

## **AZ EVOLÚCIÓ MOTORJÁNAK VIZSGÁLATA; BETEKINTÉS AZ SZBK GENETIKAI INTÉZET MUTAGENEZIS ÉS KARCINOGENEZIS CSOPORT KUTATÁSAIBA**

A Mutagenézis és Karcinogenezis Kutatócsoport 2003-ban alakult Haracska Lajos vezetésével, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetikai Intézetében. Az akkori viszonylag szerény lehetőségek ellenére az intézet, különösen a Genetikai Intézet akkori igazgatója, Raskó István jelentős erőfeszítéseket tett, hogy olyan, külföldön már elismerést szerzett kutatókat vonzzon haza, akik új csoportok alapításával képesek kompetitív, a tudomány élvonalába tartozó területeken kutatást folytatni. Ennek az elképzelésnek a Mutagenézis és Karcinogenezis Kutatócsoport és az érdeklődésének középpontjában álló DNS-hibajavítás tökéletesen megfelelt. Fő tudományos célként a mutációk kialakulásának sebességét és a karcinogenezist befolyásoló új gének és mechanizmusok felfedezése fogalmazódott meg.

A laboratórium megalakulása óta három megközelítéssel dolgozik. Az első megközelítés a hangsúlyt a DNS-hibajavítás komplex rendszerének viszonylag egyszerű modellorganizmusban, az élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) történő megismerésére helyezi. E modellrendszer összetett genetikai eszköztárat biztosít, mely lehetővé teszi a különböző DNS- hibajavítási utak tanulmányozását. A DNS-hibajavítás nagyfokú hasonlóságot mutat, legyen szó egy- vagy többsejtű élőlényről, hiszen a hibás régiók eltávolítása vagy tolerálása létfontosságú minden élőlény túléléséhez. Az élesztőben feltérképezett útvonalak tehát jó iránymutatást jelentenek az emberben zajló folyamatok tanulmányozásához; az egyes élesztő fehérjék homológjai fellelhetők emberi sejtekben is.

A laboratóriumban alkalmazott második megközelítés célja az élesztőben azonosított DNS hibajavító szereplők emberi megfelelőinek meghatározása, működésük humán sejtekben történő megismerése elsősorban sejtbiológiai módszerekkel vizsgálva. Ennek kapcsán a laboratórium rutinszerűen vizsgálja a DNS károsító ágensek (pl. számos tumorterápiás szer) humán sejtekre kifejtett hatását sejttúlélés, kromoszóma átrendeződés és mikroszkópos fehérje lokalizációs vizsgálatokkal, ugyanis a DNS-hibajavításban szerepet játszó fehérjék gyakran formálnak sejtmagi fókuszokat a DNS-károsító anyagokkal történő kezelés hatására. A kutatócsoport azonban jóval specifikusabb tesztek is végez, mint pl. a „Comet”-esszé, amely a sejtmagból gélelektroforézis hatására kivándorló DNS mérésével képes a DNS száltöréseket nyomon követni. Hasonlóan érdekes, és nagyon kevés laboratóriumban alkalmazott módszer az

ún. „DNS-fiber” technika, amellyel az egyedi replikációs villák haladási sebessége vizsgálható; kimutatható, ha egy adott DNS károsodás blokkolja a villa haladását, és új replikációs origók aktiválódása is pontosan vizsgálható.

A laboratóriumban folyó munka harmadik ágát az előző két megközelítésből származó információk további vizsgálata, az újonnan azonosított fehérjék tisztítása és biokémiai aktivitásuk meghatározása jelenti. A laboratóriumban a technikai eszközök jelentős tárháza áll rendelkezésre, kezdve az egyszerűbb, fehérje-fehérje kölcsönhatásokat vizsgáló *in vitro* interakciós esszéktől a DNS polimerázok aktivitási vizsgálatán és a változatos helikáz aktivitást vizsgáló módszereken keresztül az *in vitro* ubikvitilációs esszéig.

Ezt a háromlábú megközelítést alkalmazva születtek a csoport jelentősebb felfedezései, amelyek során elsőként írt le egy-egy új a DNS hibatoleranciában és karcinogenezisben szerepet játszó résztvevőt. Ezekre az alábbiakban kiragadunk néhány példát.

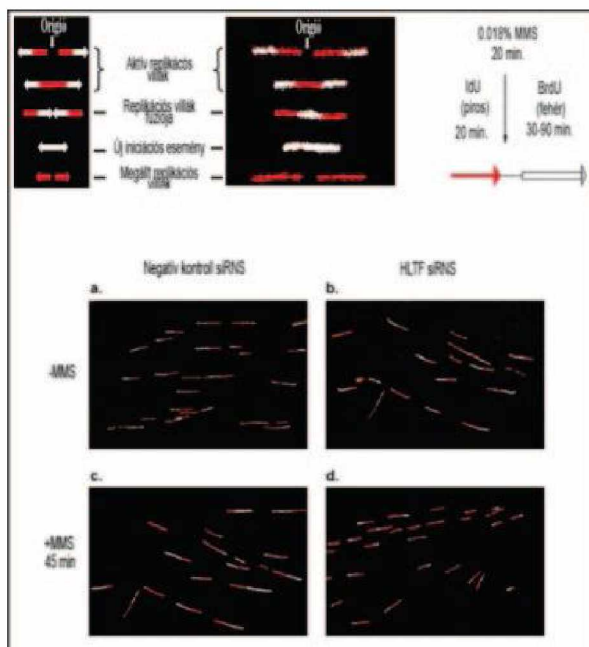
A csoport 2006-ban és 2008-ban elsőként publikálta az élesztő Rad5 fehérje két humán megfelelőjének azonosítását az SHPRH és a HLTF fehérje leírásával. Ezek közül a HLTF fehérje az, amelyik azóta is szüntelen kutatási témát biztosít. A felfedezéshez a kiindulópontot az adta, hogy az élesztőben azonosított DNS-hibatolerancia útvonalak, illetve a bennük szerepet játszó fehérjék eukariótákban nagymértékben konzerváltak. A HLTF (Helicase like transcription factor) fehérje aminosav szekvencia szinten csak kismértékű homológiát mutat az élesztő Rad5 fehérjével. Felfedezéséhez inkább az vezetett, hogy az élesztő Rad5 fehérjéhez hasonlóan, a HLTF is rendelkezik SWI/SNF helikáz doménnel, RING finger doménnel és N-terminálisán található benne egy szekvenciaelem, a HIRAN domén, ráadásul ezek a motívumok egy igen sajátos elrendeződést követnek. Irodalmi adatokból ismert volt, hogy a HLTF gén promotere metilálódik és így a fehérje nem fejeződik ki bizonyos tumorokban, ami arra utalt, hogy a fehérjének szerepe van a rákos elfajulás kialakulásának gátlásában, amely a DNS hibajavító fehérjék általános jellemzője.

A funkcionális homológia bizonyításának egyik módja annak kimutatása volt, hogy a HLTF fehérje képes menekíteni a Rad5 deléciós élesztőtörzset UV érzékenységét, azaz képes ellátni a Rad5 fehérje funkcióját a sejtekben.

Közvetlenebb bizonyítékként szolgált az, hogy a HLTf fehérje kölcsönhatásba tud lépni a Rad5 fehérje interakciós partnereivel, ui. bizonyítottuk, hogy a HLTf fehérje a DNS-hibajavítás és hibatolerancia már régóta ismert szereplőivel, a humán PCNA, Rad18, Mms2 és Ubc13 fehérjékkel működik egy komplexben.

A funkcionális homológia bizonyításához *in vitro* rekonstruáltuk azt a nyolc fehérjéből álló rendszert, melynek keretein belül a HLTf fehérje ubikvitin ligázként működve, az élesztő Rad5 fehérjéhez hasonló módon, képes volt a DNS polimerázok processzivitási faktoraként ismert PCNA fehérje poliubikvitilálására.

Azt, hogy a HLTf hogyan hat a replikációs villa stabilitására, a „DNS-fiber” módszerrel vizsgáltuk. A módszer lényege, hogy az éppen aktív replikációs villákat nukleotid analógok segítségével (IdU, CdU vagy BrdU) vizualizálhatjuk. A nukleotid analógok a szintézis során beépülnek a DNS-be, és megfelelő fluoreszcens ellenanyag segítségével kimutathatók. A módszer segítségével bizonyítottuk, hogy a HLTf fehérje hiánya a replikációs villa elakadásához, annak töréséhez és genomikus átrendeződésekhez vezethet (1. ábra).

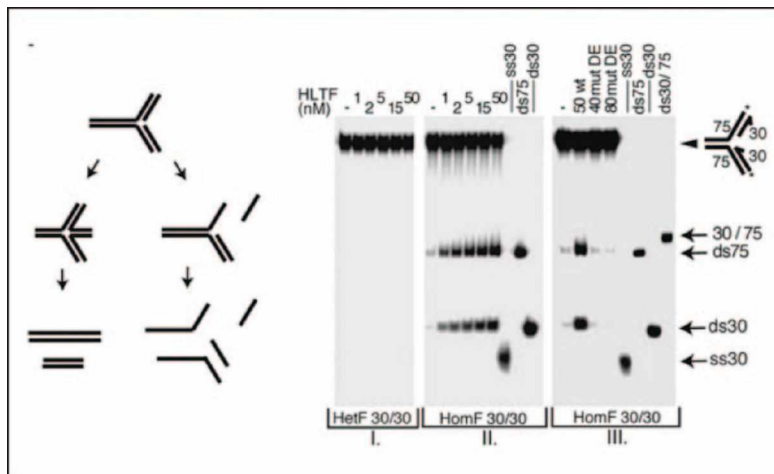


**1. ábra. A HLTf fehérje hiánya a replikációs villa elakadásához vezethet.** „DNS-fiber” módszer segítségével megjelölhetőek az éppen aktív replikációs villák nukleotid analógok segítségével. Az IdU (jóddeoxiuridin) és a BrdU (brómdeoxiuridin) a megkettőződés során beépül az újonnan szintetizálódó DNS-szádba, amely fluoreszcens ellenanyag segítségével vizualizálható. Ennek a technikának köszönhetően mutattuk ki, hogy HLTf hiányában és MMS (metilmetán szulfonát) DNS-károsító ágenssel történő kezelés után a replikációs villa elakad, mert a replikációs apparátus nem képes túljutni a hibás szakaszon.

A Mutagenesis és Karcinogenesis kutatócsoport másik jelentősebb felfedezése 2007-ben szintén az élesztő Rad5 fehérjéhez kapcsolódott. A Rad5 fehérjében található SWI/SNF2 családra jellemző helikáz motívumok arra utaltak, hogy szerepet játszhat az elakadt replikációs villa egy korábban csak elméleti lehetőségként felvetett, „csirkeláb” jellegű struktúrán keresztüli mentéséhez, így biztosítva a károsodott bázisok hibamentes, mutációt nem okozó átírását.

Ahhoz, hogy ezt az aktivitást ki tudjuk mutatni, szükség volt a replikációs villa modellezésére és *in vitro* rekonstruálására, amelyet oligonukleotidokból álló, illetve egy plazmid méretű villa létrehozásával oldottunk meg.

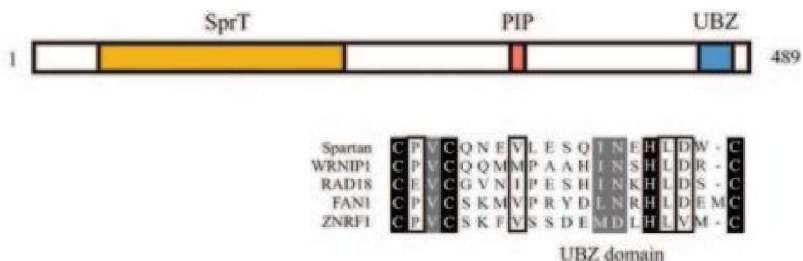
A kísérletek nemcsak azt bizonyították, hogy a Rad5 fehérje képes a replikációs villa visszafordítására, hanem azt is, hogy az általános helikázoktól eltérő módon ezt nem az egyszálú DNS-en közlekedve, a szálak szétválasztásával éri el, hanem a kettős szálú DNS-en haladva, a replikációsvilla vezető- és lemaradó szálának egyidejű szétválasztásával és ezzel szinkronban történő összehibridizálásával teszi, egyszálú köztes termék létrejötte nélkül. Ugyanezt az aktivitást később, a kutatócsoport munkafolyamatának megfelelően, a HLTf fehérjéről is bizonyítottuk (2. ábra).



**2. ábra. A Rad5 fehérje replikáció villa-visszafordító aktivitással rendelkezik.** Biokémiai módszerekkel kimutatható, hogy a Rad5 fehérje képes visszafordítani a replikációs villát, azaz szerepet játszik a DNS-hibatolerancia útvonalban. A DNS-károsodás következtében megállt replikáció folytatását úgy segíti elő, hogy helikáz aktivitása révén visszafordítja a replikációs villát, elősegíti a templátváltás folyamatát, melynek köszönhetően replikatív polimeráz számára az újonnan szintetizált hibamentes DNS-szál szolgál mintaként a másolóshoz.

Természetesen a fentebb vázolt megközelítéseken kívül gyakran használjuk új szereplők azonosítására az elérhető bioinformatikai módszereket is. Így fedeztük fel, hogy a laboratórium által mélyrehatóbban vizsgált DNS-hibatolerancia útvonalban jelentős számban vesznek részt olyan fehérjék, melyek az ubikvitin-kötő domének egy speciális változatát, a C2HC motívummal rendelkező UBZ domént tartalmazzák. Ebből arra következtettünk, hogy a folyamat szabályozásában jelentős szerepet játszó ubikvitinnek egy olyan felszíne exponált a DNS-hibatolerancia során, amely azonosítására ez a domén kifejezetten alkalmas lehet.

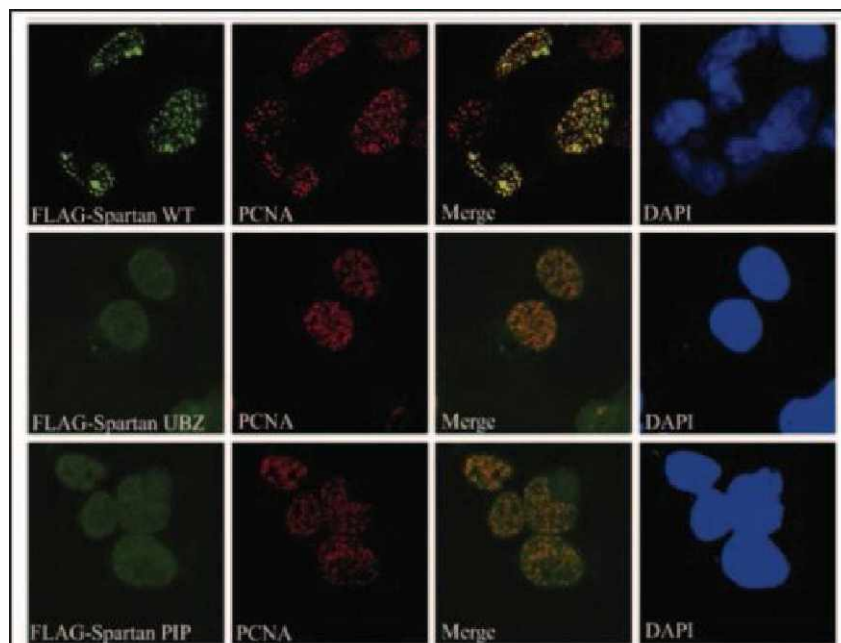
Ennek felismerése után sikerült további C2HC-típusú potenciális ubikvitin-kötőfehérjéket azonosítanunk, amelyekről még nem voltak publikációk. Ezek egyike volt a laboratóriumunk által nemrég leírt és jellemzett Spartan fehérje, amely evolúciósan konzervált PIP- (PCNA Interacting Protein), UBZ- (Ubiquitin Bindig Zinc-finger) és SprT-proteáz-doménekkel rendelkezik (3. ábra).



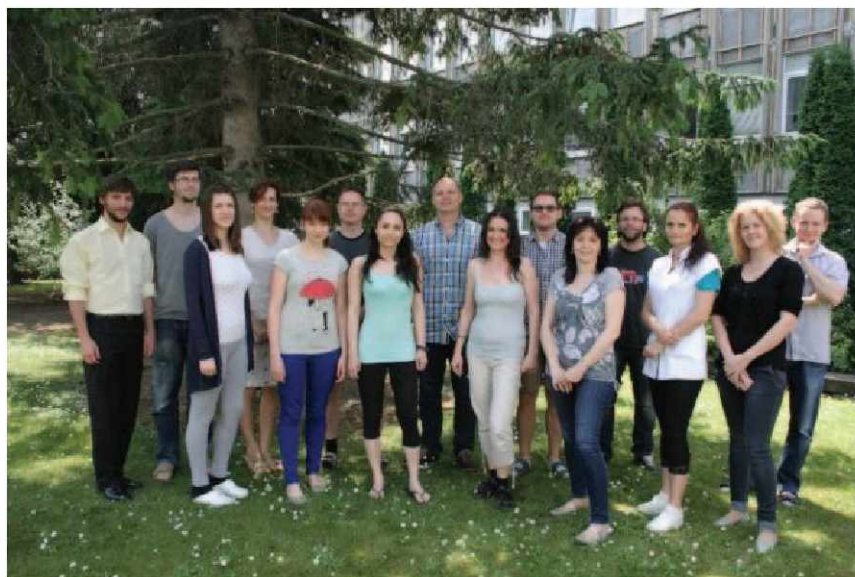
**3. ábra. A Spartan fehérje doménszerkezete.** A Spartan három funkcionális doménnel rendelkezik: egy SprT metalloproteáz doménnel, melynek funkciója még ismeretlen, egy PIP PCNA interakciós motívummal, illetve egy UBZ ubikvitinkötő cink ujj-doménnel. Ez utóbbi igen gyakran előfordul a DNS-hibajavításban szerepet játszó fehérjékben.

Kimutattuk, hogy a Spartan DNS károsodás esetén (pl. UV sugárzás) az ubikvitilált PCNA-hoz kötődik (4. ábra) és ezzel a genom stabilitásának a megőrzésében vesz részt, feltételezhetően a replikációs- és transzléziós polimerázok kicserélődését szabályozva. A polimeráz csere megvalósulásakor a replikáció tovább tud folytatódni és nem alakulnak ki száltörések, ui. a transzléziós polimerázok, amelyek flexibilisebb aktív centrummal rendelkeznek, képesek a DNS károsodásokkal szemben is nukleotid beépítésre. Ilyen transzléziós enzim például a polimeráz  $\eta$ , amely az UV-sugárzás hatására keletkező T-T dimerekkel szemben képes a megfelelő nukleotidokat beépíteni. A folyamat fontosságát mutatja, hogy a polimeráz  $\eta$  génjének mutációja egy bőrrákra erősen hajlamosító genetikai betegséget, a Xeroderma pigmentosum variáns formáját okozza és a Spartan-ról nemrégiben derült ki, hogy mutációja májrák kialakulására hajlamosít.

A Mutagenézis és Karcinogenezis Kutatócsoport az MTA SzBK legnagyobb kutatócsoportjai közé tartozik. Az egyetemi- és Ph.D. hallgatók részéről megnyilvánuló állandó érdeklődés, valamint a kompetitív terület folyamatosan biztosítja a megfelelő bázist és az új kísérleti irányokat a csoport működéséhez. A heti rendszerességgel történő munkamegbeszélések és ötletbörzék pedig kifogyhatatlan tárházat jelentik a több évtizedre elegendő új kísérletnek (5. ábra).



**4. ábra. A Spartan fehérje lokalizációja a sejtekben.** A Spartan UV-sugárzás hatására a károsodás helyére, az elakadt replikációs villához lokalizálódik a sejtmagban sejtmagi fókuszokat formálva. A lokalizációjához nélkülözhetetlen az UBZ és a PIP doménje, mellyekkel az ubikvitilált PCNA fehérjéhez kapcsolódik.



**5. ábra. A Mutagenézis és Karcinogenezis Kutatócsoport.**

**Szerzők:**

**Döme Lili**, Ph.D. hallgató, dome.lili@brc.mta.hu

**Pintér Lajos**, tudományos ügyintéző, pinter.lajos@brc.mta.hu

**Zsigmond Eszter**, Ph.D. hallgató, zsigmond.eszter@brc.mta.hu

**Haracska Lajos**, tudományos tanácsadó, csoportvezető, haracska.lajos@brc.mta.hu