

# HUNPROTEXC

A SÉRÜLT DNS REPLIKÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA SEJTLIZÁTUMOKBAN

SZÜTS DÁVID

TERMÉSZETTUDOMÁNYI  
KUTATÓKÖZPONT  
ENZIMOLÓGIAI INTÉZET

KOVÁCS MIHÁLY

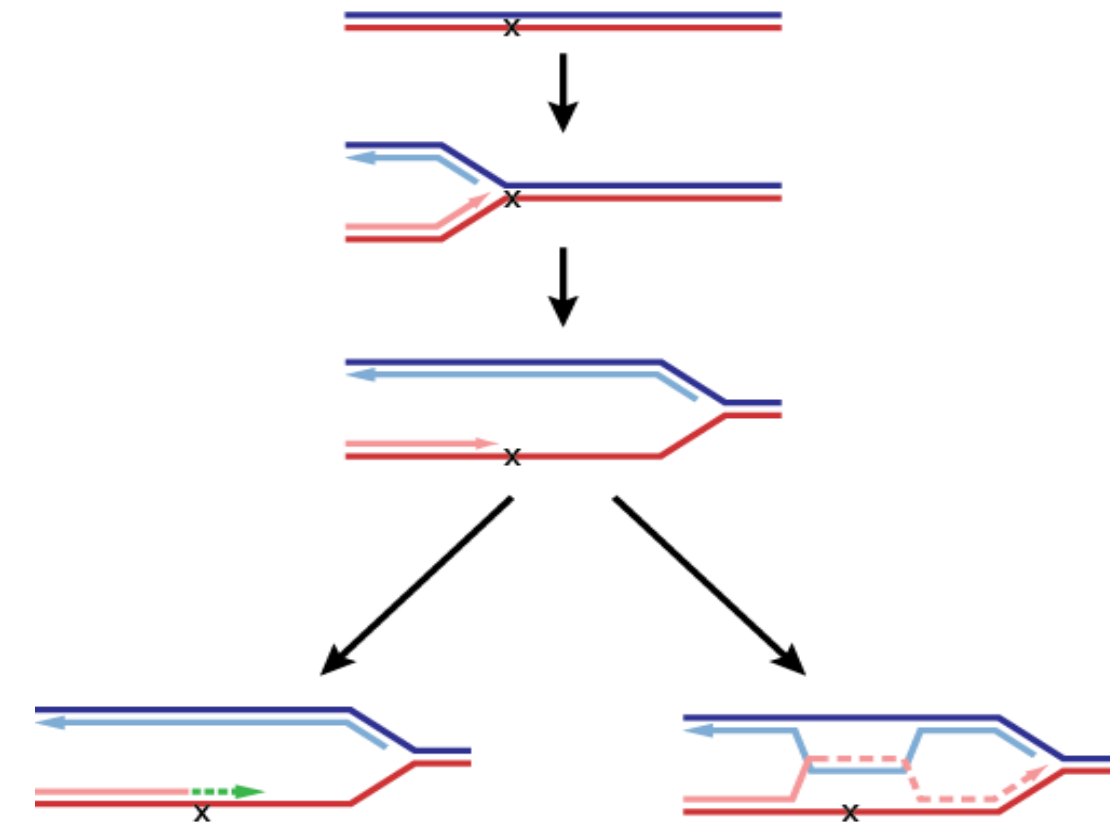
ELTE TTK BIOKÉMIA TANSZÉK



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

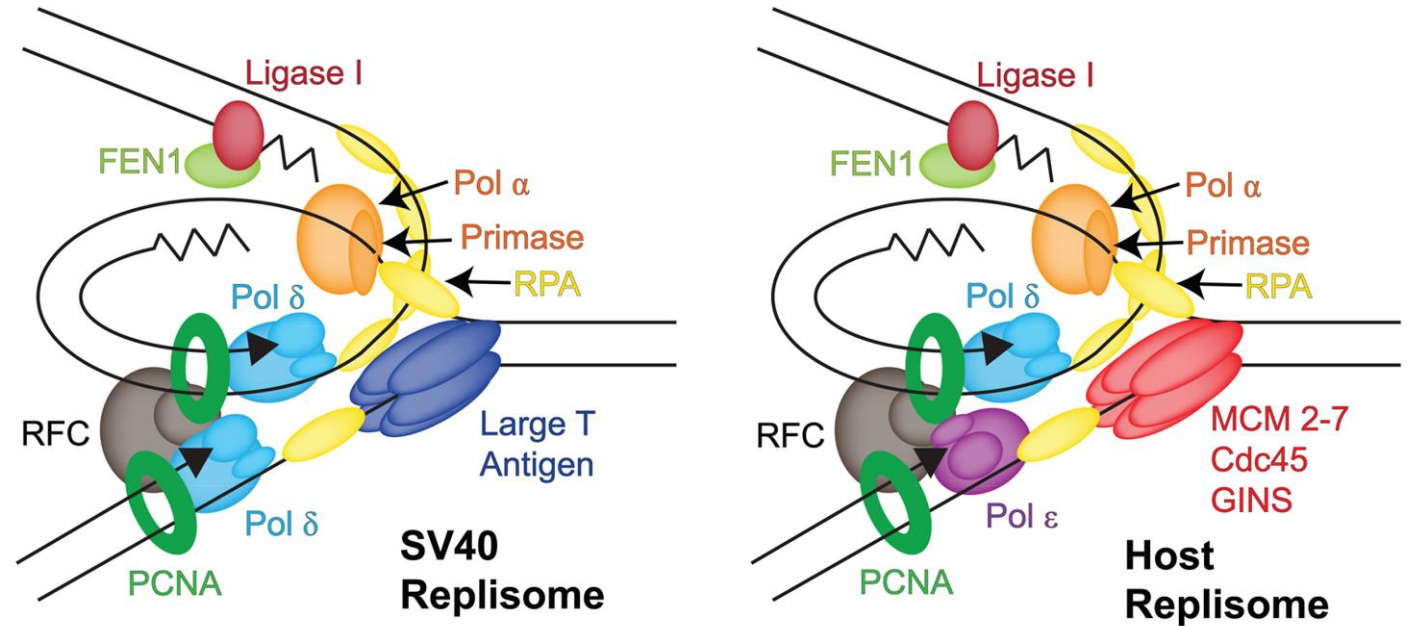


NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# DNS replikáció sejtizátumban

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



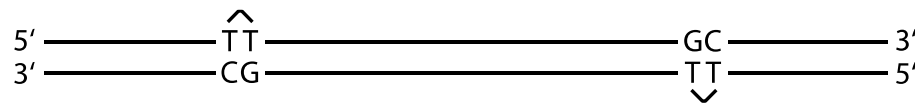
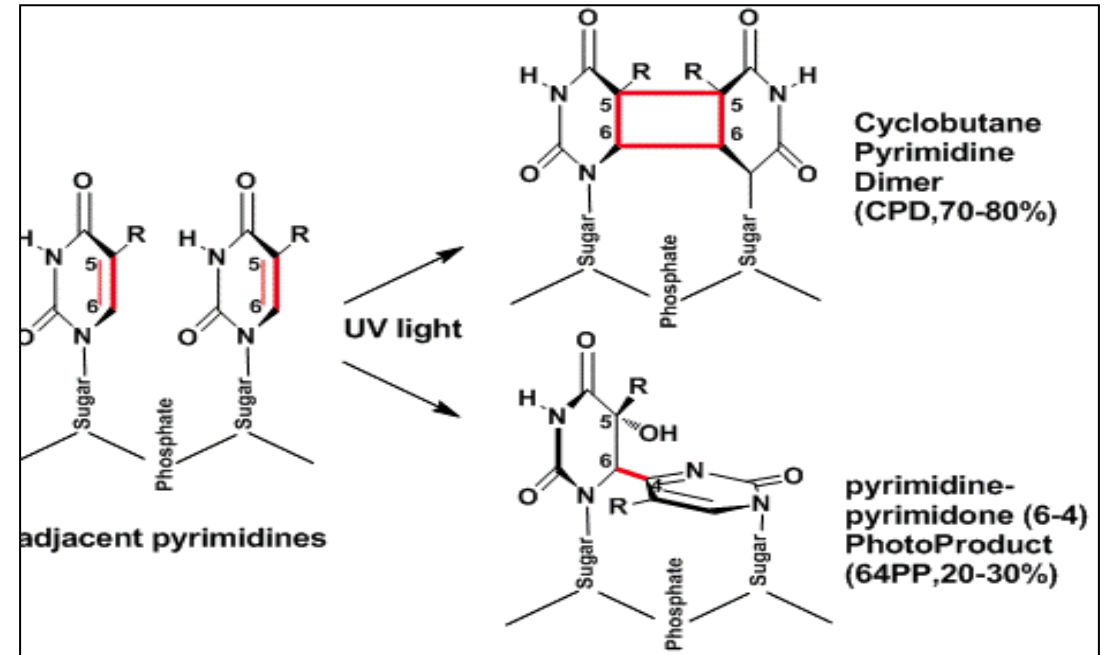
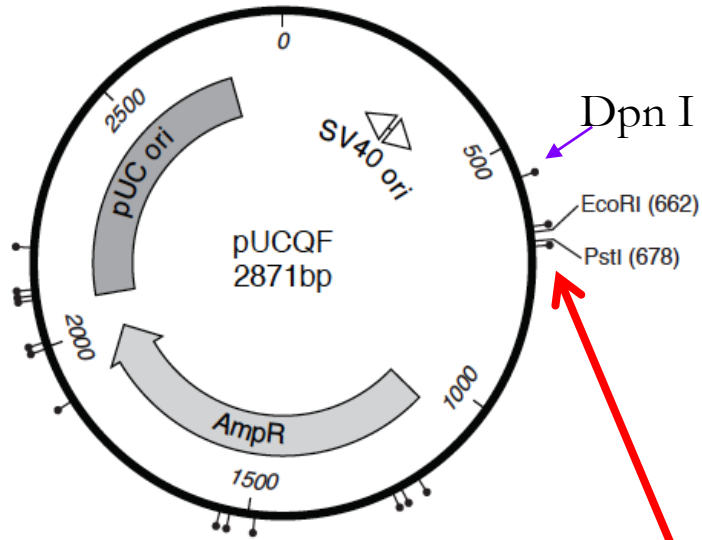
Sowd and Fanning (2012) PLOS Pathogens



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# Ultraibolya léziót tartalmazó plazmid replikációja



UV fototermékek

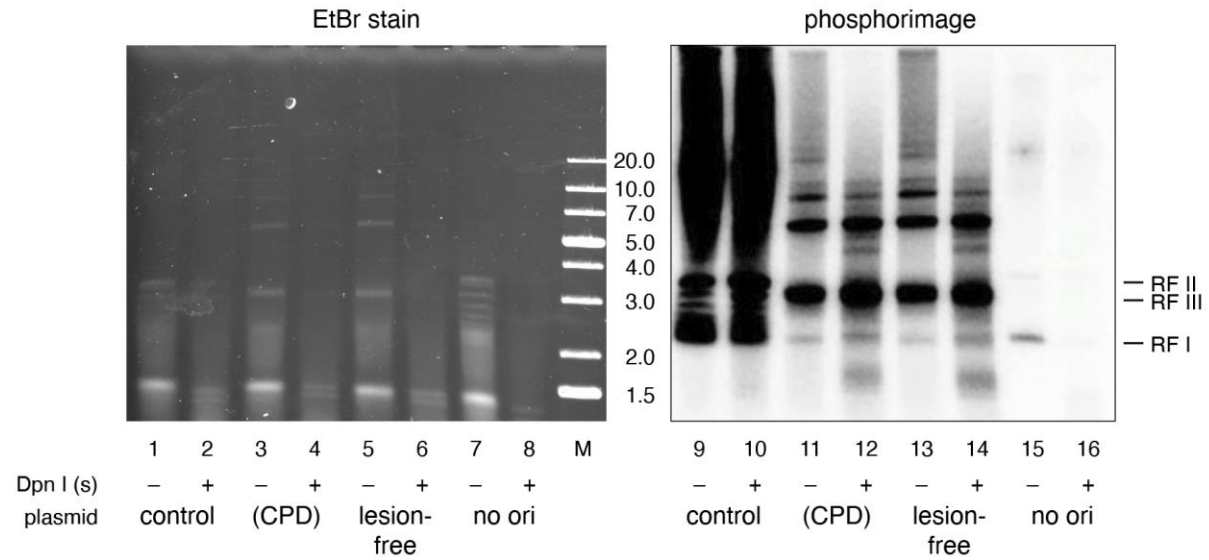


NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

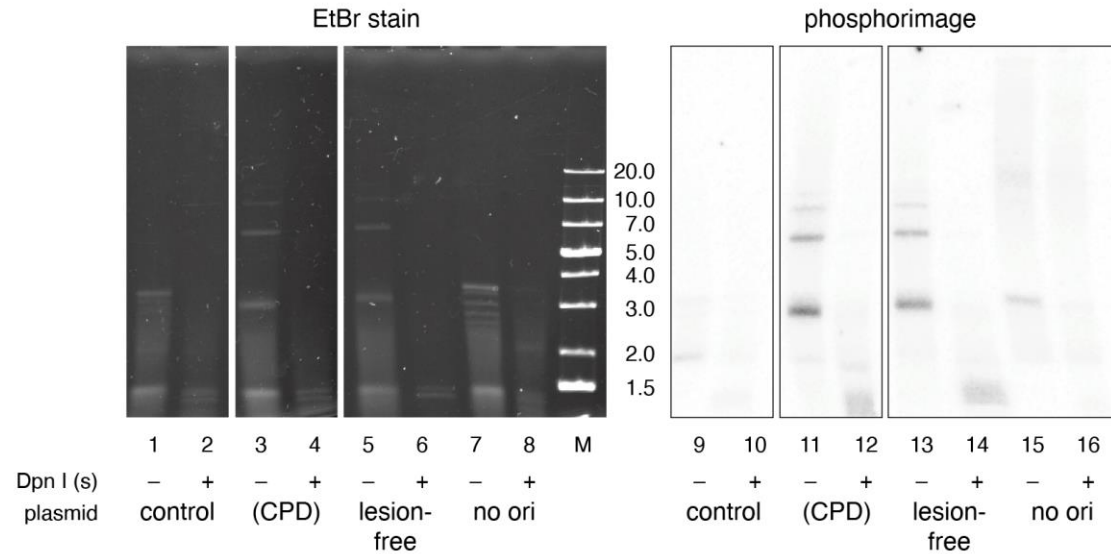
AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# Ultraibolya léziót tartalmazó plazmid replikációja

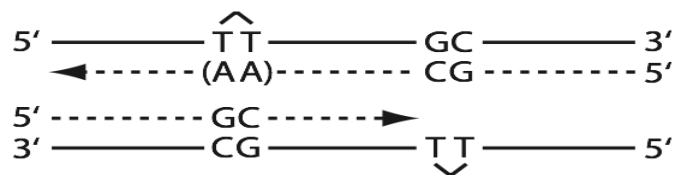
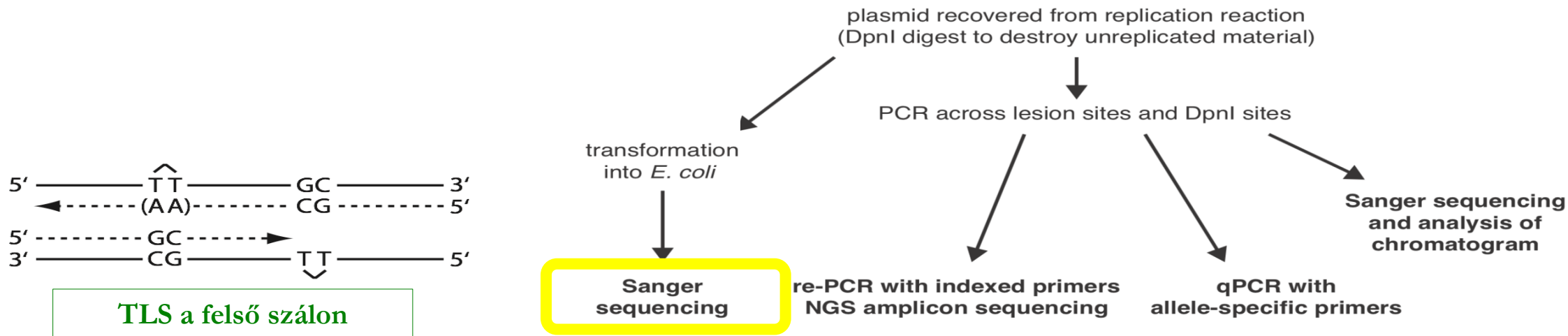
T antigénnel



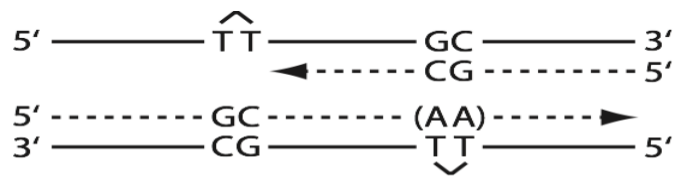
T antigén nélkül



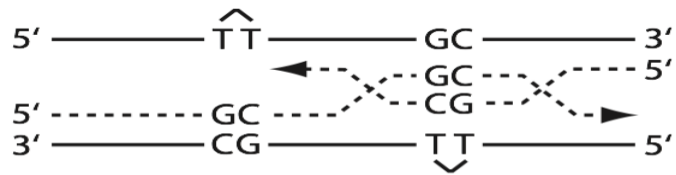
# A replikált plazmid szekvenciája megmutatja, melyik hibaelkerülő folyamat működött



TLS a felső szálon



TLS az alsó szálon



templátváltás

## 1. Sanger szekvenálás

TLS a felső szálon

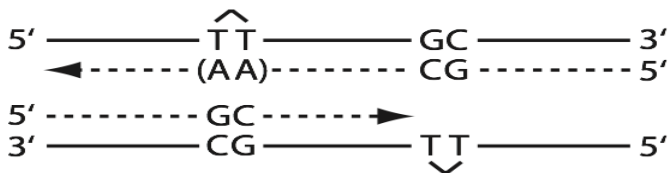
templátváltás

TLS az alsó szálon

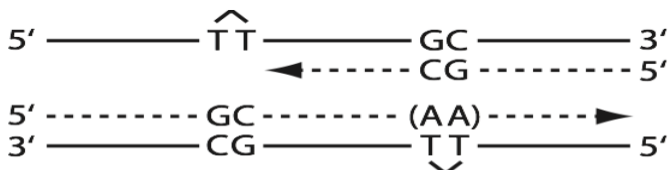
```

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

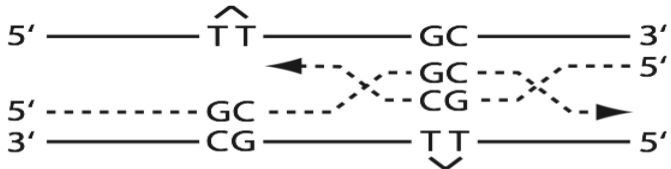
# A replikált plazmid szekvenciája megmutatja, melyik hibaelkerülő folyamat működött



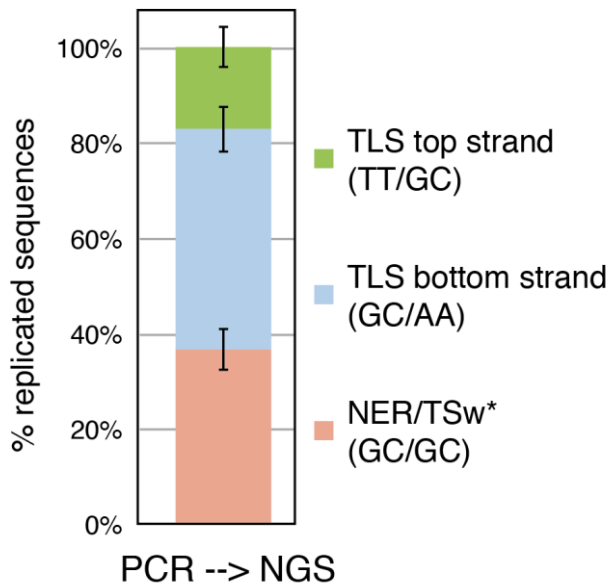
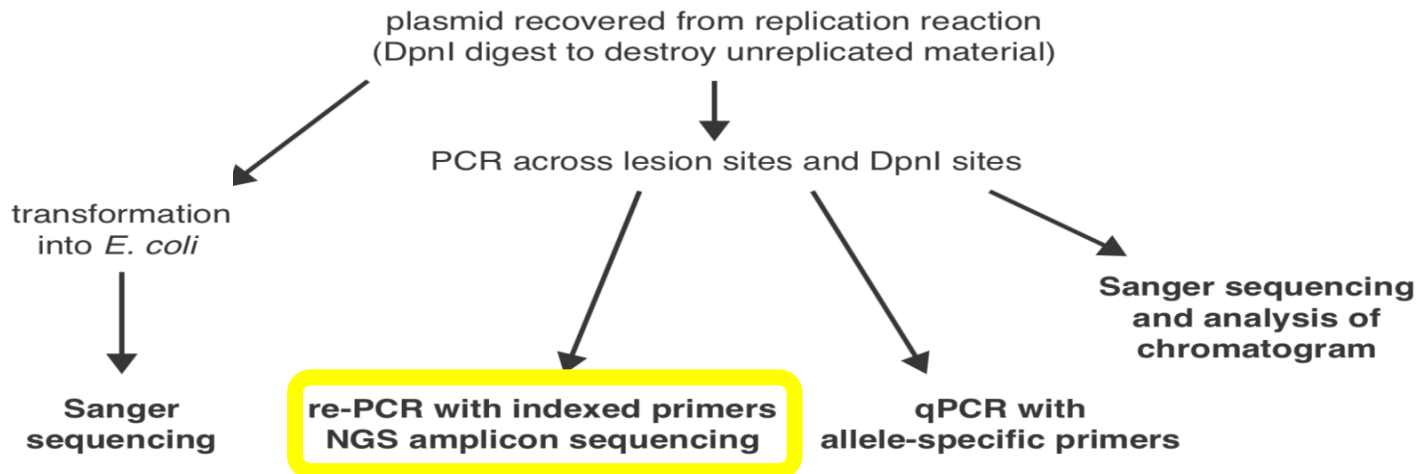
TLS a felső szálon



TLS az alsó szálon

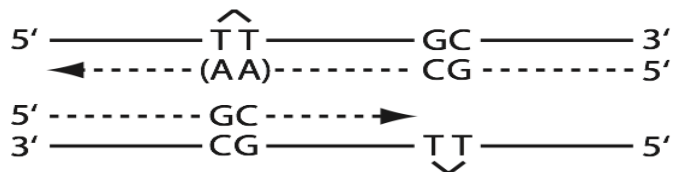


templátváltás

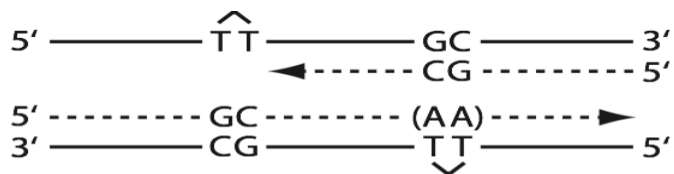


## 2. Újgenerációs ampliconszekvenálás

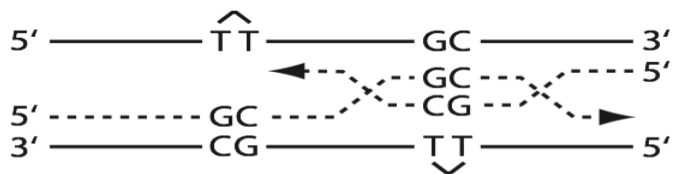
# A replikált plazmid szekvenciája megmutatja, melyik hibaelkerülő folyamat működött



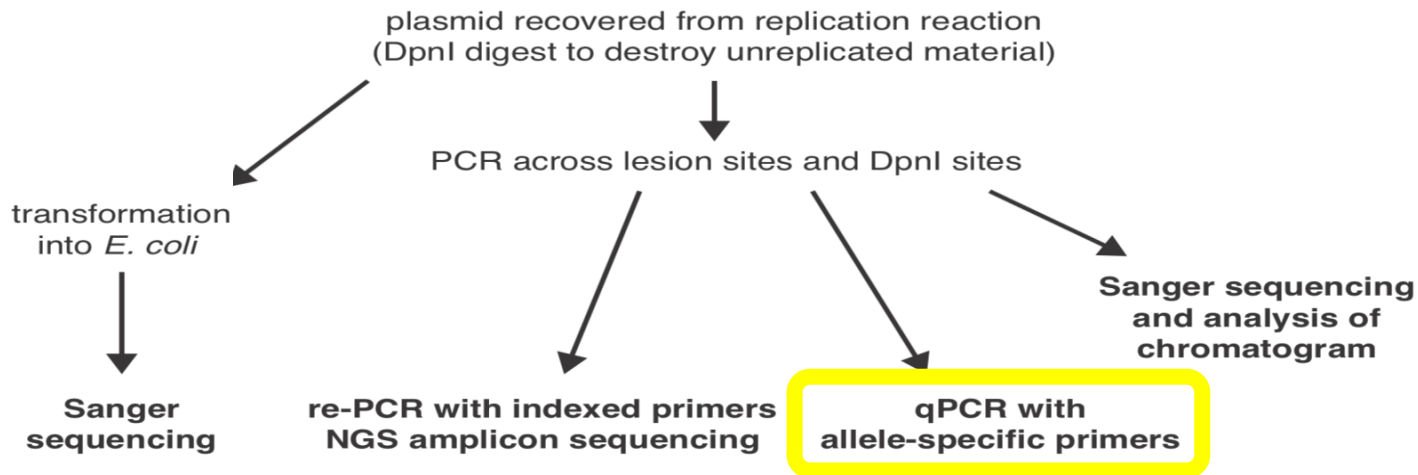
TLS a felső szálon



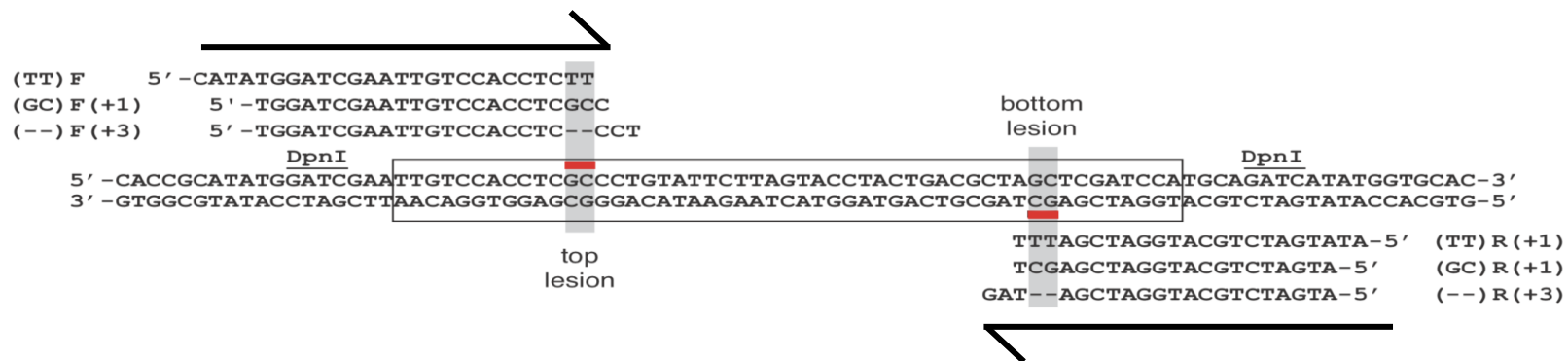
TLS az alsó szálon



templátváltás

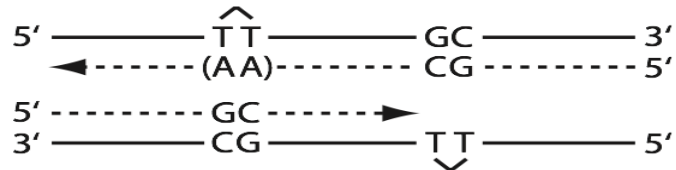


## 3. Allélspecifikus qPCR

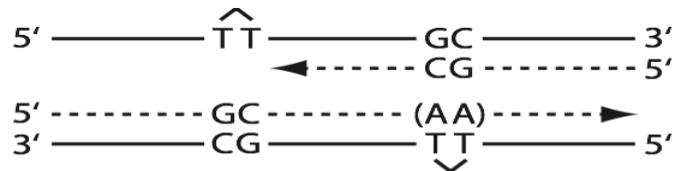




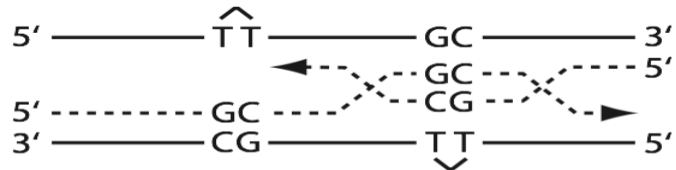
# A replikált plazmid szekvenciája megmutatja, melyik hibaelkerülő folyamat működött



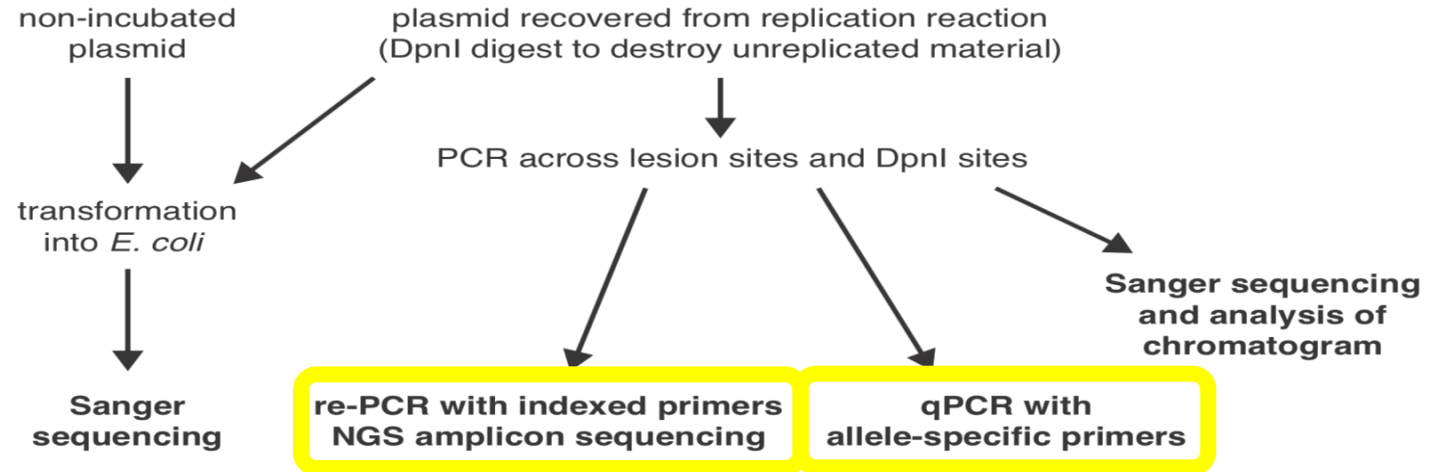
TLS a felső szálon



TLS az alsó szálon

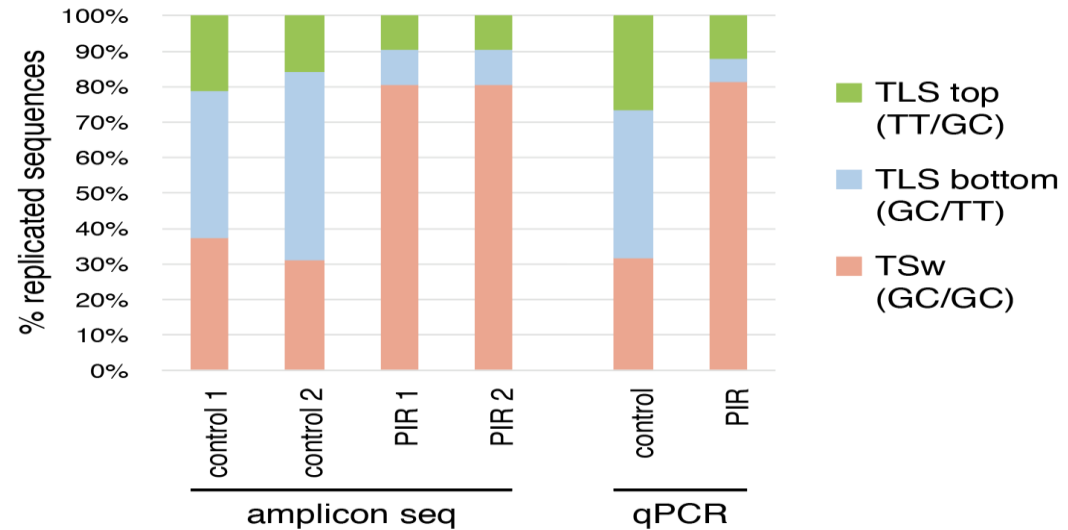


templátváltás



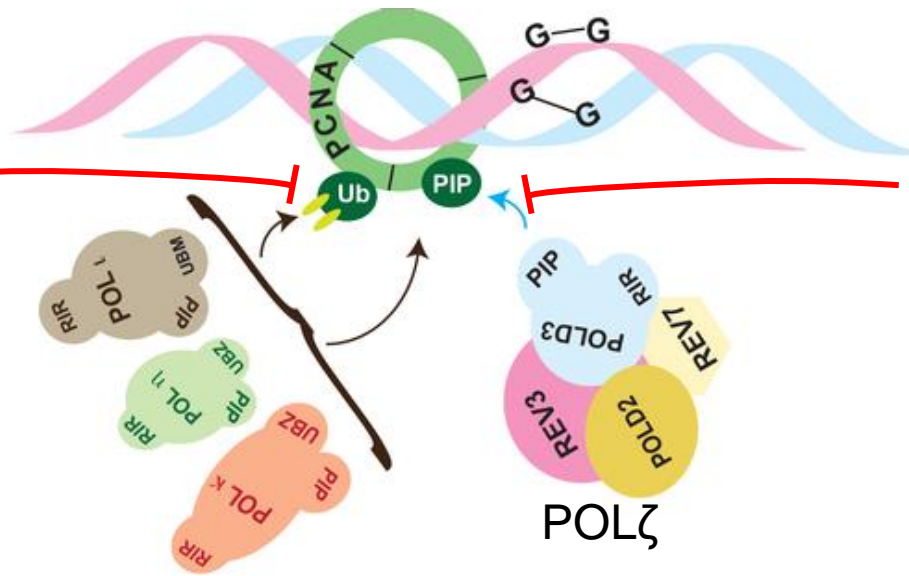
## 2. NGS amplikonszekvenálás

## 3. Allélspecifikus qPCR

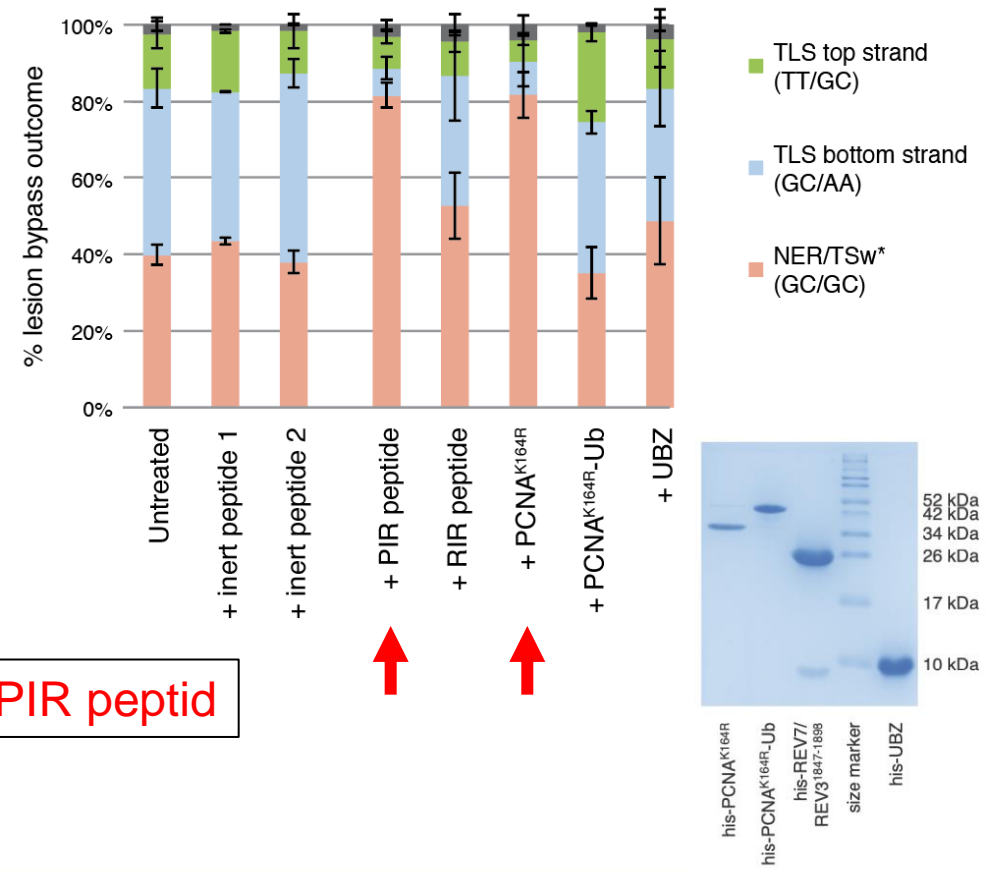


# Domén-domén kölcsönhatások célzása a transzléziós szintézisben

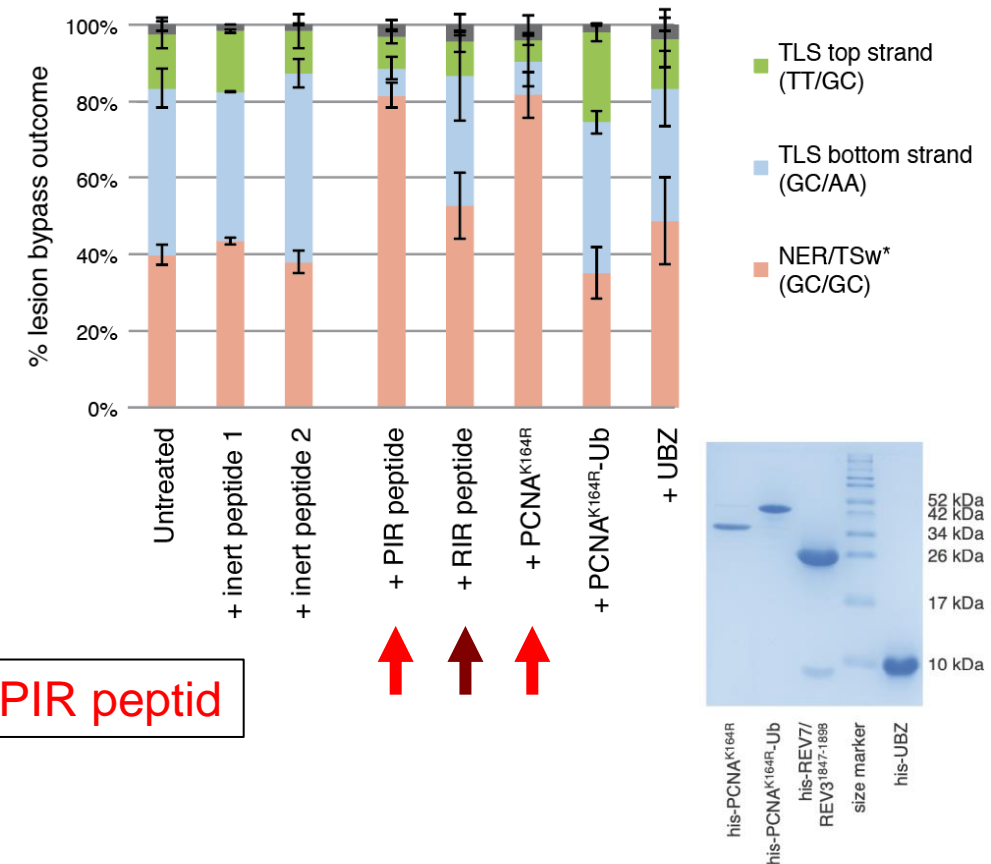
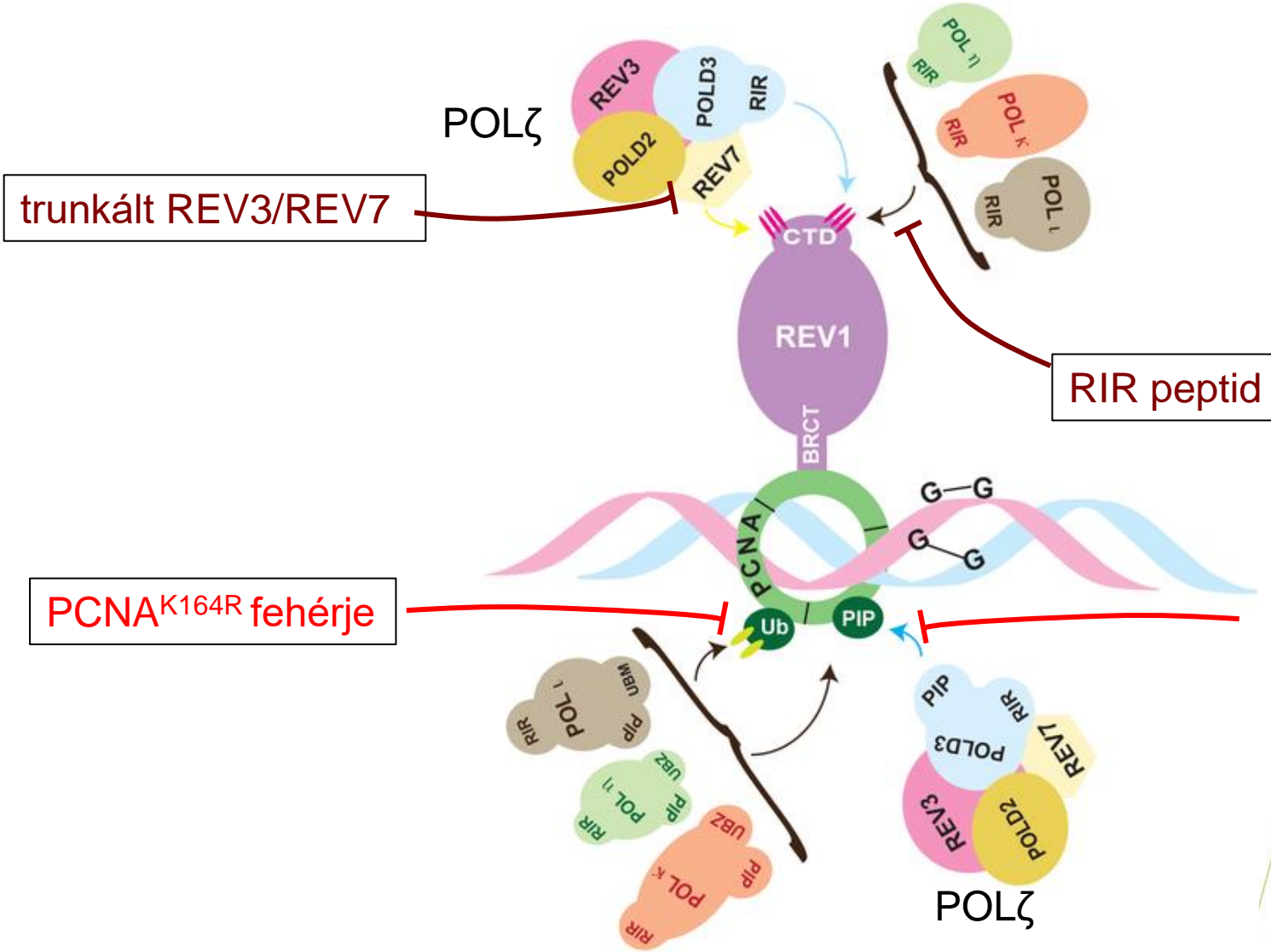
PCNA<sup>K164R</sup> fehérje



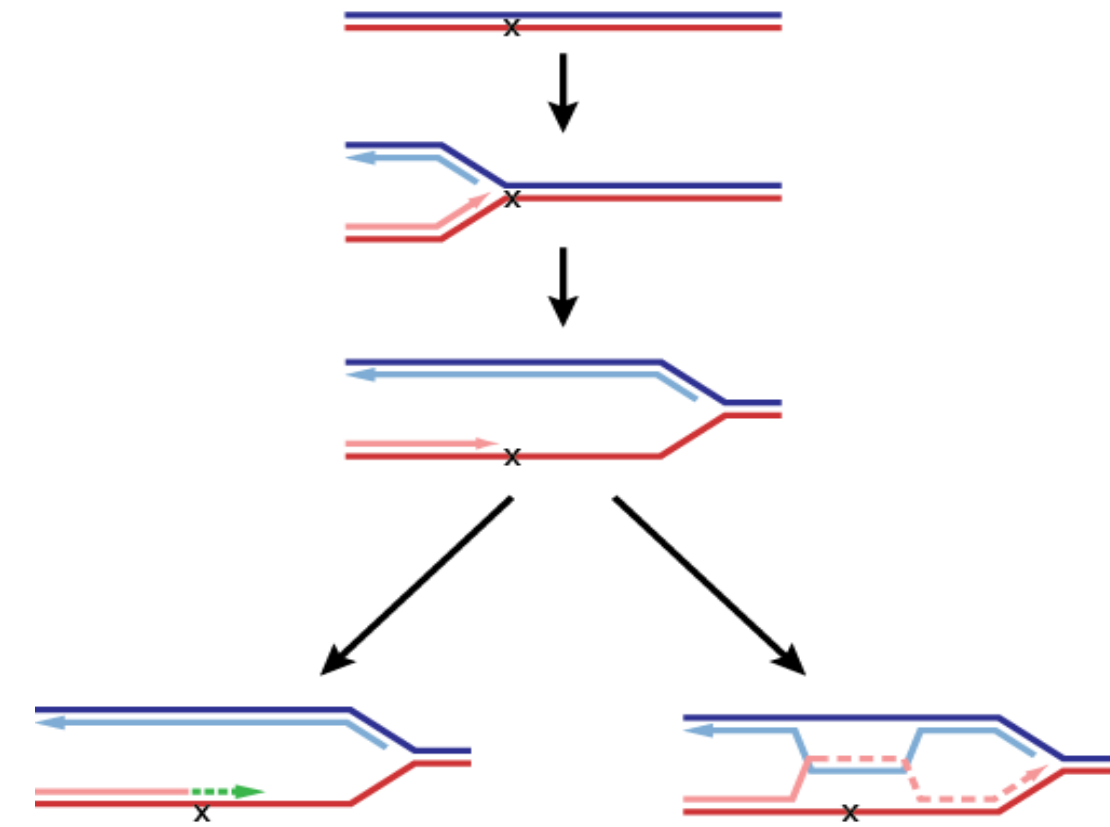
PIR peptid



# Domén-domén kölcsönhatások célzása a transzléziós szintézisben



# A sérült DNS replikációja: alternatívák



mutagenikus  
transzléziós szintézis

DNS polimerázok

hibamentes  
templátváltás

rekombinációs fehérjék



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

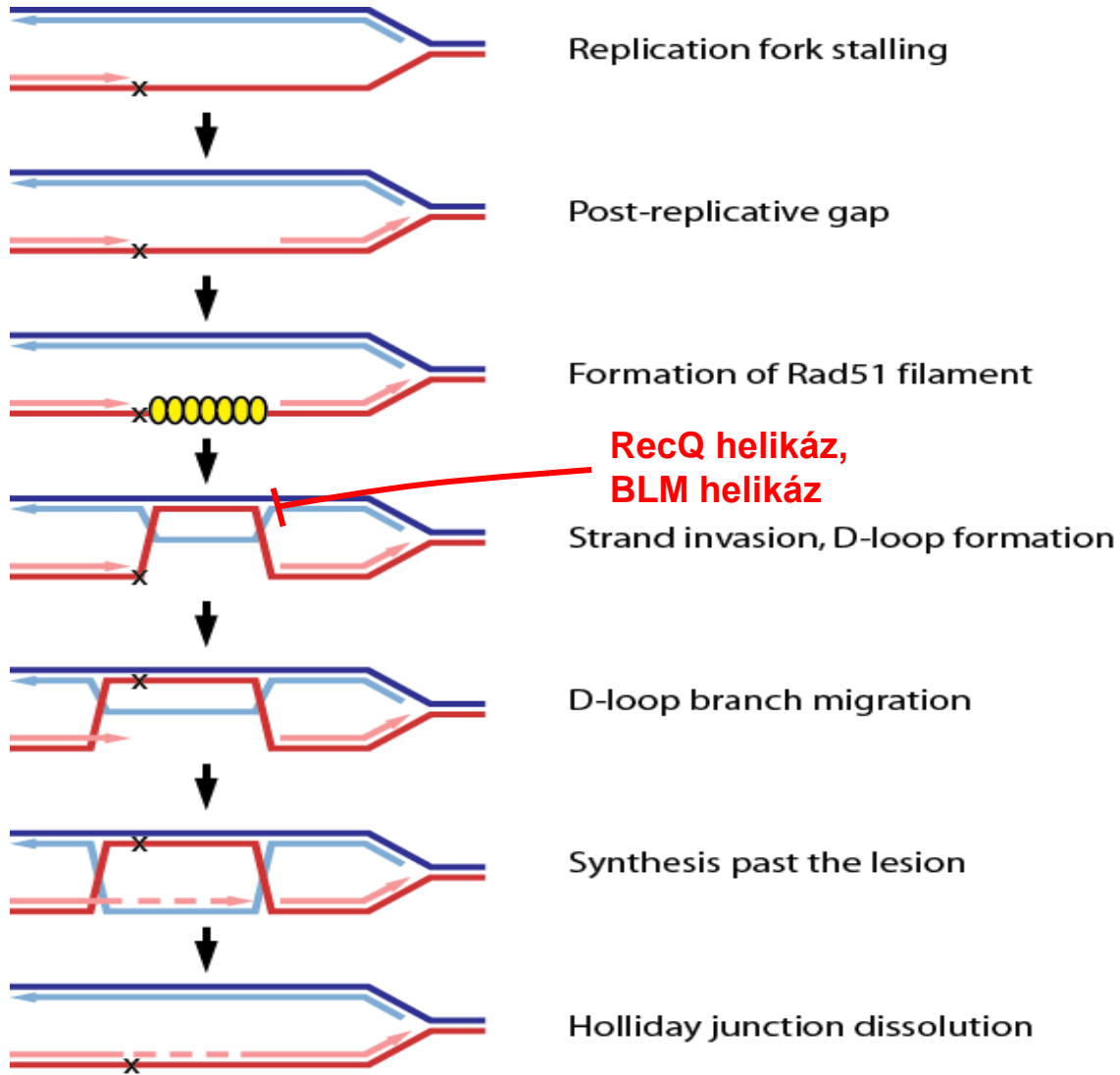
AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT

# In vitro templátváltás?

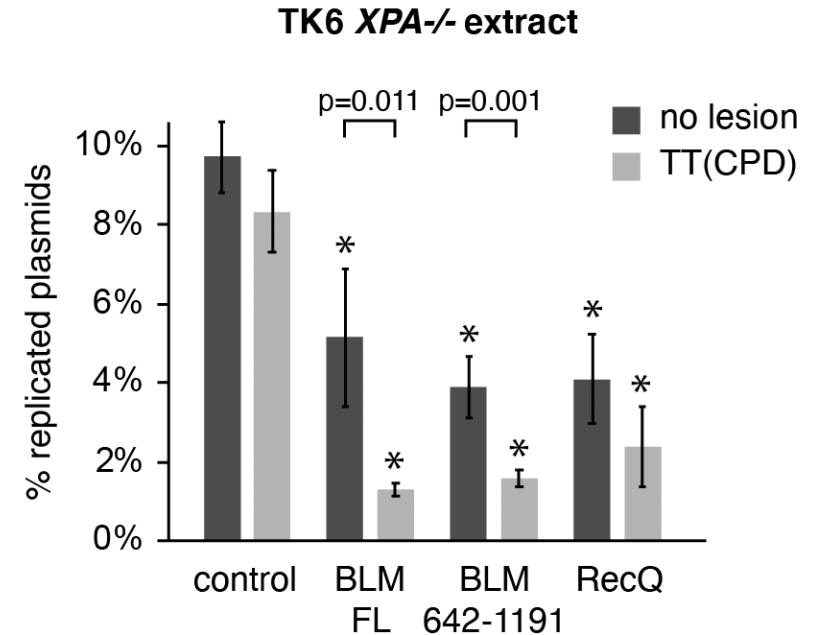
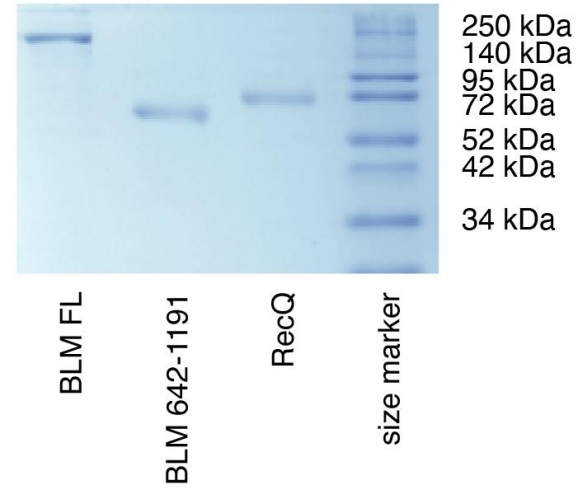


Replication fork stalling

# In vitro templátváltás?



**RecQ** helikáz,  
**BLM** helikáz



# Összefoglalás

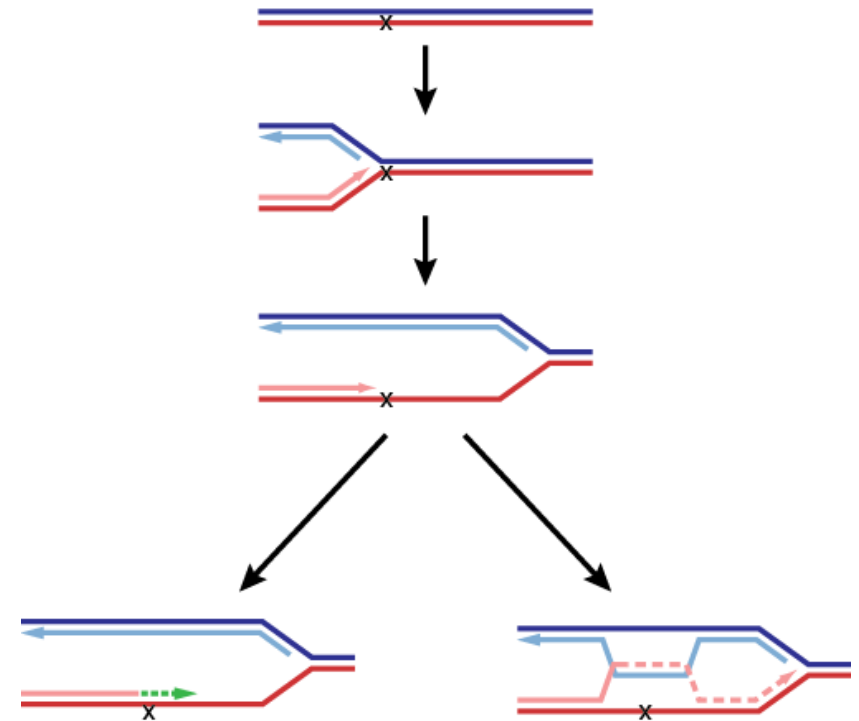
- in vitro esszé a sérült DNS replikációjának követésére
- a transzléziós DNS szintézis működik
- a templátváltás valószínűleg gyengén működik
- a résztvevő fehérjék szerepe vizsgálható



Szeltner Zoltán

Harami Gábor  
Harami-Papp Hajnalka  
Kovács Mihály

Póti Ádám



# Evaluation and modulation of DNA lesion bypass in an SV40 large T antigen-based *in vitro* replication system

Zoltán Szeltner<sup>1</sup>, Ádám Póti<sup>1</sup>, Gábor M. Harami<sup>2</sup>, Mihály Kovács<sup>2,3</sup> and Dávid Szüts<sup>1</sup> 

1 Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Budapest, Hungary

2 ELTE-MTA "Momentum" Motor Enzymology Research Group, Department of Biochemistry, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

3 MTA-ELTE Motor Pharmacology Research Group, Department of Biochemistry, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT