



Válasz Dr. Buday László bírálói véleményére

Először is köszönöm Dr. Buday Lászlónak, hogy dolgozatomat igen alaposan áttanulmányozta és eredményeimet pozitívan értékelte. Köszönöm tudományos munkám méltatását, megjegyzéseit és érdeklődő kérdéseit, amelyekre az alábbiakban válaszolok:

Kérdés 1, A genomban található különféle léziókat a legmegfelelőbb hibajavító DNS polimeráz írja-e át, és ha igen, hogyan kerül kiválasztásra a megfelelő enzim?

Általánosságban megjegyzem, hogy a bíráló mindhárom kérdése tudományterületem legizgalmasabb kérdései közé tartozik, amelyek az elmúlt években közleményeink bírálatánál, konferenciákon és szakmai megbeszéléseken is gyakran generáltak parázsló vitákat.

A hibaátíró DNS polimerázok a replikációs polimerázoknál jóval több mutációt generálnak ezért mindenképpen szükséges kordában tartásuk. Ennek egyik módja a PCNA molekula ubikvitinálása, amely nélkül ezek a polimerázok nem férnek hozzá a primer mintaszál találkozásához. Mivel minden hibaátíró DNS polimeráz működésének az előfeltétele a PCNA ubikvitinálása, ezért jogosan merül fel a kérdés, hogy milyen mechanizmus biztosítja a legmegfelelőbb polimeráz működésbe hozását és a lehetőleg hibamentes lézió átírást. Az egyik kézenfekvő megoldás lehetne, hogy a különböző DNS polimerázok más és más affinitással kötődnek különböző DNS károsodásokat hordozó DNS-hez. Ez a kezdeti elképzelés azonban gyorsan megdőlt, mivel kiderült, hogy a hibaátíró polimerázok azonos erősséggel kötik a károsodást nem tartalmazó és a különböző léziókat tartalmazó károsított DNS-t. Egy további lehetőség, hogy nem maga a polimeráz, hanem egy hipotetikus interakciós partnere ismeri fel szelektíven a károsodott bázist. Bár ezt az eshetőséget nem lehet teljes mértékben kizárni, tekintve a lehetséges DNA hibák magas számát, elképzelhetetlen, hogy minden egyes DNS károsodásnak specifikus felismerő fehérjéje legyen.

A probléma egy általános megoldásához a hibaátíró polimerázok kinetikai vizsgálata vezetett, amelyekhez saját kutatásaink is hozzájárultak. Steady-state kinetikai kísérletek kimutatták, hogy a hibaátíró polimerázok k_{cat} és a nukleotidra mért K_m értékei között jelentős lézió specifikus különbség mutatható ki. Pl. a k_{cat}/K_m értéket tekintve a polimeráz éta szinte azonos hatékonysággal írja át az UV keresztköött és a nem károsított TT bázisokat, közel azonos kinetikával az oxidatíván károsított G-t, azonban az abázikus hellyel szemben mintegy 2-3 nagyságrenddel kisebb hatékonyságú (Haracska et al, 2001; Haracska et al, 2000). A polimeráz iota a polimeráz étával ellentétben nem hatékony a T-T dimerekkel szemben történő nukleotid beépítésre, de meglehetősen hatékonyan épít be bázisokat az abázikus hellyel szemben (Johnson et al, 2000). Későbbi pre-steady state kinetikai mérések is jelentős különbségeket tártak fel a hibaátíró polimerázok működésének elemi lépéseiben, pl. jelentős különbségekre derült fény a nukleotid kötést és a nukleotid beépítés sebességének tekintetében (Washington et al, 2003). Mindezek fényében az tűnik valószínűnek, hogy a DNS károsodásnál megakadt replikációs villában a PCNA ubikvitinációja következtében több hibaátíró DNS polimeráz is lehetőséget kaphat a hibaátírásra, azaz kötődhet a primer-templát találkozáshoz. Végző soron azt, hogy milyen arányban járulnak hozzá az egyes polimerázok az adott léziók átírásához minden bizonyonnyal a polimerázok kinetikai paraméterei és az adott sejtben uralkodó polimeráz és nukleotid koncentrációs viszonyok döntik el.

2. A mintaszál váltással működő hibamentes replikáció esetében megfigyelhetők-e visszafordított replikációs villák a sejtben belül?

A visszafordított replikációs villát elsőként 1976-ban jelenítették meg elektronmikroszkóppal Strauss és munkatársai emlős sejtekben (Higgins et al, 1976). Később baktériumokban és élesztőben is sikerült az elektronmikroszkópos megjelenítésük. Sokáig tartotta magát az az ellenérv, hogy az elektronmikroszkóppal megjelentett visszafordított villák a DNS replikáció során felhalmozott torziós feszültség következtében spontán, gyakran a DNS preparálás során kialakuló képződmények, amelyek feldúsulnak, ha a replikáció akadályba ütközik. A replikációt nemcsak a sejtek DNS károsító ágenssel történő kezelésével akadályozhatjuk, de spontán is kialakulhat pl. transzkripció zavar következtében a DNS-en rekedt RNS polimeráz, vagy el nem távolított fehérjeterlaszok pl. transzkripció faktorok hatására. A visszafordított replikációs villák egyszerűbb kimutatására a két dimenziós elektroforézis és

hibridizációs technikák ötvözésével sikerült egy szélesebb körben alkalmazható módszert is kidolgozni, amellyel lehetőség nyílt nagyobb mintaszám pl. különböző mutánsok jellemzésére is. Ennek során megfigyelték, hogy az élesztő *rad53* replikációs checkpoint mutánsban nagymértékben felhalmozódnak a visszafordított replikációs villák (Sogo et al, 2002). Meg kell említeni azonban, hogy ezt is érte kritika, ui. többen patológiás elváltozásnak gondolják és úgy vélik, hogy vad típusú sejtekben a villa visszafordulása jóval ritkább esemény (Cotta-Ramusino et al, 2005). Ennek kapcsán nem szabad azonban megfeledkezni arról, hogy a villa visszafordítása reverzibilis folyamat és már néhány bázispárnyi hosszú visszafordított villa is tökéletesen be tudja tölteni szerepét a replikáció mentésében. Ebből adódóan mind az elektronmikroszkópos mind a két dimenziós elektroforézisen alapuló kimutatások csak korlátozottan alkalmasak a visszafordított replikációs villák és az ezen alapuló hibaátírás mennyiségi összehasonlítására hiszen nem teszik lehetővé a rövid szakaszon visszafordult rövid életidejű villastruktúrák észlelését.

3. Miért maradhatott fenn az evolúció során a transzléziós szintézis, ha a templát-váltás hibamentes replikációt tesz lehetővé és ezáltal tumor szuppresszor hatású lehet?

A kérdés azért is izgalmas, mert míg a templát-váltás elvileg univerzális megoldást jelenthet bármilyen DNS károsítás átírására, a transzléziós szintézis nem alkalmas minden DNS károsodás átírására. Ezen túlmenően a transzléziós szintézis gyakran mutációt generál, amely a karcinogenezis hajtóerejévé válhat, míg a templát-váltás elméletileg hibamentes. Bizonyos esetekben azonban előnyös lehet a transzléziós polimerázok által generált mutáció. Ennek egyik bizonyítékát egysejtű baktériumok növekedési körülményeinek változtatásával végzett kísérletek szolgáltatták, amelyek kimutatták, hogy a transzléziós polimerázokat hordozó és ezért gyorsabb mutagenézisre képes baktériumok gyakran túlnövik a transzléziós polimerázokat nem tartalmazó baktériumokat. Többsejtű élőlények esetében nem ilyen egyértelmű a válasz mivel a fokozott mutagenézis fokozott karcinogenezishez vezethet. Azonban, többsejtűekben is vannak olyan folyamatok pl. immunoglobulinok szomatikus hipermutációinak kialakulása, amelyben a transzléziós polimerázok központi szereppel bírnak, és amely önmagában is indokolhatja az evolúció során a transzléziós szintézis fennmaradását. Lehetnek olyan esetek is, amikor a replikációs villa nem menthető templát-váltással, pl. csak a transzléziós szintézis lehet hatékony, ha mind a vezető mind a késlekedő mintaszál szál károsított. Ezen előnyökön túlmenően, a DNS replikáció alapvető sejt folyamat

és zavartalanabb működéséhez feltételezhetően szükség volt tartalék rendszerek kialakulására. Különösen igaz ez nagyobb arányú DNS károsodás esetén, amely telítheti az egyik útvonalat pl. templát váltással történő mentést és előtérbe helyezheti a transzlációs szintézis.

Végezetül szeretném újra megköszönni Dr. Buday Lászlónak dolgozatom bírálatát.

Hivatkozások:

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

Haracska L, Washington MT, Prakash S, Prakash L (2001) Inefficient bypass of an abasic site by DNA polymerase eta. *The Journal of biological chemistry* **276**: 6861-6866

Haracska L, Yu SL, Johnson RE, Prakash L, Prakash S (2000) Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase eta. *Nature genetics* **25**: 458-461

Higgins NP, Kato K, Strauss B (1976) A model for replication repair in mammalian cells. *JMolBiol* **101**: 417-425

Johnson RE, Washington MT, Haracska L, Prakash S, Prakash L (2000) Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature* **406**: 1015-1019

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

Washington MT, Johnson RE, Prakash L, Prakash S (2003) The mechanism of nucleotide incorporation by human DNA polymerase eta differs from that of the yeast enzyme. *Mol Cell Biol* **23**: 8316-8322

Haracska Lajos
tudományos főmunkatárs
MTA SZBK
Genetikai Intézet

Szeged, 2012 04 21