



Köszönöm Dr. Tompa Péternek munkám áttekintését és dolgozatom bírálatát. Örülök, hogy nagyra értékelté kutatási eredményeimet és elismeréssel nyilatkozott eddigi tudományos tevékenységemről. Köszönöm, hogy kérdéseivel lehetőséget adott kutatási témám pozicionálásáról és további terveimről is említést tenni. Kérdéseire az alábbi válaszokat adom:

*1, Mit tart a terület legfontosabb kérdéseinek, ezen belül milyen további konkrét tervei vannak?*

A DNS hibajavítás és hibatolerancia széles kutatási területet ölel fel, amelyet jól mutat, hogy eukariótákban több mint 150 résztvevő fehérjét ismerünk, amelyek nemcsak egymással, de a sejtműködés alapvető folyamataival, mint pl. a DNS replikáció, rekombináció és sejtciklus szabályozás is szoros kölcsönhatásban működnek. A DNS hibatolerancia jelentőségét bizonyítja, hogy a rendszer számos génjének mutációja öröklődő betegségekhez vezet. Ezek közül kiemelném azokat, amelyekkel saját kutatásaink során is kapcsolatba kerültünk: ilyen a polimeráz éta inaktivációja következtében kialakuló bőrrákra hajlamosító genetikai betegség a *Xeroderma pigmentosum* variáns formája, a BLM és Werner helikázok mutációi következtében kialakuló genom instabilitással is járó Bloom- illetve Werner-szindróma, és a DNS kettős szálú töréseinek javításában szerepet játszó BRCA1 és BRCA2 mutációk, amelyek többek között emlődaganatra hajlamosítanak. Remélhetőleg ezen genetikai betegségek molekuláris hátterének komplexebb jellemzéséhez jövőbeli kutatásaink is hozzájárulnak majd. Ezen felül három kutatási témakört emelnék ki, amelyekre fókuszálni szeretnék és véleményem szerint az elkövetkező néhány évben forró pontnak számítanak majd. 1, a hibamentes és mutációt generáló DNS hibaátírás szabályozásának további tisztázása különös tekintettel az általunk nemrégiben azonosított ubikvitin-kötő fehérjék szerepére; 2, a daganatképződésre is hajlamosító autoszómás recesszív genetikai betegség a Fanconi anémia és a károsított DNS replikációja közötti kapcsolat molekuláris részleteinek felderítése; 3, homológ rekombináció faktorainak további azonosítása és az így nyert ismeretek felhasználása a célzott géncsere fokozásához.

Terveinkről bővebben:

*1, Új ubikvitin-kötő fehérjék szerepe a DNS hibaátírásban:* A replikáció kulcsfehérjéjének a PCNA-nek az ubikvitin módosítását tanulmányozva nemrégiben azonosítottunk egy fehérjét, amelyet RLZ1-nek neveztünk el (Juhasz et. al, 2012). Azt találtuk, hogy DNS károsodást követően az RLZ1 specifikusan kötődik az ubikvitin-PCNA-hez és megvédi azt a hidrolázoktól, amelyek lehasíthatják az ubikvitint. Ezért, úgy gondoljuk, hogy az RLZ1 a PCNA-ubikvitin életidejének a szabályozásán keresztül a DNS károsodások hibamentes és mutációt generáló átírását szabályozza és a karcinogenezis szempontjából is jelentős lehet. Az RLZ1 ubikvitin-kötő motívumát több más DNS hibajavításban részt vevő fehérjében is azonosítottuk, sőt elmondható, hogy ez a motívum az eddig jellemzett fehérjéket tekintve csak a DNS hibajavításban szerepet játszó fehérjékben fordul elő. Ezért különösen izgalmas számunkra az az új fehérjecsald, amely tagjai ezt a sajátos ubikvitin-kötő motívumot tartalmazzák. A fehérjecsald általunk azonosított öt fehérjéje még teljesen ismeretlen és jövőbeli jellemzésükkel azt reméljük, hogy az RLZ1-hez hasonlóan a DNS hibaátírásban vagy más hibatoleranciában pl rekombinációban szerepet játszó új faktorokat sikerül azonosítanunk.

*2. Fanconi anémia:* A DNS hibajavítással kapcsolatba hozható genetikai betegségek közül ismereteim szerint jelenleg a Fanconi anémia molekuláris részletei a legkevésbé tisztázottak és kutatását felfokozott izgalom övezi. A Fanconi anémia génjei 15 komplementációs csoportba térképezhetőek, amely érzékelteti, hogy egy meglehetősen komplex mechanizmussal állunk szemben. Eddigi megfigyelések szerint a Fanconi anémiás betegek sejtjeiben a keresztköttő ágensek hatására kialakult keresztköttő DNS szálak kijavítása kis hatékonyságú, amely a genom instabilitásához vezet és karcinogenezist indukál. Bár bizonyos Fanconi fehérjék enzimikus aktivitásáról és kölcsönható partnereiről már sikerült kísérleti eredményekkel szolgálni, ezek a molekuláris részletek még nem alkotnak egy koherens képet. Az elmúlt évben közölt kutatási eredmények, számunkra meglepetésként, arra engednek következtetni, hogy a Fanconi anémia fehérjék szoros kölcsönhatásban állnak az érdeklődésünk középpontjában álló DNS hibaátíró fehérjékkel ui. kiderült, hogy a Rad18 fehérje elengedhetetlen a Fanconi fehérjék DNS károsodáshoz történő lokalizációjához és bizonyos Fanconi fehérjék a transzléziós polimerázok működését is segítik (Keaton & Dutta, 2011). Szintén váratlanul, az előzőekben említett speciális ubikvitinkötő motívummal

rendelkező fehérjecsald egyik tagjáról is kiderült, hogy a Fanconi fehérjék közé térképeződik (MacKay et al, 2010). Terveink között szerepel a sokáig egymástól függetlennek gondolt DNS hibaátírás és Fanconi reakcióutak funkcionális kapcsolatainak felderítése. Tesztelni fogjuk hipotézisünk miszerint a Fanconi anémia fehérjék a Rad18 reakcióúttal együttműködve végső soron a keresztkötött DNS replikációját hivatottak elősegíteni.

#### *Homológ rekombináció:*

A homológ rekombináció többek között kulcsfontosságú mechanizmust jelent az elakadt replikációs villa menekítésében és a genom stabilitásának a megőrzése szempontjából is. Ugyanakkor gyakorlati jelentősége is óriási mivel a génmanipulációs eljárások a homológ rekombinációra alapozva hajtanak végre hely-specifikus cseréket a genomban - gondoljunk itt pl. a génkiütött egérvonalak készítésére.

Saját kutatásaink során az elmúlt néhány évben sikerült egy human sejtes alapú homológ rekombináció hatékonyságot mérő riporter rendszert létrehozunk, amely a GFP és a DsRed egyszerű színmarkerek segítségével méri a random és homológ rekombinációval történt stabil génbeépülések arányát és hatékonyságát. A rendszer segítségével adott gének illetve mutációk homológ rekombinációra gyakorolt hatását jellemezhetjük. Ezen felül, a kifejlesztett riporter rendszer lehetőséget nyújt nagyléptékű szűrésekhez, amelyek célja lehet rekombinációs határfokot befolyásoló új faktorok azonosítása. Eddig siRNS könyvtárral végzett génleütések és fehérje túltermelő könyvtár felhasználásával végzett fehérje túltermelések hatását vizsgáltuk a homológ rekombinációs frekvenciára, és tervbe vettük egy szintetikus kismolekula könyvtár tesztelését is. Sikerült több olyan gént azonosítanunk, amelyek leütése vagy túltermelése jelentős hatást gyakorol a homológ rekombinációra. Végső célunk egyrészt új homológ rekombinációs gének azonosítása másrészt, alkalmazott kutatásként, a kifejlesztett homológ rekombinációt fokozó gén és molekula koktélok segítségével az irányított géncserék hatékonyságának a fokozását elősegíteni.

*2, Lát-e arra lehetőséget, hogy eredményei a rák diagnózis/terápia területén esetleg a közeljövőben közvetlenül is hasznosulhatnak?*

Általánosan elfogadott, hogy a mutációk legnagyobb része a károsított DNS replikációja során keletkezik. Genetikai bizonyítékok szerint az általunk vizsgált ún. Rad6-Rad18 reakcióút egyik ága a károsított DNS hibamentes, míg másik ága a mutációk kialakulásával járó átírást biztosítja. Ismert, hogy a hibamentes út résztvevőinek, pl. polimeráz eta,

inaktiválása genom instabilitáshoz és fokozott karcinogenezishez vezet, míg a mutációk árán történő hibaátírás szereplőinek, pl. polimeráz zéta, gátlása csökkenti a pontmutációk kialakulásának frekvenciáját.

A napjainkban látványosan fejlődő célzott tumor terápia során gyakran kialakuló gyógyszerrezisztencia egyik fő oka a célfehérjében megjelenő új mutáció, amely a továbbiakban gátolja a gyógyszermolekula kötődését. Ennek egyik iskolapéldáját szolgáltatja a krónikus mieloid leukémiában szenvedő betegek célzott terápiaja a glivec nevű kis molekulával, amely inhibitora a betegségért felelős szuperaktív Bcr-Abl tirozin kináznak. Sajnos gyakori eset, hogy egy hosszabb vagy rövidebb látványosan sikeres kezelési időszak után a beteg rezisztenssé válik a glivec-re. Kimutatták, hogy legtöbb esetben a rezisztencia oka a Bcr-Abl kinázban kialakult új pontmutáció, amely gátolja a gyógyszermolekula kötődését (Santos et al, 2011). Különösen gyorsan alakulnak ki új mutációk, ha a célzott tumor terápiát hagyományos DNS károsító ágensekkel kombinálva alkalmazzák, amelyért a károsított DNS mutáció árán történő átírása a fő felelős. Az általunk is vizsgált mutációt generáló reakcióút inaktiválása az új mutációk kialakulásának a sebességét kísérleti rendszerekben drasztikusan csökkenti ezért feltételezhetően a mutagén DNS hibaátírás szereplőinek, pl. polimeráz zéta, gátlása csökkenthetné a gyógyszerrezisztencia kialakulását a célzott terápia során. Nem meglepő tehát, hogy számos próbálkozás történik az ismert hibaátíró DNS polimerázokat illetve az ezeket szabályozó kulcsfehérjéket gátló potenciális gyógyszermolekulák azonosítására. Ezen a területen a DNS hibaátírás új szereplőinek azonosítására és biokémiai jellemzésére irányuló kutatásaink elsősorban új gyógyszer-célpontokat azonosíthatnak.

Az általunk vizsgált gének tumor diagnosztikai értékére is számos jelzést találunk. Ezek közül kiemelném a HLTF gén promóterének hipermetiláltságát, amely vastagbél-daganatok mintegy negyven százalékában előfordul és a vérszérumból történő korai diagnózis kapcsán tűnik ígéretesnek (Moinova et al, 2002).

Végezetül szeretném újra megköszönni Dr. Tompa Péternek dolgozatom bírálatát.

### **Hivatkozások:**

Szilvia Juhasz, David Balogh, Ildiko Hajdu, Peter Burkovics, Mark A. Villamil, Zhihao Zhuang, Stephen J Elledge and Lajos Haracska (2012) Identification of human RLZ1, an antagonist of PCNA deubiquitylation and safeguard of replication stress response (submitted manuscript)

Keaton MA, Dutta A (2011) Rad18 emerges as a critical regulator of the Fanconi anemia pathway. *Cell Cycle* **10**: 2414-2415

MacKay C, Declais AC, Lundin C, Agostinho A, Deans AJ, MacArtney TJ, Hofmann K, Gartner A, West SC, Helleday T, Lilley DM, Rouse J (2010) Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell* **142**: 65-76

Moinova HR, Chen WD, Shen L, Smiraglia D, Olechnowicz J, Ravi L, Kasturi L, Myeroff L, Plass C, Parsons R, Minna J, Willson JK, Green SB, Issa JP, Markowitz SD (2002) HMTF gene silencing in human colon cancer. *ProcNatlAcadSciUSA* **99**: 4562-4567

Santos FP, Kantarjian H, Quintas-Cardama A, Cortes J (2011) Evolution of therapies for chronic myelogenous leukemia. *Cancer J* **17**: 465-476

Haracska Lajos  
tudományos főmunkatárs  
MTA SZBK  
Genetikai Intézet

Szeged, 2012 04 25