

UNK ILDIKÓ

DNS-javítás

A 2015-ös kémiai Nobel-díj

2015-ben a kémiai Nobel-díjat megosztva kapta három kutató, Tomas Lindahl, Aziz Sancar és Paul Modrich a DNS-javító folyamatok mechanizmusainak megismerésében végzett kiemelkedő, úttörő munkájukért (**1. ábra**). A három kutató egymástól függetlenül ért el kimagasló eredményeket a DNS-javító mechanizmusok három különböző fajtájának felderítésében. Munkájuk jelentősen hozzájárult ahhoz, hogy megértsük, a DNS-ben keletkezett hibák hogyan azonosíthatók, illetve milyen enzimek és milyen módon javítják a hibákat. Mivel a kijavíthatatlan DNS-hibák rákos elváltozáshoz is vezethetnek, a javító folyamatok feltárása új rákterápiák kidolgozását is lehetővé tette.

A svéd születésű *Tomas Lindahl* a stockholmi Karolinska Intézetben diplomázott, itt szerezte meg PhD-fokozatát, és végezte el orvosi tanulmányait. Saját bevallása szerint merész döntést hozott, amikor a biztosnak mondható orvosi karrier helyett az izgalmasnak, de bizonytalannak tűnő kutatói pályát választotta. Több neves intézetben dolgozott, mint az amerikai Princeton és Rockefeller, valamint a svéd Karolinska Intézet. Kutatói pályája nagyobb részét Angliában töltötte, ahol 1986 és 2005 között a Cancer Reserch UK, Clare Hall Laboratories igazgatója volt (ma a Francis Crick Intézet része), és ahol jelenleg is dolgozik. Eredményeit azonban a Svédországban végzett kutatásai alapozták meg.

Aziz Sancar személyében az első török születésű Nobel-díjas tudóst tisztelhetjük. Hetedikként született egy nyolcgyermekes családban. Szülei irástudatlanok voltak, de nagy hangsúlyt fektettek gyermekeik oktatására, ennek köszönhetően mind a nyolc egyetemi diplomát szerzett. *Aziz Sancar* az Isztambuli Egyetem orvosi karán diplomázott, majd gyakorló orvosként dolgozott Törökországban. Néhány év után azonban az Egyesült Államokba utazott, hogy molekuláris biológiát tanuljon a Texasi Egyetemen, ahol PhD-fokozatát is megszerezte. Azóta is az Államokban él, jelenleg az Észak-Karolinai Egyetemen professzor, de török állampolgárságát, az amerikai mellett, máig megtartotta.

A harmadik díjazott *Paul Modrich* amerikai biokémikus, a legnevesebb amerikai egyetemeken tanult. A Mas-

achusettsi Műszaki Egyetemen (MIT) diplomázott, majd doktori fokozatát a Stanford Egyetemen szerezte. 1976 óta az észak-karolinai Duke Egyetem kutatója, jelenleg professzora. A még gimnazista *Modrich*-nak édesapja, a biológia szakos középiskolai tanár javasolta, hogy minél többet igyekezzen megtudni a DNS-ről. Nem is sejtette, tanácsával milyen rendkívül sikeres kutatói pálya felé terelte fiát.

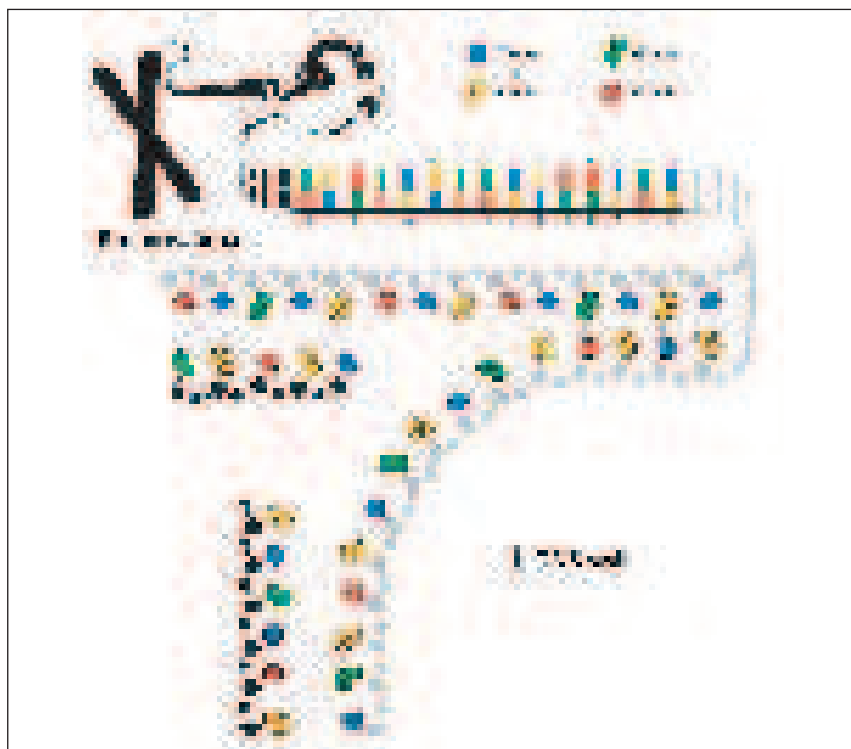
Mindhárom tudós azt vizsgálta, miként javítható a DNS-ben előforduló hibák. Hogy munkájukat megértsük, nézzük meg, miért keletkeznek hibák a DNS-ben, és miért kell kijavítani őket. A sejteink felépítését, működését meghatározó információt a sejtmagban található DNS-molekulák tárolják. A DNS kettős spirálját legkönnyebben talán úgy képzelhetjük el, mint egy hosszú létrát, amit a függőleges szimmetriatengelye mentén elcsavartunk. A létra két lábát ugyanazok az ismétlődő egységek, foszfátcsoporttal összekapcsolt cukormolekulák alkotják, míg az információ a létra fokait alkotó, a cukormolekulákhoz kapcsolódó bázisokban rejlik. A DNS-ben négyféle bázis található, adenin, timin, citozin és guanin. Az adenin a timinnel, a citozin a guaninnal képes úgynevezett bázispárt alkotni másodlagos kémiai kötések révén, ezért a létra egyik lábához kapcsolódó adeninnel szemben a másik lábán mindig timin lesz, a citozinnal szemben pedig guanin (**2. ábra**). Így az egyik láb, vagyis DNS-szál bázissorrendje, más szóval szekvenciája, meghatározza a másik DNS-szál szekvenciáját. Az információ az egymás után következő bázisokban, a bázissorrendben kódolt. Minden olyan hatás, ami megváltoztatja a bázisok minőségét vagy sorrendjét, egyúttal az információ változásához is vezet, ami viszont módosíthatja a sejtek működését, akár rákos folyamatokat, vagy sejthalált indíthat be.



1. ábra. Tomas Lindahl, Aziz Sancar, Paul Modrich

Lindahl és a BER

Lindahl egyik igen fontos korai felfedezése, ami hozzájárult a Nobel-díj odaítéléséhez, arra az egyszerű kérdésre adott választ, hogy mennyire stabil a DNS-molekula. Az 1970-es évek elején még

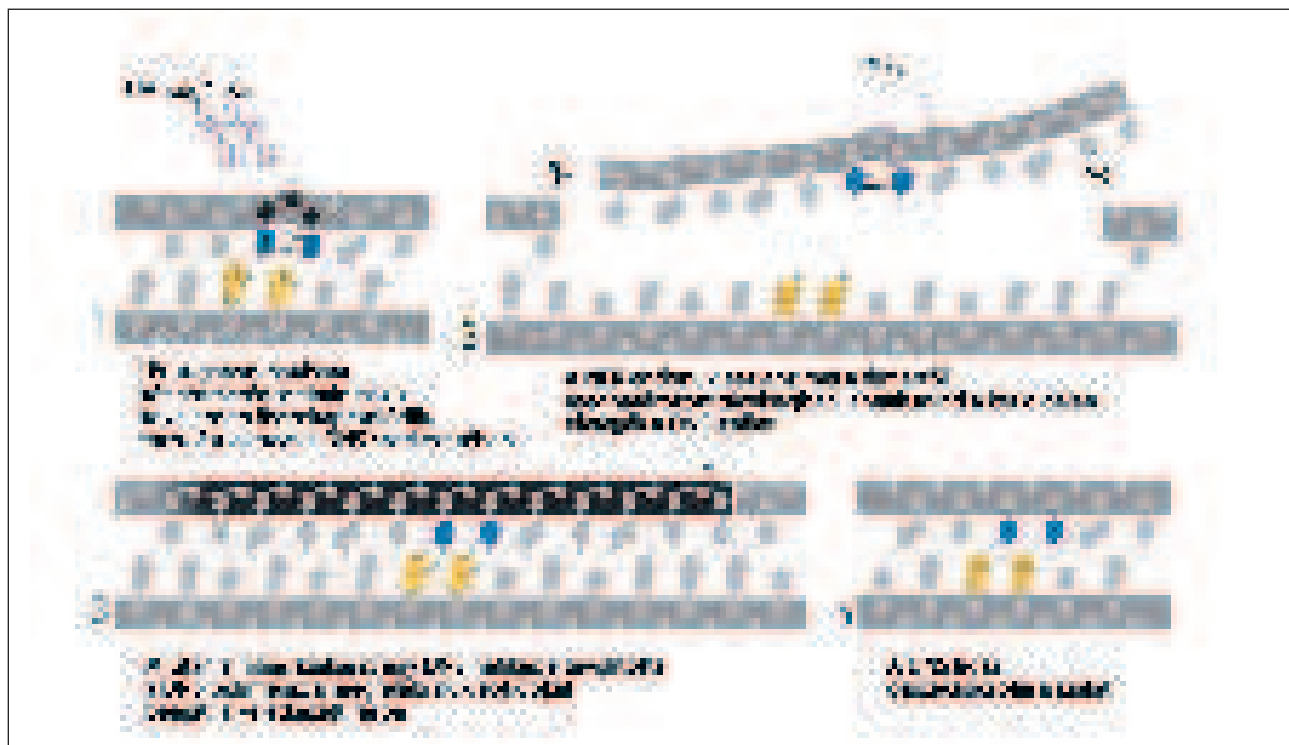


2. ábra. A DNS felépítése. A DNS gerincét alkotó cukor- és foszfátcsoportok szürke színűek, a cukorhoz kapcsolódó bázisok színesek
(http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/fig_ke_en_15_dnastructure.pdf)

elfogadott nézet volt a kutatói társadalomban, hogy a DNS rendkívül stabil. Ez összhangban állt a szerepével, hogy a benne kódolt genetikai információt sejtosztódásról sejtosztódásra változatlan formában kell az utódsejteknek átadni. Lindahl a 60-as évek vége felé a Princeton Egyetemen RNS-molekulákkal dolgozott, és azt tapasztalta, hogy ha melegíti az RNS-t tartalmazó mintákat, az RNS gyorsan lebomlik. Az RNS hasonlóan épül fel, mint a DNS, de csak egy százból áll, gerincét egy másik cukor alkotja, valamint az adenin, citozin és guanin bázisok mellett a timin helyett uracilt tartalmaz. Lindahlban felvetődött a kérdés: Vajon a DNS mennyire stabil? A választ pár évvel később, visszatérve a Karolinska Intézetbe, sikerült megadnia, mikor kimutatta, hogy a DNS folyamatos spontán kémiai reakcióknak van kitéve, amelyek módosítják a bázisokat, illetve azok elvesztését is okozhatják. Eredményeit 1972-től kezdve több publikációban jelentette meg [1–3]. Az általa felfedezett külső hatás nélkül létrejövő reakciók mértékét jól szemlélteti, hogy egy emlőssejt egy nap alatt kb. tízezer bázist veszít el a genomját alkotó DNS-molekulákból. A citozin spontán deaminációja során uracillá alakul, ami nem alkotóeleme a DNS-nek, ráadásul

3. ábra. A báziskivágó rendszer alapvető lépései
(http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/fig_ke_en_15_baseexcisionrepair.pdf)





4. ábra. A nukleotidkivágó rendszer működése

(http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/fig_ke_en_15_nucleotideexcisionrepair.pdf)

a guanin helyett az adeninnel képes bázispárt alkotni. Egyértelművé vált, hogy e reakciók eredményeként a bázisokban tárolt információ módosulhat, vagy el is veszhet. Ezek az adatok rámutattak arra, hogy a DNS és a benne tárolt információ meglehetősen sérülékeny, és egy védő, karbantartó rendszer hiányában bizonyosan nem alakulhatott volna ki az élet a ma ismert formájában. Lindahl figyelve ezek után a karbantartást végző enzimek és azok működésének felderítésére irányult. Ennek során fedezte fel azt a DNS-javító rendszert, amit 1974-ben közölt tudományos cikkében *báziskivágó rendszernek* (base excision repair, BER) nevezett el [4].

A báziskivágó rendszer olyan egy bázist érintő hibákat javít, amelyek nem okoznak nagy módosulást a DNS háromdimenziós szerkezetében [5]. Ilyen DNS-hibák például a bázisok hidrolízise, oxidációja, alkilációja. Első lépésként a DNS glikoziláz enzimek felismerik a módosult bázist és eltávolítják a DNS-ből (3. ábra). A DNS glikozilázok specifikusak a módosult bázisra, így számos glikoziláz található a sejtben. A reakció eredményeként a DNS-szálon egy bázis nélküli cukor marad vissza, úgynevezett abázikus hely keletkezik. A következő lépésben egy AP (apurinic/aprimidinic) endonukleáznak nevezett enzim az abázikus helynél elhasítja a

DNS-szálat és eltávolítja a bázis nélküli cukormaradékot. A létrejött egyes szálú rést egy DNS polimeráz tölti be egy nukleotid (a DNS építő köve, cukorhoz kapcsolódó bázisból és három foszfát-csoportból áll) beépítésével, a szemközti, ép szál bázisa alapján választva ki a megfelelő nukleotidot. A beépítés után a szál folyamatosságát egy DNS ligáz nevezetű enzim állítja helyre. A báziskivágó rendszer most ismertett folyamatának különböző variációi léteznek. Vannak kettős funkciójú DNS glikozilázok, amelyek nemcsak a bázist távolítják el, hanem a DNS-szál hasítását is elvégzik, igaz, más mechanizmussal, mint az AP endonukleázok. Ezen kívül különbség lehet az újonnan beépített nukleotidok számában is. Az SP (short patch) BER során csak egyetlen nukleotid, míg LP (long patch) BER esetén 2–12 nukleotid beépítése történik, amit a két különböző folyamatban más-más enzimek hajtanak végre. A báziskivágó rendszer, illetve működésének felfedezése a másik jelentős eredménye Lindahl-nak, ami a Nobel-díj elnyeréséhez vezetett.

Sancar, a NER és a fotoliáz

A báziskivágó rendszer glikoziláz enzimeit specifikusak egy-egy DNS-hibára. Azonban a DNS-t számtalan sok hatás

éri, nemcsak a sejt belső környezetéből, hanem a külvilágból is, mint például a Naptól érkező ultraibolya (UV-) sugárzás, radioaktív sugárzások, illetve a sejtbe kívülről bejutó kemikáliák. Ezek a hatások rendkívül változatos módosulásokat okozhatnak a DNS-ben, akár több bázist is érinthetnek egyszerre, vagy a cukormolekulákat is módosíthatják, így ezek javítása meghaladja a báziskivágó rendszer kapacitását.

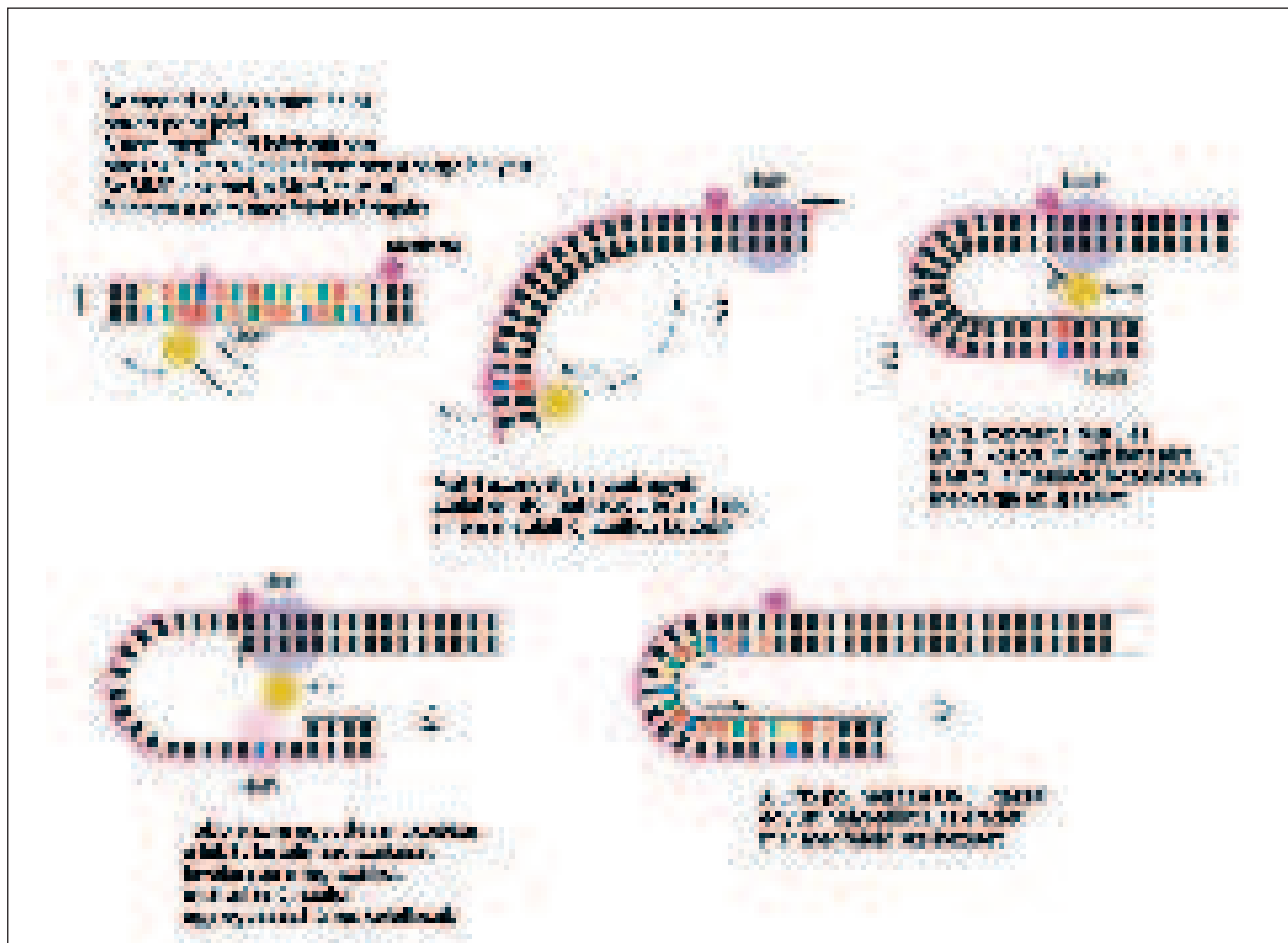
Létezik egy olyan javító rendszer a sejtben, ami nem olyan specializált, mint a báziskivágó rendszer, és a DNS-hibák széles skáláját képes felismerni és kijavítani. Ez a *nukleotidkivágó rendszer* (nucleotide excision repair, NER), ami a DNS háromdimenziós szerkezetében beálló változások, eltérések alapján találja meg a hibákat [6]. Aziz Sancar 1983-ban publikálta kísérleteit, melyekben sikerült kinyernie baktériumsejtekből a nukleotidkivágó rendszer enzimeit, és segítségével a sejtben kívül rekonstruálni működésének alapvető lépéseit [7]. A NER működése során, a hiba lokalizálását követően, két endonukleáz egyes szálú hasítást végez a hibát tartalmazó szálon a hiba két oldalán meghatározott, pár nukleotid távolságban (4. ábra). Egy DNS helikáz eltávolítja a hibát tartalmazó kivágott szakaszt a DNS-ből egy egyes szálú, 10–12 nukleotidos rést eredményez-

ve. Ezt a rést egy DNS polimeráz tölti fel nukleotidok beépítésével, majd egy DNS ligáz visszaállítja a DNS-szál folyamatosságát. Sancar később, másokkal együtt, emlősféhrjéjkkal is igazolta, hogy a folyamat alapvetően ugyanúgy megy végbe az egyszerű baktériumokban, mint a sokkal fejlettebb és összetettebb emlőssejtekben [8].

baktériumok növekedése újraindul, sokkal gyorsabban, mint a sötétben tartottaké. A jelenséget az 1940-es évek végén írták le, és hamarosan az is bebizonyosodott, hogy az aktivációért egy fehérje, egy enzim aktivitása a felelős. Az enzimet, a fotoliázt kódoló gént Aziz Sancar klónoztta meg, vagyis azonosította és nyerte ki baktériumokból még PhD-hallgató korá-

Modrich és az MMR

Egy nyugvó, azaz nem osztódó sejtben a báziskivágó rendszer és a nukleotidkivágó rendszer enzimei folyamatosan pásztázzák a DNS-molekulákat, hogy kijavítsák a spontán, vagy külső hatásra keletkezett hibákat, eltéréseket. Azonban van a DNS-hibáknak egy harmadik forrása is,



5. ábra. A metiláció-irányított MMR

(http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/fig_ke_en_15_mismatchrepair.pdf)

A nukleotidkivágó rendszer által javított DNS-hibák közé tartozik a TT dimer is. A TT dimerben egyazon DNS-szál két szomszédos timin bázisa van kovalens kémiai kötéssel összekapcsolva. UV-sugárzás hatására jön létre, és merev szerkezete a DNS kettős spirál lokális torzulását okozza. A TT dimerek eltávolítása a DNS-ből nem csak a nukleotidkivágó rendszer révén történhet. Létezik egy ősbibb, fotoreaktivációnak nevezett folyamat, ami tulajdonképpen az első DNS-javító mechanizmus, amit élő sejtekben sikerült megfigyelni [9]. Az elnevezés arra a jelenségre utal, amikor az UV-sugárzásnak kitett baktériumok növekedése megáll, majd a látható fényvel megvilágított

ban, 1978-ban [10]. Évekkel később újra visszatért a fotoliáz vizsgálatához, részletesen jellemezte az enzimet és meghatározta működését [11–13]. Azonosította az enzimenben a két kromofórnak nevezett részt, ami képes a fény energiáját elnyelni és kémiai energiává alakítani, amit az enzim a TT dimer két bázisa közötti kémiai kötés felszakításához használ fel. A fotoliáznak fontos szerepe van a baktériumok, gombák, növények UV elleni védekezésében. Emlősökben nincs fotoliázaktivitás, de a fotoliázhoz hasonló gén megtalálható. Aziz Sancar a nukleotidkivágó rendszer és a fotoliáz működésének feltárásáért kapta meg a kémiai Nobel-díjat.

aminek ellensúlyozására egy újabb javító rendszer fejlődött ki az evolúció során. Ez a hibaforrás a DNS kettőződése, a replikáció. Amikor a sejt osztódás előtt áll, meg kell kettőznie a DNS-ét, hogy mindkét utódsejt a kiindulási sejtrel azonos információtartalmú DNS-sel rendelkezzen. A replikáció során a DNS két szálát enzimek szétválasztják, és a DNS polimeráz mindkét szállal szemben egy újabb szálát szintetizál nukleotidok felhasználásával, a kiindulási szálak szekvenciája, bázissorrendje alapján, a bázispárosodás szabálya szerint. A replikációt végző DNS polimerázok rendkívül pontosan működnek, nagyon ritkán építenek be oda nem illő nukleotidot. Ha ez mégis

megtörténik, a kialakuló nem megfelelő bázispár torzult szerkezetét a polimeráz érzékeli, és exonukleáznak nevezett aktivitása révén rögtön el is távolítja a beépített rossz nukleotidot, és kicseréli a megfelelőre. Még ennek az önellenőrzésnek az ellenére is előfordul azonban, hogy egy nem megfelelő nukleotid épül be az új DNS-láncba és egy módosult szerkezetű hibás bázispár jön létre. A replikáció során kialakuló hibás bázispár, angolul mismatch, javítását az MMR (mismatch repair) végzi, csakúgy, mint a replikáció során keletkezett kisebb deléciók (1–2 nukleotid hiánya), és inszerciók (1–2 extra nukleotid beépülése) javítását is [14]. Az MMR egy kivágó rendszer, hasonlóan a BER-hez és a NER-hez. Miután az MMR enzimek azonosították a hibás bázispárt, az egyik MMR enzim endonukleáz-aktivitása révén egy egyes szálú hasítást végez a hibát tartalmazó szálon, attól akár ezer nukleotid távolságban, majd több enzim együttese a bevágott szálát a hibás bázispár felé haladva szétválasztja a másik száltól (5. ábra). A leválasztott szálát egy exonukleáz folyamatosan darabolja, míg a hibás bázispáron túljutva megáll a folyamat, egy egyes szálú rést hagyva maga után. Ezt a rést egy DNS polimeráz betölti, és egy ligáz helyreállítja a DNS-lánc folyamatosságát. Az MMR során nem károsodott, módosult nukleotidokat kell eltávolítani, mint a BER és NER esetén, így felmerül a kérdés, hogyan különböztetik meg az MMR enzimek, hogy a hibásan párosodott, de egyébként normális, ép két nukleotid közül melyik volt az eredeti szálaban, és melyik épült be hibásan. Más szóval, hogyan különböztetik meg az enzimek a régi DNS-szálat az újonnan felépített száltól? A Modrich által vizsgált *Escherichia coli* bélbaktérium egy egyszerű, de hatékony módszert alkalmaz erre [15]. Egy metiláz nevű enzim a baktérium DNS-ét metilált állapotban tartja, vagyis kis metilcsoportokkal jelöli meg a bázisokat meghatározott szekvencia-környezetben. Így replikáció során is az eredeti szál metilált, azonban az újonnan felépülő szál még nem metilált, mert a metiláz enzimek a replikációhoz képest késleltetve végzik munkájukat. Az MMR fehérjék a metilcsoportok révén felismerik az eredeti szálat és a bevágást a másik, új szálon ejtik meg. Mint később fény derült rá, a baktériumok többségében, csakúgy mint a magasabb rendű sejtekben, nem a metiláció irányítja az MMR működését. Ehelyett az új szálaban fellelhető, a replikáció mechanizmusa miatt kialakuló átmeneti rések, illetve a replikációban résztvevő fehérjék segítik az MMR enzimek szálfelismerését. Mindebből az is következik, hogy az

MMR szorosan a replikációhoz kapcsolatosan működik, hogy a megkülönböztető szignálok még azonosíthatóak legyenek. Modrich-nak döntő szerepe volt mind a metiláció irányított, mind a magasabb rendű sejtek MMR rendszere működésének megismerésében [16].

A DNS-javító rendszerek eltávolítják a DNS-ből a keletkezett hibákat és visszaállítják a DNS eredeti szekvenciáját, megőrizve ezzel a DNS-ben tárolt információt. Működésük rendkívül fontos szerepet tölt be a sejtek életében, ami jól tükröződik evolúciós konzerváltságukban is, vagyis, hogy az egyszerű baktériumsejtektől kezdve a humán sejtekig megtalálhatóak, nagyon hasonló formában. A konzerváltság a mechanizmusra és bizonyos mértékig az enzimek közötti hasonlóságra vonatkozik, de természetesen a különbségek is nyilvánvalóak. Jó példa erre a nukleotidkivágó rendszer során a hiba felismerése és a hibát tartalmazó DNS-szakasz kivágása, amit baktériumban három fehérje végez, ami humán sejtekben több mint tiz fehérje összehangolt működésének az eredménye. Míg baktériumokban a kivágott szakasz hossza 10–12 nukleotid, addig humán sejtekben 24–32 nukleotid. A másik fontos tény, ami a javító rendszerek jelentőségét hangsúlyozza, az a hibás működésük folytán kialakuló súlyos, sokszor rákra hajlamosító betegségek sora. Az MMR-rendszer hibás működése okozza a vastagbélrákok egy típusát [17], a nukleotidkivágó rendszer enzimeinek inaktiválása a rákra hajlamosító xeroderma pigmentosum nevű betegség kialakulásához vezet [18], és a báziskivágó rendszer enzimeinek hibás működéséhez is számos, különféle típusú rák előfordulása kapcsolt [19].

Nem Lindahl, Sancar és Modrich voltak azok, akik felfedezték a DNS-javítás folyamatát, azonban munkájuk, a nagy DNS-javító rendszerek működésének molekuláris szinten való jellemzése, hatalmas előrelépést jelentett a javító rendszerek kutatásában, illetve a rákhoz vezető folyamatok megértésében. ↩

Irodalom

[1]. Lindahl, T. and B. Nyberg, Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 1972. 11 (19):3610-8.
 [2]. Lindahl, T. and A. Andersson, Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 1972. 11 (19):3618-23.
 [3]. Lindahl, T. and B. Nyberg, Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 1974. 13 (16):3405-10.

[4]. Lindahl, T., An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. 71(9): 3649-53.
 [5]. Bauer NC¹, Corbett AH², Doetsch PW³. The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. *Nucleic Acids Res*. 2015 43(21):10083-101.
 [6]. Schärer OD. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013. 5 (10):a012609. doi: 10.1101/cshperspect.a012609.
 [7]. Sancar, A. and W.D. Rupp, A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell*, 1983. 33 (1):249-60.
 [8]. Mu, D., et al., Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J Biol Chem*, 1995. 270 (6):2415-8.
 [9]. Kelner, A., Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces Griseus* Conidia from Ultra-violet Irradiation Injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1949. 35 (2):73-9.
 [10]. Sancar, A. and C.S. Rupert, Cloning of the phr gene and amplification of photolyase in *Escherichia coli*. *Gene*, 1978. 4 (4):295-308.
 [11]. Sancar, G.B., et al., Action mechanism of *Escherichia coli* DNA photolyase. I. Formation of the enzyme-substrate complex. *J Biol Chem*, 1987. 262 (1):478-85.
 [12]. Jorns, M.S., et al., Action mechanism of *Escherichia coli* DNA photolyase. II. Role of the chromophores in catalysis. *J Biol Chem*, 1987. 262 (1):486-91.
 [13]. Sancar, G.B., et al., Action mechanism of *Escherichia coli* DNA photolyase. III. Photolysis of the enzyme-substrate complex and the absolute action spectrum. *J Biol Chem*, 1987. 262 (1):492-8.
 [14]. Kunkel TA¹, Erie DA². Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annu Rev Genet*. 2015 49:291-313.
 [15]. Lu, A.L., S. Clark, and P. Modrich, Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. 80 (15):4639-43.
 [16]. Lahue, R.S., K.G. Au, and P. Modrich, DNA mismatch correction in a defined system. *Science*, 1989. 245 (4914):160-4.
 [17]. Fishel, R., et al., The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 1993. 75 (5):1027-38.
 [18]. Friedberg, E.C., How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature Rev*. 2001, 1 :22-33
 [19]. Maynard S¹, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*. 2009 30:2-10.