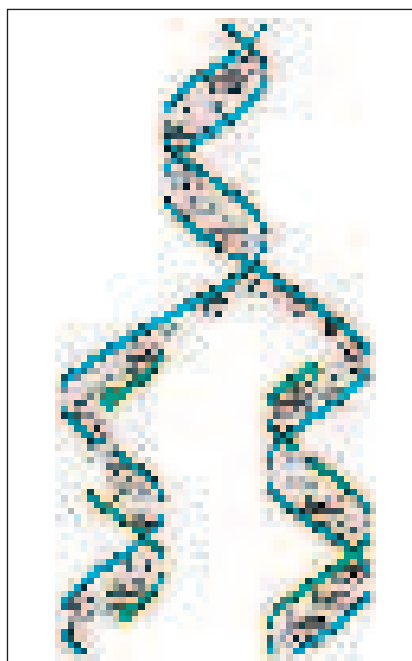


DNS-hibajavítás a megkettőződés során

Sejtjeink információtároló molekulája, a DNS meghibásodhat, amit külső és belső tényezők is okozhatnak. Külső tényezők lehetnek az UV-sugárzás, a dohányzás és a táplálékkal elfogyasztott vegyszerek, de a DNS-hibák természetes belső folyamataink révén is folyamatosan képződnek. A normál szerkezetű DNS-ből a felsorolt tényezők hatására megváltozott szerkezetű sérült DNS lesz, amely hibákat (léziókat) tartalmaz. Ezek javítása vagy másolása újra normál szerkezetű DNS-t eredményez, amelynek azonban esetenként megváltozott a bázisrendje, azaz mutációkat tartalmaz. A hibák száma naponta akár százezer is lehet sejtenként.¹ A DNS-ben képződött hibák nagy kockázatot jelentenek a sejtek és a szervezetek számára. Ezért minden élő szervezetnek szüksége van hibajavító mechanizmusokra, amelyek sokfélesége, komplexitása és a hiányukban fellépő betegségek a javítás fontosságát jelzik. Korábbi cikkünkben írtunk a hibajavító mechanizmusokról általánosságban.² Különösen veszélyes lehet azonban az, ha a DNS-anyagcserére biokémiai folyamatai (megkettőződés [replikáció], információcsere [rekombináció], RNS-re történő átírás [transzkripció]) a meghibásodott DNS-molekulákon folynak. Írásunkban a sejtosztódást megelőző DNS-megkettőződés kör végbemenő javítási folyamatairól szerzett újabb ismereteket mutatjuk be. E működés azért fontos a sejt számára, mert a hibák képződése folyamatos, viszont a megkettőződés apparátusa akár egyetlen DNS-hiba miatt leállhat. A megkettőződés megtorpanása a sejtciklus leállítását, sejthalált, nagymértékű genetikai átrendeződéseket és instabilitást okozhat, amelyek kapcsolatba hozhatók a rák kialakulásával is.

A replikációs villa és javításának fontossága

A DNS megkettőződésére azért van szükség, hogy a sejtosztódáskor mindkét utódsejtbe kerülhessen a sejt genetikai állománya egy – lehető leghűségesebben másolt – példánya. A DNS megkettőződését kiterjedt fehérjeapparátus irányítja. A megkettőződés kör először a DNS két szála el-



1. ábra. A DNS megkettőződése (replikációja). A DNS gerincét dezoxiribóz cukoregységekből és őket összekötő foszfát egységekből álló cukorfoszfát gerinc alkotja, amit az egyszerűsített ábrán szalagok jelölnek. Minden egyes dezoxiribóz-egységhez egy információhordozó ún. nukleotidbázis kötődik, amely négyféle lehet: adenin, guanin (ún. purinvázis bázisok), illetve timin és citozin (pirimidinvázis bázisok), az ábrán kezdőbetűkkel jelölve. A bázisok meghatározott párokat képeznek, melyek összetartják a DNS két szálát: az adenin timinnel, a citozin guaninnal képez párt. A megkettőződés kör a két szál szétválik, és mindkét szálról a bázispárosodás által meghatározott bázisrendű (szekvenciájú) új szál másolódik (Forrás: Wikipédia)

válk egymástól, majd a szálakat mintaként (templátként) használva történik a másolás a replikációs villának nevezett szerkezetben (1. ábra). A villa két oldala nem egyforma: az egyik (vezető) szálon a másolás folyamatosan zajlik, míg a másik (követő) szálon kisebb darabokban, ahol a közti réseket bizonyos fehérjék később kitöltik.

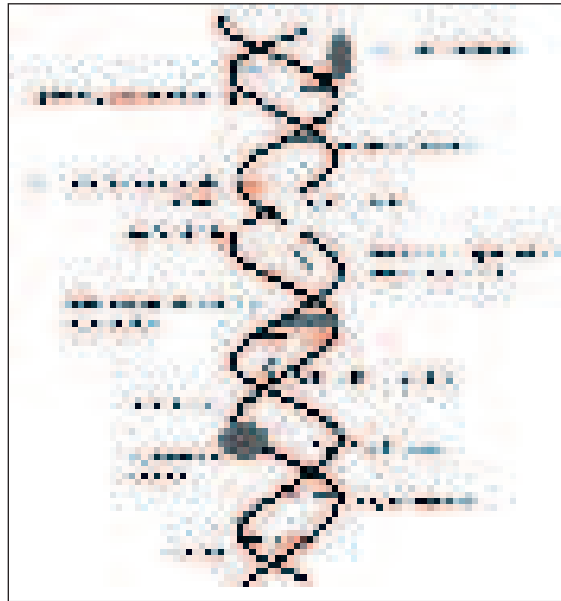
A DNS-ben sokféle hiba keletkezhet. A hibák lehetnek módosult vagy hiányzó bázisok, hiányzó kötések a cukorfoszfátgerincben, vagy az egyik szál hiánya egy adott DNS-szakaszon (2. ábra). Amennyiben a hibajavító mechanizmusok a hibákat nem javítják ki a megkettőződés előtt, ezek a replikáció leállítását okozhatják. Ezen túlmenően, a replikációs fehérjeapparátus megtorpanhat egy, a DNS-hez erősen kötött fehérje miatt, vagy más okból is széteshet, illetve leeshet a DNS-ről. A replikációs villa megállása esetén instabil szerkezet jön létre, amely könnyen széteshet és DNS-töréssé alakulhat. A DNS-törések a legveszélyesebb hibának számítanak: ha a DNS mindkét szála eltörik (kettős száltörés jön létre), az újonnan keletkezett DNS-véget a sejt kromoszómavégként ismerheti fel, ami azt eredményezheti, hogy eltérő mennyiségű és információ-tartalmú DNS-állomány kerül az osztódás során keletkező utódsejtbe. (A kromoszómák a sejt genetikai állományát [genomját] alkotó DNS különálló, fehérjékbe csomagolt egységei, amelyek a sejtosztódás során szabályozottan „szortírozva” kerülnek az utódsejtbe.) Ha a többsejtű szervezetek sejtjei már nem képesek megjavítani a nagymértékű DNS-károsodást, „öngyilkos programok” indulhatnak be. Így, bár az adott sejt elpusztul, a szervezet egésze megmenekülhet a súlyosnak károsodott sejt hibás működésének, például megállíthatatlan osztódásának a következményeitől. A replikációs villa megállása azonban olyan veszélyes genetikai változásokhoz is vezethet, amelyek következtében kontrollálatlan sejtosztódás, rákos átalakulás is létrejöhet.³ Az alábbiakban áttekintjük az elakadt replikációs villák továbbhaladását, és ezáltal a hibák elkerülését vagy türelését (tolerálását) segítő folyamatokat.

Hibatűrés polimerázváltás segítségével

A túlélés egyik módja a hibatűrés: a replikáció továbbhaladása ugyanis annyira fontos, hogy ennek érdekében a sejt a DNS-ben tárolt információ részleges elvesztésére vagy módosulásának türelésére is hajlandó. Bár a hibajavítási folyamatok közé szokás sorolni, a hibatűrés ré-

vén az eredeti hiba benn marad a DNS-ben a következőkben ismertetett módon. A replikáció során a DNS másolását végző fehérjék – a DNS-polimeráz enzimek – nagy része nem képes áthaladni a hibákon. Ezek az enzimek a DNS nagy hűséggel történő másolására optimalizá-

dását. A hibák tolerálásának azonban árvan. A hibátűrő transzléziós polimerázok az általános replikációs polimerázoknál jóval pontatlanabban másolnak: átlagosan néhány tíz vagy száz egységenként építenek be egy „rossz” (bázispárosodásnak nem megfelelő) bázist. A megkettőződés folytatásához az eredeti (replikációs) polimeráznak le kell válnia, a transzléziós polimeráznak pedig hozzá kell kötődnie a másoló apparátushoz és a másolandó DNS-molekulához. A bázisfelismerés pontosságán túlmenően, a replikációs és transzléziós polimerázok között fennálló másik fontos különbség az, hogy az utóbbiak átlagosan jóval rövidebb DNS-szakaszon (azaz kisebb processzivitással) végzik „egy futásban” a DNS-számmásolást, majd



2. ábra. DNS-hibák. Az ábrán a DNS-károsodás leggyakoribb típusait tüntettük fel. A DNS egyes pontjain hiányozhat purin-(pirossal jelölve) vagy pirimidinbázis (apurin, illetve apirimidin hely). Módosulhatnak a bázisok (alkiláció), illetve a foszfát egységek is (foszfotriészter-képződés). A DNS egyik vagy mindkét szála megszakadhat, egyszeres vagy kettős száltörést eredményezve. A DNS-molekulában gyökök (párosítatlan elektronnal rendelkező reaktív csoportok), illetve a szembenálló szálak vagy a szomszédos bázisok közötti kovalens kötések is kialakulhatnak (keresztkötés). Különböző nagymolekulák vagy a szálak közé beékelődő (interkaláló) kismolekulák kötődése is DNS-hibát hozhat létre

lódta az evolúció során: térszerkezetükben ezért a DNS-kötő rész pontosan és „szorosan” köti a másolandó DNS-szálat, hogy a másolandó nukleotidbázist (információhordozó molekularészletet) akkuratusan fel tudja ismerni. Emiatt e fehérjék aktív (DNS-szintézist végző) helyébe nem fér bele a hibák miatt torzult DNS-forma. Az ilyen DNS-polimerázok pontosságát jellemzi, hogy átlagosan csupán minden egymilliomodik lemásolt egység esetében építenek be a bázispárosodásnak nem megfelelő bázist. Kiderült azonban, hogy léteznek olyan, ún. transzléziós DNS-polimerázok, amelyek „lazább” DNS-kötőhellyel rendelkeznek, így a másolandó DNS hibás szerkezete esetén is lehetővé teszik a replikáció továbbhalá-

távoznak a DNS-ről, visszaadva helyüket a pontosabb, hosszabban futó replikációs polimeráznak.⁴

A transzléziós polimerázok esetenként a károsodott DNS-bázissal szemben véletlenszerű bázist építenek be a keletkező DNS-száalba, ami másolási pontatlanságot eredményezhet. Ez alól kivétel a polimeráz η (éta), amely nagy pontossággal képes az UV-sugárzás révén létrejött ún. timindimerekkal szemben a bázispárosodásnak megfelelő adeninbázisokat beépíteni.⁵ A pontatlanság – a kijavítatlan hibán túlmenően – mutációkat, azaz a DNS információtartalmának örökletes megváltozását is eredményezheti. A transzléziós mechanizmusok ezért rendkívül pontos szabályozás alatt állnak.

A replikáció továbbhaladása a villa visszatolásával

A replikációs villa „megmentése” és továbbhaladása érdekében nemcsak a polimeráz, hanem a DNS-templát váltása is megtörténhet. A templátváltás egyik módzata a villa visszatolása (regressziója), amelynek során a DNS régi és újonnan képződő száalai a villa mindkét ágán elválnak egymástól, és a két új szál összekapcsolódik (3. ábra). A létrejövő, immár négyágú struktúrában (ún. csirkeláb-szerkezetben) a hibamentes régi szálról másolódott új DNS-szál a hibánál elakadt rövidebb új DNS-szál mellé kerül.⁶ Ez az elrendezés alkalmas nyújt arra, hogy a hosszabb új szál átmenetileg templátként szolgáljon a rövidebb szál számára, és a csirkeláb visszarendeződése után a hibát követő szakaszon folyék tovább a DNS-replikáció.⁷ A villa-visszatolás mechanizmusát illetően sokféle elképzelés létezik, és a folyamat jelenleg is



3. ábra. Villakifordítás. Az ábrán piros vonallal az újonnan képződő, vastaggal az eredeti DNS-szálat jelöltük. A replikáció megáll, ha a vezetőszálon olyan DNS-hiba kerül a replikációs apparátus elé, amit nem képes értelmezni (a). Egy lehetséges stabilizáló és a továbbhaladást elősegítő folyamat, hogy a villakifordítás során a villa elágazási pontjának visszatolása (regresszió, szürke nyíl a „b” ábrán) révén a két új szál kapcsolódik össze eredeti partnereiktől elválva (b), és a replikációs apparátus átmenetileg a hosszabb új szálat használja mintaként (c). Ezután a replikációs villa visszarendeződhet, és a megkettőződés a hibát követő szakaszon – a hibát így kikerülve – folytatódhat (d)

intenzíven kutatott. A csirkeláb-struktúrákat elektronmikroszkóppal megfigyelték, azonban létrejöttük gyakorisága még ismeretlen.

A replikáció megmentése szálinvázióval

A templátváltás másik lehetséges módzata a szálinvázió (4. ábra). Ebben az esetben a replikációs villában a hibánál megakadt új szál vég elválik eredeti templátjától, és a hibamentes villaágon újonnan szintetizálódott szál mellé kerül: az elakadt szál vég beékelődik a hibamentes új szál és annak eredeti templátja közé. E folyamat egyes lépései hasonlóak a ko-

rábbi cikkünkben² ismertett homológ rekombináció kezdeti szakaszához. A megtorpant szál szintézisének folytatásához – a villakifordításnál látottakhoz hasonlóan – ez esetben is a másik új szál szolgál átmeneti mintául.

Ami a replikációból kimaradt

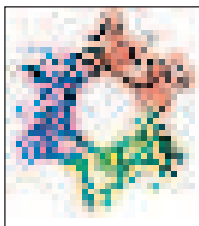
Az is megtörténhet, hogy a vezetőszálon a DNS-hiba miatt szétesett replikációs apparátus a DNS egy másik szakaszán újra összeszerelődik és a replikációs villa újraindul. Így a szintézis befejezése után a vezetőszálon a hibával szemben hiány marad. A követőszálon, ahol a replikáció a polimerázok iránybeli aszimmetriája miatt darabokban folyik, ilyen hiány a replikáció megállása nélkül is kialakulhat. Ezek a replikáció után maradt folytonosság-hiányok (ún. posztreplikációs hézagok) transzlációs szintézissel vagy szálinváziós templátváltás révén javíthatnak.⁸

A villamentés szabályozása

A fenti replikációmentő útvonalak közül a sejtnak a körülményeknek megfelelően kell választania. Ehhez a folyamatok szigorú ellenőrzése szükséges, mivel azok szimultán működése genetikai instabilitáshoz vezethet. A hibátűrő mechanizmusok további pontatlanságo-



4. ábra. Szálinvázió a replikációs villában. Az ábrán piros vonallal az újonnan képződő, vastaggal az eredeti DNS-szálakat jelöltük. A hiba (szürke pont) előtt megtorpant szál közel kerülhet a hibamentes ágon keletkezett új szálhoz, és azt templátként használva szintetizálódhat tovább



5. ábra. A PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) fehérje szerkezete. A hármas egységet (trimert) alkotó, különböző színekkel jelölt PCNA fehérjemolekulák által képzett üreg a DNS-t fogja közre. (Az ábrán bemutatott szerkezet (*Protein Data Bank* azonosító: 1AXC) nem tartalmaz DNS-t.) (Forrás: Wikipédia)

kat eredményezhetnek a DNS-másolásban, így ezek – amennyiben lehetséges – szintén visszaszorítandók. Érdekes módon azonban a hibátűrő mechanizmusok gyakrabban kerülnek alkalmazásra fejlettebb szervezetekben, míg az alacsonyabb rendű élőlények inkább a hibaelkerülő útvonalakat választják. Ennek oka a valószínűleg a fejlettebb élőlények megnövekedett genomjára vezethető vissza: nagyobb genomok esetében ugyanis a templátváltás is jelentősebb rizikóval járhat.

A PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) fehérje három azonos molekulából összeálló (homotrimer) gyűrűt képez, amely körülveszi a DNS-molekulát (**5. ábra**). A PCNA fontos hatása, hogy megnöveli a DNS-polimerázok futáshosszát (processzivitását), azaz lehetővé teszi, hogy a polimeráz DNS-hez való kötődésekor „egyvégtében” hosszú DNS-szakaszok másolódjanak.⁹ Jelen ismereteink szerint a PCNA az előzőeken túlmenően a replikációs villa mentésének szabályozásában is központi szerepet játszik. A PCNA-gyűrűre kerülnek azok a jelek, amelyek segítenek a javító útvonalak közötti választásban. Ebben az esetben a jelek szintén fehérjék, nevezetesen ubikvitin és SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) molekulák. Az ubikvitin sokféle funkcióval bír, először fehérjelebontási szignálként azonosított jelmolekula, amely egyenként vagy változatos hosszúságú és szerkezetű láncokban módosítja más fehérjék funkcióját, elhelyezkedését vagy életidejét.¹⁰ Ha a PCNA egy adott pontjára egy ubikvitin-molekula kerül, a DNS-hibajavítás a polimerázváltás és a hibátűrés felé terelődik. Ha az első ubikvitin-jelre további ubikvitin-egységek kapcsolódnak (ún. poliubikvitin-láncot létrehozva), akkor a templátváltás folyamatai aktiválódnak. Megemlítendő, hogy ennek a poliubikvitin-láncnak a szerkezete eltér a fehérjék lebontását beindító szignálétól.¹¹ A SUMO-fehérje szintén kapcsolódhat a PCNA-molekulához: ennek hatására csökken a replikációs villa összeomlásának és a csirkeláb-struktúra kettős száltöréssé alakulásának valószínűsége.¹²

A cikkünkben vázolt replikációmentő mechanizmusokat az élő sejtekben jelenleg is intenzíven kutatják. E folyamatok szereplőinek, mechanizmusának, gyakoriságának és kimenetelének pontosabb megismerése alapvető fontosságú a normális és a rákos sejt működés megismeréséhez és a célzott beavatkozások tervezéséhez.

KOCSIS ZSUZSA –
HARACSKA LAJOS –
SZÜTS DÁVID –
KOVÁCS MIHÁLY

Irodalom

- [1] Lodish, H, Berk A., Matsudaira P, Kaiser CA., Krieger M, Scott, M P, Zipursky S L, and Darnell J. (2004). *Molecular Biology of the Cell* (2004) (WH Freeman: New York, NY. 5th ed.
- [2] Gyimesi M, Vellai T, Kovács M. A genetikai állomány stabilitása: helikáz enzimek szerepe a DNS-hibajavításban, *Term. Vil. Mar* 2010;141(3):99-103.
- [3] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. Jan 7 2000;100(1):57-70.
- [4] Johnson RE, Washington MT, Haracska L, Prakash S, Prakash L. Eukaryotic polymerases ι and ζ act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature*. Aug 31 2000;406(6799):1015-1019.
- [5] Masutani C, Araki M, Yamada A, et al. Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *Embo J*. Jun 15 1999;18(12):3491-3501.
- [6] Blastyak A, Pinter L, Unk I, Prakash L, Prakash S, Haracska L. Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Mol Cell*. Oct 12 2007;28(1):167-175.
- [7] Unk I, Hajdu I, Blastyak A, Haracska L. Role of yeast Rad5 and its human orthologs, HLTf and SHPRH in DNA damage tolerance. *DNA Repair (Amst)*. Mar 2;9(3):257-267.
- [8] Sale JE, Batters C, Edmunds CE, Phillips LG, Simpson LJ, Szuts D. Timing matters: error-prone gap filling and translesion synthesis in immunoglobulin gene hypermutation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Mar 12 2009;364(1517):595-603.
- [9] Majka J, Burgers PM. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2004;78:227-260.
- [10] Pickart CM, Fushman D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol*. Dec 2004;8(6):610-616.
- [11] Ikeda F, Dikic I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. „Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects” review series. *EMBO Rep*. Jun 2008;9(6):536-542.
- [12] Gali H, Juhasz S, Morocz M, et al. Role of SUMO modification of human PCNA at stalled replication fork. *Nucleic Acids Res*. Jul 2012; 40(13):6049-6059.

Kocsis Zsuzsa munkáját a TÁMOP 4.2.4. A-1 kiemelt projekt keretében meghirdetett ösztöndíj támogatja, a Magyar Állam és az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával.