

# HUNPROTEXC

A SÉRÜLT DNS REPLIKÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA SEJTLIZÁTUMOKBAN

SZÜTS DÁVID

(MTA) TTK ENZIMOLÓGIAI  
INTÉZET

KOVÁCS MIHÁLY

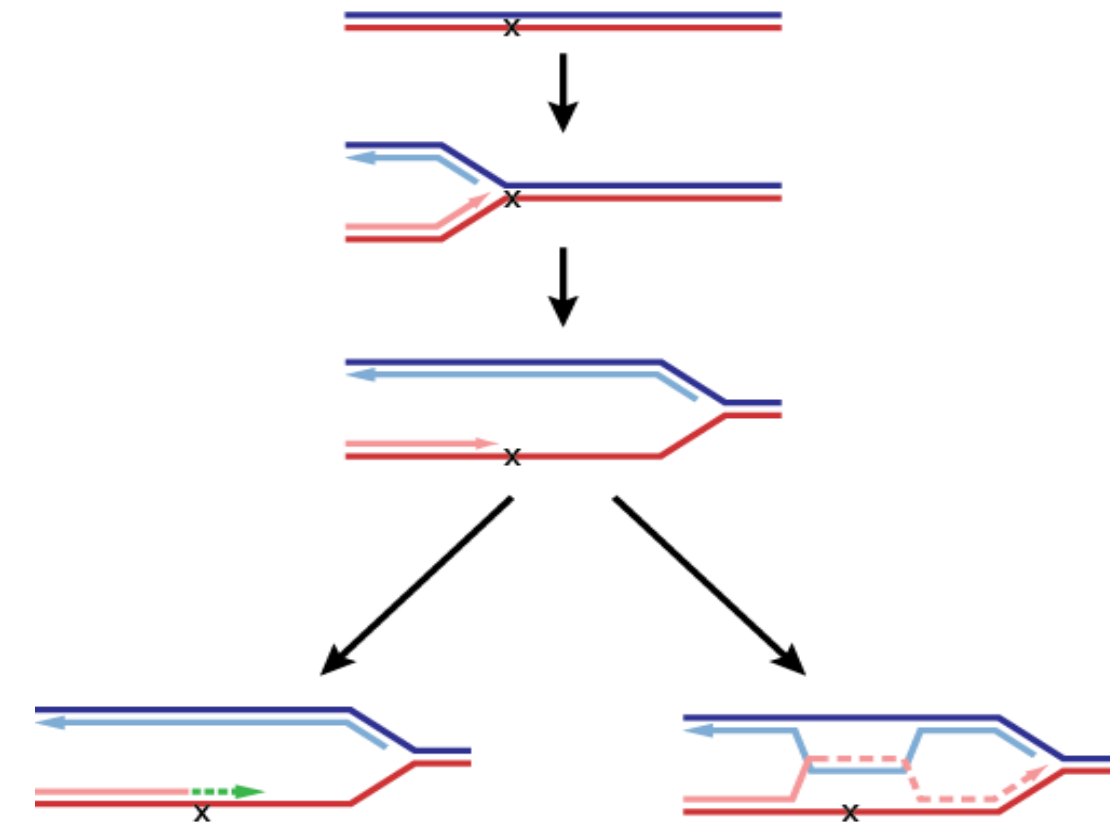
ELTE TTK BIOKÉMIA TANSZÉK



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# A mutagenézis fő forrása: a sérült DNS replikációja



mutagenikus  
transzléziós szintézis

DNS polimerázok

hibamentes  
templátváltás

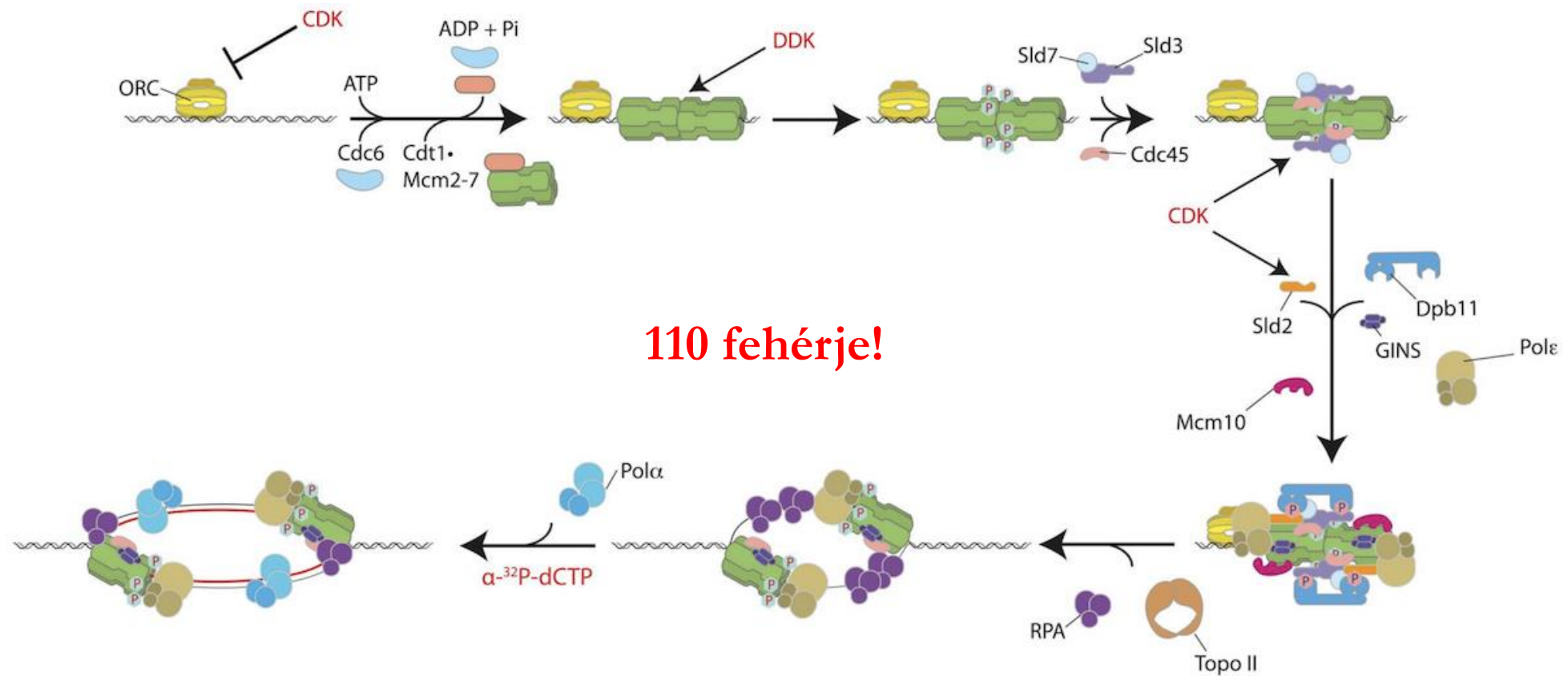
rekombinációs fehérjék



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# A DNS replikáció biokémiája?



## Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins

Joseph T. P. Yeeles<sup>1</sup>, Tom D. Deegan<sup>1</sup>, Agnieszka Janska<sup>1</sup>, Anne Early<sup>1</sup> & John F. X. Diffley<sup>1</sup>

26 MARCH 2015 | VOL 519 | NATURE | 431

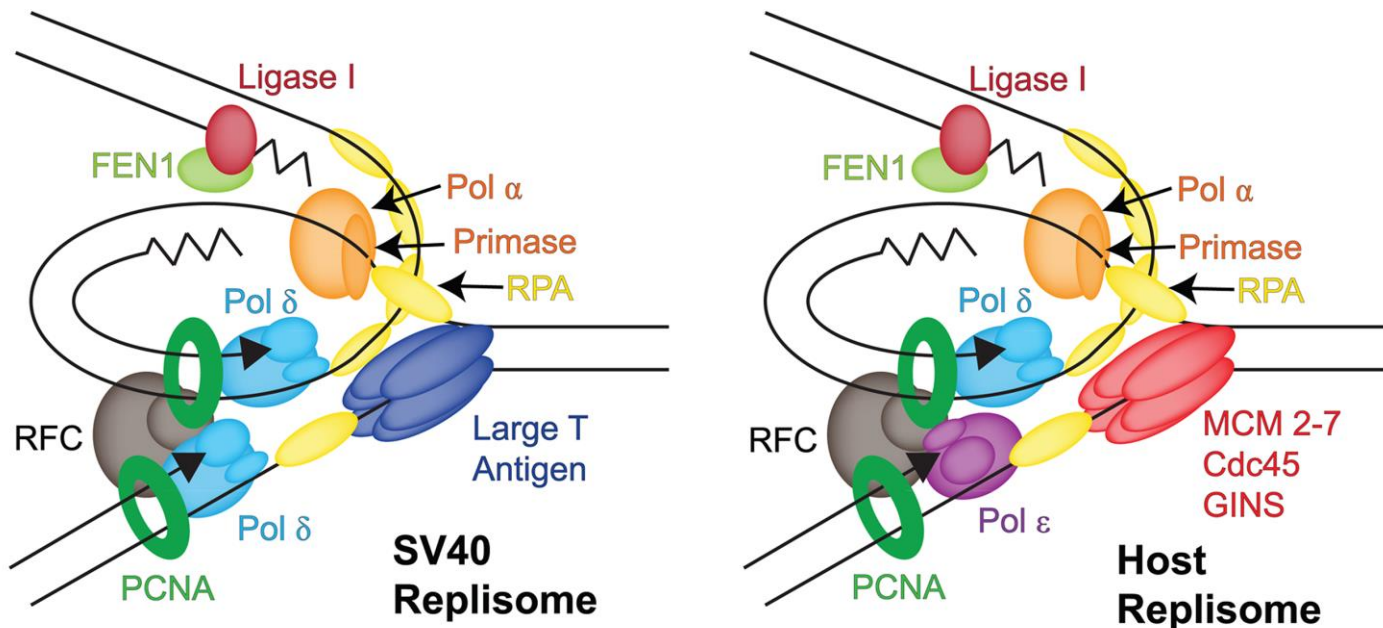


NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# DNS replikáció sejtizátumban

- hipotonikus sejtizátum
- SV40 T antigén
- NTP-k, dNTP-k
- ATP regeneráló rendszer
- plazmid DNS templát, SV40 replikációs origóval



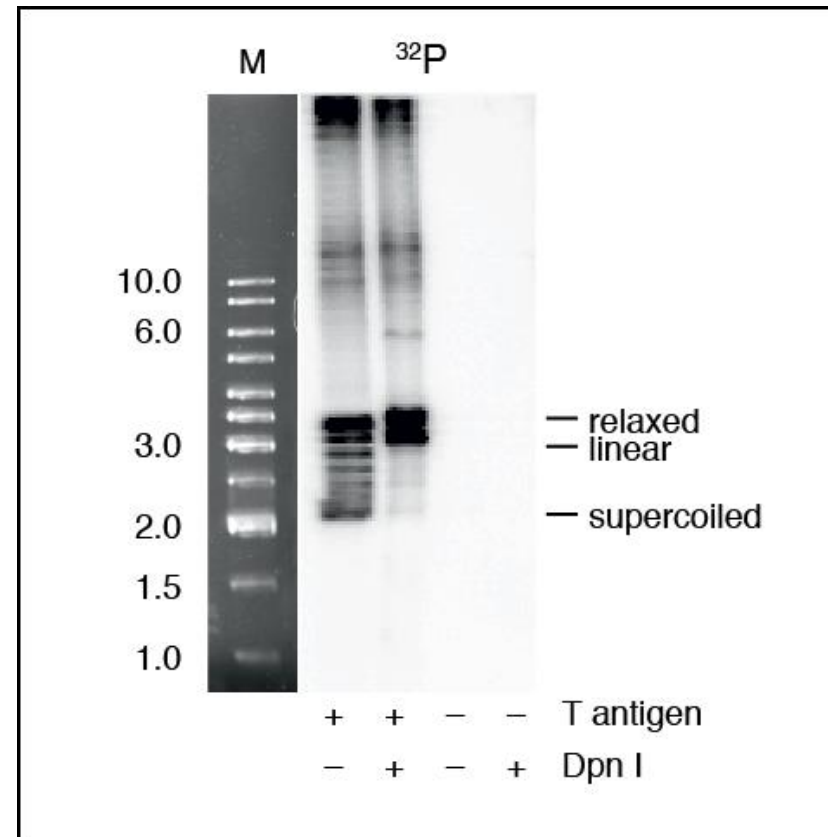
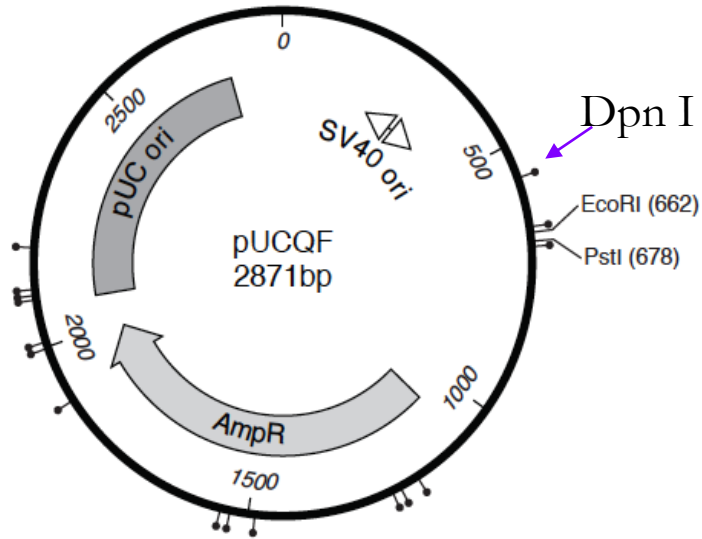
Sowd and Fanning (2012) PLOS Pathogens



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

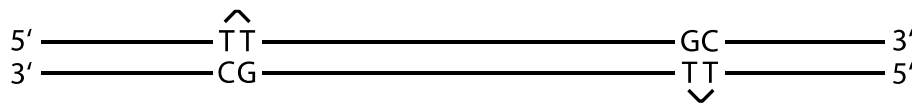
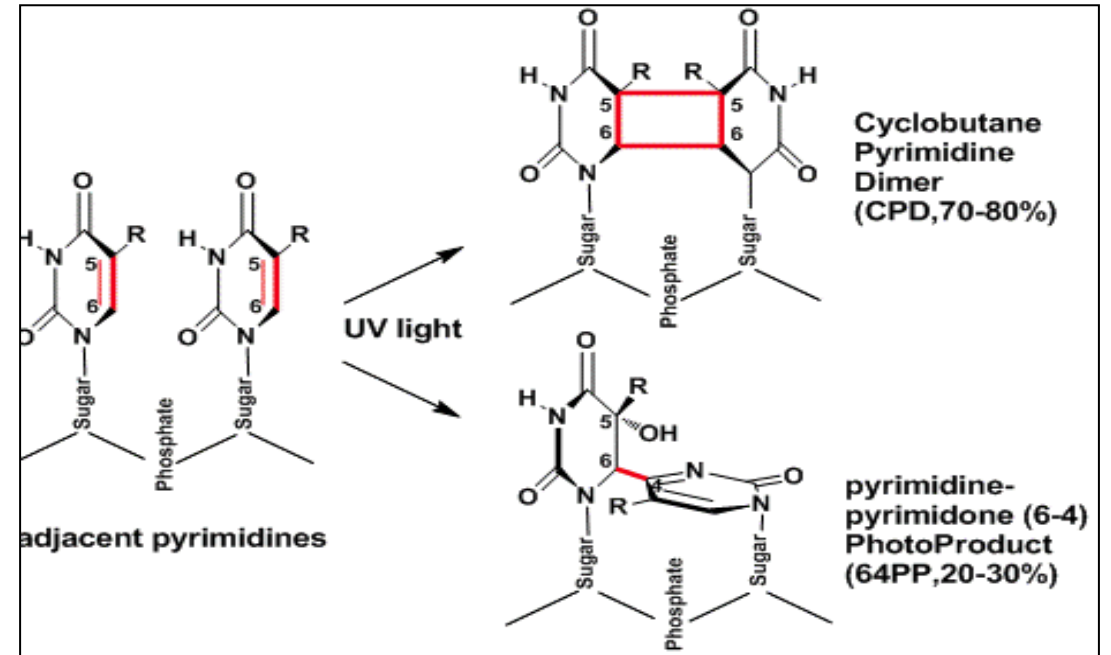
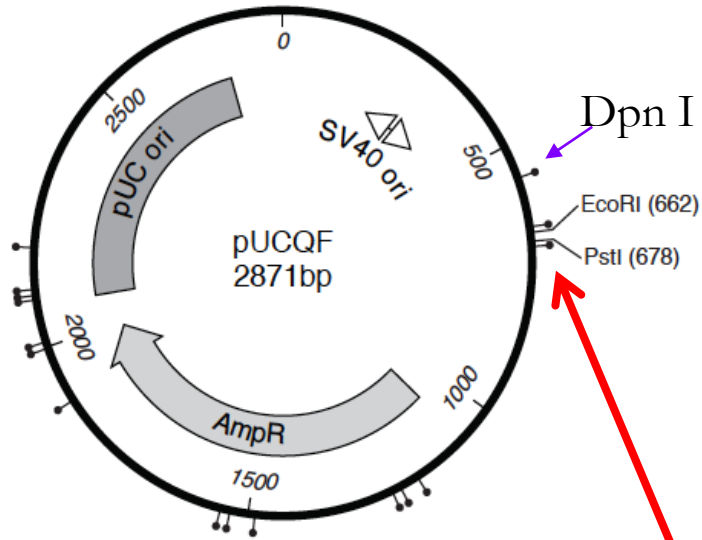
# SV40 T antigén-dependens DNS replikáció sejtizátumban



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# Ultraibolya léziót tartalmazó plazmid replikációja



UV fototermékek

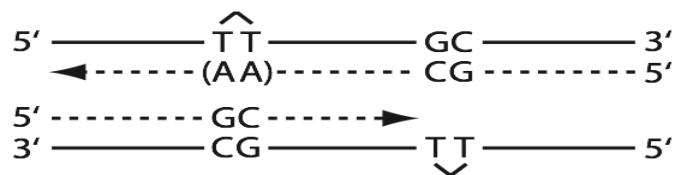
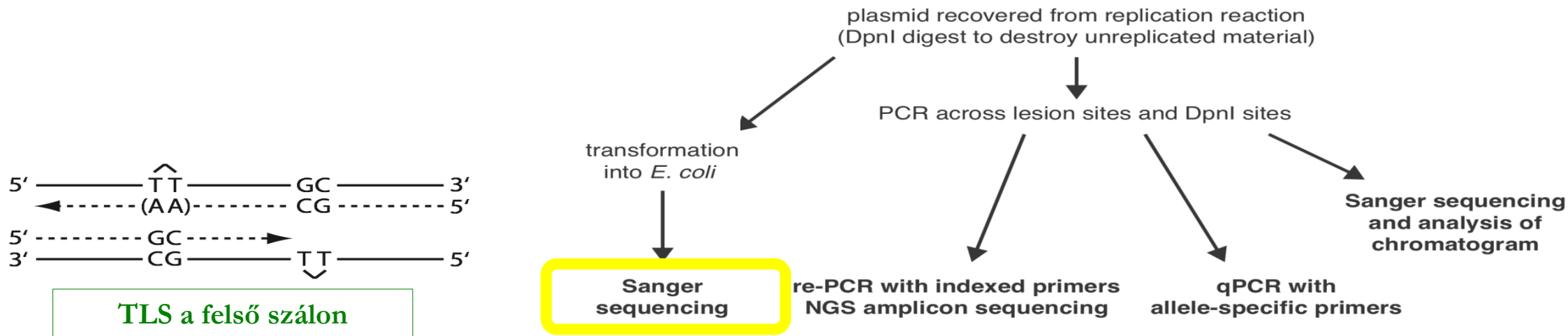


NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

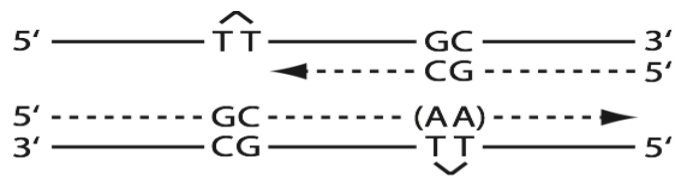
AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT



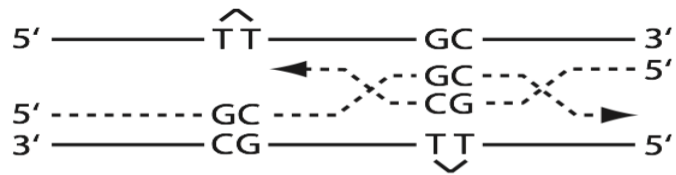
# A replikált plazmid szekvenciája megmutatja, melyik hibaelkerülő folyamat működött



TLS a felső szálon



TLS az alsó szálon



templátváltás

## 1. Sanger szekvenálás

TLS a felső szálon

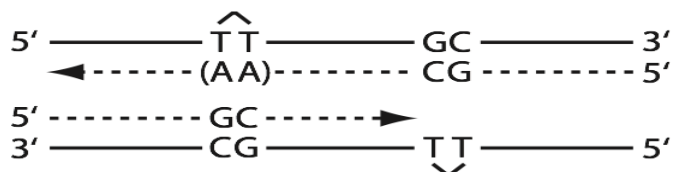
templátváltás

TLS az alsó szálon

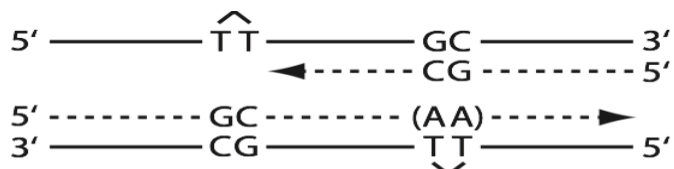
```

GAATTGTCCACCTGCCTGTATTCTTAGTACCTACTGACGCTAGCTCGATCCATGCAG
GAATTGTCCACCTGGCCCTGTATTCTTAGTACCTACTGACGCTAAATCGATCCATGCAG
GAATTGTCCACCTCTTCTGTATTCTTAGTACCTACTGACGCTAGCTCGATCCATGCAG
GAATTGTCCACCTGGCCCTGTATTCTTAGTACCTACTGACGCTAAATCGATCCATGCAG
GAATTGTCCACCTCTTCTGTATTCTTAGTACCTACTGACGCTAGCTCGATCCATGCAG
GAATTGTCCACCTGGCCCTGTATTCTTAGTACCTACTGACGCTAAATCGATCCATGCAG
GAATTGTCCACCTGGCCCTGTATTCTTAGTACCTACTGACGCTAAATCGATCCATGCAG
GAATTGTCCACCTGGCCCTGTATTCTTAGTACCTACTGACGCTAAATCGATCCATGCAG
GAATTGTCCACCTGGCCCTGTATTCTTAGTACCTACTGACGCTAAATCGATCCATGCAG
GAATTGTCCACCTGGCCCTGTATTCTTAGTACCTACTGACGCTAAATCGATCCATGCAG
    
```

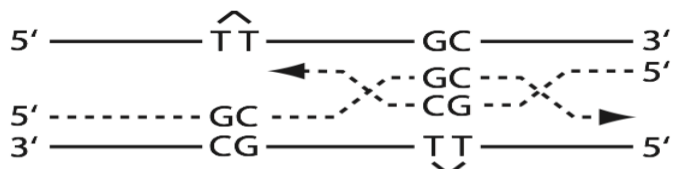
# A replikált plazmid szekvenciája megmutatja, melyik hibaelkerülő folyamat működött



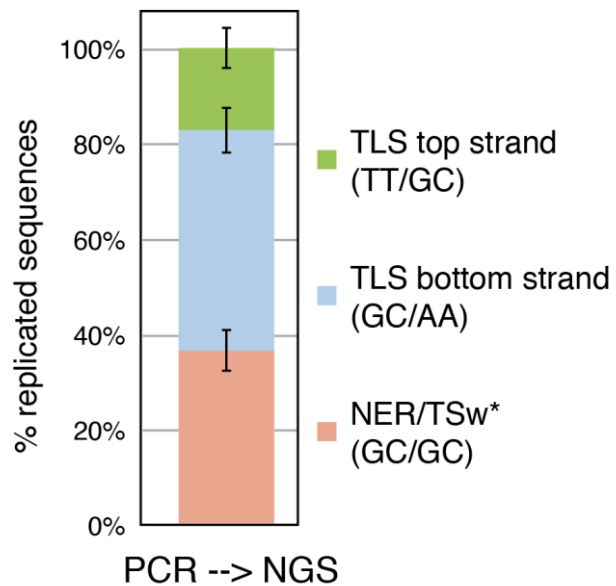
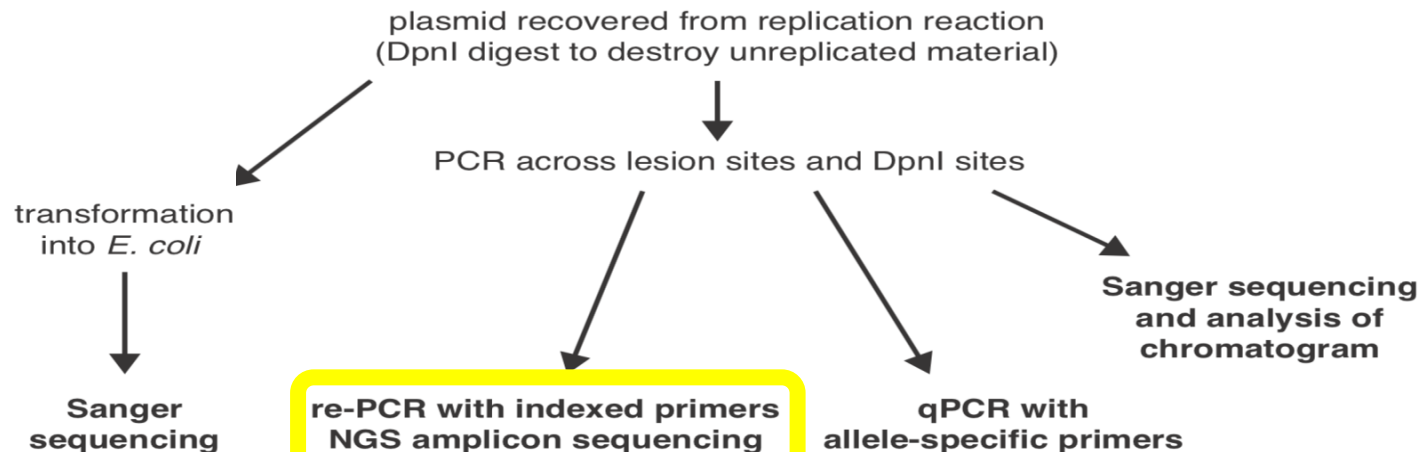
TLS a felső szálon



TLS az alsó szálon



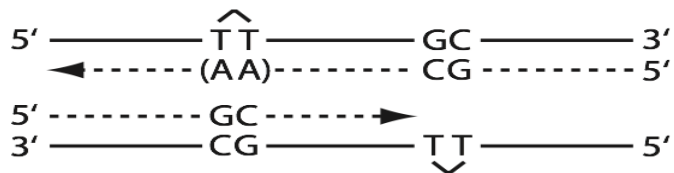
templátváltás



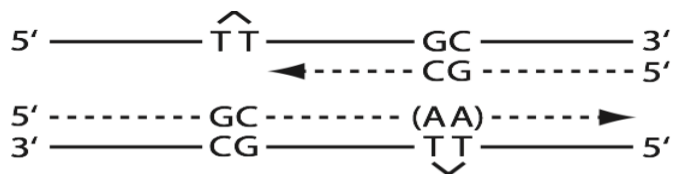
2. Újgenerációs  
amplikonszekvenálás



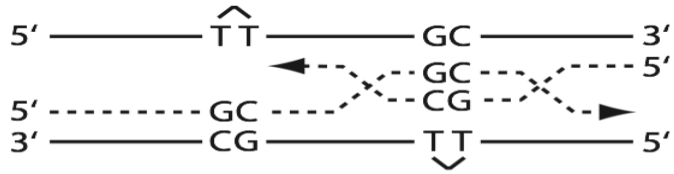
# A replikált plazmid szekvenciája megmutatja, melyik hibaelkerülő folyamat működött



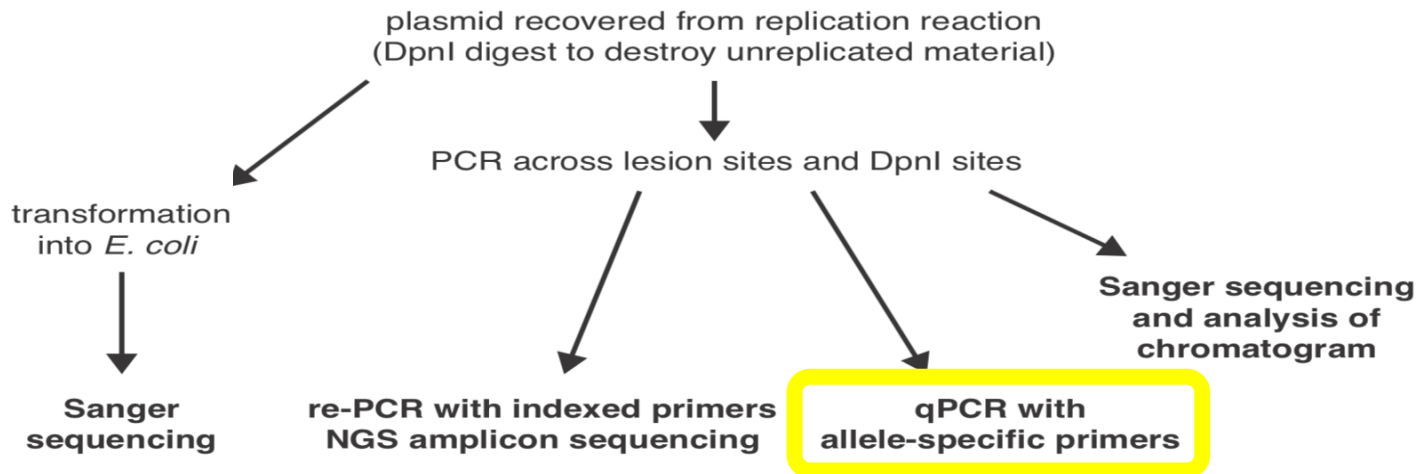
TLS a felső szálon



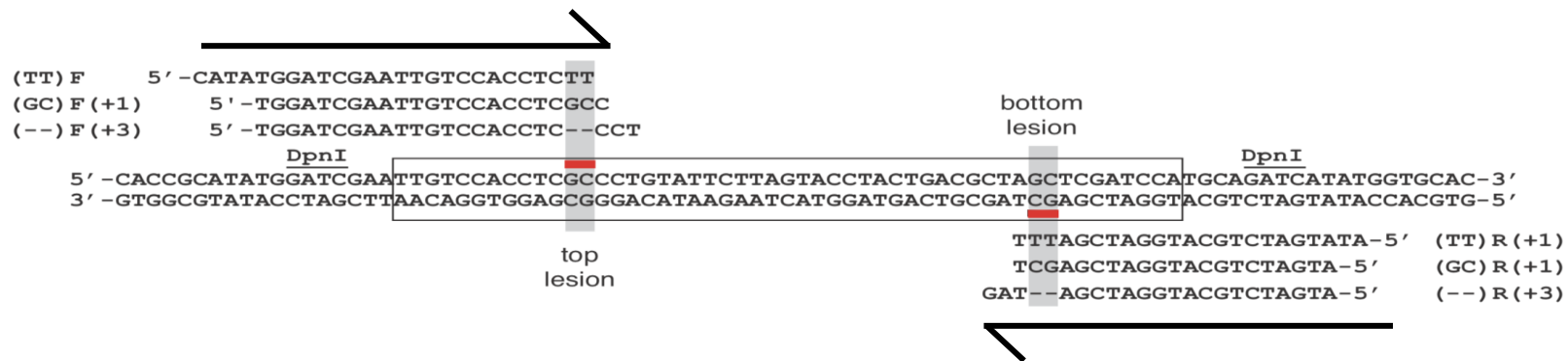
TLS az alsó szálon



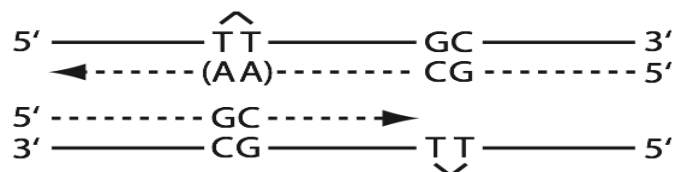
templátváltás



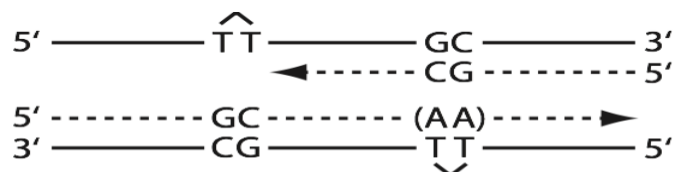
## 3. Allélspecifikus qPCR



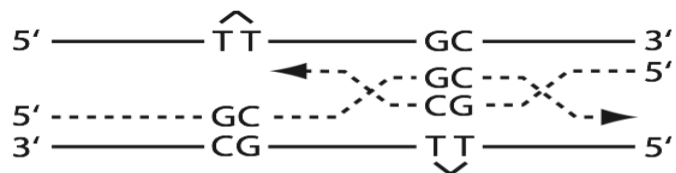
# A replikált plazmid szekvenciája megmutatja, melyik hibaelkerülő folyamat működött



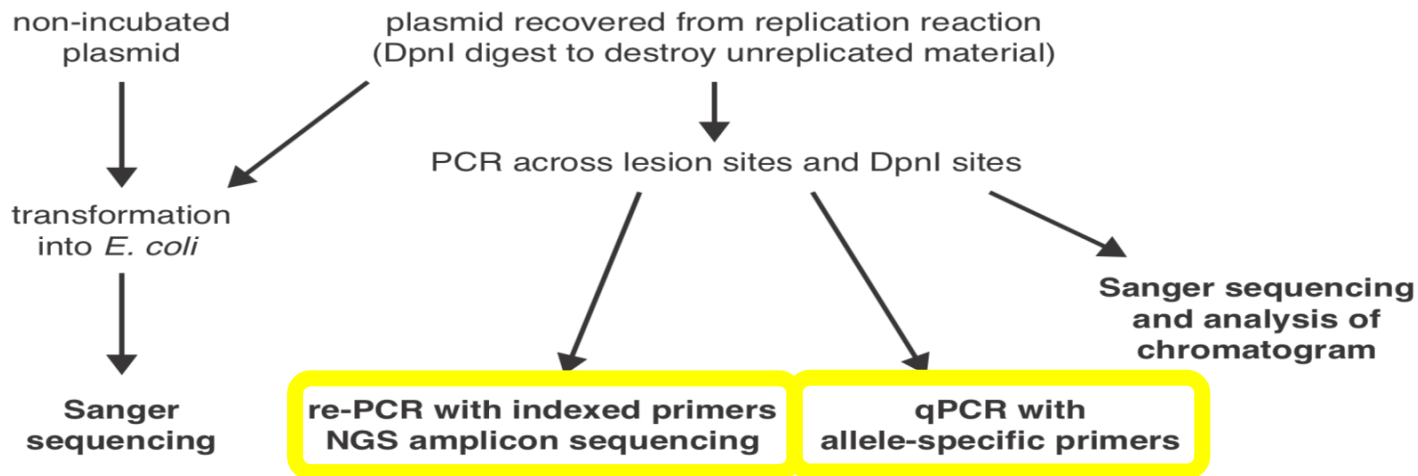
TLS a felső szálon



TLS az alsó szálon

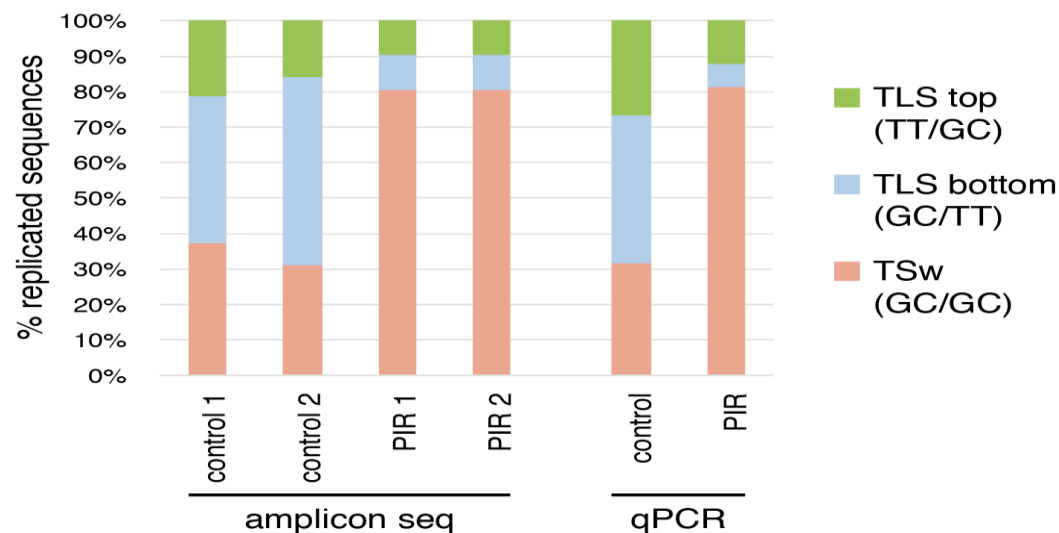


templátváltás



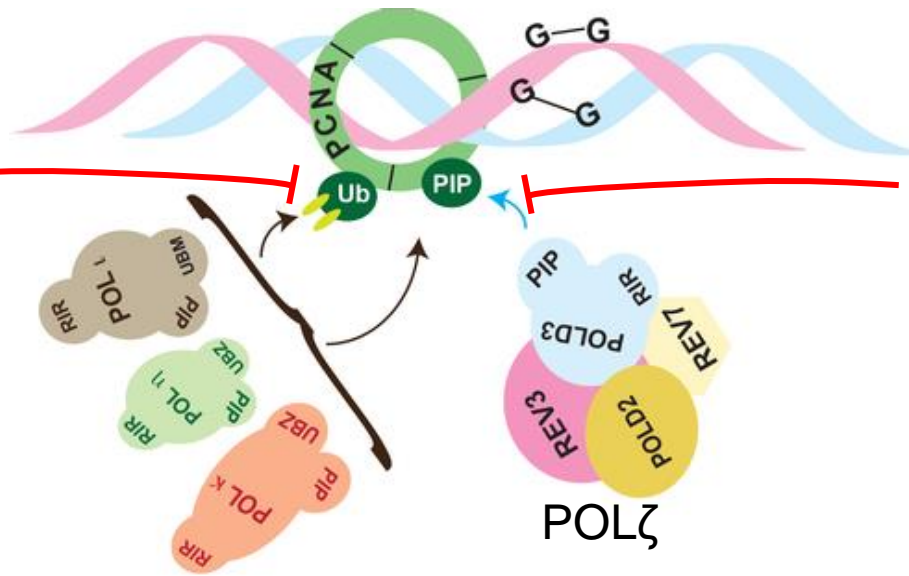
## 2. NGS amplikonszekvenálás

## 3. Allélspecifikus qPCR

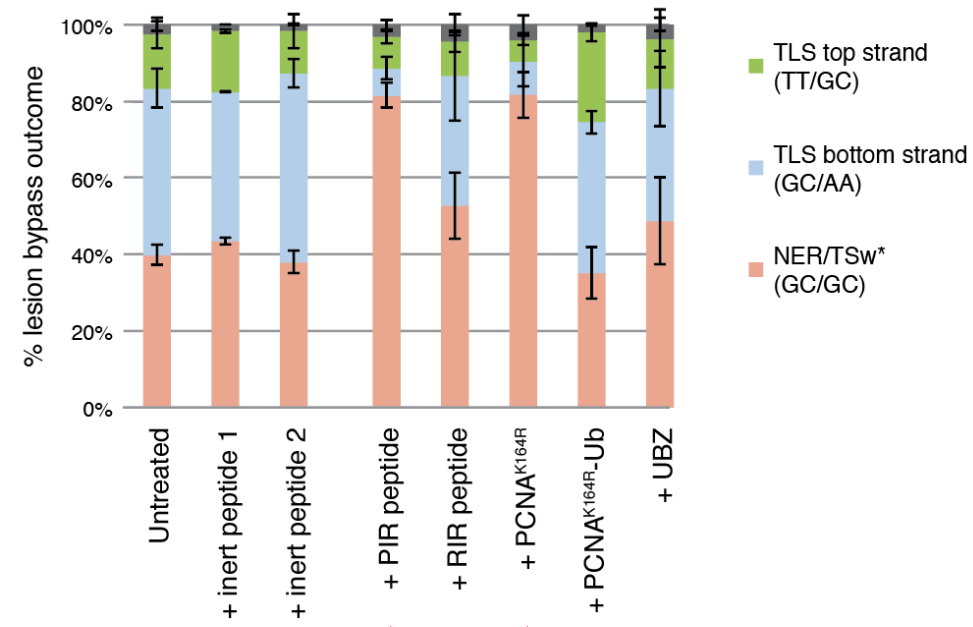


# Domén-domén kölcsönhatások célzása a transzléziós szintézisben

PCNA<sup>K164R</sup> fehérje



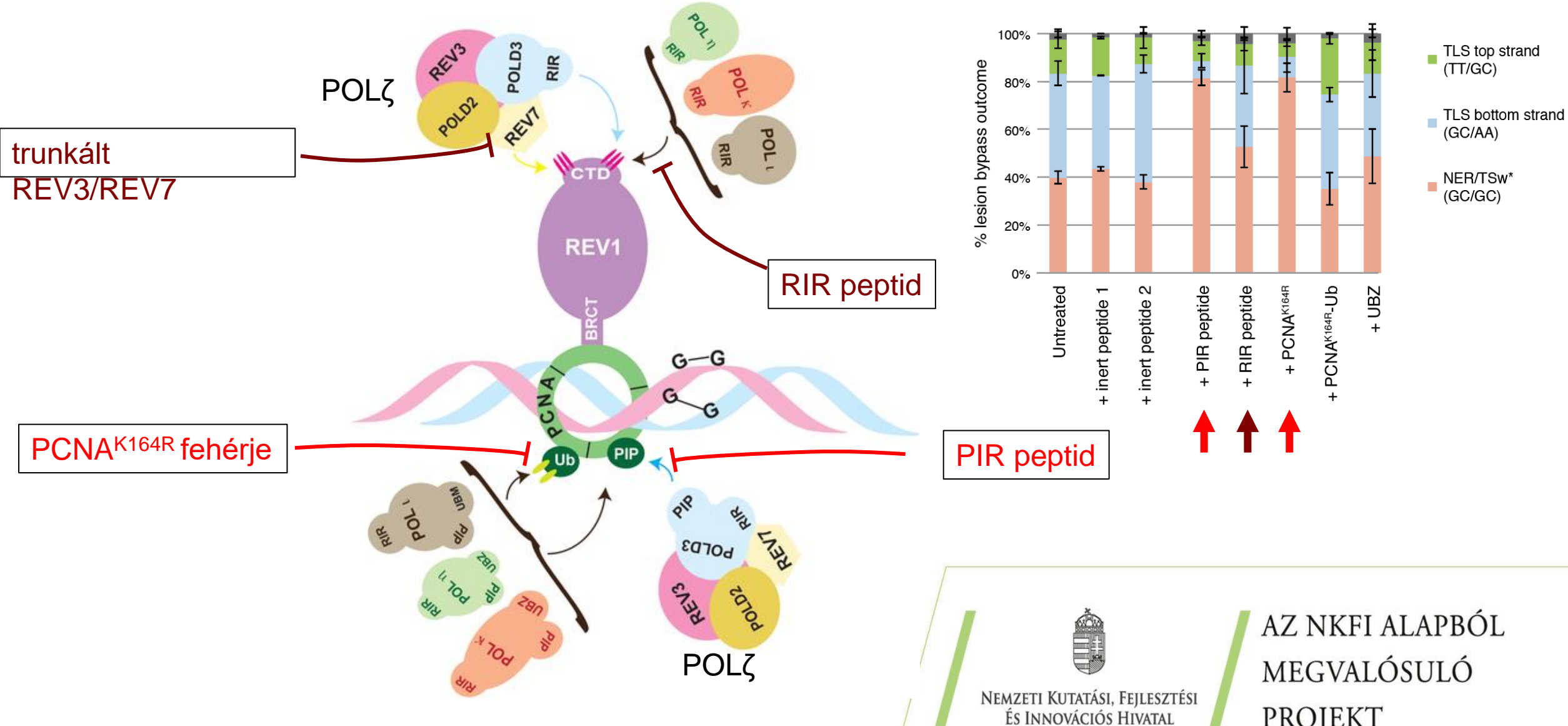
PIR peptid



Yamanaka K, Chatterjee N, Hemann MT, Walker GC (2017) Inhibition of mutagenic translesion synthesis: A possible strategy for improving chemotherapy? PLOS Genetics 13(8): e1006842.

AZ NKFI ALAPBÓL  
 MEGVALÓSULÓ  
 PROJEKT

# Domén-domén kölcsönhatások célzása a transzléziós szintézisben

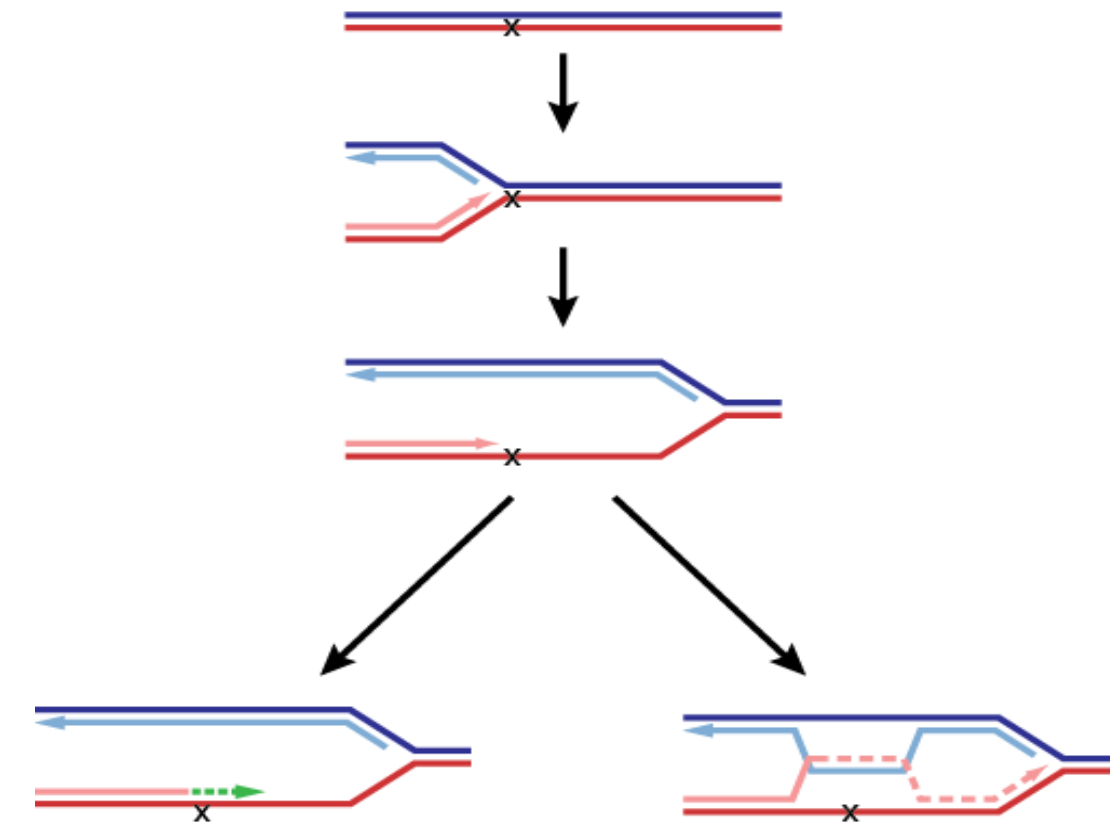


Yamanaka K, Chatterjee N, Hemann MT, Walker GC (2017) Inhibition of mutagenic translesion synthesis: A possible strategy for improving chemotherapy? PLOS Genetics 13(8): e1006842.

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# A sérült DNS replikációja: alternatívák



mutagenikus  
transzléziós szintézis

DNS polimerázok

hibamentes  
templátváltás

rekombinációs fehérjék



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

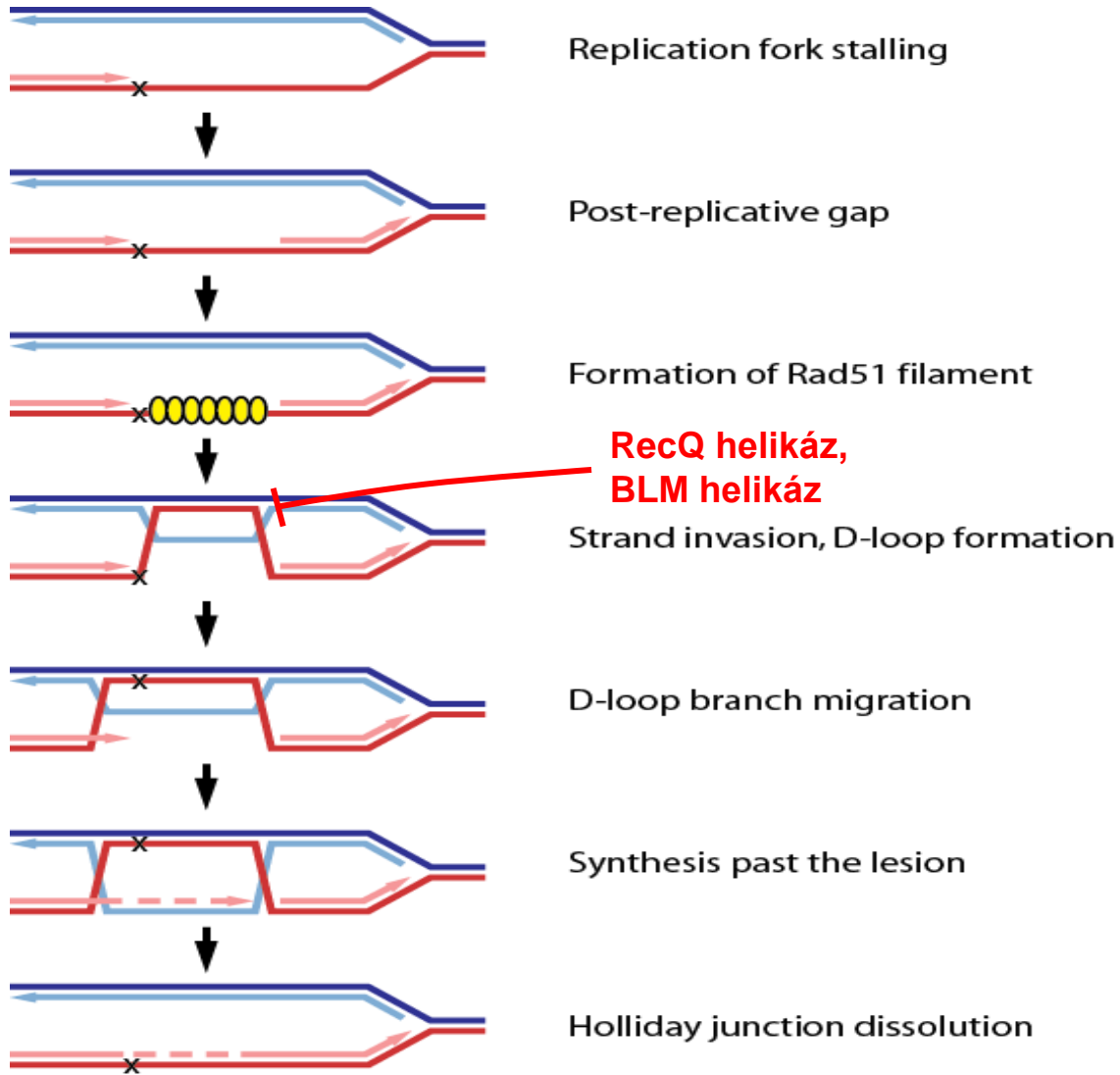
# In vitro templátváltás?



Replication fork stalling



# In vitro templátváltás?



## Shuttling along DNA and directed processing of D-loops by RecQ helicase support quality control of homologous recombination

Gábor M. Harami<sup>a,1</sup>, Yeonee Seol<sup>b,1</sup>, Junghoon In<sup>b</sup>, Veronika Ferencziová<sup>a</sup>, Máté Martina<sup>a</sup>, Máté Gyimesi<sup>a</sup>, Kata Sarlós<sup>a</sup>, Zoltán J. Kovács<sup>a</sup>, Nikolett T. Nagy<sup>a</sup>, Yuze Sun<sup>b,2</sup>, Tibor Vellai<sup>c</sup>, Keir C. Neuman<sup>b,3</sup>, and Mihály Kovács<sup>a,3</sup>

3952–3963 *Nucleic Acids Research*, 2012, Vol. 40, No. 9  
doi:10.1093/nar/gks008

Published online 16 January 2012

## Complex activities of the human Bloom's syndrome helicase are encoded in a core region comprising the RecA and Zn-binding domains

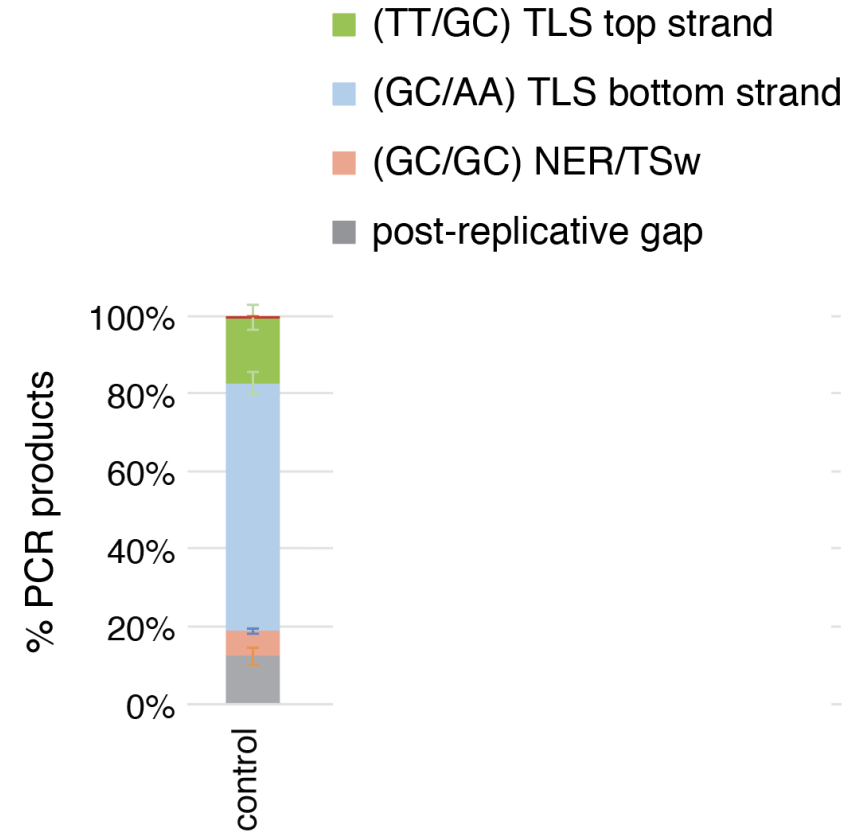
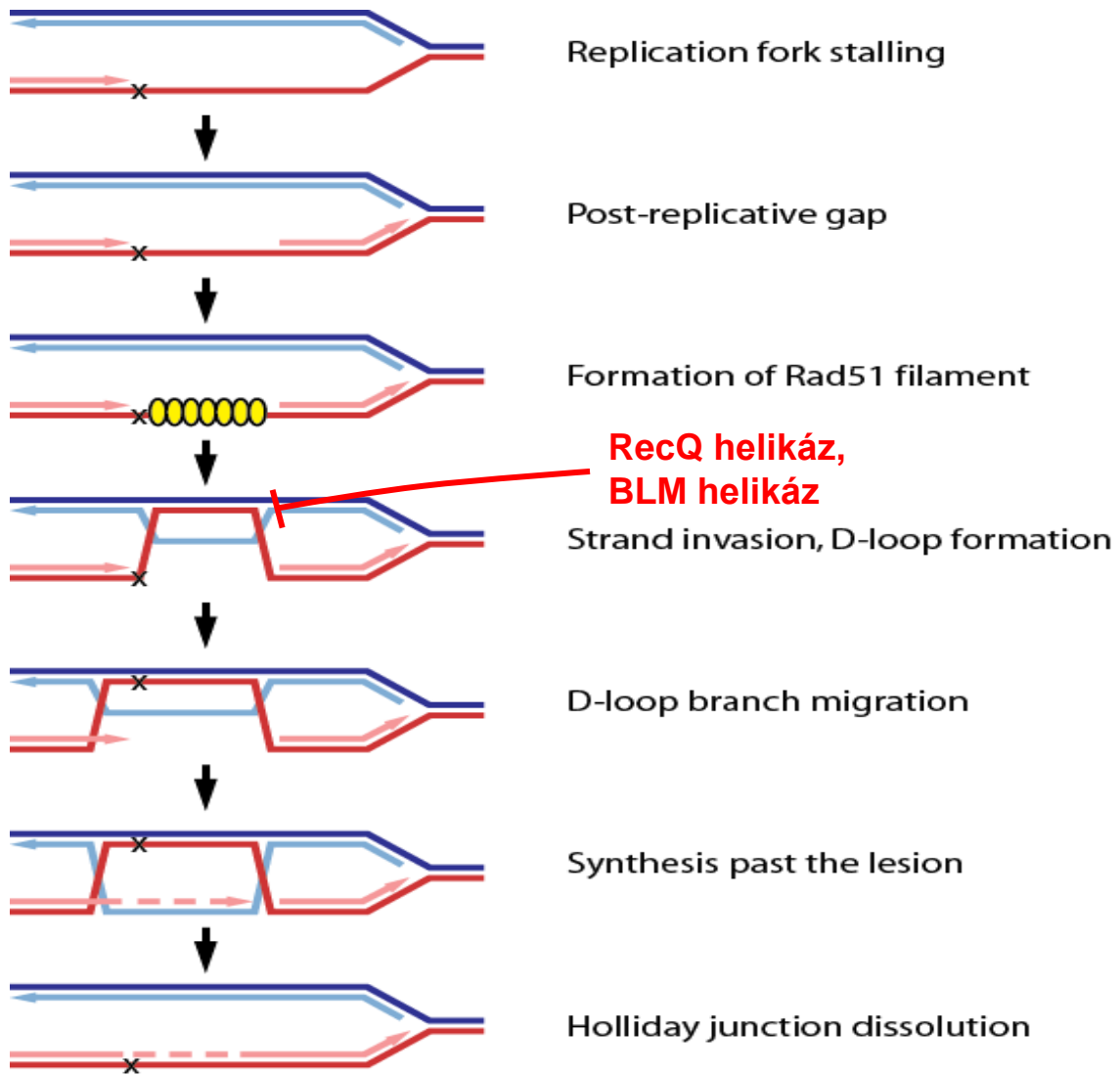
Máté Gyimesi<sup>1</sup>, Gábor M. Harami<sup>1</sup>, Kata Sarlós<sup>1</sup>, Eszter Hazai<sup>2</sup>, Zsolt Bikádi<sup>2</sup> and Mihály Kovács<sup>1,\*</sup>



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# In vitro templátváltás?



# Összefoglalás

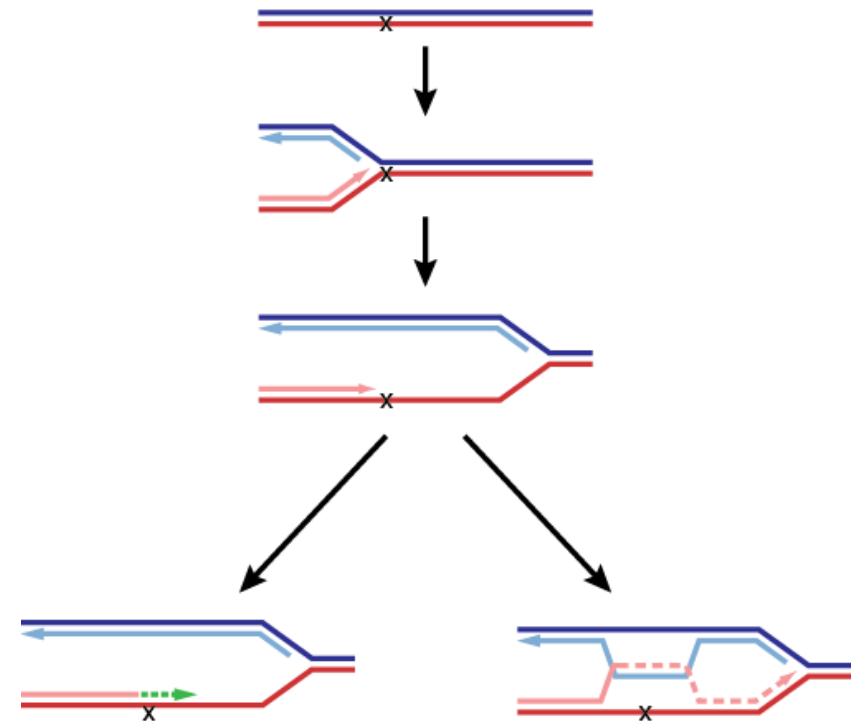
- in vitro esszé a sérült DNS replikációjának követésére
- a transzléziós DNS szintézis működik
- a templátváltás valószínűleg nem működik
- a résztvevő fehérjék szerepe vizsgálható



Szeltner Zoltán

Harami Gábor  
Harami-Papp Hajnalka  
Kovács Mihály

Póti Ádám





NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT