

A DNS HIBA TOLERANCIA ÚTVONALAK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A MUTAGENEZISBEN TELJES-GENOM SZEKVENÁLÁS SEGÍTSÉGÉVEL

Doktori tézisek

Gyüre Zsolt Tamás

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:	Dr. Dávid Szűts, DSc
Hivatalos bírálók:	Dr. Arányi Tamás, PhD Dr. Burkovics Péter, PhD
Komplex vizsga bizottság elnöke:	Dr. Geiszt Milkós, DSc
Komplex vizsga bizottság tagjai:	Dr. Unk Ildikó, PhD Dr. Szalai Bence, PhD

Budapest
2023

1 Bevezetés

A genetikai információ lemásolása, vagyis a replikáció, minden az egyik legalapvetőbb életjelenségek egyike. A hibás vagy be nem fejezett replikáció a kromoszómák töréséhez és a genetikai információ sérüléséhez vezet. Ezt genomi instabilitásnak nevezzük, ami a sejtek tumoros elváltozásához vezethet.

Külső és belső mutagén hatások a DNS kémiai tulajdonságainak megváltozását okozzák. Mivel a replikatív polimerázok képtelenek felismerni a sérült templátot, ez a replikációs villa elakadásához vezet. Az elakadt replikációs villa összeomlása esetén kettősszál-törés következik be, ami az egyik legveszélyesebb DNS-károsodás. Az elakadt replikációs villa védelmét, illetve a replikáció folytonosságát biztosítani hivatott molekuláris mechanizmusokat összefoglalóan DNS hiba tolerancia (DDT) útvonalaknak nevezzük.

Az elakadt replikációs villa újraindítható az elakadást okozó lézió mögött. A követő szálon a DNS szintézise nem folyamatos, hanem szakaszosan, körülbelül 200 bázispár hosszú Okazaki fragmentumokként történik, így elakadás esetén a következő Okazaki fragmentum szintézise biztosítja a replikáció folytonosságát. Ezzel szemben a vezető szálon, ahol a DNS szintézise folyamatos, az elakadt replikációs villa újraindítását a PRIMPOL fehérje biztosítja, ami, a DNS polimerázok között egyedülálló módon, képes a *de novo* DNS-szintézisre. A replikáció újraindítása esetén az új szál folytonossága megszakad, így egyszálú DNS-t tartalmazó szakaszok, hézagok

jelennek meg. Ezeket a sejtciklus későbbi fázisában az úgynevezett posztreprikatív (PRR) DDT mechanizmusok javítják ki.

A transléziós szintézis (TLS) során az elakadt replikációs polimerázok helyét átveszik speciális, úgynevezett transléziós polimerázok. Ezek, köszönhetően speciális aktív centrumuknak és a 3'->5' exonukleáz aktivitás hiányának, képesek folytatni az új DNS-szálak hosszabbítását. Jelenleg öt olyan humán polimerázt ismerünk, aminek fő feladata transléziós szintézis: REV1, Pol θ , Pol κ , Pol ι és a Pol ζ . A templát minősége iránt mutatott rugalmasságnak az ára a pontosság csökkenése: a TLS-polimerázok akár több nagyságrenddel több hibát vétenek a DNS szintézis során, amik rögzülésük esetén mutációként jelennek meg. Mindazonáltal minden TLS-polimeráz bizonyos DNS hibákat, más néven léziókat, képes hiba nélkül másolni. Ezeket „rokon” lézióknak nevezzük. A mutációk elkerülése érdekében a TLS egy gondosan szabályozott folyamat, ami aktív a sejtciklus S (reprikatív TLS) és G2/M (PRR TLS) fázisában is.

A posztreprikációs hézagokat a TLS mellett a templátváltás (TSw) útvonala javítja ki. Első lépésként az EXO1 és MRE11 exonukleázok valamint a DDX11 helikáz 5' és 3' irányban is kiszélesítik a egyszálú DNS szakaszt. A hézag betöltése homológ rekombinációval történik, templátként a testvérkromatidát felhasználva. A templátváltás rekombinációs lépését a kettős szálú DNS törés javításának (DSBR) kulcsfehérjéi végzik, úgy mint a BRCA1, BRCA2, valamint a RAD51 és homológjai.

Az elakadt replikációs villa összeomlása megakadályozható a villa visszafordításával, felhasználva, hogy a frissen szintetizált szálak

egymás komplementerei. A villa visszafordítását a SWI/SNF fehérjecsaládba tartozó HLTf, ZRANB3 és SMARCAL1 transzlokázok hajtják végre a rekombinációs faktor RAD51 segítségével. Az így kialakult, a szakirodalomban „csirkelábnak” nevezett négyágú DNS struktúra fokozottan kitett az exonukleázok általi degradációnak. Ezt RAD51 akadályozza meg, ami a BRCA1 és BRCA2 fehérjék hatására nukleoprotein filamenteket formál a frissen szintetizált szálakkal. A replikációs villa stabilizálása lehetőséget nyújt a DNS hibajavító útvonalaknak a lézió javítására. A négyágú struktúrát ekkor a RECQ1 és a WRN helikázok visszaalakítják a klasszikus háromágú struktúrába, lehetőséget adva a replikáció folytatására.

A replikációs polimerázok elakadása szétkapcsolja a replikációs villát és a kettős szál felnyitásáért felelős CMG-helikáz komplexet. Az ennek eredményeként kialakuló hosszú, egyszálú DNS szakaszokat RPA fehérjék stabilizálják. A DNA-RPA nukleofilamentek inicializálják a DDT útvonalak kezdeti lépéseit. Központi szerepet töltenek be DNS polimeráz kofaktor PCNA fehérje poszttranszlációs modifikációi. A monoubikvitinációja a K164-es pozícióban aktiválja, míg a deubikvitinációja terminálja a TLS-t. A monoubikvitinált PCNA-án K63-as lánchosszabítás során kialakuló poliubikvitin lánc, illetve az azonos pozícióban történő SUMOiláció szabályozza a templátváltás illetve a villa visszafordítást.

Az utóbbi években egyre több eredmény mutatja, hogy a DDT útvonalak fontos szerepet játszanak a rákos elváltozásokat kialakulásában. Habár TLS működése növeli a mutációk

megjelenésének kockázatát, a megfelelő polimerázok hiánya még mutagénebbnek bizonyulhat. Régóta ismert példa a Pol η szerepe az UV-sugárzás miatt kialakuló CPD léziókon keresztül történő replikációban, ugyanis a hiánya egy XP-V kórképhez vezet és növeli a melanóma kialakulásának kockázatát. Hasonló kapcsolatot tártak fel a REV1 és a Pol ι mutációi, valamint bizonyos ráktípusok között. Habár ilyen minőségben védik a sejteket a tumoros elfajulástól, protektív hatásukat kifejtik azon kemoterápiában használt ágensekkel szemben is, amik DNS léziók kialakulásával fejtik ki terápiás hatásukat. Példaként említeném a ciszplatint, egy tüdő-, here- és petefészekrákok, valamint pediátriás daganatok kezelésében használt kemoterápiás szert, ami GG és AG dinukleotidok keresztkötésével formál DNS léziókat és indukál apoptózist. A PCNA-monoubikvitilációja, valamint a REV1 és Pol η a ciszplatinnal szembeni rezisztencia kialakulásában bizonyos tumorok esetében.

A kialakuló mutációk a genetikai információ változása és a szekvenciakontextusa alapján mintázatokba rendezhetőek. A mutagén hatások, illetve a DDR és DDT útvonalak együttes hatása egyedi mutációs mintázatok megjelenését okozza, amiknek különböző arányú keveréke alakítja ki a sejtvonalakra, tumorokra vagy akár fajokra jellemző mutációs spektrumokat. Ezek a komponensek matematikai módszerekkel (például nem-negatív mátrix faktorizációval – NMF) kinyerhetőek. A sokezer megszekvenált tumor minta analiziséből kinyert komponenseket (szignatúrákat) speciális adatbázisokban tárolják, amik közül a legismertebb a COSMIC.

2 Célkitűzések

A PhD kutatásom során az alábbi célokat tűztem ki:

- 1) A DDT útvonalak fontosabb szabályzófehérjéinek kiütése, illetve módosítása a humán hTERT RPE-1 *TP53*^{-/-} sejtvonalba CRISPR-rendszer segítségével.
- 2) A mutáns sejtvonalak vizsgálatával a DDT útvonalak szerepének meghatározása a spontán mutagenesis folyamatában, teljes-genom szekvenálás, illetve gépi tanulási algoritmusok segítségével.
- 3) Annak meghatározása, hogy az RPE-1 sejtvonalakból származó eredmények mennyiben használhatók fel más humán sejtvonalakban lejátszódó folyamatok magyarázatára, illetve ezen folyamatok evolúciós konzerváltságának vizsgálata DT40 csirke sejtvonalak elemzésével.
- 4) A ciszpaltinhoz köthető mutációs mintázatok DDT-függésének vizsgálata RPE-1 sejtvonalakban, teljes-genom szekvenálás segítségével.

3 Módszerek

3.1 Sejtkultúra és kezelések

Az RPE-1 sejteket DMEM/F12 médiumban, 10% FBS, 1% PenStrep és 0.01 mg/ml Hygromycin B jelenlétében, a HMEC sejteket MEGM *Mammary Epithelial Cell Growth Medium BulletKit* használatával tenyésztettem, 37 C°-on, 5% CO₂ jelenlétében.

A spontán mutagenézis vizsgálatához a sejteket 60 napig tartottam kultúrában a két egysejt-klónozás között. A ciszplatin-indukált mutagenézis vizsgálata során a 60 nap alatt a sejteket négy alkalommal kezeltem 2µm ciszplatinnal, 1 órán át.

3.2 CRISPR-mutagenézis

A gén-specifikus oligonukleotidokat az pSpCas9(BB)-2A-GFP plazmidba klónoztam, majd 4D-Nucleofectorral transzfektáltam az RPE-1 sejtekbe. Egy nap elteltével a sikeres GFP+ sejteket FACS segítségével szelektáltam majd 96-lyukú mikrolemezre ültettem ki. Amint a sejtszám lehetővé tette, a kultúrákból genomot izoláltam és *Phire Tissue Direct PCR Master Mix* segítségével amplifikáltam a CRISPR-el megcélzott genomi szakaszokat. A génkiűtött klónokat T7-esszével szelektáltam, majd a Sanger-szekvenálással azonosítottam és lehetőség esetén westernblottal igazoltam. A PCNA modifikációhoz a CRISPR konstrukcióhoz 100 µm ssDNS templátot adtam, majd a transzfekeció után a sejteket 50µm *scr7*-el kezeltem. A templát tartalmazott egy Esp3I endonukleáz hasító helyet, így a sikeres

integrációt T7-esszé helyett az amplikonok Esp3I-emesztésével azonosítottam.

3.3 Westernblot

A sejteket 4x Laemmli pufferben inkubáltam 100 C°-on, 5 percig. A lizátumokat *Mini-PROTEAN TGX* Precast fehérje gélen választottam el, majd PVDF membránra vittem át. Blokkolás után a membránokat 4 C°-on ON inkubáltam az elsődleges ellenanyagban (1:2000), majd szobahőmérsékleten a HRP-kötött másodlagos ellenanyagban (1:20000). A blokkoláshoz 5%, TBST-ben oldott tejport használtam. Ugyanebben hígítottam az ellenanyagokat is. TBST-ben való mosás után a HRP-szignált *Clarity™ Western ECL* szubsztráttal és *ChemiDox MP Imaging* rendszerrel hívtam elő.

3.4 Citotoxicitás vizsgálat.

384-lyukú mikrolemezre lyukanként 250 sejtet ültettem ki, amiket ciszplatinnal kezeltem csökkenő dózisban, 10µm és 4.5 nm koncentráció között. 120 óra után az élő sejtek arányát PrestoBlue festékkel, *EnSpire plate reader* segítségével határoztam meg. Az IC50 értéket a túlélési görbéből határoztam meg, R programnyelv segítségével.

3.5 Teljes-genom szekvenálás és analízis

Sejtvonalanként és kezelésként 3-3 szubklónt és 1-1 parentális klónt szekvenáltattam Illumina NovaSeq gépen, *2x150 bp paired-end* formátumban, 30x átlag lefedettséggel. A nyers

szekvenálási fájlokat FastQC, Trimmomatic, Samblaster és GATK programok segítségével dolgoztam fel és illesztettem a GRCh38 referencia genomra. Az egyedi mutációkat IsoMut program segítségével azonosítottam. A mutációs mintázatokat R programnyelven, *MutationalPatterns* csomag segítségével analizáltam.

3.6 Hosszú deléciók és kópiaszám változások detektálása

A hosszú deléciókat GRIDSS2 programmal azonosítottam, az alapértelmezett paramétereket használva. A kópiaszám változások (CNA) detektálására egy laborunk által fejlesztett algoritmust használtam, ami a lefedettség változásaiból és egyedileg választott SNP-k allélfrekvenciáiból határozza meg az adott genomi szakasz ploiditását a parentális klónhoz viszonyítva.

4 Eredmények

4.1 DDT-mutáns sejtvonalak létrehozása

hTERT RPE-1 *TP53*^{-/-} sejtvonalban CRISPR-rendszer segítségével kiütöttem a REV1 TLS-polimerázt, a PRIMPOL repriming enzimet, illetve bejuttattam egy amoniasav cserét okozó mutációt a PCNA fehérjébe, ami megakadályozza annak ubiquitilációját a 164-es számú lizinjének (K164R mutáció). Az egyszeres mutánsok mellett létrehoztam az összes lehetséges kétszeres mutánst. Továbbá kiütöttem a REV3L extenzor TLS-polimerázt.

4.2 Spontán mutagenesis vizsgálata

Két egysejt-klónozás között a sejteket 60 napig növesztettem. Amint a sejtszám lehetőséget adott rá, sejtvonalanként három párhuzamos kultúrát indítottam. A 60 nap leteltével újra klónoztam a sejteket, majd amint a sejtszám lehetővé tette, sejtvonalanként 3-3 klónból genomot izoláltam, majd a parentális mintával együtt megszekvenáltattam. A nyers szekvenálási adatok feldolgozása után egyedi mutációkat kerestem az izogenikus mintákban. A REV1 és REV3L hiánya minden genotípusban csökkentette a pontmutációk (SBS-ek) számát. Míg a rövid inszerciók száma némileg csökkent a PRIMPOL és PCNA-mutáns sejtekben, a rövid deléciók egyedül a *PCNA*^{K164R}*REV1*^{-/-} tértek el szignifikánsan a kontroll sejtvonaltól.

4.3 A REV1, REV3L és a PRIMPOL befolyásolják a spontán mutagenezist

Nem-negatív mátrix faktorizáció segítségével két komponensre (SBS-A és SBS-B), bontottam a DDT-mutáns sejtek SBS spektrumait. Amikor a két komponenst a COSMIC adatbázisban tárolt ismert szignatúrákhoz hasonlítottam, az SBS-A magas koszinusz hasonlóságot mutatott, amiket a reaktív oxigén szabadgyökök mutagén hatásához kötött SBS18 és SBS36 szignatúrákkal, míg az SBS-B legjobban az SBS3 és SBS40 szignatúrákhoz hasonlít, amiket HR-deficiens tumorokban írtak le. Fontos megjegyezni, hogy a sejtvonalak egyike sem volt kitéve oxidatív hatásnak, illetve egyik sem hordoz HR gént érintő mutációt.

A sejtvonalakban a *de novo* szignatúrák arányát a *REV1*, *REV3L* és *PRIMPOL* gének státusza határozta meg. A *REV1* és *REV3L*-kiütés minden sejtvonalban az SBS-B majdnem teljes eltűnését okozta, míg a *PRIMPOL* hiánya csökkentette az SBS-A-t az SBS-B rovására. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy az RPE-1 sejtekben a HRD-szerű szignatúrát okozó mutációs folyamat a *REV1/Pol ζ* komplex működéséhez köthető.

4.4 Az SBS-A és SBS-B általánosan megtalálható humán sejtvonalakban

Az RPE-1 sejtekből nyert *de novo* szignatúrák megkísérletem rekonstruálni 19 humán sejtvonal publikusan elérhető SBS spektrumát. 12 sejtvonal esetében nagy pontossággal (koszinusz

hasonlóság > 0.9) tudtam rekonstruálni, míg a maradék 7 sejtvonalt olyan hipermutátor fenotípusokat (MMR-deficiencia vagy APOBEC mutagenézis) mutatott, ami specifikus SBS szignatúra megjelenése mellett nagyságrendekkel növelték a mutációk számát. A 12-ből 3, BRCA1 vagy BRCA2-deficienciát mutató sejtvonalt spektrumát pusztán az SBS-B-vel sikerült rekonstruálni, megerősítve a kapcsolatot a REV1/Pol ζ -függő SBS-B-vel és a HRD között. Vizsgáltam továbbá egy másik hTERT-immortalizált sejtvonalt, a HMEC mutációs mintázatát. Az SBS-A és SBS-B újfent elégséges volt a három párhuzamos klón SBS spektrumainak nagy pontosságú rekonstrukciójához (koszinusz hasonlóság > 0.94).

Hogy lefedjem az összes ismert DDT útvonalat, kiütöttem a HLTF transzlokált a hTERT RPE-1 *TP53*^{-/-} és a hTERT RPE-1 *TP53*^{-/-} *PCNA*^{K164R} háttérben, valamint vizsgáltam hTERT RPE-1 *TP53*^{-/-} *BRCA1*^{-/-} sejtvonalt. Mind BRCA1, mind a HLTF hiánya növelte a pontmutációk számát, mégpedig az SBS-B-függő módon. Utóbbi esetben a fenotípus PCNA-ubikvitiláció-függő módon jelent meg.

Az eredmények alapján elmondható, hogy az RPE-1-ből származó SBS-A és SBS-B olyan mutációs folyamatok eredményei, amik általánosan előfordulnak humán sejtvonalakban.

4.5 A REV1/Pol ζ szerepe evolúciósan konzervált

A csirke limfoblasz eredetű DT40 REV1- és BRCA1-sejtvonalak vizsgálata megmutatta, hogy bár a NMF során nyert *de novo* szignatúrák nem mutattak hasonlóságot a humán sejtekből nyertekkel, eloszlásuk hasonló logikát mutat: két szignatúrával

rekonstruálható a vad típus SBS spektruma, amik közül az egyik, REV1-mutáns sejtekben nem megfigyelhető szignatúra felelős a BRCA1-kiütött sejtekben megjelenő emelkedett SBS-mutagenézisért, ami arra enged következtetni, hogy a REV1 szerepe e HRD-szerű mutagenézisben evolúciósan konzervált.

4.6 A TLS segíti a repeat-szekvenciák pontos másolását

Az indel spektrumok vizsgálata megmutatta, hogy a TLS fontos szerepet játszik a DNS repeat-ek replikációjában. A *PCNA^{K164R}* mutáció minden genotípusban csökkentette az egy bázispár hosszúságú deléciók számát, főleg az A/T homopolimer repeat-eknél. Továbbá a TLS teljes gátlása a *PCNA^{K164R}REV1^{-/-}* sejt vonalban megnövelte az repeat szekvenciákban az A/T, illetve a 2 és 3 bp hosszú deléciók számát. Ez a mintázat hasonlít a korábban ID4-ként leírt COSMIC indel szignatúrára, amit korábban az TOP1, illetve RNase-H2 működésével is összefüggésbe hoztak, habár azok egymástól és a most az általam leírt mintázattól és némiképp eltérnek, felvetve a lehetőségét, hogy több eltérő mutációs folyamat is okozhat ID4-szerű indel szignatúrát.

Az ID4 megjelenése a *PCNA^{K164R}REV1^{-/-}* sejt vonalban magyarázható azzal, hogy a TLS mindkét ismert ágának kiütése aktivál egy új, eddig tartalék mechanizmust.

4.7 A REV1/Pol ζ védi a sejteket a hosszú deléciók kialakulásától

A GRIDSS analízis megmutatta, hogy a REV1 vagy REV3L hiányában minden sejtvonalon deléciók jelennek meg egy specifikus, körülbelül 5-50 kilobázisos mérettartományban. A legtöbb deléciót a REV3L^{-/-} sejtvonalon figyeltem meg, azt sugallva, hogy a fenotípus elsődleges forrása a REV3L hiánya, amit REV1-mutáns sejtekben a polimeráz REV1-függő toborzásának hiánya okoz.

4.8 A REV1 és a PRIMPOL fehérjék megakadályozzák a genomi instabilitást

Két sejtvonalon mutatott szignifikánsan emelkedett számú CNA-t, a BRCA1^{-/-} és a REV1^{-/-}PRIMPOL^{-/-}. Míg a BRCA1 esetében régóta ismert, hogy hiánya genomi instabilitást okoz a homológ rekombináció hiányában aktiválódó NHEJ következtében, az REV1 és PRIMPOL egyidejű hiányának ilyen hatása eddig nem volt ismert.

Mivel mindkét fehérje szerepet játszik az replikáció fenntartásában, kézenfekvő magyarázat, hogy a mindkettő hiányában a megnő a elégtelenül replikálódott genomi szakaszok száma, ami mitotikus szegregációs hibákhoz vezet. Alternatív magyarázat, hogy a TLS és repriming hiányában a villa visszafordítás lép működésbe. A visszafordított villák számának növekedése együtt jár az összeomló villák számával, amik kromoszóma-töréshez és genomi instabilitáshoz vezetnek.

4.9 A DDT szerepe a ciszplatin-indukált mutagenézisben

A ciszplatin-kezelt hTERT RPE-1 *TP53*^{-/-}, hTERT RPE-1 *TP53*^{-/-}*PRIMPOL*^{-/-} és hTERT RPE-1 *TP53*^{-/-} *BRCA1*^{-/-} sejtvonalak mutációs elemzése megmutatta, hogy, a megfelelő kezeletlen mintákkal összehasonlítva, mind a pontmutációk, mind rövid deléciók száma többszörösére nőtt a kezelés hatására. Az SBS spektrumok analízise alapján a pontmutációk főleg C>A, C>T és T>A báziscserék voltak, jellemzően GG vagy AG dinukleotidokat tartalmazó tripletelnél, mutatva, hogy megjelenő pontmutációk egyértelműen kötődnek a ciszplatin által formált genomi léziókhöz. Hogy növeljem a NMF pontosságát, az RPE-1 kezelt és kezeletlen minták mellé publikusan elérhető ciszplatin kezelt HepG2, MCF-10A, TK6 és DT40 adatokat adtam. A kinyert négy komponens közül az SigD a kezeletlen mintákban mutatott jelentős kontribúciót, így ezt tekintettem a háttér mutagenézisnek. A SigA, SigB és SigC ciszplatin indukált szignatúrák, amik eltérő arányú keveréke volt felelős a ciszplatin-kezelt mintákban talált pontmutációkért. Míg a *PRIMPOL* hiánya nem változtatta meg a mutagenézist a kontrollhoz képest, a *BRCA1*^{-/-} sejtekben szignatúrák aránya jelentősen eltért. Az SBS-spektrumok dimenzioredukciója három különböző algoritlussal (PCA, UMAP és tSNE) rávilágított, hogy a sejtek szöveti eredete jobban meghatározta a ciszplatin-indukált mutációs mintájukat, mint *PRIMPOL* vagy a *BRCA1* fehérjék hiánya.

Az azonosított rövid indelek túlnyomú többsége 1 bp hosszú deléció illetve inszerció volt, utóbbiak esetében A/T inszerciók. A

szekvencianalízis megmutatta, hogy míg az A/T deléciók főleg homopolimer repeat-ekben történtek, addig a C/G deléciók főleg GG vagy AG dinukleotidok szomszédságában. A nagyszámú A/T inszerció ennél egyedi szekvenciakontextust mutatott, ugyanis szinte kizárólag GGTT > GGTTT mutációt foglaltak magukba, ami egy specifikus molekuláris folyamatot sejtet.

5 Következtetések

- 1) A REV1 központi szerepet tölt be a humán sejtek spontán mutagenezisében, megakadályozva a hosszú deléciók kialakulását, valamint esszenciális a SBS mutagenézis HRD-szerű komponenséhez. Ezen funkcióját valószínűleg a Pol ζ TLS-polimeráz toborzásán keresztül fejeti ki.
- 2) A TLS teljes gátlása a RPE-1 *PCNA^{K164R}REV1^{-/-}* sejtvonalon egy, a két egyszeres mutánsban nem megfigyelhető mutagén folyamat megjelenését okozza, ami A/T deléciók, valamint 2, illetve 3 bázispáros deléciók megjelenésével jellemezhető.
- 3) A REV1 a PRIMPOL-al közösen védi a genom integritását. A RPE-1 *PRIMPOL^{-/-}REV1^{-/-}* kettős mutánsban megfigyelhető genomi instabilitás lehetséges magyarázata, a REV1 és PRIMPOL egyidejű hiánya esetén megnő az elégtelenül replikálódott genomi szakaszok és/vagy a visszafordult replikációs villák száma.
- 4) Az SBS és CNA események száma alapján a REV1 fontosabb szerepet játszik a TLS inicializálásában, mint a PCNA-ubikvitilációja.
- 5) A ciszpaltin-kezelés emelkedett SBS-mutagenézist és az 1 bázispáros indelek számának növekedését okozza szekvencia-specifikus módon.

6 Saját publikációk jegyzéke

6.1 A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1. Zsolt Gyüre, Ádám Póti, Eszter Németh, Bernadett Szikriszt, Rita, Lózsa R, Michal Krawczyk, Andrea L Richardson and Dávid Szüts. **Spontaneous mutagenesis in human cells is controlled by REV1-Polymerase ζ and PRIMPOL.** Cell Reports. 2023;42(8).
2. Dan Chen, Judit Z. Gervai, Ádám Póti, Eszter Németh, Zoltán Szeltner, Bernadett Szikriszt, Zsolt Gyüre, Judit Zámorszky, Marta Ceccon, Fabrizio d'Adda di Fagagna, Zoltan Szallasi, Andrea L. Richardson and Dávid Szüts. **BRCA1 deficiency specific base substitution mutagenesis is dependent on translesion synthesis and regulated by 53BP1.** Nature Communications. 2022;13(1):226.

6.2 Egyéb publikációk

1. Dávid Czimer, Klaudia Porok, Dániel Csete, Zsolt Gyüre, Viktória Lavró, Krisztina Fülöp, Zelin Chen, Hella Gyergyák, Gábor E. Tusnády, Shawn M. Burgess, Attila Mócsai, András Váradí and Máté Varga. **A new zebrafish model for pseudoxanthoma elasticum.** Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021;9:628699.