



Köszönöm Dr. Vértessy Beátának, hogy figyelmesen áttanulmányozta dolgozatomat és elkészítette bírálatát. Külön köszönöm észrevételeit, amelyek koherensnek értékelték eddigi kutatásaimat és jelezték, hogy kutatócsoportom fejlődése eljutott abba a fázisba, ahol már saját jogon is nemzetközi elismertségnek örvendhet. Kérdéseire, amelyek továbbgondolkodásra serkentettek és további ötleteket is adtak kísérleteinkhez, az alábbiak szerint válaszolok:

*1. Haracska Lajos jelen kutatásaiban az ubikvitináció és a szumoilálás központi szerepét játszanak. Bizonyára léteznek olyan cikkek, melyek rendszerbiológiai elhivatottsággal igyekeznek vizsgálni ezeket a folyamatokat és a termékként keletkező poszttranszlációs módosítással ellátott fehérjéket. Van-e lehetőség bizonyos általános (vagy jelenleg legalábbis annak tűnő) következtetések levonására ezen a területen? Van-e például olyan megközelítés, ahol a módosítási helyek egymáshoz képest való elhelyezkedését térbeli modellekben vizsgálják?*

A rendszerbiológiai megközelítések napjainkban a biológiai tudományok szinte minden területére hatással vannak és nem kivétel ez alól a fehérjék SUMO- és ubikvitin-poszttranszlációs módosítása sem. A SUMOilált és ubikvitinált fehérjék azonosítására és a módosítások pontos helyének a megállapítására elsősorban affinitás tisztítást követő tömegspektroszkópiás módszereket használtak (Galissou et al, 2011; Jeram et al, 2009; Jeram et al, 2010; Starita et al, 2012). Az így nyert és az adatbázisokból fellelhető már meglévő adatok alapján került térképezésre a részt vevő fehérjék hálózata és ezek fényében előrejelzések is születtek, amelyek közül többet kísérletesen is sikerült igazolni. Jelenlegi ismereteink alapján a következő általános szabályok körvonalazódnak:

- 1, A fehérjék foszforilálásához hasonló mértékben az ubikvitin és SUMO módosítás a fehérjék jelentős körét érinti, bár ezek a módosítások reverzibilitásukból következően gyakran rövid életűek és nehezen kimutathatóak.
- 2, Azonosíthatóak konzervált aminosav szekvenciával rendelkező fehérje ubikvitinációs és SUMOilációs helyek, azonban az elsődleges módosítási hely mutációs inaktiválása

következtében gyakran alternatív helyeken is történhet a módosítás, amely meglepő módon, az elsődleges módosítással megegyező funkciót eredményezhet.

3, Egyazon fehérje különböző helyeken egyidejűleg SUMO-val és ubikvitinnel is módosulhat, de a két módosítás kompetálhat is egymással ugyanazon lizin aminosavért.

4, A SUMO és ubikvitin módosulás következtében a fehérjék konformációja általában nem változik meg. A módosulás célja elsősorban a SUMO és ubikvitin kötő doménnal rendelkező fehérjékkel történő új kölcsönhatások kialakítása.

5, A SUMO és ubikvitin rendszerek között számos kapcsolat található, amelyet jól példáz, hogy léteznek SUMO aktivált ubikvitin ligázok, amelyek csak a SUMO módosított fehérjéket képesek ubikvitinálni.

A kutatásaink fókuszában álló PCNA fehérje SUMO és ubikvitin módosulásainak térbeli modellezésére, részben a mesterséges előállított SUMO- és ubikvitin fúziós PCNA-fehérje kristálystruktúrájukból kiindulva, már történtek próbálkozások (Freudenthal et al, 2011; Freudenthal et al, 2010; Tsutakawa et al, 2011). Ezekből a következő modell körvonalazódik: a replikálódó DNS-t körbefogva a gyűrű alakú PCNA molekula elülső felszíne, amely a primer és a mintaszál találkozásának irányába fekszik, a replikációs polimeráz számára biztosít kapcsolódási felületet, amellyel a replikáció magas fokú processzivitását segíti. A PCNA gyűrűjének hátulsó felszínén helyezkedhetnek el a SUMO- és ubikvitin módosításokon keresztül kapcsolódó fehérjék (pl. hibaátíró polimerázok ill. az Srs2 helikáz), amelyek ezért nem zavarják az elülső felszínhez kapcsolt replikatív polimeráz működését, így tartalékban állhatnak. A modell szerint, ha a replikatív polimeráz nem képes továbbhaladni elengedheti a primer véget, amely utat nyit ahhoz, hogy az eddig tartalékban lévő fehérjék hozzáférjenek a primerhez és elősegítsék a replikáció mentését. Mivel a PCNA három egyenértékű monomerből felépülő homotrimert formál, így elképzelhető olyan állapot, hogy a K164 pozícióban egyik alegysége ubikvitinált ugyanakkor egy másik alegysége SUMOilált és ezeken keresztül egyidejűleg különböző fehérjék kötődnek. A felvázolt modellt a PCNA "szerszámöv" modelljének is nevezik, mivel a PCNA ubikvitin és SUMO módosulásain keresztül kapcsolt fehérjék könnyedén előhúzóak, ha a replikáció során segítségükre van szükség.

*2. A károsodott DNS másolási mechanizmusai az evolúció szempontjából is fontosak lehetnek, és talán a különböző organizmusokban eltérő módon nyilvánulhat meg ez a jelentőség. Vannak-e olyan organizmusok, melyekben az irodalom szerint ezen folyamatok kiemelkedő jelentőségűek – gyorsított evolúciót tehetnek lehetővé.*

A magas precizitású polimerázok a DNS pontos másolását tudják elvégezni és kifejezetten a DNS replikációjára szakosodtak. A replikációs polimerázok azonban nem alkalmasak a DNS hibák átírására, amely alacsony pontosságú polimerázokat igényel. Speciális esetekben egyetlen DNS polimeráz áll csak rendelkezésre a genom replikációjához pl. bizonyos vírusok esetében, ahol mivel DNS károsodások mindig vannak, csak egy alacsonyabb pontosságú polimeráz alkalmas a feladatra. Ennek egyik velejárója a vírus genomok igen nagyfokú változékonysága. Kijelenthető, hogy egy meglehetősen stabil genom fenntartása érdekében legalább két DNS polimerázra, egy alacsony és egy magas pontosságúra van szükség és a váltásukat szabályozó mechanizmus is elengedhetetlen.

Ismert, hogy baktériumokban a hibaátíró polimerázok növelik a fitnesszt pl. vad típusú és hibaátíró mutáns *E.coli* törzsetek azonos arányban keverve a vad típusú stacioner fázisban túlnövi a mutáns törzset. Ennek kapcsán az is kimutatható, hogy a vad típusú törzsben több mutáció halmozódik fel. A hibaátíró polimerázok tehát a mutációk kialakulásának a sebességét gyorsítva a genom változékonyságához és a sejt alkalmazkodóképességéhez járulnak hozzá. Ennek további bizonyítéka, hogy bizonyos széles gazdaspecificitású bakteriális eredetű plazmidok hordoznak hibaátíró DNS polimeráz gént, gyakran antibiotikum rezisztencia gén szomszédságában. Ez azt sugallja, hogy a transzlációs polimerázok elősegíthetik patogén baktériumok ellenálló képességének és antibiotikum rezisztenciájának a kialakulását (Goldsmith et al, 2000). Megemlítem, hogy a kémiai anyagok mutagén ill. karcinogén hatásának kimutatására széles körben elterjedt Ames teszt, egy hibaátíró DNS polimeráz túltermelő *Salmonella* baktérium alkalmazására épül, amelyben ezért fokozott mutagenézist vált a vizsgált anyag okozta DNS károsodás.

*3. Ismeretesek-e olyan próbálkozások, ahol a poszttranszlációs helyek esetleges SNP mutációi vezetnek meghatározott fenotípushoz?*

Elsősorban modell élőlényekben állnak rendelkezésünkre mutánsok, amelyekben DNS reparációs fehérjék SUMO- ill. ubikvitin módosulási helye inaktiválódott. Ezeket a mutánsokat gyakran reverz genetikai megközelítésként célzottan képezték, de arra is van példa, hogy nagy léptékű genetikai szűrésekkel pl. UV érzékenységre vagy mutagenézisre

tesztelve történt izolálásuk. Human genetikai betegségről nem tudok, amelyet egyértelműen SUMO- vagy ubikvitin poszttranszlációs hely mutációja okozna. Az érdeklődésünk központjában álló PCNA fehérjével kapcsolatos megfigyelésekre leszűkítve a kérdést megállapítható, hogy a PCNA-ben az ubikvitin és SUMO módosítás helyéül szolgáló 164-es pozíciójú lizin mutációja mind élesztő mind human sejtekben nagymértékben megváltoztatja a genom stabilitását. Saját és mások kutatásai is azt mutatják, hogy a PCNA K164-es lizin mutáns sejtek érzékenyebbeké válnak DNS károsító ágensekre, lecsökken bennük a DNS károsodás indukálta mutagenézis és fokozódik a homológ rekombináció.

*4. Az eredmények orvos biológiai jelentősége első olvasatban is egyértelmű. Kérem a jelöltet, bővebben fejtsse ki, milyen haladási irányok vannak ezen a területen és milyen elvárások fogalmazódnak meg.*

Kutatásaink központjában a DNS hibajavító folyamatok, a genom stabilitása, a mutagenézis és karcinogenezis molekuláris mechanizmusának vizsgálata áll. Ezekben a folyamatokban direkt szereppel bíró DNS hibajavító gének listája folyamatosan bővül, jelenleg mintegy 150-nél tart, amelyhez több új génnel pl. HLTF, SHPRH és RLZ1 kutatócsoportunk is hozzájárult. A jelenleg is folyamatban lévő tumor genom szekvenálási projektek eddig közel 80 gént azonosítottak, amelyek familiáris mutációi tumorképződésre hajlamosítanak. Ezen gének mintegy fele kódol a DNS hibajavításban szereppel bíró fehérjét, amely a DNS hibajavítás központi tumor szuppresszor jelentőségét jól alátámasztja. Napjainkra elfogadottá vált, hogy a tumorigenezis hajtóerejét leggyakrabban a DNS hibajavítás egy-egy elemének korai mutációs inaktivációja biztosítja, amely fokozott mutagenézishez vezet. Tumor-terápiás szempontból is egyre nagyobb jelentősége van annak az ismeretere, hogy az adott tumorban mely DNS hibajavító fehérjék inaktiválódtak pl. található-e mutáció a kettős szálú DNS törések javításában szerepet játszó BRCA1 vagy BRCA2 génekben. Erre az egyik legismertebb példát a PARP inhibitorok nyújtják, amelyek a BRCA1 vagy BRCA2 mutáns tumorokban bizonyulnak igen hatásosnak. A PARP inhibitorok példája is megvilágítja az ún. szintetikus letalításban rejlő tumorterápiás lehetőségeket. Bízatóak azok a gyógyszereszesztek, amelyek két hibajavító útvonal egyidejű gátlásával kívánják elérni a tumorsejtek pusztulását, vagy kombinálják a hagyományos DNS károsító ágenseket egy-egy DNS hibajavító fehérjét gátló molekulával (Basu et al, 2012). Jelenleg is folyik számos DNS hibajavításban szerepet játszó fehérje pl. a Rad51 és DNS-függő kináz gátlására alapozó potenciális gyógyszermolekula klinikai tesztelése. Mindezek alapján elmondható, hogy új DNS hibajavító fehérjék azonosítása és az eddigiek mélyebb jellemzése még több lehetőséget kínál majd egy-egy specifikus DNS hibajavító folyamatot gátló molekula kifejlesztésére is.

Végezetül szeretném újra megköszönni Vértessy Beátának dolgozatom bírálatát.

## Referenciák:

Basu B, Yap TA, Molife LR, de Bono JS (2012) Targeting the DNA damage response in oncology: past, present and future perspectives. *Current opinion in oncology* **24**: 316-324

Freudenthal BD, Brogie JE, Gakhar L, Kondratick CM, Washington MT (2011) Crystal structure of SUMO-modified proliferating cell nuclear antigen. *J Mol Biol* **406**: 9-17

Freudenthal BD, Gakhar L, Ramaswamy S, Washington MT (2010) Structure of monoubiquitinated PCNA and implications for translesion synthesis and DNA polymerase exchange. *Nature structural & molecular biology* **17**: 479-484

Galisson F, Mahrouche L, Courcelles M, Bonneil E, Meloche S, Chelbi-Alix MK, Thibault P (2011) A novel proteomics approach to identify SUMOylated proteins and their modification sites in human cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **10**: M110 004796

Goldsmith M, Sarov-Blat L, Livneh Z (2000) Plasmid-encoded MucB protein is a DNA polymerase (pol RI) specialized for lesion bypass in the presence of MucA', RecA, and SSB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11227-11231

Jeram SM, Srikumar T, Pedrioli PG, Raught B (2009) Using mass spectrometry to identify ubiquitin and ubiquitin-like protein conjugation sites. *Proteomics* **9**: 922-934

Jeram SM, Srikumar T, Zhang XD, Anne Eisenhauer H, Rogers R, Pedrioli PG, Matunis M, Raught B (2010) An improved SUMmOn-based methodology for the identification of ubiquitin and ubiquitin-like protein conjugation sites identifies novel ubiquitin-like protein chain linkages. *Proteomics* **10**: 254-265

Starita LM, Lo RS, Eng JK, von Haller PD, Fields S (2012) Sites of ubiquitin attachment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteomics* **12**: 236-240

Tsutakawa SE, Van Wynsberghe AW, Freudenthal BD, Weinacht CP, Gakhar L, Washington MT, Zhuang Z, Tainer JA, Ivanov I (2011) Solution X-ray scattering combined with computational modeling reveals multiple conformations of covalently bound ubiquitin on PCNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 17672-17677

Haracska Lajos  
tudományos főmunkatárs  
MTA SZBK  
Genetikai Intézet

Szeged, 2012 04 25