

A sérült DNS replikációjának vizsgálata sejtízátumokban

Szeltner Zoltán, Harami Gábor, Harami-Papp Hajnalka, Kovács Mihály, Szüts Dávid

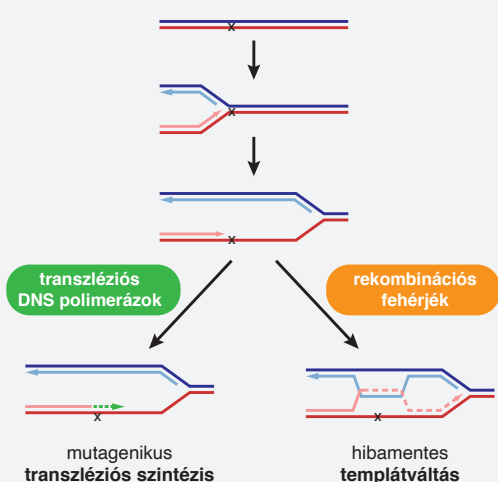


Háttér

A sérült DNS replikációja alapvető szerepet tölt be a mutációk és a daganatok kialakulásában. A folyamatról elsősorban genetikai adataink vannak, mert a résztvevő fehérjék nagy száma miatt biokémiailag nehezen vizsgálható. **Szüts Dávid (TTK Enzimológiai Intézet)** kutatócsoportja élő sejtekben tanulmányozta DNS léziókat hordozó plazmidok replikációját. Humán sejtízátumokban lehetőség nyílik plazmid DNS replikációjára a virális SV40 nagy T antigén hozzáadásával. Eredményeink szerint ez az esszé is képes a sérült plazmid másolására, megnyitva a lehetőséget a folyamat fehérjeinterakcióinak tanulmányozására vad típusú és mutáns fehérjék, valamint interakciókat gátló peptidek hozzáadásával. A kutatás keretében a speciális polimerázokat használó transzléziós szintézis, és a homológ rekombináción alapuló templátváltás folyamatát vizsgáljuk, felhasználva **Kovács Mihály (ELTE TTK Biokémia Tanszék)** csoportjának a rekombinációs fehérjék szerkezet-funkció összefüggéseiről szerzett tapasztalatait.



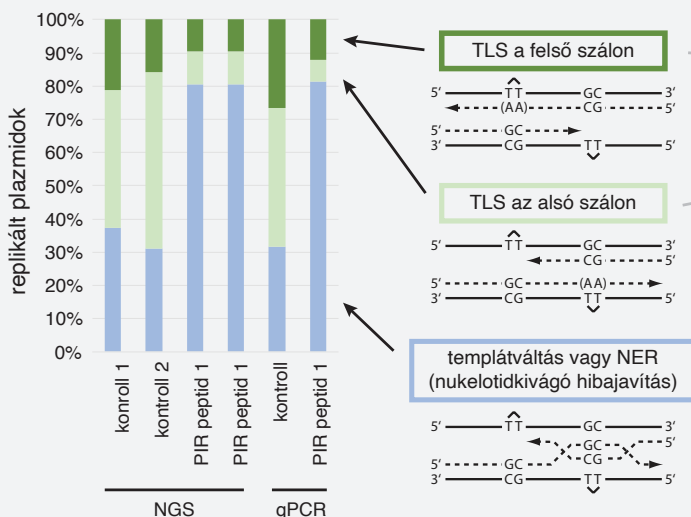
SÉRÜLT DNS-SZAKASZ REPLIKÁCIÓJA



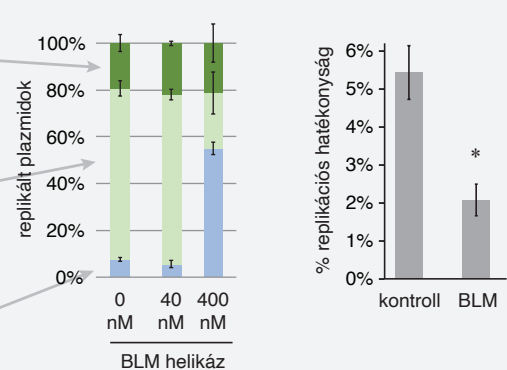
Kísérletek

1. Kontroll plazmid replikációja humán sejtízátumokban T antigén jelenlétében.
2. A nukleotidkivágó hibajavítás hatásának ellenőrzése NER mutáns (*XPA*^{-/-}) sejtekből készített lizátum felhasználásával.
3. Ultraibolya fototermekek (TT-CPD, TT-(6-4)) beillesztése plazmidokba replikációs reakciókhoz.
4. Módszerfejlesztés a replikáció termékeinek észleléséhez (Sanger szekvenálás, NGS, allélspecifikus qPCR).
5. Interferencia-kísérletek a transzléziós szintézis gátlására.
6. Interferencia-kísérletek a templátváltás gátlására.

TT(CPD) FOTOTERMÉK REPLIKÁCIÓJA



A BLM helikáz gátolja a plazmid replikációját



XPA^{-/-} (NER deficiens) sejtekből készült extraktban kizárólag TLS észlelhető. Ezen körülmények között a BLM helikáz gátolja a replikációt, a látszólagos templátváltás PCR eredetű műtermék.

Eredmények

1. Hatékonyan replikálódik a kontroll és a CPD-tartalmú plazmid.
2. A nukleotidkivágó hibajavítás aktív az extraktban, és befolyásolja az eredményeket.
3. Több módszert sikerült beállítani a replikációs termékek hatékony detektálására.
3. Az extraktban hatékony TLS figyelhető meg CPD fototermekeken, melynek mutációs spektruma meghatározható. A folyamat gátolható a PCNA - polimeráz interakció interferenciájával (PIR peptid).
4. A rekombinációs hibaelkerülés detekcióját PCR-alapú hibrid termékek keletkezése nehezíti.