ***p*<0.01

A sejtvonalakból származó eredményekkel ellentétben a *Brca1* mutáns egér tumormodellben a PLD számottevően hatékonyabbnak bizonyult. A maximális tolerálható dózis magasabb volt (5 mg/kg doxorubicin, 8 mg/kg PLD), és a beültetett tumorral rendelkező állatok átlagos progressziómentes túlélése kb. 6-szoros volt a PLD esetében (9 nap, illetve 56 nap), és a teljes túlélése is háromszorosa volt a doxorubicinnel kezelt állatokhoz viszonyítva (49,5 nap, illetve 151,5 nap). 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). Az eredmények jól mutatják, hogy bár a DNS-hibajavítás génjeinek mutációja érzékenyíthet a DNS-t célzó

kemoterápiás szerekre, a szinte törvényszerűen kialakuló rezisztencia szempontjából a multidrog rezisztencia folyamatokat is figyelembe kell venni.

3.4 A daganatok mutációs mintázatainak rendszerezése kísérletes és bioinformatikai megközelítéssel

3.4.1 A homológ rekombináció hiánya egységes bázisszubsztitúciós mutációs folyamatot indukál

A 3.3.1 alfejezetben megmutattuk, hogy a HR gének kiütése megnöveli a spontán SNV mutagenezist. A fellépő mutagenikus folyamat jobb megértéséhez matematikailag elemeztük a detektált mutációk triplet spektrumait. A sejtvonalanként összesített mutációs halmazokat (összesen 11 halmaz) nemnegatív mátrix faktorizációval próbáltuk közös komponensekre bontani. Azt találtuk, hogy már két komponens is kis hibával leírja mind a 11 genotípusban mért mutációs folyamatokat (15A ábra). A kapott szignatúrák biológiailag is értelmezhetőnek bizonyultak. Az egyik (BG, 'background') szignatúra hasonlított a vadtypus 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. Mindkét szignatúra igen széles spektrumú; majdnem minden lehetséges triplet mutációt tartalmaznak eltérő arányokban (15B ábra).

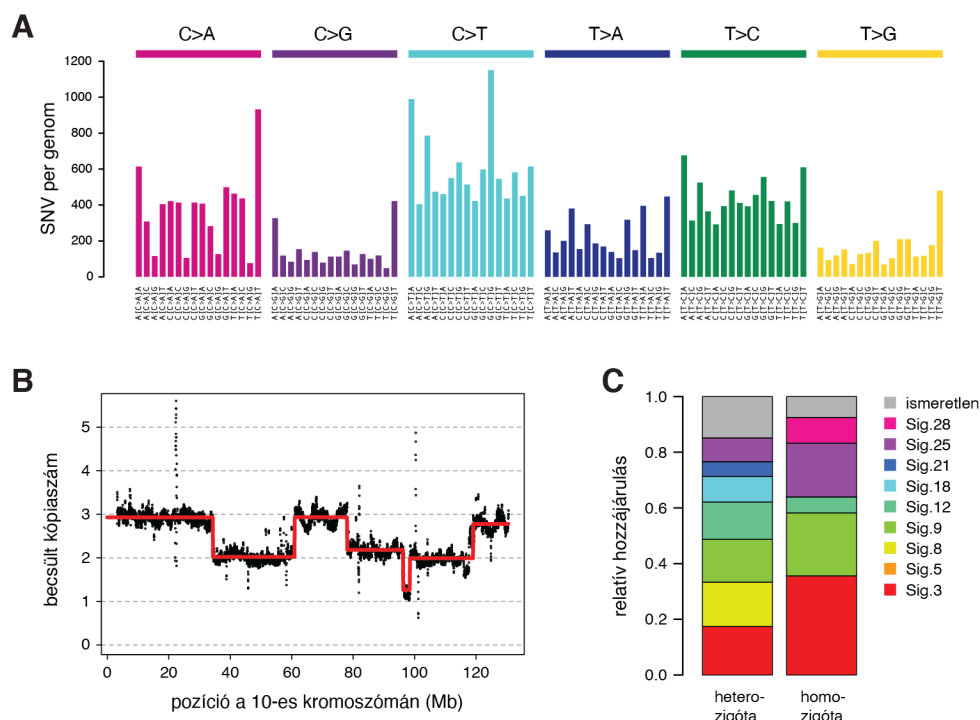
A COSMIC v2 tumorspecifikus szignatúrákhoz hasonlítva a HRD szignatúra nagyon hasonlít a COSMIC 3-as szignatúrához (koszinusz hasonlóság 0,940, 15C ábra), amelyet gyakran észleltek *BRCA1/2* mutációt hordozó daganatokban (Alexandrov et al., 2013). Eredményeink tehát igazolják az összefüggést a *BRCA1/2* 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. Itt érdemes visszaemlékezni, hogy ugyanezen gének deléciós fenotípusai eltérőnek bizonyultak (13. ábra).

származó normál szomatikus szövetminták genomi elemzésekor is az 1-es és 5-ös szignatúrák kombinációját figyelték meg (Martincorena et al., 2018). A DT40 sejtvonal tehát nem csak a mutációs ráta szerint, hanem a mutációk spektrumában is kiválóan modellezi a humán szomatikus szöveteket.

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

A 3.3.3 alfejezetben bemutattam egy *Brcal* mutáns egér emlőtumor felhasználását a doxorubicin tiszta és liposzómális pegilált formájának összehasonlító vizsgálatához (Füredi et al., 2017). Ebből a tumorból Szakács Gergely csoportja izolált egy stabil sejtvonalat (CST), amely egérbe visszaültetve újra daganatokat formál. Egy sejtklón szekvenálásával megvizsgáltuk a *Brcal* mutáció befolyását a sejtben zajló mutagenikus folyamatokra. A sejtklón genomot az FVB egértörzs konszenzus genomjához hasonlítottuk. 125415 pontmutációt találtunk, a 16A ábrán bemutatott triplet spektrummal. Páros összehasonlítások helyett a kapott spektrumot megkíséreltük felbontani COSMIC szignatúráknak megfelelő komponensekre. Detektáltuk a HR hiánnyal asszociált 3-as és 8-as szignatúra kontribúcióját (16C ábra), valamint egyéb mutációs folyamatok hozzájárulását. Elképzelhető, hogy a HR-asszociált szignatúrák relatíve alacsony kontribúcióját az FVB referenciagenom használata okozza az eredeti egér genomjának használata helyett, hiszen a kettő közötti mutációs különbségek is megjelennek az általunk meghatározott spektrumban.

A nagyléptékű genomi instabilitást a kópiaszám 16 kb hosszúságú genomi ablakokban történő becslésével vizsgáltuk. Igen nagyszámú kópiaszám-változást találtunk (16B ábra), hasonlóan a *BRCA1/2* mutáns humán emlődaganatok genomjához. A CST sejtvonal és tumormodell tehát különösen alkalmas a *BRCA1*-asszociált genomi instabilitás vizsgálatára.



16. Ábra: A CST sejtvonali genomi tulajdonságai.

(A) A CST sejtvonali genomjában található heterozigóta mutációk triplet mutációs spektruma. A bázisszubsztitúciók (a panel tetején feltüntetve) a két szomszédos nukleotid szerint kerültek csoportosításra, amint az a panel alatt látható. Az FVB egérgenomában a dbSNP adatbázis szerint SNV-ként nyilvántartott pozíciókat kiszűrtük. (B) Kópiaszám-változások a CST sejtvonali egy tipikus kromoszómáján. (C) A sejtvonali talált heterozigóta és homozigóta SNP-k spektrumának dekompozíciója COSMIC v2 SNV mutációs szignatúrákra (sig).

3.4.3 Két fő mutációs folyamat működik az MMR hiányában

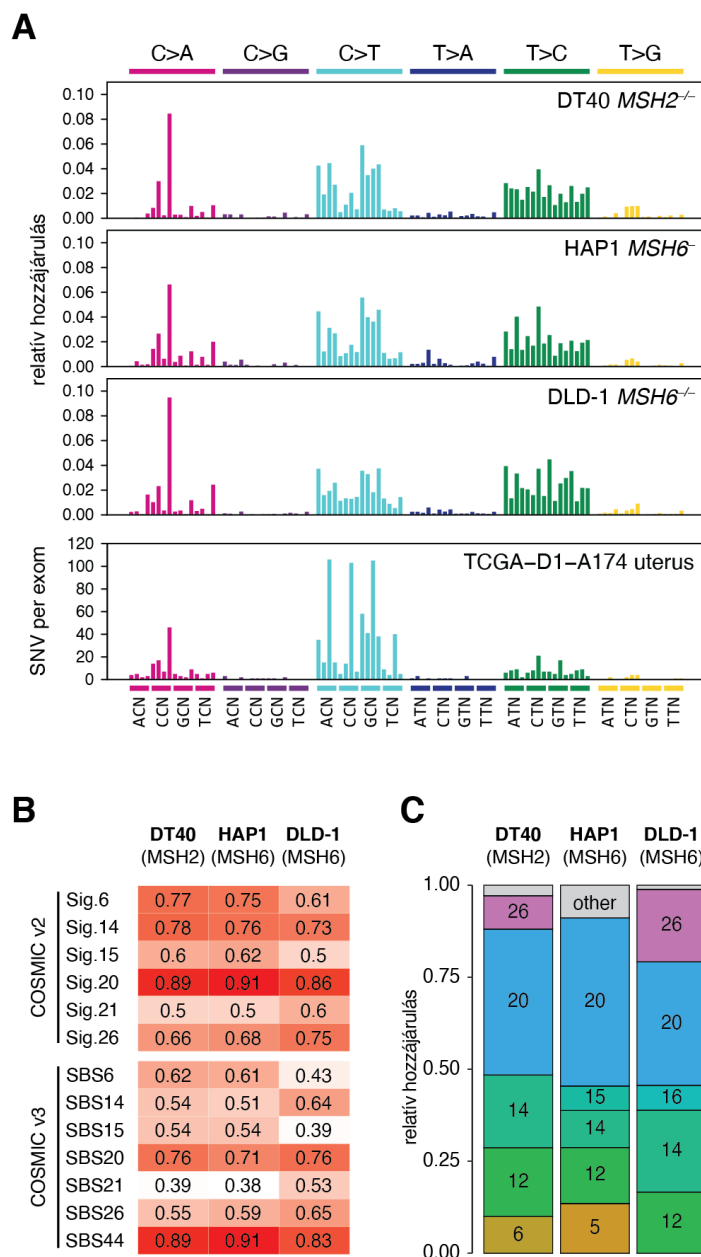
A tumorgenomok szekvenálása megmutatta, hogy az MMR hiányában jelentősen megnövekszik a bázisszubsztitúciós ráta. Nagyszámú rövid indel kialakulása is jellemző az MMR hiányos sejtekre és tumorokra, elsősorban ismétlődő szekvenciáknál, amelyet mikroszatellit instabilitásnak (MSI) nevezünk (Modrich és Lahue, 1996; Shah et al., 2010). Így az MMR hiányos tumorokban észkelhető a legtöbb szomatikus mutáció (Campbell et al., 2017). 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 (3-as szignatúra), 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. Az *MSH2*, *MSH6* és *MLH1* gének biallélus inaktivációja gyakran figyelhető meg MMR hiányos daganatokban.

Tumorszekvenciákban az MMR hiánya különféle genetikai hátterű daganatokban figyelhető meg, melyek befolyásolhatják a mutagenikus folyamatokat. A mutációs spektrumok validálásához tehát izogenikus MMR-re képes és MMR hiányos sejtvonalak elemzése lenne szükséges. Egy tanulmány humán haploid HAP1 sejtvonalakon vizsgálta az *MSH6* inaktivációjának hatására fellépő mutagenikus folyamatot, melynek spektruma a legtöbb MMR hiánnyal asszociált COSMIC szignatúrával hasonlóságot mutatott (Zou et al., 2018), és hasonló mutációs spektrumokat írtak le *mlh-1* és *pms-2* mutáns *C. elegans* törzsekben (Meier et al., 2018).

Laboratóriumunkban meghatároztuk az *MSH2* gén kiütésének hatását a spontán mutagenézisre DT40 sejtvonalban, egy kiindulási sejtklón és 50 nappal később izolált szubklónok genomjának összehasonlításával. Míg a vadtypusú sejtvonal genomjában átlag 48 SNV-t találtunk, az *MSH2* mutáns klónokban átlag 1167 SNV keletkezett. Az indelek számában még számottevőbb volt a különbség (Németh et al., 2020). Szintén meghatároztuk a homozigóta *MSH6* mutációt hordozó DLD-1 sejtvonal spontán mutációs spektrumát (7B ábra). A DT40 *MSH2*^{-/-}, HAP-1 *MSH6*^{-/-}, és DLD-1 sejtvonalak spontán triplet mutációs spektruma majdnem tökéletes egyezést mutatott (17A ábra), azonban a tipikus MMR hiányos tumorgenomok mutációs spektruma némileg eltér a sejtvonalaktól (17A ábra).

A kísérletes spektrumokat összehasonlítottuk az MMR hiányával asszociált szignatúrákkal. A COSMIC v2 verziójában a 20-as, a v3 verzióban a 44-es szignatúrával mutattak legnagyobb hasonlóságot (17B ábra). Azonban amikor a kísérleti spektrumokat az összes COSMIC v2 szignatúra legjobb keverékére kíséreltük meg felbontani, kisebb hozzájárulást szinte mindegyik MMR hiánnyal asszociált szignatúra esetén észleltünk (17C ábra), amely arra utal, hogy ezek a szignatúrák is valós folyamatokat reprezentálnak.

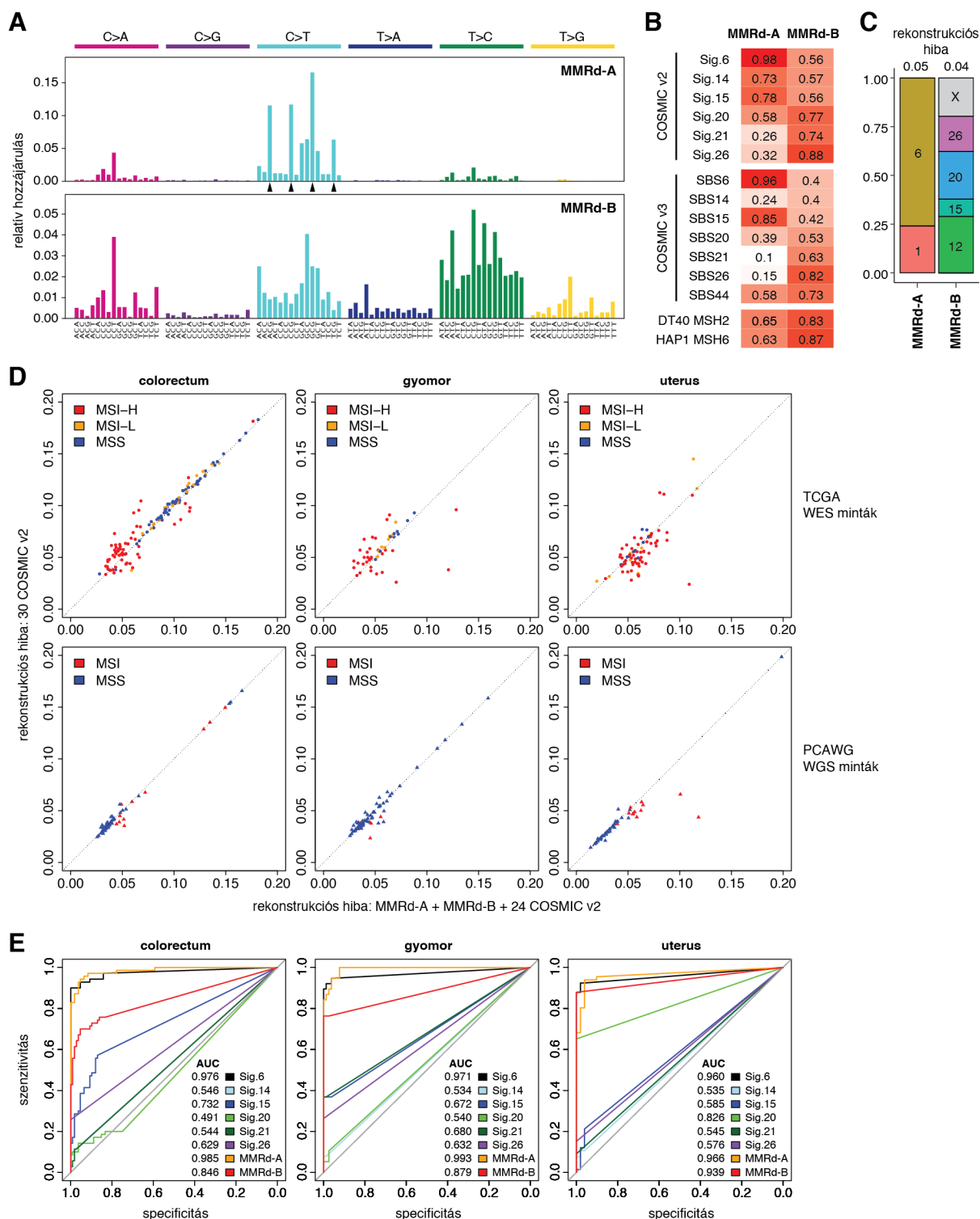


17. Ábra: SNV mutációs spektrumok MMR deficiens (MMRd) sejtvonalakban

(A) Aktív, spontán mutagenézis triplet mutációs spektruma a feltüntetett sejtvonalakban. A bázisszubsztitúciók (a panel tetején ábrázolt kategóriákban) a két szomszédos nukleotid szerint kerültek csoportosításra, amint az a panel alatt látható. A mutációt követő nukleotid helyhiány miatt nincsen feltüntetve (N), ezek abc-sorrendben vannak ábrázolva. A spektrumok több független szekvenált sejtklón mutációs számainak átlagát mutatják. A DT40 és a HAP1 sejtvonal esetén az izogenikus vad típusú kontroll sejtvonal átlag mutációs számait levontuk a spektrumokból. A HAP1 adatok a (Zou et al., 2018) közleményből származnak. Összehasonlításként egy tipikus *MSH2* mutációt hordozó endometriális karcinóma (uterus) minta mutációs spektrumát tüntettük fel a TCGA adatbázis alapján. (B) A sejtvonalak mutációs spektrumainak hasonlósága az irodalom alapján MMRd-asszociált COSMIC v2 és v3 SNV szignatúrákhoz (koszinusz távolság). (C) A sejtvonalak mutációs spektrumának felbontása COSMIC v2 SNV szignatúrákra. A 6% feletti hozzájárulású szignatúrákat tüntettük fel, azonosító számuk az oszlopokon látható.

Felismerve az MMR hiányos COSMIC szignatúrák közötti hasonlóságokat, megkíséreltük újradefiniálni az MMR hiánnyal kapcsolatos mutációs folyamatok szignatúráit. E célból letöltöttük az MSI státusz alapján MMR hiányosnak kategorizált tumorminták szomatikus mutációs katalógusait a TCGA és PCAWG adatbázisokból (Alexandrov et al., 2020). Az egyesített SNV mutációs adathalmazon végzett nemnegatív mátrix faktorizáció eredménye szerint két triplet szignatúra megfelelően leírja a minták mutációs spektrumait. Az MMRd-A szignatúrában az NCG>NTG csúcsok a legszembetűnőbbek, míg az MMRd-B szignatúra sokféle mutációt tartalmaz, a T>C és C>T csúcsok dominanciájával (18A ábra). Az MMRd-A nagyon hasonlít a COSMIC 6-os szignatúrákhoz, míg az MMRd-B leginkább a 26-os szignatúrához hasonlít, és ugyanennyire mutat hasonlóságot az *MSH6* mutáns DT40 sejtek, valamint az *MSH2* mutáns HAP1 sejtek SNV spektrumához (18B ábra). Az MMRd-A a COSMIC 1-es és 6-os szignatúrákra bontható, míg az MMRd-B felbontásához számos COSMIC szignatúra szükséges (18C ábra).

Az új MMRd szignatúrák teszteléséhez a fent elemzett tumorminta-spektrumokat egyenként felbontottuk vagy a 30 COSMIC v2 szignatúrára, vagy egy olyan szignatúra-halmazra, amelyben a hat MMR hiányos COSMIC szignatúrát felcseréltük a két újra. A rekonstrukciós hibákat mintánként ábrázolva látszik, hogy a két új szignatúra a hat régihez hasonlóan teljesít (18D ábra), tehát az új szignatúrák jól helyettesítik az MMR hiánnyal asszociált COSMIC szignatúrákat. Végül teszteltük, hogy az új MMRd szignatúrák mennyire használhatók az MMR hiányos minták azonosítására. A tumorminták spektrumainak fent említett felbontásain ROC analízist végeztünk, hogy minden egyes szignatúra kontribúcióját külön-külön az MSI státuszhoz hasonlítsuk. Az MMRd-A és a hasonló Sig.6 kiválóan teljesített a görbe alatti terület (AUC) értékek alapján, melyek 0.966-0.993 között voltak a vizsgált tumortípusokban (17E ábra). Az MMRd-B jól teljesített a méh endometriális daganatok esetén (AUC=0.9393), és közepesen jól a kolorektális és gyomordaganat-mintákon (AUC=0.846 és 0.879). Az MMRd-B szignatúra sokkal jobban teljesített, mint a COSMIC szignatúrák a 6-os kivételével.



18. Ábra: Két SNV szignatúra megfelelően leírja az MMRd-asszociált mutagenézist

(A) Két MMRd tumorminták mutációs adataiból származtatott mutációs szignatúra. A bázisripletek a panel alatt, a bázisváltozás a panel felett látható. A nyilak az MMRd-A szignatúrában az NCG>NTG tripletekre mutatnak. (B) Az MMRd-A és MMRd-B szignatúrák összehasonlítása az MMRd-asszociált COSMIC szignatúrákkal és az MMR génkiütés következtében fellépő DT40 és HAP1 sejtvonalak mutációs spektrumaival (koszinusz távolság). (C) Az MMRd-A és MMRd-B szignatúrák felbontása a 30 COSMIC v2 SNV szignatúrára. X

jelöli a 6%-nál kisebb hozzájárulásokat, a rekonstrukciós hiba (RMSD) a panel felett látható. (D) Rekonstrukciós hibák (RMSD) összehasonlítása a teljes COSMIC v2 szignatúra készlettel történő (x tengely), illetve a 6, 14, 15, 20, 21, 26-es szignatúrákat az MMRd-A és MMRd-B szignatúrákkal helyettesített készlettel történő (y tengely) felbontás esetén. A szimbólumok a TCGA ill. a PCAWG adatbázisból származó egyes tumorminták mutációs spektrumát jelzik. A mintákat az egyes minták függetlenül megállapított MSI státusza alapján színekódoltuk. (MSI-H magas, MSI-L alacsony, MSS stabil). (E) Az MMRd-asszociált SNV szignatúrák használhatósága az MSI és MSS minták megkülönböztetésére, ROC görbékkel ábrázolva. Az egyes szignatúrák teljesítményét a (D) pontban bemutatottakkal ekvivalens dekonstrukciókkal elemeztük a kombinált TCGA+PCAWG szövetspecifikus adathalmazon. Az MSI-L mintákat MSS-ként kezeltük, feltüntettük a görbe alatti területet (AUC)

Összességében tehát a mutációs adatok gondos elemzésével egyszerűsítettük a mutációs szignatúrák rendszerét, és azonosítottunk két olyan MMR hiányában fellépő mutációs folyamatot, amelyek valószínűleg valódi biológiai relevanciával bírnak. Az MMRd-A mintázat CG>TG mutációi elsősorban metilált CpG helyeken fordulnak elő (Poulos et al., 2017), és keletkezésüket a replikatív polimerázok pontatlansága magyarázhatja az 5-metilcitozin másolásakor (Tomkova et al., 2018). Az MMRd-B szignatúrában kontextustól független tranzíciós mutációk dominálnak, melyek valószínűleg a replikatív polimerázok általános hibaspektrumához köthetők (Kunkel és Bebenek, 2000). A C>A mutációk kialakulási mechanizmusa nem ismert.

3.5 A mutációk kialakulásának molekuláris mechanizmusai

3.5.1 A ciklobutil pirimidin dimer ultraibolya fototermékek átírásának mechanizmusai

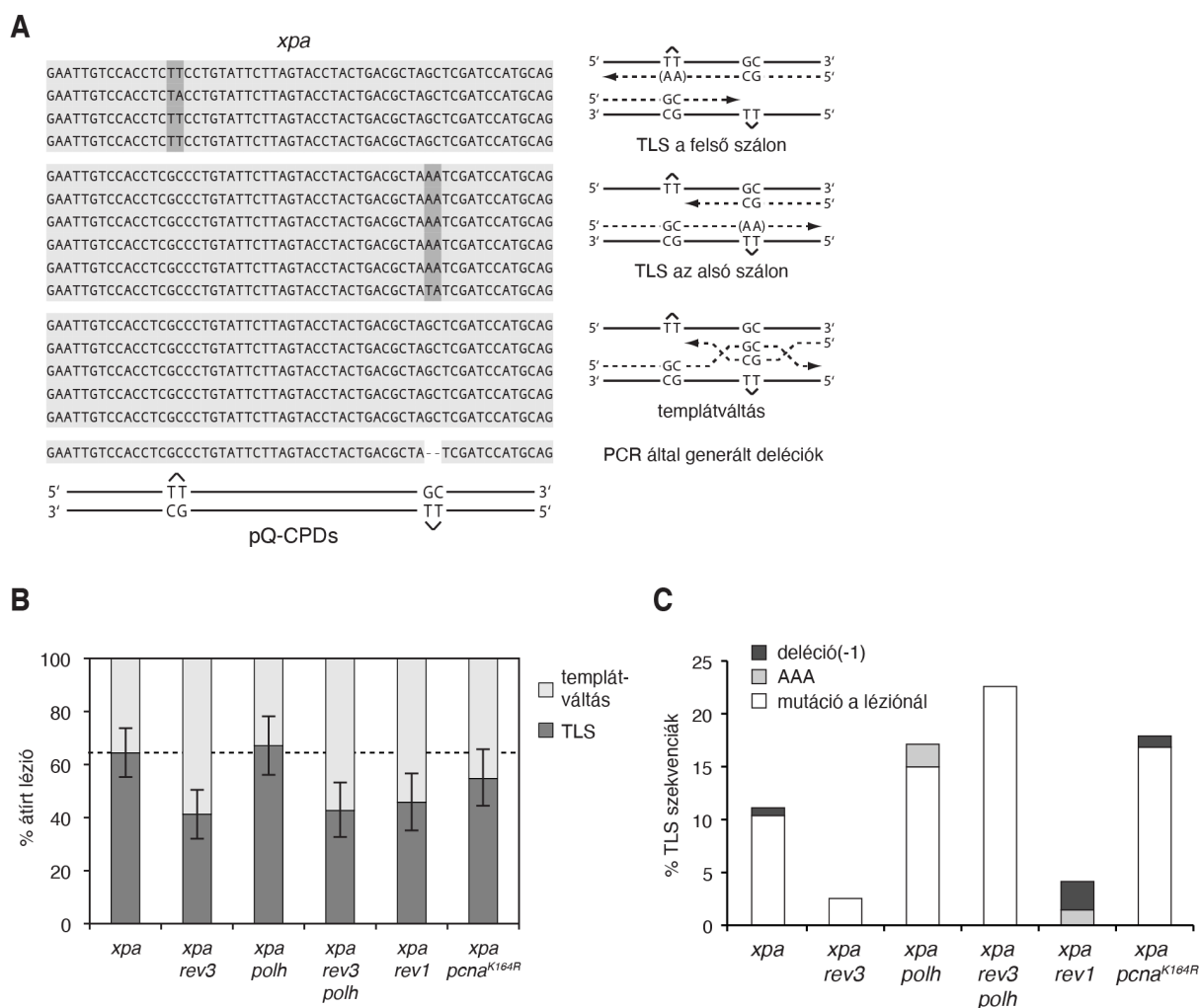
A mutagenézis egyik fő mechanizmusa a téves bázisok beillesztése az adduktokat tartalmazó templát DNS-szál másolásakor. Két szempont határozza meg a DNS adduktok mutagenikus hatását: (1) a replikációjukat a sérült templátot felhasználó transzléziós szintézis (TLS), vagy az alternatív templátot felhasználó 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) (Cadet et al., 2005; Ravanat et al., 2001) esetében vizsgáltuk. Szintetikus T-T(CPD) léziókat (Murata et al., 1990) illesztettünk egy eukarióta sejtekben replikációra képes plazmidba a bevezetésben említett

módszer szerint (Szüts et al., 2008). Mivel a lézióval szemben a komplementer AA dinukleotid helyett GC dinukleotidot helyeztünk el, a replikált plazmidok szekvenciájában meg lehet különböztetni a transzléziós szintézissel és a templátváltással keletkezett termékeket. Amennyiben a két szálon 30 bp távolságban elhelyezett lézió egyikénél AA vagy hasonló szekvencia jelenik meg, TLS zajlott le, amennyiben viszont mindkét lézió helyén GC szekvenciát látunk, templátváltás történt (19A ábra). A plazmidot NER hiányos genetikai háttérben, *XPA*⁻ mutáns DT40 sejtekben alkalmaztuk, mivel a léziók NER általi javítása templátváltásnak megfelelő termékeket adhat. Az *XPA*⁻ sejtekben sikeresen replikálódott plazmidok kb. 60%-a TLS, 40%-a templátváltás bizonyítékát mutatta (19. ábra A, B).

A két 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, míg a polimeráz η génjének (*POLH*) kiütése esetén nem változott (19B ábra). A TLS polimerázokat a REV1 fehérje vagy a PCNA ubikvitilációja toborozza a léziót tartalmazó templáthoz (Edmunds et al., 2008; Sale et al., 2009). Ennek megfelelően mind a *REV1* mutánsban, mind az ubikvitilációra képtelen *PCNA*^{K164R} pont mutánsban szignifikánsan csökkent a TLS aránya, bár a csökkenés mértéke nem volt szembeötlő (19B ábra). A két mechanizmus minden bizonnyal redundáns módon képes a TLS-t koordinálni, azonban ezt a redundanciát nem tudtuk genetikailag igazolni, mert nem sikerült *XPA*⁻ *REV1*^{-/-} *PCNA*^{K164R} hármas mutáns sejtvonalat előállítani annak valószínű életképtelensége miatt.

A TLS események szekvenciájában a T-T lézióknak megfelelő AA dinukleotidtól eltérő, mutációkat hordozó termékeket is azonosítottunk. Az *XPA*⁻ kontroll háttérben ezeknek aránya 11% volt, tehát a TLS által másolt T-T(CPD) léziók kísérleti rendszerünkben ilyen arányban okoznak mutációkat, amely részben magyarázza az UV sugárzás mutagenikus hatását. Ez a mutagenikus ráta lényegesen magasabb, mint a hasonló plazmidalapú mérések eredményei *E. coli* (7%), *S. cerevisiae* (0%) vagy human sejtvonalas (2-4%) modellekben (Banerjee et al., 1988; Gibbs et al., 2005; Shachar et al., 2009; Yoon et al., 2009). Az általunk használt replikálódó plazmid azonban egy sokkal fiziológiásabb kísérleti rendszer a replikációs villánál

történő események követésére, mint a vírus eredetű T antigén által katalizált replikáció (Yoon et al., 2009), vagy az egyszálú hézagok betöltése nem replikálódó plazmidokon (Shachar et al., 2009). Így a 10% körüli érték jobban mutathatja a T-T(CPD) léziók valós mutagenikus hatását magasabb eukariótákban, és magyarázhatja a COSMIC v3-ban szereplő, UV hatáshoz kötött T>A mutációkat tartalmazó SBS7D szignatúrát (Alexandrov et al., 2020).



19. Ábra: TT(CPD) ultraibolya léziók átírásának genetikai vizsgálata

(A) Reprezentatív szekvenciák *XPA* mutáns sejtekben replikálódott, eredetileg CPD léziókat tartalmazó pQ-CPDs plazmidokból, a jobb oldalon ábrázolt hibaelkerülési mechanizmusok szerint csoportosítva. (B) A feltüntetett genotípusú sejtvonalakban replikált, sikeresen átírt lézióval rendelkező plazmidok között a TLS és a templátváltás aránya. A hibavonalak 95%-os binomiális konfidencia intervallumokat jelölnek. (C) A T-T(CPD) lézió átírásának mutációs spektruma, a korrekt AA szekvenciától eltérő TLS események szekvenciáját bemutatva: bázisváltozás a léziónál (fehér), extra A beillesztése (AAA, világosszürke), egy nukleotidos deléció (sötétszürke).

A mért mutagenikus ráta jelentősen csökkent a *REV3*^{-/-} és *REV1*^{-/-} háttérben (19C ábra). Mivel a REV3 fehérjét tartalmazó polζ-t a REV7 alegységének kötésével a REV1 toborozza, eredményünk a polζ kitüntetett szerepére utal a T-T(CPD) mutagenikus átírásában. Érdekes módon a mutációt tartalmazó TLS események aránya jelentősen megnőtt mind a *POLH*^{-/-}, mind a *POLH*^{-/-}*REV3*^{-/-} háttérben (19C ábra), amely arra utal, hogy a polη hibamentesen másolja a léziót, és egyéb, nem vizsgált TLS polimerázok is képesek mutagenikus DNS szintézisre a T-T(CPD) léziót tartalmazó templáton.

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 K63R mutáns ubikvitin túlexpressziója humán sejtekben megnöveli az UV mutagenikus hatását (Chiu et al., 2006), amely a PCNA poliubikvitiláció templátváltásban betöltött szerepét sugallja. Azonban a poliubikvitilációra képes Rad5 homológok közül az SHPRH segíti az UV léziók mutagenikus átírását, míg a HLTF a PCNA monoubikvitilációt is szabályozza (Lin et al., 2011), így közvetlen bizonyíték nincsen a PCNA poliubikvitiláció hibaelkerülésben betöltött szerepére magasabb eukariótákban.

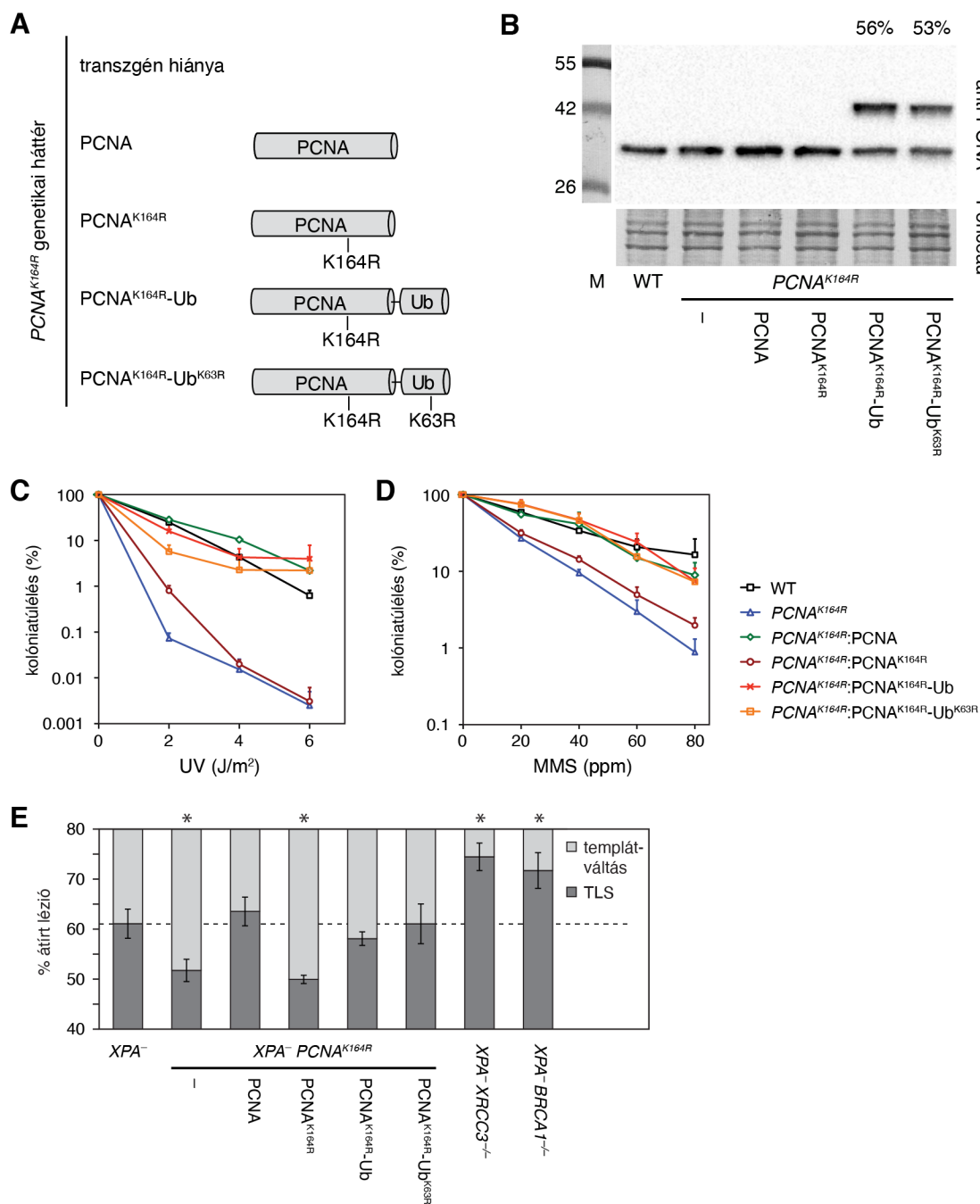
A kérdés vizsgálatára egy genetikai esszét használtunk, melyben PCNA-ubikvitin fúziós fehérjék stabil expressziójával különítettük el a mono- és poliubikvitilációs folyamatok szerepét. A PCNA és egy ubikvitin N- vagy C-terminális lineáris fúziója képes részben helyettesíteni az endogén ubikvitiláció szerepét *S. cerevisiae* (Parker et al., 2007; Pastushok et al., 2010), *S. pombe* (Ramasubramanyan et al., 2010) és humán (Qin et al., 2013) sejtekben. Ennek megfelelően létrehoztunk olyan DT40 sejt vonalakat, amelyek a poszttranszlációs módosításokat gátló *PCNA*^{K164R} genetikai háttérben *PCNA*^{K164R}-Ub vagy *PCNA*^{K164R}-Ub^{K63R} fúziós fehérjéket expresszáltak. A korábbi tanulmányokban használtakhoz hasonló *PCNA*^{K164R}-Ub fúzió megengedi a K63-kapcsolt ubikvitin láncok kialakulását, azonban a *PCNA*^{K164R}-Ub^{K63R} esetében erre nincsen lehetőség. Pozitív és negatív kontrollként a vad típusú PCNA fehérjét, illetve a *PCNA*^{K164R} mutáns formát expresszáló sejt vonalakat is létrehoztunk

(20A ábra). A konstrukciók expresszióját pontosan összehangoltuk megfelelő sejtklónok kiválasztásával (20B ábra).

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 mind UV-val, mind a metil-metánszulfonát (MMS) alkilálószerrel (Wyatt és Pittman, 2006) történő kezelésre. A *PCNA*^{K164R} negatív kontroll expressziója nem befolyásolta az érzékenységet, míg a vad típusú PCNA expressziója menekítette a fenotípust (20. ábra C, D). Lényeges, hogy a vad típusú PCNA-hoz hasonlóan a *PCNA*^{K164R}-Ub és *PCNA*^{K164R}-Ub^{K63R} fúziós fehérjék expressziója egyaránt menekítette a *PCNA*^{K164R} sejtvonal érzékenységét mind UV, mind MMS kezelés esetében (20C ábra). A PCNA monoubikvitilációja tehát elegendő a vad típusú sejtvonallal ekvivalens DNS-hibitolerancia eléréséhez.

A vizsgált sejtvonalakat *XPA*⁻ háttérben is előállítottuk, hogy NER hiányos sejtekben alkalmazhassuk az előző fejezetben bemutatott plazmid alapú esszét a DNS-hibaelkerülő útvonalak aktivitásának vizsgálatára. Az *XPA*⁻ sejtvonalhoz képest az *XPA*⁻ *PCNA*^{K164R} mutáns sejtvonalban, és az ezen háttérben *PCNA*^{K164R} fehérjét expresszáló negatív kontroll sejtvonalban is szignifikánsan alacsonyabb volt a TLS aránya a T-T(CPD) léziók átírásában, megerősítve a PCNA ubikvitiláció szerepét a TLS polimerázok toborzásában (20E ábra). 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 (20E ábra). Mivel az *XPA*⁻ *PCNA*^{K164R}:*PCNA*^{K164R}-Ub^{K63R} sejtvonalban a PCNA poliubikvitilációjára nincsen lehetőség, az eredmény arra utal, hogy a PCNA monoubikvitilációja elegendő a TLS és a templátváltás/HR hibaelkerülő útvonalak működéséhez.

A szintetikus CPD léziókat tartalmazó plazmidokon alapuló esszé elsősorban a TLS és templátváltás arányát képes mérni, azonban kvantitatív PCR mérések azt mutatták, hogy a *PCNA*^{K164R}-Ub^{K63R} fehérjét expresszáló sejtvonalban a plazmid replikációjának teljes



20. Ábra: PCNA módosítások és HR fehérjék befolyása a hibaelkerülő mechanizmusokra.

(A) A DT40 *PCNA*^{K164R} mutáns sejtvonalonban expresszált PCNA konstrukciók sematikus ábrája: PCNA (pozitív kontroll), PCNA^{K164R} (negatív kontroll), PCNA^{K164R}-Ub és PCNA^{K164R}-Ub^{K63R} fúziós fehérjék. A PCNA K164R mutációja megakadályozza a fehérje *in vivo* ubikvitilációját, az ubikvitin K63R mutációja megakadályozza az *in vivo* poliubikvitilációt. (B) A nem módosított és módosított PCNA formák szintjének összehasonlítása Western blottal DT40 sejtltizátumokban. Az ubikvitin fúzió denzitometriásan meghatározott arányát feltüntettük a kép felett. A membrán Ponceau S festése töltési kontrollként van feltüntetve. (C, D) Kolóniatúlélési esszék a feltüntetett sejtvonalak érzékenységeinek meghatározására UV (C) és MMS (D) kezelés esetén, három független mérés átlagát és standard hibáját ábrázolva. (E) A feltüntetett genotípusú sejtvonalakban replikált, sikeresen átírt lézióval rendelkező plazmidok között a TLS és a templátváltás aránya, 4-6 független mérés átlagát és standard hibáját ábrázolva.

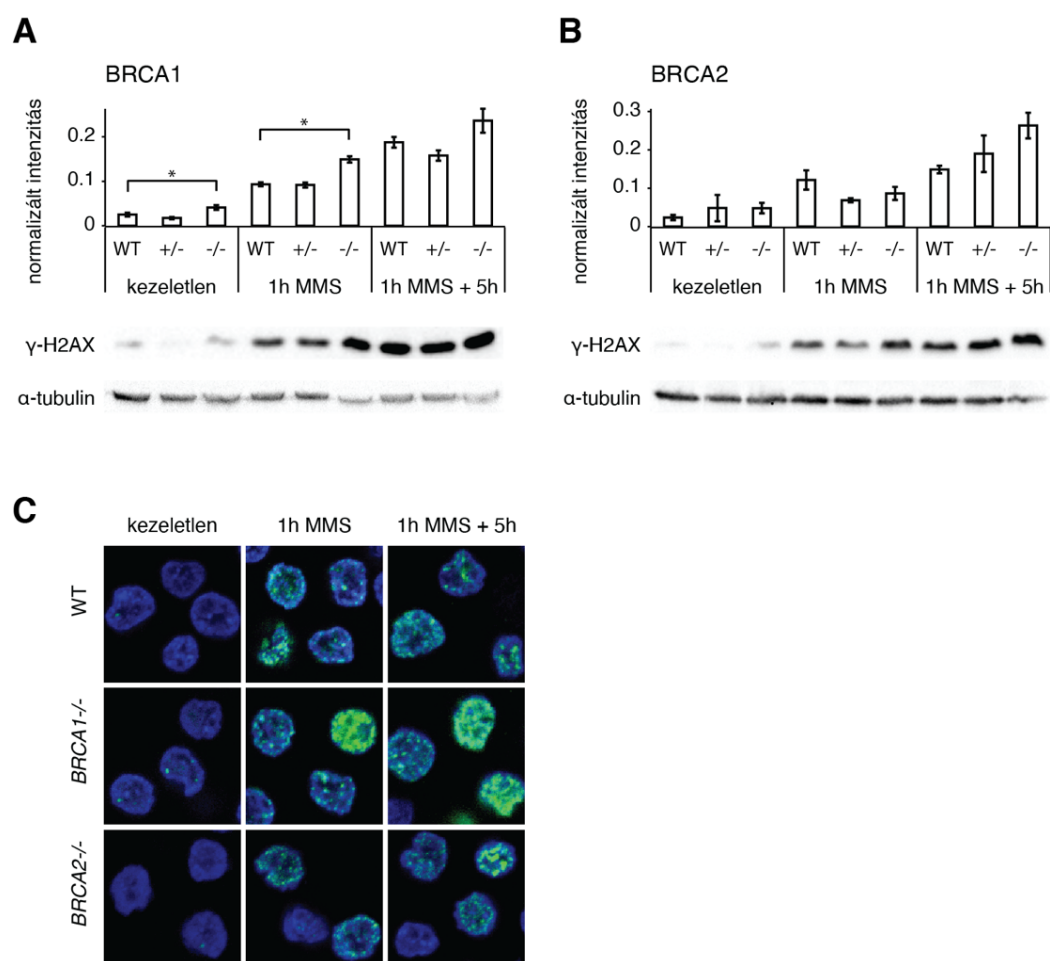
hatékonysága sem csökkent (Gervai et al., 2017). Amennyiben az észlelt templátváltás típusú események valódiak, kell lennie olyan genetikai háttérnek, amelyben a templátváltás hatékonysága alacsonyabb. Elvégeztük az esszét tehát két HR génhiányos sejtvonalon is, és azt tapasztaltuk, hogy mind a *BRCA1*, mind az *XRCC3* gén kiütése jelentősen csökkentette a templátváltást mutató szekvenciák arányát (20E ábra). A kísérletsorozat tehát azt mutatja, hogy a DT40 sejtvonalon a PCNA poliubikvitilációja nem szükséges, a klasszikus HR fehérjék viszont szükségesek a templátváltáshoz. Annak megállapítására, hogy az észlelt templátváltás milyen topológiai mechanizmussal történik, illetve szükségelteti-e a replikációs villa összeomlását, további vizsgálatok szükségesek. Eredményeink nem zárják ki a PCNA poliubikvitilációjának más funkcióit például az elakadt replikációs villák stabilizálásában.

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. A replikációs villa összeomlása nélküli templátváltó reakcióban, és az eltörött replikációs villák újraindításában is szerepet játszhatnak (2. ábra). A H2AX hiszton foszforilációja a kettős szálú DNS száltöréseknek és az elakadt replikációs villáknál keletkező hosszú egyszálú DNS-szakaszoknak is korai markere (Gagou et al., 2010; Rogakou et al., 1998; Szüts és Krude, 2004). Kezeletlen vad típusú DT40 sejtekben is észlelhető a foszforilált H2AX (γ -H2AX) alacsony szintje, azonban *BRCA1*^{-/-} sejtekben szignifikánsan magasabb szinten van jelen (21A ábra, $p=0.049$, páros t -teszt). A különbség még látványosabb egyórás MMS kezelés után (21A ábra). A γ -H2AX szintje öt órával a kezelés után tovább emelkedett a vad típusú és a *BRCA1*^{-/-} sejtekben is. Hasonló tendenciákat láttunk kezeletlen és MMS-kezelt *BRCA2*^{-/-} sejtek esetében is (21B ábra). A γ -H2AX összességében megemelkedett szintje együtt járt a γ -H2AX szubnukleáris fókuszok megjelenésével a sejtek egy részében (21C ábra), melyek az S fázisban levő sejtek elakadt vagy összeomlott replikációs villáit jelölhetik.

Az MMS kezelés közvetlenül nem okoz DNS-töréseket (Lundin et al., 2005). Amennyiben a templátváltás aránylag rövid posztreplikációs hézagoknál történik, valószínűleg ezek sem vezetnek H2AX foszforilációhoz. A megemelkedett és tartós γ -H2AX szignál így a replikációs

villák gyakoribb összeomlására, illetve az így keletkezett törött villák hiányos javítására utal *BRCA2*^{-/-} és *BRCA1*^{-/-} sejtekben. A spontán, illetve MMS kezelés után észlelt genomi deléciók magasabb száma (Zámborszky et al., 2017) is a DNS-törések feldúsulására utal *BRCA1/2* mutánsokban.

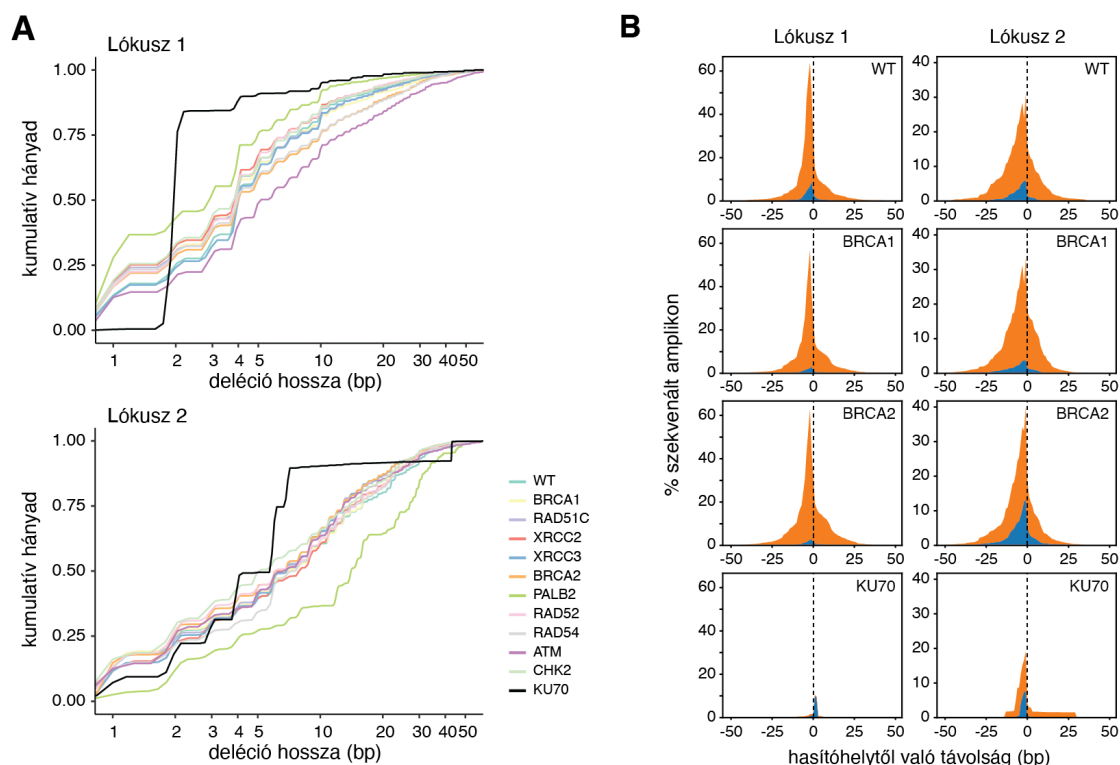


21. Ábra: a DNS sérüléseinek molekuláris markere

(A, B) A γ -H2AX foszforilált hiszton forma detekciója western blottal vad típusú sejtekben, valamint *BRCA1* heterozigóta (+/-) és homozigóta (+/+) sejtekben (A), és *BRCA2* heterozigóta (+/-) és homozigóta (+/+) sejtekben (B), kezelés nélkül vagy egyórás 80 ppm MMS kezelés után közvetlenül vagy 5 órával. A reprezentatív kemilumineszcenciás képek felett a normalizált jel átlaga és standard hibája van ábrázolva 3-4 kísérletből. A vad típus és a homozigóta mutánsok közötti szignifikáns különbségeket csillag jelzi ($p < 0.05$, páros t -teszt). (C) Reprezentatív immunfluoreszcenciás képek γ -H2AX (zöld) és DNA (kék) festéssel vad típusú, *BRCA1*^{-/-} és *BRCA2*^{-/-} mutáns sejtek magjaiban az (A, B) panelekben is alkalmazott kezeléseket követően.

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

A HR fehérjék hiányában megnövekszik a spontán kialakuló deléciók száma, azonban a BRCA2 és a PALB2 hiányában több és nagyobb deléció keletkezik, mint pl. a BRCA1 hiányában (13. ábra). A 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. Két különböző genomi lókuszt hasítottunk CRISPR-Cas9 rendszerrel, melyhez a szükséges sgRNS-t és Cas9 fehérjét kódoló plazmidot tranziens transzfekcióval juttattuk be a DT40 sejtekbe. A sikeresen transzfektált sejteket sejt szorterrel kiválasztottuk a plazmid által szintén expresszált fluoreszcens fehérje alapján, majd a célzott genomi régiót PCR segítségével sokszorozítottuk, és az amplikont nagy lefedettséggel szekvenáltuk. Vadtípusú sejtek esetén a szekvenciák kb. 60%-a mutatott mutációkat, amelyek főleg deléciók, vagy kombinált deléciók és inzerciók voltak (22B ábra). Ugyanezt a kísérletet elvégeztük a 3.3. fejezetben már bemutatott HR és checkpoint mutáns sejtvonalakon. Érdekes módon nem találtunk számottevő különbségeket a keletkező deléciók méreteloszlásában a vad típusú és a különféle mutáns sejtek között (22. ábra). A kapott méreteloszlásokban a medián méret kb. 5-7, amely igen hasonlít a BRCA2 és PALB2 hiányában keletkező spontán deléciók spektrumára (13. ábra). Egy *KU70*^{-/-} génkiütött sejtvonalban, amelyben az NHEJ hibajavító folyamat működésképtelen, sokkal kevesebb deléciót találtunk a célzott lókuszonál, melyeknek méreteloszlása is erősen eltért a többi sejtvonalban tapasztaltnál. Következésképpen megállapíthatjuk, hogy (1) a kettős DNS száltörés mutagenikus javításáért kizárólag az NHEJ felelős, (2) az 5-7 medián hosszúságú, mikrohomológiát mutató deléciók kettős száltörés javítása következtében jöhetnek létre, (3) 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.



22. Ábra: Rövid inzerciók és deléciók kialakulásának genetikai háttere

(A) Amplikonszekvenálással meghatározott deléciók kumulatív méreteloszlása két CRISPR-rel célzott genomi lókusznál a feltüntetett vad típusú és génkiütött sejt vonalakban. (B) Egymásra halmozott nézete az összes deléciónak (narancs) és inzerciónak (kék) két CRISPR-rel célzott genomi lókusznál négy feltüntetett sejt vonalban, az összes szekvenált amplicon arányában mutatva.

Valószínű tehát, hogy a *BRCA1* és egyéb HR mutánsokban keletkező nagyon rövid deléciókat egy az NHEJ-től és a kettős szál törés javításától különböző mechanizmus okozza, melynek aktivitása növekszik a HR fehérjék hiányában. Ez a mechanizmus lehet a TLS, hiszen a cisplatin kezelés után is megfigyelhettük rövid, 1-2 bázispáros indelek keletkezését, melyeket a léziót tartalmazó templát másolása okoz.

4 KÖVETKEZTETÉSEK, KITEKINTÉS

A DNS-szekvenálás és a bioinformatika fejlődése forradalmasította a mutagenézis kutatását. A mutagenikus folyamatok mechanizmusának megértéséhez alapvető szükséglet a folyamatok minél alaposabb megismerése, melyre lehetőséget nyújt sejtpopulációk és szövetminták teljes genomjának a meghatározása, valamint az adathalmazokon végzett pontos mutációdetektálás. Munkánkkal lényegesen hozzájárultunk a sejtvonalak genomjának mutagenikus esszéként való hasznosításához. Elsőként térképeztük fel több gyakran használt sejtvonal genomját, és kifejlesztettünk egy egyszerű elven működő, gyors és pontos mutációdetekciós módszert sok izogenikus minta különbségeinek azonosítására. Megmutattuk, hogy tenyésztett sejtvonalak spontán mutációs folyamatai igen jól modellezik a szöveti sejtekben zajló spontán mutagenézist, egészséges és tumorszövet esetében is. A mutációs folyamatok továbbá fontos információt nyújtanak a sejt fiziológiai állapotáról, genomstabilitásáról és evolúciójának sebességéről, így a jövőben ajánlott minden kísérleti célra használt sejtvonal esetében a genom szekvenálása, valamint a spontán mutagenikus ráta és spektrumok meghatározása.

A különféle hatóanyagok, vegyszerek és környezeti hatások mutagenicitásának mérése lényeges az egészségre ártalmas hatás, elsősorban a karcinogén hatás megítélése szempontjából. A mutagenikus hatást jelenleg főleg riporter géneket használó esszékkel mérik, mint a bakteriális Ames teszt (Mortelmans és Zeiger, 2000), vagy a HPRT mutagenézis teszt emlős sejtvonalakban (Johnson, 2012). A teljes genomra kiterjedő mutációdetektálás azonban sokkal részletesebben méri a mutagenézist, és az okozott mutációk mennyisége is jobban értelmezhető, mint a sokszor túlérzékeny Ames teszt esetén. Így valószínű, hogy hamarosan bekerül az ajánlott vagy elvárt preklinikai toxicitási vizsgálatok körébe a sejtkultúrában történő teljes genomszekvenálás. Ezzel a módszerrel hasonlítottuk össze a gyakran használt kemoterápiás szerek mutagenikus hatását. Eredményeink hasznosságát több modell sejtvonal bevonásával lehetne növelni.

A mutációkat előállító folyamatok különösen érdekesek. Az ultraibolya fény által okozott fototermékek esetén megmutattuk, hogy a transzléziós DNS szintézis felelős a mutagenikus hatás jelentős részéért. A homológ rekombináció és az MMR esetén pedig az látszik, hogy ezen

specifikus DNS-javító mechanizmusok védik a sejtet a mutációk kialakulásától, tehát a hiányukban fellépő vagy feldúsuló alternatív folyamatok rendelkeznek mutagenikus hatással. Amennyiben a HR DNS-töréseket javít, csak az NHEJ képzelhető el reális alternatívájának. Azonban kísérleteinkből kitűnt, hogy az NHEJ nem felelős a HR hiányában keletkező 1-2 bázispáros indelekért, illetve a bázisszubsztitúciókért. A HR fehérjék az elakadt replikációs villáknál bekövetkező templátváltásban is szerepet játszanak, és ennek a folyamatnak lehet alternatívája a transzléziós szintézis, például az egyszálú posztreplikációs hézagok betöltésével. A HR hiányában bekövetkező bázisszubsztitúciók és rövid indelek keletkezésére a legvalószínűbb magyarázat tehát a transzléziós szintézis felerősödött működése.

A mutagenézis az emberek számára legrelevánsabban a daganatok kialakulásában jelentkezik. Ennek megfelelően a mutációs mintázatok jelenleg népszerű osztályozása is szinte kizárólag tumorgenomokra támaszkodik. A daganatok valóban jól mutatják a sejtekben működő összes típusú mutagenikus hatást: a környezeti hatásokat, valamint a sejt normális és abnormális működéséből eredő hatásokat. Kézenfekvő tehát a tumor szomatikus mintázatait diagnosztikai célokra felhasználni. Az adatgyűjtés a DNS szekvenálás költségeinek további csökkenésével általánosan elérhető lesz, az adatok feldolgozása automatizálható, és a viszonylag egyszerű szerkezetű mutációs adathalmazokon könnyen alkalmazhatók a gépi tanulás módszerei (Jiao et al., 2020). Így várhatóan egyre több predikciós módszer születik majd a megfelelő kezelésnek a tumorgenom alapján történő kiválasztására. Fontos azonban figyelembe venni, hogy egyrészt a daganatok heterogének, tehát egy szövetminta nem biztos, hogy jól reprezentálja az egész tumor tulajdonságait, másrészt a mutációs mintázatok a daganat múltbeli tulajdonságait is mutatják, és nem feltétlenül észlelhető rajtuk egy későbbi újabb változás. Például ha egy HR mutáns tumor rezisztenssé válik a HR hiányát célzó kezelésre, amely megtörténhet a mutált BRCA génekben keletkező újabb, reverziós mutációk következtében (Sakai et al., 2008; Szikriszt et al., 2016), akkor megszűnnek a tumorban a HR hiányára jellemző spontán mutagenikus folyamatok. Azonban a genomjában továbbra is látható a HR hiányra specifikus mintázat, amely már nem korrelál az adott kezelésre mutatott (csökkent) érzékenységgel.

A daganatok kezelése látványosan fejlődik, új célzott terápiák megjelenésével és a kemoterápiák pontosabb alkalmazásával. Azonban a rezisztencia kialakulása minden kezelésnél alapvető probléma. A DNS-t célzó kemoterápiák, valamint a DNS hibajavítás problémáit kiaknázó célzott terápiák esetén rezisztenciát okozhat a DNS-hibitolerancia mechanizmusok megváltozott működése. Így a rezisztencia mechanizmusainak feltárásához és újabb terápiás megközelítésekkel való kiaknázásához alapvetően szükséges a DNS hibajavító és hibaelkerülő mechanizmusok minél részletesebb megismerése.

5 AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Nagy áteresztőképességű újgenerációs DNS-szekvenálás segítségével elsőként térképeztük fel több kísérletes sejtvonallal 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 eszkékként való felhasználásának.
3. Meghatároztuk és összehasonlítottuk a legfontosabb kemoterápiás szerek mutagenikus hatását, és a mutációs spektrum alapján értelmeztük a ciszplatin 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 gátlószerek nem rendelkeznek 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 fehérjének szerepét a DNS-hibatoleranciában és a mutagenézisben, és részletesen feltártuk a PCNA fehérje ubikvitilációjának szerepét a sérült DNS replikációjában.

RÖVIDÍTÉSEK

Angol nyelvű kifejezések rövidítéseinek esetében az angol és a magyar megfelelőt is feltüntettem.

ALV	avian leukosis virus, madárleukózis vírus
AUC	area under curve, görbe alatti terület
BER	base excision repair, báziskivágó hibajavítás
bp	bázispár
CPD	ciklobutil pirimidin dimer
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DNV	dinukleotid variáció
FBS	Fetal bovine serum, magzati marhaszérum
FPR	fals pozitív ráta
HR	homológ rekombináció
MMR	mismatch repair, nem összeillő bázispárok javítása
MMRd	MMR deficiens
MSI	microsatellite instability, mikroszatellit instabilitás
MSS	microsatellite stability, mikroszatellit stabilitás
NER	nucleotide excision repair, nukleotidkivágó hibajavítás
NHEJ	non-homologous end joining, nem homológ végek összekapcsolása
NMF	nemnegatív mátrix faktorizáció
PBS	phosphate buffered saline, foszfátpufferes fiziológiás sóoldat
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCAWG	Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes
PDX	patient-derived xenograft, betegből származó xenograft
ppm	parts per million, milliomodrész

RMSD	root-mean-squared deviation, négyzetes közép
ROC	receiver operating characteristic, vevő működési karakterisztika
SCE	sister chromatid exchange, testvérkromatidok kicserélődése
SNP	single nucleotide polymorphism, egynukleotidos polimorfizmus
SNV	single nucleotide variation, egynukleotidos variáció
SV	strukturális variáció
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TLS	transzléziós szintézis
TPR	valódi (true) pozitív ráta
Ub	ubikvitin
UV	ultraviolet, ultraibolya
WES	whole exome sequencing, egész exom szekvenálás
WGS	whole genome sequencing, egész genom szekvenálás
WT	wild type, vadtypus

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, Kovácsházi Csenger, Lovrics Anna, Lózsa Rita, Molnár János, Németh Eszter, Pipek Orsolya, Póti Ádám, Rusz Orsolya, Szeltner Zoltán, Szikriszt Bernadett, Varga Ágnes, Zámborszky 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, Szakács Gergely, Szállási Zoltán, Tusnády Gábor, valamint Andrea Bardelli, Andrea Ciliberto, Andrea L Richardson, Charles Swanton.

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.
- Abkevich, V., Timms, K.M., Hennessy, B.T., Potter, J., Carey, M.S., Meyer, L.A., Smith-McCune, K., Broaddus, R., Lu, K.H., Chen, J., *et al.* (2012). Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 107, 1776-1782.
- Adey, A., Burton, J.N., Kitzman, J.O., Hiatt, J.B., Lewis, A.P., Martin, B.K., Qiu, R., Lee, C., and Shendure, J. (2013). The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature* 500, 207-211.
- Al Abo, M., Dejsuphong, D., Hirota, K., Yonetani, Y., Yamazoe, M., Kurumizaka, H., and Takeda, S. (2014). Compensatory functions and interdependency of the DNA-binding domain of BRCA2 with the BRCA1-PALB2-BRCA2 complex. *Cancer Res* 74, 797-807.
- Alexandrov, L.B., Jones, P.H., Wedge, D.C., Sale, J.E., Campbell, P.J., Nik-Zainal, S., and Stratton, M.R. (2015). Clock-like mutational processes in human somatic cells. *Nat Genet* 47, 1402-1407.
- Alexandrov, L.B., Ju, Y.S., Haase, K., Van Loo, P., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., Totoki, Y., Fujimoto, A., Nakagawa, H., Shibata, T., *et al.* (2016). Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science* 354, 618-622.
- Alexandrov, L.B., Kim, J., Haradhvala, N.J., Huang, M.N., Ng, A.W., Wu, Y., Boot, A., Covington, K.R., Gordenin, D.A., Bergstrom, E.N., *et al.* (2019). The Repertoire of Mutational Signatures in Human Cancer. *bioRxiv*, 322859.
- 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.
- Ang, Y.L.E., and Tan, D.S.P. (2017). Development of PARP inhibitors in gynecological malignancies. *Curr Probl Cancer*.
- Antoniou, A.C., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pylkas, K., Roberts, J., Lee, A., Subramanian, D., De Leeneer, K., Fostira, F., *et al.* (2014). Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med* 371, 497-506.
- Arakawa, H., Lodygin, D., and Buerstedde, J.M. (2001). Mutant loxP vectors for selectable marker recycle and conditional knock-outs. *BMC Biotechnol* 1, 7.

Arakawa, H., Moldovan, G.L., Saribasak, H., Saribasak, N.N., Jentsch, S., and Buerstedde, J.M. (2006). A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation. *PLoS Biol* 4, e366.

Baba, T.W., Giroir, B.P., and Humphries, E.H. (1985). Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* 144, 139-151.

Baba, T.W., and Humphries, E.H. (1984). Differential response to avian leukosis virus infection exhibited by two chicken lines. *Virology* 135, 181-188.

Bailey, M.H., Tokheim, C., Porta-Pardo, E., Sengupta, S., Bertrand, D., Weerasinghe, A., Colaprico, A., Wendl, M.C., Kim, J., Reardon, B., *et al.* (2018). Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell* 173, 371-385.e318.

Banerjee, S.K., Christensen, R.B., Lawrence, C.W., and LeClerc, J.E. (1988). Frequency and spectrum of mutations produced by a single cis-syn thymine-thymine cyclobutane dimer in a single-stranded vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8141-8145.

Baretti, M., and Le, D.T. (2018). DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacol Ther* 189, 45-62.

Bartek, J., and Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13, 738-747.

Bauer, N.C., Corbett, A.H., and Doetsch, P.W. (2015). The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. *Nucleic Acids Res* 43, 10083-10101.

Bezzubova, O., Silbergleit, A., Yamaguchi-Iwai, Y., Takeda, S., and Buerstedde, J.M. (1997). Reduced X-ray resistance and homologous recombination frequencies in a RAD54^{-/-} mutant of the chicken DT40 cell line. *Cell* 89, 185-193.

Bienko, M., Green, C.M., Crosetto, N., Rudolf, F., Zapart, G., Coull, B., Kannouche, P., Wider, G., Peter, M., Lehmann, A.R., *et al.* (2005). Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science* 310, 1821-1824.

Birkbak, N.J., Li, Y., Pathania, S., Greene-Colozzi, A., Dreze, M., Bowman-Colin, C., Sztupinski, 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.

Birkbak, N.J., Wang, Z.C., Kim, J.Y., Eklund, A.C., Li, Q., Tian, R., Bowman-Colin, C., Li, Y., Greene-Colozzi, A., Iglehart, J.D., *et al.* (2012). Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents. *Cancer Discov* 2, 366-375.

Bizard, A.H., and Hickson, I.D. (2014). The dissolution of double Holliday junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a016477.

Blastyak, A., Pinter, L., Unk, I., Prakash, L., Prakash, S., and Haracska, L. (2007). Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Mol Cell* 28, 167-175.

Blokzijl, F., Janssen, R., van Boxtel, R., and Cuppen, E. (2018). MutationalPatterns: comprehensive genome-wide analysis of mutational processes. *Genome Med* 10, 33.

Bocquet, N., Bizard, A.H., Abdulrahman, W., Larsen, N.B., Faty, M., Cavadini, S., Bunker, R.D., Kowalczykowski, S.C., Cejka, P., Hickson, I.D., *et al.* (2014). Structural and mechanistic insight into Holliday-junction dissolution by topoisomerase III α and RMI1. *Nat Struct Mol Biol* 21, 261-268.

Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114-2120.

Boot, A., Huang, M.N., Ng, A.W.T., Ho, S.C., Lim, J.Q., Kawakami, Y., Chayama, K., Teh, B.T., Nakagawa, H., and Rozen, S.G. (2018). In-depth characterization of the cisplatin mutational signature in human cell lines and in esophageal and liver tumors. *Genome Res* 28, 654-665.

Branzei, D., Seki, M., and Enomoto, T. (2004). Rad18/Rad5/Mms2-mediated polyubiquitination of PCNA is implicated in replication completion during replication stress. *Genes Cells* 9, 1031-1042.

Branzei, D., and Szakal, B. (2016). DNA damage tolerance by recombination: Molecular pathways and DNA structures. *DNA Repair (Amst)* 44, 68-75.

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

Brooks, P.J., and Theruvathu, J.A. (2005). DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol* 35, 187-193.

Bruno, P.M., Liu, Y., Park, G.Y., Murai, J., Koch, C.E., Eisen, T.J., Pritchard, J.R., Pommier, Y., Lippard, S.J., and Hemann, M.T. (2017). A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nat Med* 23, 461-471.

Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., and Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434, 913-917.

Buerstedde, J.M., Reynaud, C.A., Humphries, E.H., Olson, W., Ewert, D.L., and Weill, J.C. (1990). Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line. *EMBO J* 9, 921-927.

Buerstedde, J.M., and Takeda, S. (1991). Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* 67, 179-188.

Bugreev, D.V., Yu, X., Egelman, E.H., and Mazin, A.V. (2007). Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. *Genes Dev* 21, 3085-3094.

Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., *et al.* (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141, 243-254.

Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276, 42462-42467.

Burtner, C.R., and Kennedy, B.K. (2010). Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 567-578.

Cadet, J., Douki, T., and Ravanat, J.L. (2010). Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic Biol Med* 49, 9-21.

Cadet, J., Sage, E., and Douki, T. (2005). Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* 571, 3-17.

Campbell, B.B., Light, N., Fabrizio, D., Zatzman, M., Fuligni, F., de Borja, R., Davidson, S., Edwards, M., Elvin, J.A., Hodel, K.P., *et al.* (2017). Comprehensive Analysis of Hypermutation in Human Cancer. *Cell* 171, 1042-1056.e1010.

Campbell, C.D., and Eichler, E.E. (2013). Properties and rates of germline mutations in humans. *Trends Genet* 29, 575-584.

Cannan, W.J., and Pederson, D.S. (2016). Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *J Cell Physiol* 231, 3-14.

Carter, S.L., Eklund, A.C., Kohane, I.S., Harris, L.N., and Szallasi, Z. (2006). A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet* 38, 1043-1048.

Cejka, P., Cannavo, E., Polaczek, P., Masuda-Sasa, T., Pokharel, S., Campbell, J.L., and Kowalczykowski, S.C. (2010). DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature* 467, 112-116.

Chiu, R.K., Brun, J., Ramaekers, C., Theys, J., Weng, L., Lambin, P., Gray, D.A., and Wouters, B.G. (2006). Lysine 63-polyubiquitination guards against translesion synthesis-induced mutations. *PLoS Genet* 2, e116.

Choi, D.K., Helenowski, I., and Hijiya, N. (2014). Secondary malignancies in pediatric cancer survivors: perspectives and review of the literature. *Int J Cancer* 135, 1764-1773.

Cibulskis, K., Lawrence, M.S., Carter, S.L., Sivachenko, A., Jaffe, D., Sougnez, C., Gabriel, S., Meyerson, M., Lander, E.S., and Getz, G. (2013). Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol* 31, 213-219.

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.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., *et al.* (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823.

Cordeiro-Stone, M., and Nikolaishvili-Feinberg, N. (2002). Asymmetry of DNA replication and translesion synthesis of UV-induced thymine dimers. *Mutat Res* 510, 91-106.

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

Cotta-Ramusino, C., Fachinetti, D., Lucca, C., Doksan, Y., Lopes, M., Sogo, J., and Foiani, M. (2005). Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells. *Mol Cell* 17, 153-159.

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.

Deng, Z., Qin, Y., Wang, J., Wang, G., Lang, X., Jiang, J., Xie, K., Zhang, W., Xu, H., Shu, Y., *et al.* (2019). Prognostic and predictive role of DNA mismatch repair status in stage II-III colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Clin Genet* 97, 25-38.

Eastman, A. (1986). Reevaluation of interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. *Biochemistry* 25, 3912-3915.

Edmunds, C.E., Simpson, L.J., and Sale, J.E. (2008). PCNA ubiquitination and REV1 define temporally distinct mechanisms for controlling translesion synthesis in the avian cell line DT40. *Mol Cell* 30, 519-529.

Elstrodt, F., Hollestelle, A., Nagel, J.H., Gorin, M., Wasielewski, M., van den Ouweland, A., Merajver, S.D., Ethier, S.P., and Schutte, M. (2006). BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer Res* 66, 41-45.

Ercan, D., Zejnullahu, K., Yonesaka, K., Xiao, Y., Capelletti, M., Rogers, A., Lifshits, E., Brown, A., Lee, C., Christensen, J.G., *et al.* (2010). Amplification of EGFR T790M causes resistance to an irreversible EGFR inhibitor. *Oncogene* 29, 2346-2356.

Fan, W.L., Ng, C.S., Chen, C.F., Lu, M.Y., Chen, Y.H., Liu, C.J., Wu, S.M., Chen, C.K., Chen, J.J., Mao, C.T., *et al.* (2013). Genome-wide patterns of genetic variation in two domestic chickens. *Genome Biol Evol* 5, 1376-1392.

Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., *et al.* (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917-921.

Faust, G.G., and Hall, I.M. (2014). SAMBLASTER: fast duplicate marking and structural variant read extraction. *Bioinformatics* 30, 2503-2505.

Favero, F., Joshi, T., Marquard, A.M., Birkbak, N.J., Krzystanek, M., Li, Q., Szallasi, Z., and Eklund, A.C. (2014). Sequenza: allele-specific copy number and mutation profiles from tumor sequencing data.

Feng, Z., and Zhang, J. (2012). A dual role of BRCA1 in two distinct homologous recombination mediated repair in response to replication arrest. *Nucleic Acids Res* 40, 726-738.

Fong, P.C., Boss, D.S., Yap, T.A., Tutt, A., Wu, P., Mergui-Roelvink, M., Mortimer, P., Swaisland, H., Lau, A., O'Connor, M.J., *et al.* (2009). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 361, 123-134.

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.

Gagou, M.E., Zuazua-Villar, P., and Meuth, M. (2010). Enhanced H2AX Phosphorylation, DNA Replication Fork Arrest, and Cell Death in the Absence of Chk1. In *Mol Biol Cell*, pp. 739-752.

Gan, G.N., Wittschieben, J.P., Wittschieben, B.O., and Wood, R.D. (2008). DNA polymerase zeta (pol zeta) in higher eukaryotes. *Cell Res* 18, 174-183.

Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Math, M., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., *et al.* (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366, 883-892.

Germano, G., Amirouchene-Angelozzi, N., Rospo, G., and Bardelli, A. (2018). The Clinical Impact of the Genomic Landscape of Mismatch Repair-Deficient Cancers. *Cancer Discov* 8, 1518-1528.

Gervai, J.Z., Gálicza, J., Szeltner, Z., Zámboreszky, 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.

Gibbs, P.E., McDonald, J., Woodgate, R., and Lawrence, C.W. (2005). The relative roles in vivo of *Saccharomyces cerevisiae* Pol eta, Pol zeta, Rev1 protein and Pol32 in the bypass and mutation induction of an abasic site, T-T (6-4) photoadduct and T-T cis-syn cyclobutane dimer. *Genetics* 169, 575-582.

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.

Grantham, R. (1974). Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185, 862-864.

Groenen, M.A., Megens, H.J., Zare, Y., Warren, W.C., Hillier, L.W., Crooijmans, R.P., Vereijken, A., Okimoto, R., Muir, W.M., and Cheng, H.H. (2011). The development and characterization of a 60K SNP chip for chicken. *BMC Genomics* 12, 274.

Grompone, G., Ehrlich, D., and Michel, B. (2004). Cells defective for replication restart undergo replication fork reversal. *EMBO Rep* 5, 607-612.

Guo, C., Sonoda, E., Tang, T.S., Parker, J.L., Bielen, A.B., Takeda, S., Ulrich, H.D., and Friedberg, E.C. (2006). REV1 protein interacts with PCNA: significance of the REV1 BRCT domain in vitro and in vivo. *Mol Cell* 23, 265-271.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

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. (2011). The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Mol Oncol* 5, 387-393.

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

Higgins, N.P., Kato, K., and Strauss, B. (1976). A model for replication repair in mammalian cells. *J Mol Biol* 101, 417-425.

Hirota, K., Sonoda, E., Kawamoto, T., Moteji, A., Masutani, C., Hanaoka, F., Szüts, D., Iwai, S., Sale, J.E., Lehmann, A., *et al.* (2010). Simultaneous disruption of two DNA polymerases, Poleta and Polzeta, in Avian DT40 cells unmasks the role of Poleta in cellular response to various DNA lesions. *PLoS Genet* 6.

Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.

Huang, H., Woo, J., Alley, S.C., and Hopkins, P.B. (1995). DNA-DNA interstrand cross-linking by cis-diamminedichloroplatinum(II): N7(dG)-to-N7(dG) cross-linking at 5'-d(GC) in synthetic oligonucleotides. *Bioorg Med Chem* 3, 659-669.

ICGSC (2004). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432, 695-716.

Ito, S., Murphy, C.G., Doubrovina, E., Jasin, M., and Moynahan, M.E. (2016). PARP Inhibitors in Clinical Use Induce Genomic Instability in Normal Human Cells. *PLoS One* 11, e0159341.

Izhar, L., Ziv, O., Cohen, I.S., Geacintov, N.E., and Livneh, Z. (2013). Genomic assay reveals tolerance of DNA damage by both translesion DNA synthesis and homology-dependent repair in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1462-1469.

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

Jiao, W., Atwal, G., Polak, P., Karlic, R., Cuppen, E., Danyi, A., de Ridder, J., van Herpen, C., Lolkema, M.P., Steeghs, N., *et al.* (2020). A deep learning system accurately classifies primary and metastatic cancers using passenger mutation patterns. *Nat Commun* 11, 728.

Johnson, G.E. (2012). Mammalian cell HPRT gene mutation assay: test methods. *Methods Mol Biol* 817, 55-67.

Jones, P., Altamura, S., Boueres, J., Ferrigno, F., Fonsi, M., Giomini, C., Lamartina, S., Monteagudo, E., Ontoria, J.M., Orsale, M.V., *et al.* (2009). Discovery of 2-{4-[(3S)-piperidin-3-yl]phenyl}-2H-indazole-7-carboxamide (MK-4827): a novel oral poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibitor efficacious in BRCA-1 and -2 mutant tumors. *J Med Chem* 52, 7170-7185.

Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., *et al.* (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333-339.

- Kannouche, P.L., Wing, J., and Lehmann, A.R. (2004). Interaction of Human DNA Polymerase η with Monoubiquitinated PCNA; A Possible Mechanism for the Polymerase Switch in Response to DNA Damage. *Mol Cell* 14, 491-500.
- Karow, J.K., Constantinou, A., Li, J.-L., West, S.C., and Hickson, I.D. (2000). The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of Holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 97, 6504-6508.
- 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.
- Koboldt, D.C., Zhang, Q., Larson, D.E., Shen, D., McLellan, M.D., Lin, L., Miller, C.A., Mardis, E.R., Ding, L., and Wilson, R.K. (2012). VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 22, 568-576.
- Kong, A., Frigge, M.L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., Gudjonsson, S.A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Wong, W.S., *et al.* (2012). Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 488, 471-475.
- Konstantinopoulos, P.A., Ceccaldi, R., Shapiro, G.I., and D'Andrea, A.D. (2015). Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. *Cancer Discov* 5, 1137-1154.
- Kunkel, T.A., and Bebenek, K. (2000). DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* 69, 497-529.
- Kunkel, T.A., and Erie, D.A. (2015). Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annu Rev Genet* 49, 291-313.
- Kurian, A.W., Hughes, E., Handorf, E.A., Gutin, A., Allen, B., Hartman, A., and Hall, M.J. (2017). Breast and Ovarian Cancer Penetrance Estimates Derived From Germline Multiple-Gene Sequencing Results in Women. *JCO Precision Oncology* 1, 1-12.
- Landry, J.J., Pyl, P.T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M.M., Stutz, A.M., Jauch, A., Aiyar, R.S., Pau, G., Delhomme, N., *et al.* (2013). The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda)* 3, 1213-1224.
- 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.
- Le, D.T., Durham, J.N., Smith, K.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Aulakh, L.K., Lu, S., Kemberling, H., Wilt, C., Lubner, B.S., *et al.* (2017). Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357, 409-413.

Ledermann, J.A., Raja, F.A., Fotopoulou, C., Gonzalez-Martin, A., Colombo, N., and Sessa, C. (2013). Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 24 Suppl 6, vi24-32.

Lee, J.H., and Paull, T.T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308, 551-554.

Lehmann, A.R. (2011). DNA polymerases and repair synthesis in NER in human cells. *DNA Repair (Amst)* 10, 730-733.

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

Lehmann, A.R., Niimi, A., Ogi, T., Brown, S., Sabbioneda, S., Wing, J.F., Kannouche, P.L., and Green, C.M. (2007). Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair (Amst)* 6, 891-899.

Lemaire, M.A., Schwartz, A., Rahmouni, A.R., and Leng, M. (1991). Interstrand cross-links are preferentially formed at the d(GC) sites in the reaction between cis-diamminedichloroplatinum (II) and DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1982-1985.

Li, Q., and Wang, K. (2017). InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *Am J Hum Genet* 100, 267-280.

Liberi, G., Maffioletti, G., Lucca, C., Chiolo, I., Baryshnikova, A., Cotta-Ramusino, C., Lopes, M., Pelliccioli, A., Haber, J.E., and Foiani, M. (2005). Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication forks in *sgs1* mutants defective in the yeast ortholog of BLM RecQ helicase. *Genes Dev* 19, 339-350.

Lin, J.R., Zeman, M.K., Chen, J.Y., Yee, M.C., and Cimprich, K.A. (2011). SHPRH and HLTf act in a damage-specific manner to coordinate different forms of postreplication repair and prevent mutagenesis. *Mol Cell* 42, 237-249.

Lindahl, T. (1996). The Croonian Lecture, 1996: endogenous damage to DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351, 1529-1538.

Liu, D., Keijzers, G., and Rasmussen, L.J. (2017). DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutat Res* 773, 174-187.

Liu, Y., and West, S.C. (2004). Happy Hollidays: 40th anniversary of the Holliday junction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 937-944.

Livneh, Z., Ziv, O., and Shachar, S. (2010). Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis. *Cell Cycle* 9, 729-735.

- Livraghi, L., and Garber, J.E. (2015). PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. *BMC Med* 13, 188.
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A.S., and Helleday, T. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* 33, 3799-3811.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-1217.
- Magoč, T., and Salzberg, S.L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957-2963.
- Mandal, R., Samstein, R.M., Lee, K.W., Havel, J.J., Wang, H., Krishna, C., Sabio, E.Y., Makarov, V., Kuo, F., Blecula, P., *et al.* (2019). Genetic diversity of tumors with mismatch repair deficiency influences anti-PD-1 immunotherapy response. *Science* 364, 485-491.
- Martincorena, I., Fowler, J.C., Wabik, A., Lawson, A.R.J., Abascal, F., Hall, M.W.J., Cagan, A., Murai, K., Mahbubani, K., Stratton, M.R., *et al.* (2018). Somatic mutant clones colonize the human esophagus with age. *Science* 362, 911-917.
- Mateos-Gomez, P.A., Gong, F., Nair, N., Miller, K.M., Lazzerini-Denchi, E., and Sfeir, A. (2015). Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature* 518, 254-257.
- McCulloch, S.D., and Kunkel, T.A. (2008). The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res* 18, 148-161.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., *et al.* (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20, 1297-1303.
- Meier, B., Cooke, S.L., Weiss, J., Bailly, A.P., Alexandrov, L.B., Marshall, J., Raine, K., Maddison, M., Anderson, E., Stratton, M.R., *et al.* (2014). *C. elegans* whole-genome sequencing reveals mutational signatures related to carcinogens and DNA repair deficiency. *Genome Res* 24, 1624-1636.
- Meier, B., Volkova, N.V., Hong, Y., Schofield, P., Campbell, P.J., Gerstung, M., and Gartner, A. (2018). Mutational signatures of DNA mismatch repair deficiency in *C. elegans* and human cancers. *Genome Res* 28, 666-675.
- Minca, E.C., and Kowalski, D. (2010). Multiple Rad5 activities mediate sister chromatid recombination to bypass DNA damage at stalled replication forks. *Mol Cell* 38, 649-661.

- Modrich, P., and Lahue, R. (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 65, 101-133.
- Mortelmans, K., and Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 455, 29-60.
- Moschetta, M., George, A., Kaye, S.B., and Banerjee, S. (2016). BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer. *Ann Oncol* 27, 1449-1455.
- Mounir, M., Lucchetta, M., Silva, T.C., Olsen, C., Bontempi, G., Chen, X., Noushmehr, H., Colaprico, A., and Papaleo, E. (2019). New functionalities in the TCGA biolinks package for the study and integration of cancer data from GDC and GTEx. *PLoS Comput Biol* 15, e1006701.
- Murai, J., Huang, S.Y., Das, B.B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J.H., Ji, J., Takeda, S., and Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res* 72, 5588-5599.
- Murata, T., Iwai, S., and Ohtsuka, E. (1990). Synthesis and Characterization of a Substrate for T4 Endonuclease-V Containing a Phosphorodithioate Linkage at the Thymine Dimer Site. *Nucleic Acids Research* 18, 7279-7286.
- Naxerova, K., and Jain, R.K. (2015). Using tumour phylogenetics to identify the roots of metastasis in humans. *Nat Rev Clin Oncol* 12, 258-272.
- 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.
- Nimonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2011). BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev* 25, 350-362.
- O'Connor, M.J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell* 60, 547-560.
- Ono, M., and Kuwano, M. (2006). Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clin Cancer Res* 12, 7242-7251.

- Ozgenic, A.I., Szekeres, E.S., and Lawrence, C.W. (2005). In vivo evidence for a recA-independent recombination process in *Escherichia coli* that permits completion of replication of DNA containing UV damage in both strands. *J Bacteriol* *187*, 1974-1984.
- Pabla, N., Huang, S., Mi, Q.S., Daniel, R., and Dong, Z. (2008). ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* *283*, 6572-6583.
- Pannunzio, N.R., Watanabe, G., and Lieber, M.R. (2018). Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* *293*, 10512-10523.
- Pao, W., Miller, V.A., Politi, K.A., Riely, G.J., Somwar, R., Zakowski, M.F., Kris, M.G., and Varmus, H. (2005). Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* *2*, e73.
- Parameswaran, B., Chiang, H.C., Lu, Y., Coates, J., Deng, C.X., Baer, R., Lin, H.K., Li, R., Paull, T.T., and Hu, Y. (2015). Damage-induced BRCA1 phosphorylation by Chk2 contributes to the timing of end resection. *Cell Cycle* *14*, 437-448.
- Parker, J.L., Bielen, A.B., Dikic, I., and Ulrich, H.D. (2007). Contributions of ubiquitin- and PCNA-binding domains to the activity of Polymerase eta in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* *35*, 881-889.
- Pascal, J.M. (2018). The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* *71*, 177-182.
- Pastushok, L., Hanna, M., and Xiao, W. (2010). Constitutive fusion of ubiquitin to PCNA provides DNA damage tolerance independent of translesion polymerase activities. *Nucleic Acids Res* *38*, 5047-5058.
- Patel, A.G., Sarkaria, J.N., and Kaufmann, S.H. (2011). Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 3406-3411.
- Petljak, M., Alexandrov, L.B., Brammell, J.S., Price, S., Wedge, D.C., Grossmann, S., Dawson, K.J., Ju, Y.S., Iorio, F., Tubio, J.M.C., *et al.* (2019). Characterizing Mutational Signatures in Human Cancer Cell Lines Reveals Episodic APOBEC Mutagenesis. *Cell* *176*, 1282-1294.e1220.
- Pfeifer, G.P. (2006). Mutagenesis at methylated CpG sequences. *Curr Top Microbiol Immunol* *301*, 259-281.
- 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.

Plosky, B.S., Vidal, A.E., Fernandez de Henestrosa, A.R., McLenigan, M.P., McDonald, J.P., Mead, S., and Woodgate, R. (2006). Controlling the subcellular localization of DNA polymerases ι and η via interactions with ubiquitin. *Embo j* 25, 2847-2855.

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

Popova, T., Manié, E., Rieunier, G., Caux-Moncoutier, V., Tirapo, C., Dubois, T., Delattre, O., Sigal-Zafrani, B., Bollet, M., Longy, M., *et al.* (2012). Ploidy and large-scale genomic instability consistently identify basal-like breast carcinomas with BRCA1/2 inactivation. *Cancer Res* 72, 5454-5462.

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.

Poulos, R.C., Olivier, J., and Wong, J.W.H. (2017). The interaction between cytosine methylation and processes of DNA replication and repair shape the mutational landscape of cancer genomes. *Nucleic Acids Res* 45, 7786-7795.

Povirk, L.F., and Shuker, D.E. (1994). DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutat Res* 318, 205-226.

Qin, Z., Lu, M., Xu, X., Hanna, M., Shiomi, N., and Xiao, W. (2013). DNA-damage tolerance mediated by PCNA*Ub fusions in human cells is dependent on Rev1 but not Pol η . *Nucleic Acids Res* 41, 7356-7369.

Qing, Y., Yamazoe, M., Hirota, K., Dejsuphong, D., Sakai, W., Yamamoto, K.N., Bishop, D.K., Wu, X., and Takeda, S. (2011). The epistatic relationship between BRCA2 and the other RAD51 mediators in homologous recombination. *PLoS Genet* 7, e1002148.

Rainey, M.D., Black, E.J., Zachos, G., and Gillespie, D.A. (2008). Chk2 is required for optimal mitotic delay in response to irradiation-induced DNA damage incurred in G2 phase. *Oncogene* 27, 896-906.

Ramasubramanyan, S., Coulon, S., Fuchs, R.P., Lehmann, A.R., and Green, C.M. (2010). Ubiquitin-PCNA fusion as a mimic for mono-ubiquitinated PCNA in *Schizosaccharomyces pombe*. *DNA Repair (Amst)* 9, 777-784.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8, 2281-2308.

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.

Riaz, N., Blecua, P., Lim, R.S., Shen, R., Higginson, D.S., Weinhold, N., Norton, L., Weigelt, B., Powell, S.N., and Reis-Filho, J.S. (2017). Pan-cancer analysis of bi-allelic alterations in homologous recombination DNA repair genes. *Nat Commun* 8, 857.

Rice, P., Longden, I., and Bleasby, A. (2000). EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16, 276-277.

Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.

Rosenthal, R., McGranahan, N., Herrero, J., Taylor, B.S., and Swanton, C. (2016). DeconstructSigs: delineating mutational processes in single tumors distinguishes DNA repair deficiencies and patterns of carcinoma evolution. *Genome Biol* 17, 31.

Ross, A.L., Simpson, L.J., and Sale, J.E. (2005). Vertebrate DNA damage tolerance requires the C-terminus but not BRCT or transferase domains of REV1. *Nucleic Acids Res* 33, 1280-1289.

Rottenberg, S., Nygren, A.O., Pajic, M., van Leeuwen, F.W., van der Heijden, I., van de Wetering, K., Liu, X., de Visser, K.E., Gilhuijs, K.G., van Tellingen, O., *et al.* (2007). Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12117-12122.

Rubin, C.J., Zody, M.C., Eriksson, J., Meadows, J.R., Sherwood, E., Webster, M.T., Jiang, L., Ingman, M., Sharpe, T., Ka, S., *et al.* (2010). Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication. *Nature* 464, 587-591.

Sakai, W., Swisher, E.M., Karlan, B.Y., Agarwal, M.K., Higgins, J., Friedman, C., Villegas, E., Jacquemont, C., Farrugia, D.J., Couch, F.J., *et al.* (2008). Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* 451, 1116-1120.

Sale, J.E., Batters, C., Edmunds, C.E., Phillips, L.G., Simpson, L.J., and Szüts, D. (2009). Timing matters: error-prone gap filling and translesion synthesis in immunoglobulin gene hypermutation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 595-603.

Samstein, R.M., Lee, C.H., Shoushtari, A.N., Hellmann, M.D., Shen, R., Janjigian, Y.Y., Barron, D.A., Zehir, A., Jordan, E.J., Omuro, A., *et al.* (2019). Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet* 51, 202-206.

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.

Scully, R., and Xie, A. (2013). Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat Res* 750, 5-14.

Serero, A., Jubin, C., Loeillet, S., Legoix-Né, P., and Nicolas, A.G. (2014). Mutational landscape of yeast mutator strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 1897-1902.

Shachar, S., Ziv, O., Avkin, S., Adar, S., Wittschleben, J., Reissner, T., Chaney, S., Friedberg, E.C., Wang, Z., Carell, T., *et al.* (2009). Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO J* *28*, 383-393.

Shah, S.N., Hile, S.E., and Eckert, K.A. (2010). Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes. *Cancer Res* *70*, 431-435.

Sogo, J.M., Lopes, M., and Foiani, M. (2002). Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* *297*, 599-602.

Song, H., Dicks, E., Ramus, S.J., Tyrer, J.P., Intermaggio, M.P., Hayward, J., Edlund, C.K., Conti, D., Harrington, P., Fraser, L., *et al.* (2015). Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian Cancer in the Population. *J Clin Oncol* *33*, 2901-2907.

Sonnenblick, A., de Azambuja, E., Azim, H.A., Jr., and Piccart, M. (2015). An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting. *Nat Rev Clin Oncol* *12*, 27-41.

Sonoda, E., Sasaki, M.S., Buerstedde, J.M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., Takata, M., Yamaguchi-Iwai, Y., and Takeda, S. (1998). Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *Embo J* *17*, 598-608.

Spivak, G. (2015). Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair (Amst)* *36*, 13-18.

Spivak, G., and Ganesan, A.K. (2014). The complex choreography of transcription-coupled repair. *DNA Repair (Amst)* *19*, 64-70.

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., and Krude, T. (2004). Cell cycle arrest at the initiation step of human chromosomal DNA replication causes DNA damage. *J Cell Sci* *117*, 4897-4908.

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.

Szüts, D., Simpson, L.J., Kabani, S., Yamazoe, M., and Sale, J.E. (2006). Role for RAD18 in homologous recombination in DT40 cells. *Mol Cell Biol* *26*, 8032-8041.

Taheri-Ghahfarokhi, A., Taylor, B.J.M., Nitsch, R., Lundin, A., Cavallo, A.L., Madeyski-Bengtson, K., Karlsson, F., Clausen, M., Hicks, R., Mayr, L.M., *et al.* (2018). Decoding non-random mutational signatures at Cas9 targeted sites. *Nucleic Acids Res* *46*, 8417-8434.

Takao, N., Kato, H., Mori, R., Morrison, C., Sonada, E., Sun, X., Shimizu, H., Yoshioka, K., Takeda, S., and Yamamoto, K. (1999). Disruption of ATM in p53-null cells causes multiple functional abnormalities in cellular response to ionizing radiation. *Oncogene* *18*, 7002-7009.

Takata, M., Sasaki, M.S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson, L.H., and Takeda, S. (2001). Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol* *21*, 2858-2866.

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.

Thompson, E.G., Fares, H., and Dixon, K. (2012). BRCA1 requirement for the fidelity of plasmid DNA double-strand break repair in cultured breast epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* *53*, 32-43.

Timms, K.M., Abkevich, V., Hughes, E., Neff, C., Reid, J., Morris, B., Kalva, S., Potter, J., Tran, T.V., Chen, J., *et al.* (2014). Association of BRCA1/2 defects with genomic scores predictive of DNA damage repair deficiency among breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res* *16*, 475.

Tomasetti, C., and Vogelstein, B. (2015). Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* *347*, 78-81.

Tomkova, M., McClellan, M., Kriaucionis, S., and Schuster-Bockler, B. (2018). DNA Replication and associated repair pathways are involved in the mutagenesis of methylated cytosine. *DNA Repair (Amst)* *62*, 1-7.

Turajlic, S., and Swanton, C. (2016). Metastasis as an evolutionary process. *Science* *352*, 169-175.

Umar, A., Koi, M., Risinger, J.I., Glaab, W.E., Tindall, K.R., Kolodner, R.D., Boland, C.R., Barrett, J.C., and Kunkel, T.A. (1997). Correction of hypermutability, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine resistance, and defective DNA mismatch repair by introducing chromosome 2 into human tumor cells with mutations in MSH2 and MSH6. *Cancer Res* *57*, 3949-3955.

Unk, I., Hajdu, I., Fatyol, K., Hurwitz, J., Yoon, J.H., Prakash, L., Prakash, S., and Haracska, L. (2008). Human HLTf functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 3768-3773.

Unk, I., Hajdu, I., Fatyol, K., Szakal, B., Blastyak, A., Bermudez, V., Hurwitz, J., Prakash, L., Prakash, S., and Haracska, L. (2006). Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-

dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 18107-18112.

Vandenberg, C.J., Gergely, F., Ong, C.Y., Pace, P., Mallery, D.L., Hiom, K., and Patel, K.J. (2003). BRCA1-independent ubiquitination of FANCD2. *Mol Cell* *12*, 247-254.

Vergara, I.A., Frech, C., and Chen, N. (2012). CooVar: co-occurring variant analyzer. *BMC Res Notes* *5*, 615.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* *339*, 1546-1558.

Wallace, S.S. (2014). Base excision repair: a critical player in many games. *DNA Repair (Amst)* *19*, 14-26.

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.

Ward, I.M., and Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* *276*, 47759-47762.

Wyatt, H.D., and West, S.C. (2014). Holliday junction resolvases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *6*, a023192.

Wyatt, M.D., and Pittman, D.L. (2006). Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol* *19*, 1580-1594.

Yeeles, J.T., Deegan, T.D., Janska, A., Early, A., and Diffley, J.F. (2015). Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature* *519*, 431-435.

Yonetani, Y., Hohegger, H., Sonoda, E., Shinya, S., Yoshikawa, H., Takeda, S., and Yamazoe, M. (2005). Differential and collaborative actions of Rad51 paralog proteins in cellular response to DNA damage. *Nucleic Acids Res* *33*, 4544-4552.

Yoon, J.H., Prakash, L., and Prakash, S. (2009). Highly error-free role of DNA polymerase η in the replicative bypass of UV-induced pyrimidine dimers in mouse and human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 18219-18224.

Yu, X., Wu, L.C., Bowcock, A.M., Aronheim, A., and Baer, R. (1998). The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. *J Biol Chem* *273*, 25388-25392.

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.

Zehir, A., Benayed, R., Shah, R.H., Syed, A., Middha, S., Kim, H.R., Srinivasan, P., Gao, J., Chakravarty, D., Devlin, S.M., *et al.* (2017). Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 23, 703-713.

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.

Zhu, Y.O., Siegal, M.L., Hall, D.W., and Petrov, D.A. (2014). Precise estimates of mutation rate and spectrum in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E2310-2318.

Zou, X., Owusu, M., Harris, R., Jackson, S.P., Loizou, J.I., and Nik-Zainal, S. (2018). Validating the concept of mutational signatures with isogenic cell models. *Nat Commun* 9, 1744.

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, Szüts D, 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 sejtvonallal 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)