

**A dUTPáz sejtbeli szerepének *in vivo* analízise mikobaktériumban és
szerkezet-funkció kapcsolatának *in vitro* elemzése humán és
mikobakteriális enzimekben**

Pécsi Ildikó
Okleveles Biológus

Doktori Értekezés

Témavezető:

Dr. Tóth Judit

Tudományos főmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ, Enzimológiai Intézet

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola

A doktori iskola vezetője:
Prof. Erdei Anna
Szerkezeti Biokémia Program
Programvezető:
Prof. Gráf László



Készült:
A Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Enzimológiai Intézetében
Budapest 2011-ben.

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|---|----|
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE..... | 5 |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS..... | 7 |
| 1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS..... | 8 |
| 1.1. A genetikai anyag és a sejt integritásának megőrzése az élővilágban | 8 |
| 1.2. A dUTPáz fiziológiai funkciója..... | 10 |
| 1.3. A tuberkulózis és az újabb gyógyszercélmolekulák azonosításának fontossága | 11 |
| 1.4. A dUTPáz enzim mechanizmusa és szubsztrátspecifitása..... | 13 |
| 2. CÉLKITŰZÉSEK | 17 |
| 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK..... | 18 |
| 3.1. Anyagok | 18 |
| 3.2. Blast analízis..... | 18 |
| 3.3. A <i>dut</i> génkiűtött mutáns sejt vonalak előállítása..... | 18 |
| 3.3.1. Bakteriális törzsek, médiumok és sejt fenntartási körülmények | 18 |
| 3.3.2. DNS tisztítása és koncentráció meghatározása | 18 |
| 3.3.3. DNS konstruktok elektroporálása <i>Mycobacterium smegmatis</i> -ba | 19 |
| 3.3.4. Flexibilis kazetta módszer ismertetése | 19 |
| 3.3.5. Az „öngyilkos vektor” klónozása..... | 20 |
| 3.3.6. A vad típus (WT) és a Δ -loop mutáns komplementáló vektorok klónozása | 21 |
| 3.3.7. Az SCO, a merodiploid és „delinquens” sejt vonalak létrehozása..... | 22 |
| 3.3.9. Gén-esszencialitás bizonyítása a „switching” módszerrel | 24 |
| 3.4. Fehérjék előállítása..... | 25 |
| 3.4.1. Irányított mutagenézis | 25 |
| 3.4.3. Fehérjeminták koncentrációjának meghatározása..... | 26 |
| 3.4.4. Steady-state reakciósebesség mérés | 27 |
| 3.5. Fluoreszcencia spektroszkópiai titrálások | 27 |
| 3.6. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiai titrálások..... | 28 |
| 3.7. Tranziens kinetikai mérések | 29 |
| 3.7.1. Stopped-flow mérés:..... | 29 |
| 3.7.2. Radioaktív quench-flow mérés:..... | 30 |
| 3.8. Röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat | 30 |

| | |
|---|----|
| 3.9. Ioncserélő kromatográfia..... | 31 |
| 3.10. DNS-fehérje kötési vizsgálatok (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)..... | 31 |
| 3.11. Eredmények statisztikai kiértékelése..... | 32 |
| 4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK..... | 33 |
| 4.1. A dUTPáz fiziológiai szerepének <i>in vivo</i> vizsgálata <i>Mycobacterium smegmatis</i> ban ... | 33 |
| 4.1.1. A <i>M. smegmatis</i> , mint érvényes <i>M. tuberculosis</i> modell organizmus..... | 33 |
| 4.1.2. A dUTPáz kódoló <i>dut</i> gén kiütése letális a <i>M. smegmatis</i> ban | 36 |
| 4.1.3 A mikobakteriális loop motívum deléciója letális fenotípust mutat..... | 39 |
| 4.2. A <i>M. tuberculosis</i> Δ -loop mutáns dUTPáz enzimatisz szerepének <i>in vitro</i> vizsgálata | 41 |
| 4.2.1. A steady-state reakciósebesség vizsgálata | 41 |
| 4.2.2. Disszociációs állandó meghatározása differenciális fluoreszcencia és CD spektroszkópiával | 42 |
| 4.3. A humán és mikobakteriális dUTPáz szerkezet-funkció kapcsolatának <i>in vitro</i> vizsgálata..... | 43 |
| 4.3.1. A dUTPázok aktív helyén található fenilalanin konzervált..... | 45 |
| 4.3.2. Az mtDUT ^{H145W} kristályszerkezete az aromás kölcsönhatás konzerváltságát tükrözi | 45 |
| 4.3.3 Az aromás kölcsönhatás megszüntetése nincs hatással a dUTPáz általános konformációjára, sem a szubsztrátkötő zseb szerkezetére | 46 |
| 4.3.4. A π - π kölcsönhatás megszüntetése csökkentette a steady-state reakciósebességet. | 48 |
| 4.3.5. A hidrolízis lépés felelős a csökkent enzimaktivitásért a hDUT ^{F158A} mutánsban.. | 49 |
| 4.3.6. Az enzim-szubsztrát π - π kölcsönhatásának megszüntetése a szubsztrát kötést kismértékben befolyásolta. | 50 |
| 4.3.7. A P-loop-szerű hurok mutáns dUTPázok nem tudnak különbséget tenni a di-és a trifoszfát ligandumok között | 51 |
| 4.3.8. A P-loop-szerű hurok dUTPáz mutánsok steady-state reakciósebességét érintő változásai..... | 53 |
| 4.3.9. A γ -foszfát koordinációjáért felelős aminosavak mutációi a hidrolízis lépés sebességi állandóját szignifikáns mértékben csökkentették..... | 54 |
| 4.3.10. A humán dUTPáz a dUTP analóg dUDP.BeF _x komplexet nem hidrolizálja el ... | 55 |
| 4.4. A dUTPáz enzim fiziológiai hatásának vizsgálata <i>C. elegans</i> ban | 57 |
| 5. EREDMÉNYEK TÁRGYALÁSA | 60 |
| 6. ÖSSZEFOGLALÁS | 68 |

| | |
|---|----|
| 7. SUMMARY | 70 |
| 8. TÁBLÁZATOK | 71 |
| 9. MELLÉKLET | 74 |
| 10. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA | 77 |
| 10.1. A doktori értekezés témájához kapcsolódó közlemények..... | 77 |
| IRODALOMJEGYZÉK..... | 80 |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|------------------------|---|
| ATP | adenozin-trifoszfát |
| BCG | Bacille Calmette-Guérin (tüdőgümőkör elleni vakcina) |
| <i>C.elegans</i> | <i>Caenorhabditis elegans</i> féreg |
| CD | cirkuláris dikroizmus |
| C-terminális | szén-terminális |
| DCO | double crossover (kettős kereszteződés) |
| dCTP | dezoxicitidin-trifoszfát |
| DNS | dezoxiribonukleinsav |
| dTMP | dezoxitimidin-monofoszfát |
| dTTP | dezoxitimidin-trifoszfát |
| dUDP | dexoxiuridin-difoszfát |
| dUMP | dezoxiuridin-monofoszfát |
| dUPNPP | dezoxiuridin- α,β -imido-trifoszfát |
| <i>dut</i> | dUTPáz fehérjét kódoló gén |
| dUTP | dezoxiuridin-trifoszfát |
| dUTPáz | dezoxiuridin-trifoszfát-nukleotid-hidroláz |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> baktérium |
| GFP | Green Fluorescent Protein (zölden fluoreszkáló fehérje) |
| hDUT | humán dUTPáz fehérje |
| HEPES | N-[2-hidroxietyl]piperazin-N'-[2-etán-szulfonsav] |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus (emberi immunhiány-előidéző vírus) |
| <i>M. bovis</i> | <i>Mycobacterium bovis</i> baktérium |
| <i>M. leprae</i> | <i>Mycobacterium leprae</i> baktérium |
| <i>M. smegmatis</i> | <i>Mycobacterium smegmatis</i> baktérium |
| <i>M. tuberculosis</i> | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> baktérium |
| <i>M. ulcerans</i> | <i>Mycobacterium ulcerans</i> baktérium |
| mtDUT | mikobakteriális dUTPáz fehérje |
| NDP | nukleotid-difoszfát |
| NTP | nukleotid-trifoszfát |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (Ploimeráz láncreakció) |
| PDB | Protein Data Bank (Fehérjeszerkezeti adatbázis) |

| | |
|----------------------|---|
| PP _i | szervetlen pirofoszfát |
| RNS | ribonukleinsav |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> élesztő |
| SCO | single crossover (egyszeres kereszteződés) |
| TBC | tüdőgümőkór |
| TRIS | (hidroximetil)-aminometán |
| WHO | World Health Organisation (Egészségügyi Világszervezet) |
| WT | vad típus |
| X-Gal | 5-bróm-4-klór-3-indol-β-D-galaktopiranozid |

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretnék köszönetet mondani **Dr. Vértessy G. Beátának**, aki lehetőséget nyújtott arra, hogy a kutatócsoportjában dolgozhassak, biztosította a hatékony kutatómunka feltételeit és megismertetett a kiváló téma alapjaival.

Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Tóth Juditnak**, hogy megismertetett az enzimműködés kinetikai „világának” alapjaival, hogy bevezetett a külföldi pályázatok megírásának fortélyaiába, valamint számos külföldi és hazai konferenciákon való részvételemet támogatta és munkámat mindig kiemelkedő szakértelemmel irányította.

Hasonlóképpen köszönet illeti a sok-sok tanácsért, türelemért és a mai napig is tartó együttműködésért **Prof. Tanya Parisht** és **Dr. Amanda C. Brownt**, akik a Londonban végzett munkámat irányították az EMBO és a FEMS ösztöndíj keretén belül eltöltött négy hónap alatt.

Köszönöm **Dr. Závodszy Péternek** és **Dr. Budai Lászlónak**, az Enzimológiai Intézet egykori és jelenlegi igazgatójának, hogy lehetővé tették munkámat az intézetben.

Köszönet illeti az Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológia Doktori Iskola vezetőit, **Prof. Erdei Annát** és **Prof. Gráf Lászlót**, hogy PhD tanulmányaimat a Doktori Iskolában végezhettem.

Köszönettel tartozom **Dr. Harmat Veronikának**, **Leveles Ibolyának**, **Hirmondó Ritának**, **Lopata Annának** és **Szabó Judit Eszternek**, akik értékes eredményeikkel emelték a dolgozat színvonalát. Külön köszönet illeti **Dr. Pukáncsik Máriát**, aki számos esetben a fehérjetisztítás során felmerülő problémák megoldásában mindig a segítségemre volt, valamint **Merényi Gábort**, **Horváth Andrást** és **Róna Gergelyt**, akik a klónozási problémák megoldásában mindig hasznos és eredményre vezető tanácsokkal segítettek.

Szeretném megköszönni a kutatócsoportból **minden Munkatársamnak** a segítséget, hogy munkám során bármilyen kérdéssel, bizalommal fordulhattam hozzájuk.

Továbbá köszönöm a doktori munkám befejezéséhez nyújtott támogatást a **Richter Gedeon Centenárium Alapítványnak**.

Továbbá nagyon hálás vagyok **Trencsényi András** grafikus barátomnak, aki türelmével és tanításával sok segítséget nyújtott a Corel-DRAW program használatához.

Végül és nem utolsósorban ez a munka nem jöhetett volna létre szerető **Édesanyám**, **Testvérem** és **Párom** támogatása nélkül. Nagyon köszönöm, hogy mindvégig hittek bennem.

Természetesen köszönöm továbbá **Barátaimnak**, akikkel megoszthattam sikereimet és olykor izgalmas szakmai beszélgetésekbe is bocsátkoztunk.

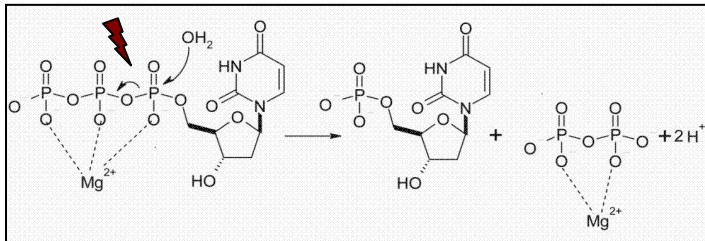
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A genetikai anyag és a sejt integritásának megőrzése az élővilágban

A sejt örökítő anyagának (DNS) épsége nélkülözhetetlen a helyes sejtosztódási folyamathoz, azonképpen a genetikai anyag mintázatának generációkon át történő pontos átörökítéséhez. Hasonlóképpen írt véleményt erről már több mint száz éve még a DNS-makromolekula pontos szerkezetének megfejtése előtt 1893-ban Friedrich Miescher biokémikus: "az öröklődés gondoskodik az egymást követő nemzedékek alaki kontinuitásról és ennek alapja még a kémiai molekulák szintjénél is mélyebben, az atomcsoportok elrendeződésében keresendő" [1]. Mint ahogy az 1930-as években minden bizonnyal kiderült, hogy a DNS hosszú, láncszerű molekula, amely négy szerves bázisból épül fel: adenin (A), guanin (G), timin (T) és citozin (C). Az ősi elsőként létrejött világ az „RNS-világ” volt [2], amelyben a timin helyett az uracil (U) bázis található meg. Ezen építőkövek helyes arányban történő előfordulása a sejtben szigorú alapfeltétele a megfelelő genetikai kódot tartalmazó DNS szintézishez. A dUTP és dTTP nukleotidokat egyetlen metil csoport különbözteti meg egymástól. Ezért fordulhat elő, hogy a DNS polimeráz nem tud különbséget tenni a nukleotidok között, így a DNS replikáció során adeninnel szembe a kanonikus dTTP helyett dUTP-t is beilleszthet [3]. Az uracil pedig hibaként jelenik meg az örökítő anyagban. Ezen kívül az emberi szervezet sejtjeiben naponta ezer és egymillió között van a DNS bázispár sérülések száma. Ezen sérülések okai többfélék lehetnek: 1) a DNS-t felépítő bázisok kémiai módosulása, mint pl. a citozin dezaminálódása, amely G-C → A-T pontmutációt eredményez, tautomerizálódás, oxidáció stb.; 2) környezeti károsító hatások, mint pl. UV-C sugárzás, amely timin dimerek kialakulását okozza; 3) vegyi anyagok pl. N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG), amely erős elektrofilként a DNS molekula nukleofil központjait, a nitrogén atomokat támadja meg. A sejtek DNS szerkezetét ért károsodás típusától függően sokféle DNS-javító mechanizmus alakult ki [4] számos javító fehérje toborzásával [5, 6].

A nukleotidok helyes arányban történő előfordulása a sejtben elengedhetetlen, ami számos enzimműködés szigorú szabályozása alatt áll. A nukleotid dUTP egy természetes közttermék, amely a timidin bioszintézis során minden osztódó sejtben folyamatosan szintetizálódik. A megfelelően alacsony dUTP: dTTP arányt a sejtben a dUTPáz katalitikus aktivitása biztosítja, amely az egyetlen *de novo* természetes szintézis útvonal egyik reakciója. A dUTPáz a dUTP hidrolízisét katalizálja, ami által a sejt számára egyrészt a dTTP nukleotid bioszintézishez szükséges dUMP prekursor molekulát biztosítja, másrészt szervesen

pirofoszfát (PP_i) keletkezik (1. ábra) [7-10]. Az enzim aktivitása révén csökkenti a DNS-be hibaként beépülhető uracil mennyiségét, hozzájárulva így a nukleinsav integritásának megőrzéséhez [11].



1.ábra A dUTPáz által katalizált hidrolízis

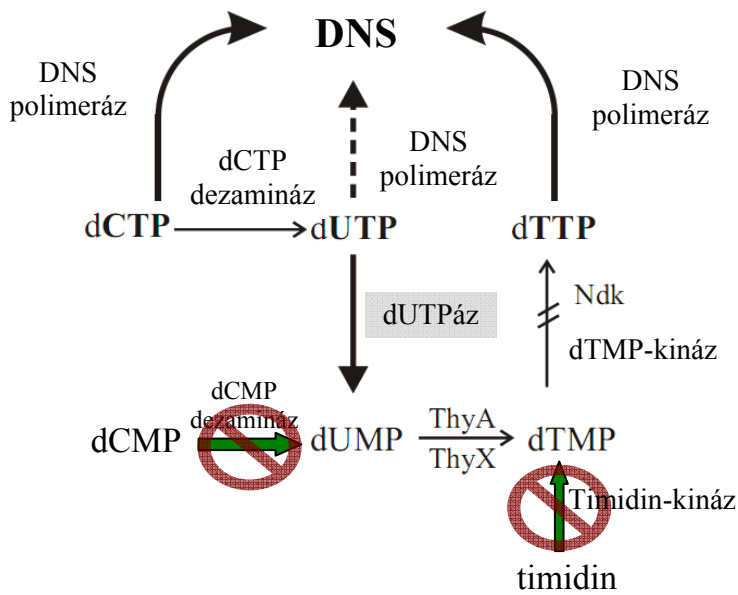
A reakció során az aktivált vízmolekula a dUTP α -foszfátja ellen indít nukleofil támadást, amely dUMP és PP_i keletkezését eredményezi. Ábra forrása: Barabas et al 2004 [115].

A dUTPáz aktivitásának csökkenése vagy hiánya folytán a sejtben magas dUTP:dTTP arány keletkezik, ami a sejtsztódás során uracil tartalmú DNS-t fog eredményezni. Ez aktiválja az uracil kivágásán alapuló javító mechanizmust [12]. A javítás azonban nem lesz hatékony, amennyiben továbbra is magas a sejt dUTP koncentrációja, mivel a DNS polimeráz a kivágott uracil bázis helyére nagy valószínűséggel ismét uracilt fog beépíteni. Az így felerősödő hiábavaló báziskivágó javító mechanizmus a kromoszóma fragmentációjához és végül a sejt halálához vezet, amit timinmentes sejthalálnak nevezünk [13, 14].

A timinmentes sejthalál mechanizmusát alapvetően apoptózisként írták le [15, 16], de más sejthalál mechanizmus is felmerült a dUTPáz csendesítéssel kapcsolatban [17]. Az autofágia is egy ilyen programozott élettani mechanizmus, amelynek funkciói igen változatosak. Alapvető szerepet játszik a sejt éhezési, hypoxiás és hipertermiás stresszre adott válaszában, a stressz-indukált és programozott sejpusztulásban. Feltehetően ilyen stressz faktornak tekinthető a dUTPáz enzim aktivitásának hiánya vagy csökkent működése is. Az autofágia („önemésztés”) folyamata során a citoplazma bizonyos részletei lizoszómákba jutnak, ahol savas hidrolázok (nukleázok, lipázok) által lebontódnak [18, 19]. Az így felszabaduló komponensek újra hasznosulhatnak a sejtfelépítő folyamatokban, illetve építőkövekként szolgálhatnak makromolekulák szintéziséhez. Az autofág degradáció ugyancsak esszenciális a károsodott, funkcióképtelen makromolekulák, sejtszervecskék hatékony eltávolításához [20, 21]. Az autofágia tehát esszenciális szerepet játszik a sejt anyagának megújításában, makromolekulák újra képződésében, a sejt túlélésében, összegezve nagymértékben járul hozzá a sejt épségének megőrzéséhez. Ennek ellenére, egyre több publikáció olvasható az irodalomban arról, hogy az autofágia a programozott sejthalál egyik alternatív mechanizmusát képezheti [19, 22].

1.2. A dUTPáz fiziológias funkciója

A fenti okok miatt a dUTPáz rendkívül jelentős minden élő szervezet számára, ezt támasztja alá az a tény is, hogy nemcsak eukarióták kódolják genomjukban hanem prokariótákban és vírusokban egyaránt megtalálható [11, 23, 24]. Rákellenes terápiák során a timidin bioszintéziséért felelős enzimeket, gátló gyógyszereket, széles körben alkalmazzák. Ezek közül is legismertebb a timidilát szintáz gátló fluoropirimidin: az 5-fluorouracil (5-FU) [25], vagy a dihidrofolát reduktáz (DHFR) gátlásáért felelős methotrexát [26], amelyek jelentős mértékben megnövelik a sejtbeli dUTP szintet. [27]. Ezen kívül azonban más fertőző betegségek, mint pl. a TBC (tüdőgümőkór) vagy a malária esetében is a timidin bioszintézisben szereplő enzimek ígéretes gyógyszer-célpontot jelentenek. A timidilát szintáz enzimek mellett a dUTPáz hasonlóképpen fontos gyógyszer-célpontnak tekinthető a TBC, a malária [28] és a daganatos betegségek gyógyításában, mint ahogy ezt több nemrégiben megjelent publikáció is igazolja [29-31]. Kiemelkedően fontos fiziológiai funkcióval bírhat különösen a mikobaktérium és plazmodium fajokban, ahol a dUTPáz a dTMP-t képző útvonal központi jelentőségű enzime [11]. A dTTP szintéziséért emberben 3 fő útvonal felelős (két *de novo* és egy menekítő), a mikobaktériumokban viszont egyetlen útvonal látja el ezt a feladatot nevezetesen a *dut* gén által kódolt dUTPáz aktivitásán keresztül (2. ábra). A dUTPáz létfontosságát két szervezetben (*E. coli* [32], *S. cerevisiae* [33, 34]) korábban már leírták. Továbbá egy 2003-ban közölt genomi méretű mutagenézisen alapuló átfogó, de alacsony megbízhatóságú vizsgálat szerint a dUTPáz nélkülözhetetlen a sejtosztódáshoz a *M. tuberculosis* baktériumban [35]. Mindemellert a *M. tuberculosis* dUTPáz átfogó biokémiai jellemzésével [36-38] ellentétben olyan irányú kísérletek, amelyekben a dUTPáz génkiütött mutáns fiziológiai hatását *in vivo* mikobaktériumban vizsgálták volna ez idáig nem történtek. Holott a timidilát szintáz útvonalban résztvevő dUTPáznak az *M. smegmatis* organizmusban betöltött fiziológiai szerepének a feltárása továbbá, mint gyógyszer célmolekula azonosítása óriási jelentőséggel bírhat a TBC kór gyógyításában. Az eddig ismert összes mikobakteriális genom nagyfokú homológiával tartalmazza a dUTPázt, azonban ennek mikobaktériumban való létfontosságáról bizonyítékok nem állnak rendelkezésünkre.

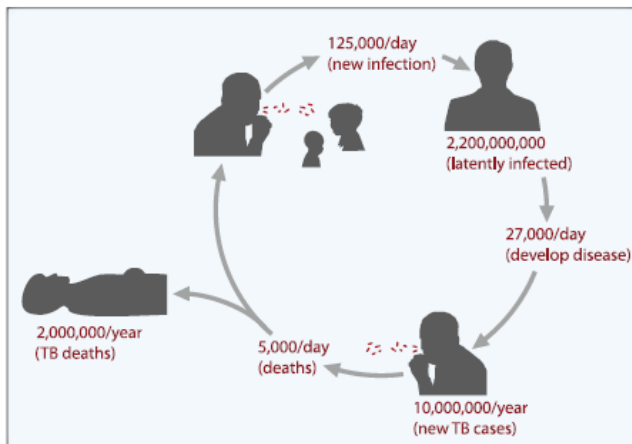


2. ábra A *Mycobacterium smegmatis de novo* timidin bioszintézisében szereplő kulcsenzimek

A timidin bioszintézisében résztvevő enzimek a következők: dezoxi-citidin-trifoszfát deamináz (dCTPdeamináz), dezoxi-uridin-trifoszfát nukleotidhidroláz (dUTPáz), nukleozid-difoszfát-kináz (Ndk), timidilát-kináz (dTMP kináz) és a timidilát szintázok nevezetesen a ThyX és a ThyA. A dUTPáz (szürke háttérrel kiemelve) a dUTP foszfátészter-hidrolízist katalizálja, így közvetve hozzájárul a dTMP szintéziséhez, valamint csökkenti a sejtbeli dUTP szintet. Megemelkedett dUTP szint az uracil DNS-be való beépülését eredményezi, amit a szaggatott nyíllal jelöltem. A menekítő útvonalak hiányát tilos jelzéssel ábrázoltam. Ábra forrása: Pecki et al, bírálat alatt a *Journal of Bacteriology*-nál.

1.3. A tuberkulózis és az újabb gyógyszer-célmolekulák azonosításának fontossága

A több mint egy évszázada tartó intenzív kutatómunka ellenére a *M. tuberculosis* baktérium okozta fertőző betegség a TBC napjainkban is közegészségügyi problémát jelent világszerte. Évente több, mint két milliárd látens fertőzött és nyolc millió aktív TBC esetet regisztrálnak [39, 40] és a WHO jelentése szerint 2010-ben 1,6 millió ember halálát követelte [41] (3. ábra). A multi drog rezisztens TBC [42], ezenfelül az extrém drog rezisztens TBC több, mint 40 országban való előfordulása [43] és a HIV vírus globális elterjedése [44] mind olyan tényezők, amelyek miatt a tuberkulózis kezeléséhez újabb gyógyszer-célmolekulák azonosítása nem tűr halasztást a kutatásban. Napjainkban a rendelkezésünkre álló egyetlen TBC vakcina a BCG (Bacille Calmette-Guérin), amit az elmúlt 90 évben több, mint 4 milliárd embernek adtak be [45]. Számos bizonyíték áll rendelkezésünkre, amelyek kétséget kizáróan igazolják, hogy a BCG a felnőttkori pulmonáris TBC ellen nem immunizál [45-47]. Összefoglalva, új gyógyszer-célmolekulákra és második generációs vakcinára mihamarabb szükség van ahhoz, hogy ezt a cseppfertőzéssel terjedő kórokozót megfékezzük, amely megfelelő kezelés híján halálos kimenetelű betegséget okoz [48].



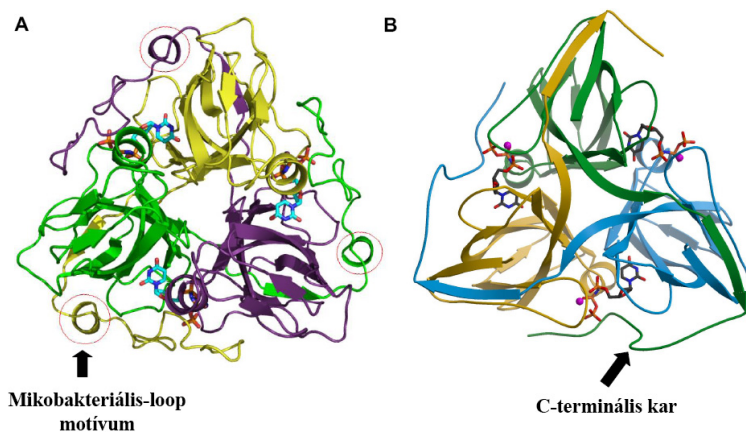
3. ábra A TBC kórokozójának "bűnös" terjedési ciklusa

Ez a cseppfertőzéssel terjedő betegség évente 1,6-2 millió ember halálát követeli és több mint kilencmillió új fertőzést regisztrálnak. A TBC kórokozójával a világnépesség csaknem harmada, mintegy kétmilliárd ember látenszen fertőződött. Az ábrán ezek az adatok napra lebontva is láthatók. Ábra forrása: Kaufmann et al 2010 [45].

A racionális gyógyszertervezéshez szükséges jó gyógyszercélmolekulák azonosításához elengedhetetlen fontosságú, hogy az adott célmolekula úgy fiziológias, mint enzimatisz szerepét az adott organizmusban, ez esetben a mikobaktériumban mélységeben megértsük és feltárjuk. Annak ellenére, hogy a dUTPáz már több tanulmányban is javasolták, mint gyógyszercélmolekulát [29], a racionális gyógyszertervezésnél igencsak nehéz, olykor megoldhatatlan feladatot jelent a nagyfokú szelektivitással bíró molekula meghatározása. A humán és patogén dUTPázok nagyfokú szekvencia és szerkezeti homológiával rendelkeznek, ami igencsak megnehezíti a hatékony és specifikus gyógyszer molekula tervezését. A mikobakteriális dUTPázok kivételnek számítanak, mivel itt az aminosav-szekvencia összehasonlítások egyértelműen igazoltak egy faj-specifikus, öt aminosavból álló motívumot, amely a humán dUTPázból hiányzik (4. ábra). Ez a mikobakteriális inzert egy hurok konformációt alakít ki a dUTPáz monomer egységek felszínén. Ezen mikobakteriális inzert-szekvencia úgy fiziológias, mint enzimatisz aktivitásban betöltött funkciója ismeretlen volt munkám kezdetén.

1.4. A dUTPáz enzim mechanizmusa és szubsztrátspecifitása

Inhibitor tervezésekor a lehetséges mellékhatások elkerülése érdekében nem lehet figyelmen kívül hagyni, hogy az enzimaktivitást gátló molekula a dUTPázra szelektív legyen, továbbá ahhoz specifikusan kötődjön. Ehhez szükséges a dUTPáz enzim szerkezetének alapos feltérképezése és enzimmechanizmusának részletes ismerete. Korábbi publikációból a *M. tuberculosis* dUTPáz kristályszerkezetét már ismertük [37], viszont részletes oldatfázisú kísérletek, amelyek mélységeiben az enzimmechanizmust vizsgálják, hiányoztak. Az enzim általános feltekeredése a bakteriális dUTPáztól a humán dUTPázig konzervált [49-53]. A dUTPázok a dUTP szubsztrátra kiemelkedő módon specifikusak, mind a dezoxiribózra, mind az uracilbázisra, mind a foszfátlánc hosszára nézve, így az enzim egyéb nukleotidok hidrolízisét csak kismértékben katalizálja (pl. az *E.coli* dUTPáz a dCTP-t alacsony katalitikus hatékonysággal bontja) de pl. a dUDP-t egyáltalán nem hidrolizálja el [54]. A *M. tuberculosis* és a humán dUTPázok homotrimer szerkezettel rendelkeznek, azaz három teljesen azonos polipeptidláncból épülnek fel (4. ábra) és három szimmetrikus aktív hely található bennük.



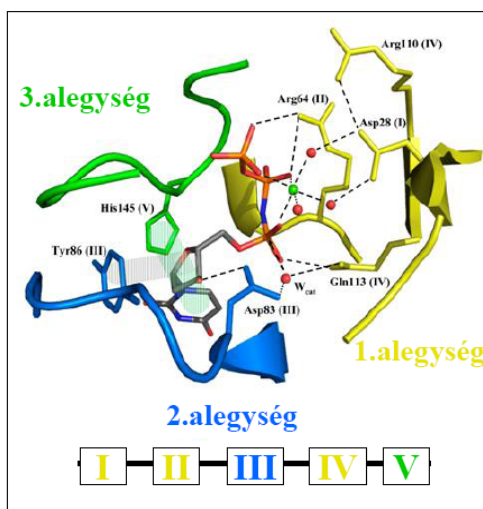
4. ábra (A) *M. tuberculosis* (PDB: 2PY4) és a (B) humán (PDB: 3EHW) dUTPázok kristályszerkezete

A három azonos polipeptidláncból felépülő dUPNPP szubsztrátanaloggal komplexálódott szerkezetek 3 eltérő színű szalagmodellel ábrázolva. Az aktív zsebekben található szubsztrátok pálcikamodellel szemléltetve. A releváns szerkezeti sajátosságokat nyilak szemléltetik. Ábra forrása: Varga et al BBRC 2008 (A) [37] és Varga et al Febs Letters 2007 (B) [94].

Azonban a mikobakteriális dUTPáz kristályszerkezetében a humán enzimmel ellentétben a monomer egységek felszínén egy hurok konformáció látható (4A. ábra). A dUTPázokban mindhárom aktív hely kialakításában, ahogy az 5-ös ábrán jól látható öt konzervált motívum vesz részt, amelyek a különböző (1-es 2-es és 3-as) alegységekből származnak. A hatékony katalízishez szükséges a nem-szomszédos alegység C-terminális karja is, amely a szomszédos alegység fölött átívelve és abba beépülve éri el a távoli

aktívhelyet. Az uracil gyűrű kötéséért a III. motívum által kialakított β -hajtú felelős, melynek főlánc-atomjai az uracillal a DNS-ben megszokott bázispárosodáshoz hasonló, csak az uracilra jellemző hidrogénkötés-rendszert alakítanak ki. A harmadik motívumban található a katalitikus vizet koordináló Asp 83 (5. ábra) is, a reakciót (1. ábra) ezen aminosav által koordinált víz molekula nukleofil támadása indítja (5. ábra). A nukleofil támadás az α foszfáton történik. A reakciósebesség meghatározó lépés az S_N2 mechanizmusú hidrolízis ($k = 6 \text{ s}^{-1}$) [55]. A II-IV. motívumok az enzim kofaktorának a Mg^{2+} ionnak és a dUTP-nek a koordinálásában vesznek részt [11], valamint olyan kölcsönhatásokat létesítenek, amelyek az aktívhely aleggység-aleggység kapcsolat stabilizálásához járulnak hozzá [38].

Az V. motívum a harmadik monomer aleggység C-terminális karjában található és elsősorban a γ -foszfát koordinálásában és az átmeneti állapot stabilizálásában vesz részt. Ez a motívum tartalmaz egy konzervált aromás aminosavat is (humán enzimben a 158-as fenilalanin, mikobakteriális enzimben a 145-ös hisztidin), melynek oldallánca π - π kölcsönhatást hoz létre a szubsztrát (dUTP) uracil gyűrűjével.



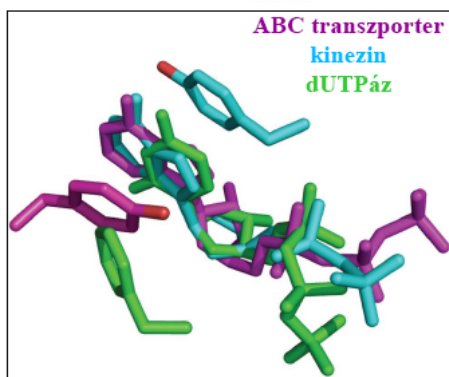
5. ábra *M. tuberculosis* dUTPáz (PDB kód:2PY4) aktív zsebének felépítése

Az aktív centrum felépítéséhez az 1.alegység (sárga) az I, II és IV-ös motívumokat, a 2.alegység (kék) a III-as motívumot míg a 3.alegység (zöld) az V-ös motívumot adja. A megfelelő aleggységekben megtalálható motívumok azonos színnel jelölve. A szubsztrátanalóg dUPNPP-t narancssárga pálcikamodell szemlélteti. A szubsztrát uracil gyűrűje és a konzervált His 145 között kialakuló aromás kölcsönhatás zöld sávval ábrázolva. A Mg^{2+} iont (zöld) és a víz molekulákat (piros) gömbmodell jelöli. Ábra forrása: Vertessy és Toth ACR 2009 [11].

Ez a konzervált aromás kölcsönhatás a rendelkezésünkre álló összes dUTPáz kristályszerkezetben megfigyelhető, azonban ennek katalízisben betöltött szerepe még tisztázatlan. Az aromás kölcsönhatások szerepét a makromolekulák konformációjának kialakításában számos biológiai rendszerben tanulmányozták, mint pl. a DNS kettős hélix [56], ribonukleo-protein komplexekben [57], fehérjék feltekeredésében [58]. Azonban a π - π kölcsönhatások enzim-katalízisben játszott szerepéről nem sokat tudunk, az irodalmi adatok alapján leginkább csak a flavoenzimek [59] és a N-glikozidos kötést hasító enzimek, a hidrolázok [60] esetében vizsgálták. Holott a makromolekulák felismerésében az aromás

oldalláncok biztosította kölcsönhatások kulcsfontosságú szereppel rendelkeznek [57]. Ezek részletekben történő megértése nélkülözhetetlen a racionális gyógyszertervezéshez és a hatóanyag optimalizáláshoz a farmakológiában.

A fent említett két példa jól összevethető az általunk vizsgált jelenséggel ugyanis azokban az esetekben is a kölcsönható aromás molekula kovalens vagy nem-kovalens kölcsönhatások révén, de a kémiai reakció központjában van. A flavoenzimek által katalizált redoxreakciókban az elektron akceptor flavin kofaktor aromás gyűrűje a kémiai reakció központja, amivel közvetlenül az enzim egyik aromás oldallánca hat kölcsön, és ez a kölcsönhatás a redoxpotenciál csökkenését eredményezi [61]. A nukleotid hidrolázok pedig az aromás kölcsönhatást a katalitikus komplexet elhagyó purin nukleobázis megfelelő protonáltságához használják [60]. A PDB adatbázisban található nukleotidokat hasító enzimek szerkezetének vizsgálata és összehasonlítása alapján azt mondhatjuk, hogy az aktív zsebben többnyire aromás oldalláncok találhatók [62] (6. ábra) és funkciójukat tekintve a szubsztrátkötésben játszanak szerepet, mint pl. az ABC transzporterek [63], kinezinok [64] és kinázok [65] esetében. Ezeknek a kölcsönhatásoknak a katalízisben betöltött szerepéről ismereteink igencsak hiányosak.

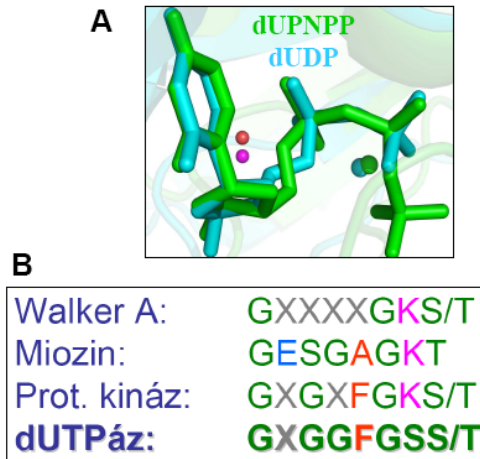


6. ábra Különböző nukleotidokat hasító enzimesaládok szubsztrátjaikkal alkotott szerkezete látható

Az enzim és szubsztrátja között kialakult π - π kölcsönhatás figyelhető meg az ABC transzporter, (PDB:1XEF); a kinezin (PDB:2NCD) és a dUTPáz (PDB:2HQU) fehérjékben. Ábra forrása: Pecsí et al NAR 2010 [135].

A dUTPáz nagyfokú specificitással rendelkezik a trifoszfát nukleozidra nézve, aminek ok-okozati összefüggéseit valószínűleg a harmadik alegység V. motívumában kell keresnünk. A dUTPáz egyik jól ismert tulajdonsága, hogy a szubsztrátját a dUTP-t nagy katalitikus hatékonysággal hidrolizálja az α és a β foszfát atomok között, míg a dUDP ligandumot nem képes elhidrolizálni annak ellenére, hogy mindkét nukleotid, a katalitikus víz molekula és a Mg^{2+} ion is az enzim aktív zsebében azonos módon (7A. ábra) a katalízishez kompetens konformációban helyezkednek el, ahogy a kristályszerkezetből kiderült. Továbbá a C-terminális karban egy P-loop-szerű hurok szekvencia motívum is található (7B. ábra) [66, 67]

amelynek feltehetőleg a kristályszerkezetek alapján a szubsztrát γ -foszfátjának koordinálásában, az átmeneti állapot stabilizálásában, avagy a dUDP és a dUTP nukleotidok megkülönböztetésében lehet szerepe.



7. ábra Két dUTPáz szerkezet aktív helyének illesztése a di- és a trifoszfát ligandumokat szemléltetve PDB:2HQ ;1SLH (A) és különböző enzimek konszenzus P-hurok aminosav szekvenciái (B)

Az (A) ábrán jól látható hogy mindkét ligandumnál az α - β foszfátok és a katalitikus vizek (narancs a tri- és lila a di foszfát) azonos pozícióban a hidrolízishez kompetens konformációban vannak. Ábra forrása: Pecsí et al, bírálat alatt a PNAS-nél.

A P-hurok szekvencia számos ATPáz és GTPáz fehérjecsaldában megtalálható, például kinázokban, citoskeletális motorfehérjékben és ABC transzporterekben. Ezeknek az enzimeknek közös tulajdonsága, hogy egy purin nukleotidot hidrolizálnak NDP-vé és szervetlen foszfáttá. A G-fehérjékben és a miozinokban a P-hurok motívum a szubsztrát nukleotid és a támadó víz molekula koordinálásában, a γ foszfáton történő hatékony nukleofil támadásban játszik fontos szerepet [68-70]. Szerkezeti elhelyezkedését tekintve általában a P-hurokra az jellemző, hogy a fehérje belsejében / magjában egy β -redőt köt össze egy α -hélixel (lásd 3-as ábra az [68]-as cikkben). A homotrimer dUTPázok esetében ez a motívum érdekes szerkezeti elrendeződésben, a fehérje felszínén mintegy az aktív helyet lezárva található (4B. ábra). Korábbi tanulmányokban *E.coli* dUTPázokban kimutatták, hogy a C-terminális kar flexibilis és a dUTP hidrolízishez feltétlenül szükséges [66, 71, 72]. A humán dUTPáz C-terminális karjának ezen belül is csakis a P-loop-szerű hurok motívumnak a szubsztrátkötésben betöltött szerepéről azonban vizsgálatok nem állnak rendelkezésünkre. Azaz továbbra is nyitott kérdés maradt, hogy a dUTPáz hogyan különbözteti meg a difoszfátot a szubsztrát trifoszfátjától és hogy ez a P-loop-szerű hurok motívum milyen mértékben járul ehhez hozzá.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során a következő kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

1. A mikobaktériumokban kiemelkedő jelentőséggel bírhat a dUTPáz, mivel a timidin bioszintézis útvonalban kizárólag ez az enzim biztosítja a dUMP prekursor molekulát a sejt számára. Így joggal merült fel a kérdés, hogy mi a dUTPáz gén kiütésének fiziológiai hatása *in vivo M. smegmatis*-ban? Létfonosságú-e ez a fehérje, és ezáltal javasolható-e ígéretes gyógyszer célmolekulának?

2. A mikobakteriális dUTPázok egy mikobaktérium specifikus szerkezeti motívummal is rendelkeznek a humán enzimmel ellentétben. Mi lehet ennek a specifikus motívumnak a szerepe *in vivo* mikobaktériumban? Célom volt, ennek a motívumnak a funkcióját külön is tanulmányozni.

3. A továbbiakban tisztázatlan kérdés volt az is hogy, mi lehet ennek a mikobaktérium specifikus motívumnak az enzimmechanizmusban betöltött szerepe? Erre a kérdésre steady-state enzimkinetikai és spektroszkópiai módszerek alkalmazásával kerestünk választ.

4. Munkám kezdetén a dUTPáz és a szubsztrát (dUTP) uracil gyűrűje között kialakult aromás kölcsönhatásnak a szubsztrátkötésben és a termék felszabadulásban tulajdonítottak szerepet a kristályszerkezetek alapján [50]. Oldatfázisú kísérletekben is meg kívántuk vizsgálni ezt a dUTPázokban konzervált kölcsönhatást mutánsokon végzett szerkezeti és kinetikai módszerekkel.

5. A dUTPázok megkülönböztetik az NDP (nincs hidrolízis) és NTP ligandumokat, annak ellenére, hogy a hidrolízis az α - β foszfátok között történik. Miért? Ezen kérdés megválaszolására a szubsztrát dUTP γ -foszfátjának koordinációját befolyásoló mutációkat terveztünk a dUTPáz P-loop-szerű hurok szerkezetében.

6. A dUTPáz csendesítése *C. elegans* hermafrodita embriókban az embrió letalitása mellett autofágia folyamatra utaló morfológiai változásokat mutat. Vellai Tibor munkacsoportjával együttműködésben azt vizsgáltuk, mi lehet a dUTPáz szerepe az autofágia folyamatában.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

Az elektroforézis során használt anyagokat a Bio-Rad, a kromatográfiához szükséges gyantákat a Qiagen cégtől szereztük be. A restriktív enzimeket és a molekuláris biológiához (klónozáshoz) szükséges enzimeket a New England Biolabs vagy a Fermentas cégektől vásároltuk. A felhasznált analitikai tisztaságú vegyszerek a Merck és a Sigma-Aldrich cégektől származtak.

3.2. Blast analízis

Blast-p aminosav-szekvencia analízist alkalmaztam a timidilát metabolizmusban szereplő enzimek homológia mértékének a meghatározásához a *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. ulcerans*, *M. leprae* és *M. bovis* fajok között. Az idetartozó fehérjék aminosav szekvenciáinak illesztését és összehasonlítását a következő web szerver <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> alkalmazásával végeztem. A honlapon található alapbeállítási paramétereket használtam.

3.3. A *dut* génkiütött mutáns sejtvonalak előállítása

3.3.1. Bakteriális törzsek, médiumok és sejtfenntartási körülmények: *M. smegmatis* mc²-155 [73] sejtvonalat Lemco (folyadék) médiumban vagy 15 g L⁻¹ Bacto agart (szilárd) tartalmazó Petri-csészében növesztettem az irodalomban eddig leírtaknak megfelelően [74]. A különböző sejtvonalakot a megfelelő antibiotikumokat (20 µg / ml kanamycin, 100 µg / ml hygromycin B, 10 µg / ml gentamicin, és 20 µg / ml streptomycin) tartalmazó tápoldatokban növesztettem. A különböző sejtvonalak szelekciójához az agart tartalmazó tápoldatokhoz 5 % (wt/v) szukrózt alkalmaztam. A kék-fehér telepek szelekciójához 20 µg / ml X-Gal-t (5-bróm-4-klór-3-indol-β-D-galaktopiranozid) használtam. A plazmidokat az *E. coli* DH5α, és az XL1-blue sejtvonalakban termeltem 37 °C-on Luria-Bertani (LB) tápoldatban.

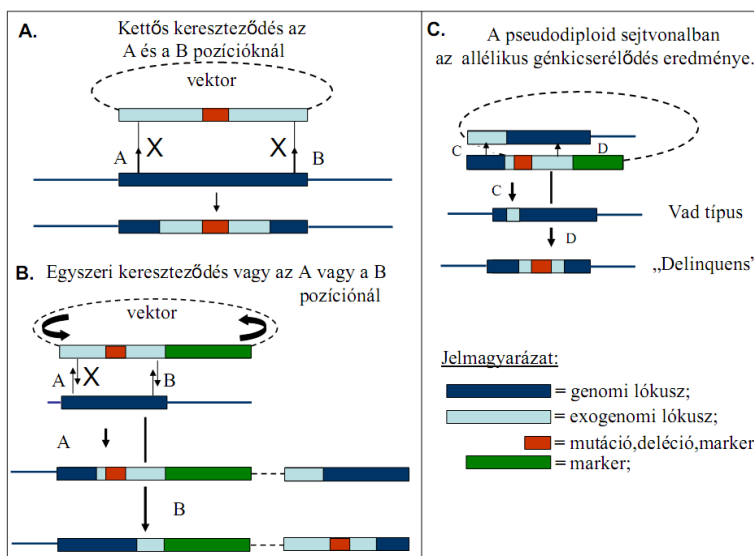
3.3.2. DNS tisztítása és koncentráció meghatározása: Restriktív DNS fragmentek valamint PCR amplifikátumok izolálását és tisztítását a Qiagen Gél-izoláló és PCR tisztító Kit-el végeztem a gyártó használati utasítása szerint. A specifikus PCR termékeket 1%-os agaróz gélen 100V-on 30 vagy 45 percig futattam, azaz választottam el a számomra nonspecifikus amplifikátumoktól. Az elektroforáláshoz nélkülözhetetlen nagy tisztaságú és koncentrációjú DNS plazmidokat a DNA Clean and Concentrator-25 Kit-el (Zymo Research) állítottam elő. A DNS minták koncentrációját az UV abszorbancia spektrumból (260 nm-nél)

a Nanodrop ND-1000 Spektrofotométer (Thermo Scientific) készülékkel határoztam meg. A klónozási lépéseket valamint a restrikciós enzimekkel végzett endonukleáz emésztést a New England Biolabs által gyártott enzimekkel végeztem, standard körülmények között.

3.3.3. *DNS konstruktok elektroporálása Mycobacterium smegmatis*ba: 200 μ L kompetens *M.smegmatis* sejtekbe 5 μ L-nyi vagy kevesebb végtérfogatban maximum 5 μ g-i DNS plazmidot elektroporáltam. 0,2 cm átmérőjű jégben előhűtött elektroporáló küvettákat (Flowgen) használtam. A sejtek elektroporálását egyszeri pulzust alkalmazva az X Cell Gene Pulser (Bio-Rad); műszerrel végeztem 2,5 kV feszültség, 25 μ F kapacitás, és 1000 Ω ellenállás beállítása mellett. Ezt követően a küvettát még 10 percig jégen inkubáltam, majd a sejteket 5 mL Lemco tápoldattal átmostam és steril csőbe raktam. A transzformált sejteket 37 °C-on minimum 2 óráig 155 rpm-en rázattam. Az inkubációs idő leteltével a baktériumokat 4000 rpm-en 10 percig centrifugáltam, majd a sejtsapadékat friss 1mL Lemco tápoldatban felfuszpendáltam. A sejtszuszpenziót a megfelelő antibiotikumot tartalmazó agar platekre szélesztettem ki. Az antibiotikum rezisztens transzformánsokat 37 °C-os 2-5 napig tartó inkubáció elteltével izoláltam.

3.3.4. *Flexibilis kazetta módszer ismertetése*: A dUTPáz génkiütéshez egy homológ rekombináción alapuló (lásd 8-as ábra) úgynevezett flexibilis kazetta módszert alkalmaztam [75]. Rekombináció (genetikai-anyag kicserélődés) kiterjedt homológ DNS szakaszok között jön létre, amit mikobaktériumokban a RecA fehérje közvetít [76]. Kezdetleges próbálkozások a homológ rekombinációs esemény, mint módszer alkalmazására a lassú növekedésű TBC baktériumban nagyon problematikus volt [77]. Az okok még a mai napig is tisztázatlanok. Mindamellett ezeknek a problémáknak a megoldásához számos stratégiát kidolgoztak, aminek következtében jelentőségteljes mértékben javult az elérhető eredmények minősége. Mint pl. a minél hosszabb túlnyúló végek [78, 79] alkalmazása, vagy enyhén károsított (UV vagy lúgos denaturáló szerek által) DNS szubsztrátok sejtbe történő bejuttatása [80] ezzel is a rekombinációs esemény előfordulási gyakoriságát növelve, valamint több szelekciós marker együttes használata [81]. Továbbá, elengedhetetlen volt a mikobaktérium sejtbe juttatáshoz szükséges szállító stratégiák továbbfejlesztése, mint pl. hőérzékeny fágok, plazmidok, öngyilkos plazmid rendszerek kidolgozása, majd a módszerben való alkalmazásuk [82-84]. Allélikus rekombináción alapuló mutánsok létrehozásához a megfelelő szelekciós markerek használata alapvető fontosságú. A negatív szelekciós markerek azok a gének melyek káros, olykor halálos hatással vannak a baktériumra, amikor a megfelelő hatóanyag a médiumba kerül. Az egyik ilyen leggyakrabban használt negatív szelekciós marker a *Bacillus subtilis*-nak a *sacB* génje által kódolt levanszukróz, amely a mikobaktériumokban szukróz

jelenlétében letalitást okoz [85]. Előnye az antibiotikum érzékenységgel szemben, hogy nem egy antibiotikum rezisztens sejtvonallal kell dolgozni. Ugyanakkor a hátránya, hogy elég nagy gyakorisággal alakulhatnak ki spontán szukróz rezisztens mutánsok [77]. Kísérleteim során ezt a negatív szelektációs markert használtam. Továbbá egy másik hatékonyan alkalmazható marker a kék színreakciót eredményező *lacZ* gén által kódolt β -galaktozidáz volt [82]. Azok a sejtek amelyek expresszálják a β -galaktozidázt és a médium X-galt tartalmaz, kék színűek lesznek, így a többi kolóniától jól elválaszthatók. A *lacZ* gén indukciójához a mikobaktériumokban ellentétben az *E.coli*-val nem szükséges IPTG-t használni, ugyanis a génmeghajtást saját mikobakteriális promoter (*Ag85a*) végzi. Az általam alkalmazott génkiütéses módszer a fent említett szelektációs markereket tartalmazza, továbbá két DNS konstrukciót is, nevezetesen az „öngyilkos” és a komplementáló plazmidokat. Ezen plazmidok lépésről-lépésre történő előállítását az alábbiakban ismertetem.



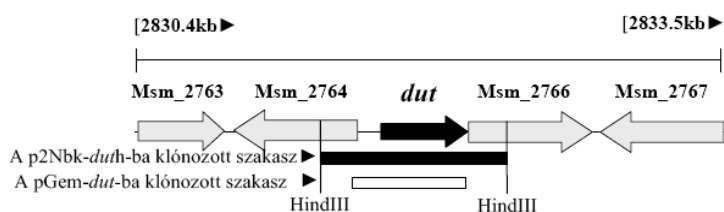
8. ábra Allélikus génkicserélődés sematikus ábrázolása homológ rekombinációt követően

A.) Kettős rekombinációs esemény a kívánt vektor egyidejű integrációjával az adott genomba. **B.)** a kívánt vektor egy ponton történő bevitelét követően a B pontban szemléltetett sejtvonalból kiindulva az újabb egyszeri rekombinációs esemény előfordulásától és helyétől függően a kívánt mutáns sejtvonalt, vagy a vad típus izolálható. (delinquens; kromoszómális kópia törölve, mutáns kópia genom-ba integrálódott).

3.3.5. Az „öngyilkos vektor” klónozása: A *dUTPáz* (*dut*) mutáns (funkcióképtelen) sejtvonalak létrehozásához egy „öngyilkos” vektort (amely nem képes további osztódásra így a plazmid generációkra való átörökítése nem történhet meg) a következőképpen terveztem és klónoztam: a.) a *M. smegmatis* genomból polimeráz-lánreakcióval (PCR) egy 2,1 kb méretű szakaszt amplifikáltam fel amely a *dut* gént, továbbá a rekombinációhoz szükséges túlnyúló végeket tartalmazta. A 2,1 kb PCR termékek 5' végére a *Hind*III hasító helyek beviteléhez a következő előre és ellentétes irányba haladó primer szekvenciákat terveztem: (5'-ctacgaagcttaccctgatcttggctctcggc-3') és (5'-ctacgaagcttaccgagccgcgcgtgaccgg-3'). Majd ezt a 2,1 kb méretű szakaszt a p2NIL [75] vektorba klónoztam a *Hind*III restrikciós hely

segítségével. b.) A higromicin marker kazettát (hyg) a pGOAL19 [75] plazmidról PCR reakcióval amplifikáltam fel a következő *AgeI* restrikciós helyet tartalmazó előre és ellentétes irányba haladó primer szekvenciákkal: (5'-cgtcaccgggtgcagtcctccacgggcagctcgt-3'); (5'-cgtcaccgggtctgaaggtggcatttccgcag-3'). A funkcióképtelen dUTPáz kódoló allélt a hyg marker kazettának az *AgeI* restrikciós hely által a *dut* génbe történő beklónozása eredményezte. Ezáltal egy 1,8 kb méretű hyg rezisztenciát kódoló szekvenciával megszakított, azaz funkcióképtelen dUTPáz kódoló *dut* gént kaptam. Ezután a 6,1 kb méretű *PacI* kazettát, amely a *lacZ* és a *sacB* szelekciós markereket tartalmazta a pGOAL17 plazmidból [75] kivágtam majd a p2NIL vektorba beklónoztam a vektor egyetlen *PacI* restrikciós helyét felhasználva. Mindezen klónozások a p2Nbk-*duth* (10A. ábra) „öngyilkos vektor” létrejöttét eredményezték.

3.3.6. *A vad típus (WT) és a Δ-loop mutáns komplementáló vektorok klónozása:* A WT *dut* komplement vektor elkészítéséhez a teljes *dut* gént a natív promoterével együtt (amplifikált szakasz a 9-es ábrán jelölve) PCR reakcióban megsokszoroztam, amelyben a következő előre és ellentétes irányba haladó primer szekvenciákat használtam: (5'-cgccgatttcggcacctcgg-3') és (5'-cgtcaagcttccacaaactcgcagtcgcc-3').

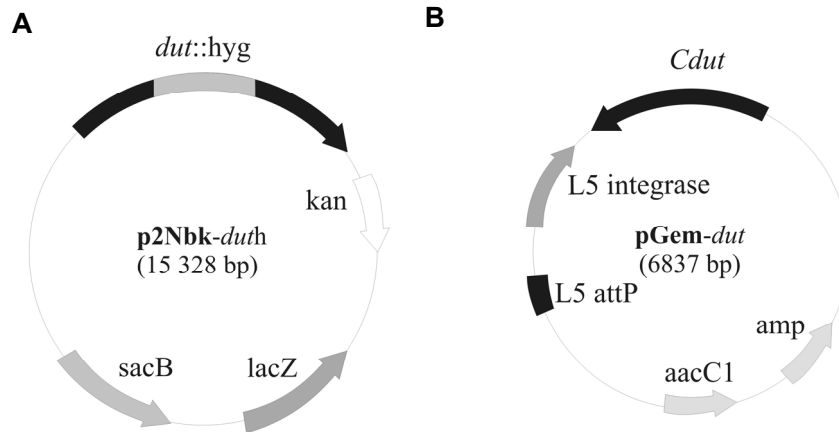


9. ábra *A M. smegmatis* genom dUTPáz (*dut*) génjének kromoszómális környezete

Az öngyilkos és a komplement vektor klónozásához (*HindIII* restrikciós enzimmel) szükséges szekvencia részeket fekete illetve fehér téglalappal jelöltem. Ábra forrása: Pecsí et al, bírálat alatt a *Journal of Bacteriology*-nál.

Ezt követően a 0,8 kb méretű PCR termékeimre adenin bázisokat szintetizáltam a Taq polimerázzal, majd a pGEM T-easy vektorba (Promega) klónoztam. Továbbá az antibiotikum szelekcióért (gentamicin) és a hely specifikus integrációért felelős Gm-Int kazettát a pUC-Gm-Int [86] vektorból *HindIII* restrikciós helyek segítségével klónoztam be ugyanebbe a konstrukcióba, amelynek eredményeképpen a pGem-*dut* komplementáló vektort (10B. ábra) állítottam elő. A Δ -loop mutáns komplementáló vektort a QuikChange irányított mutagenézis kit-tel (Stratagene) hoztam létre a megfelelő aminosavak (Ala133-Ser137) deléciójával. A PCR reakcióban templátnak a pGem-*dut* vektort használtam. A mutációhoz tervezett és felhasznált előre és ellentétes irányba haladó primer szekvenciák a következők voltak: (5'-cctcgttcgacgagacaaccctggcg-3') és (5'-cgccacgggtgtctcgtcgaacgagg-3'). A vektorok

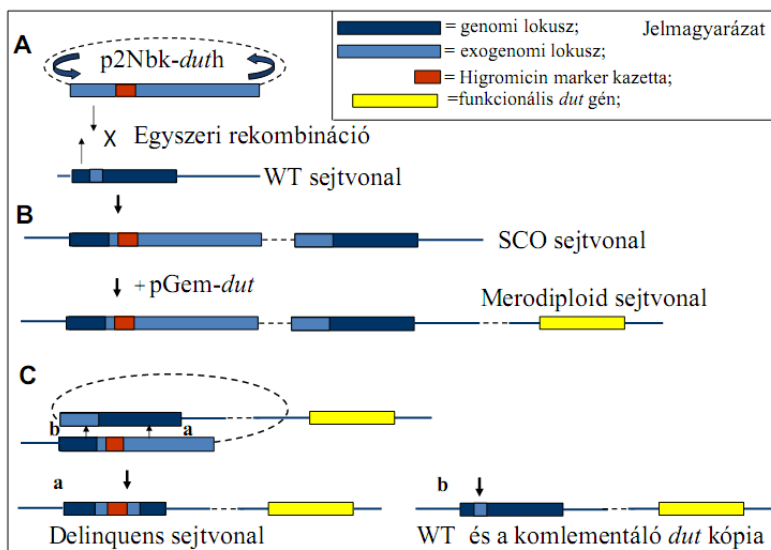
helyességét, valamint az inzert szekvenciák meglétét ezután restriktációs emésztéssel, és szekvenálással ellenőriztem (Eurofins MWG Operon, Németország).



10. ábra A dUTPáz génkiűtött mutáns *M. smegmatis* sejtvonala előállításához készített DNS plazmidok

(A) A p2Nbk-duth öngyilkos vektor a dUTPáz-t kódoló *dut* gént tartalmazza, ahova egy 1,8 kb higromicin rezisztenciát kódoló marker kazetta lett beklónoztva, ami egy funkcióképtelen enzimet eredményezett (*dut::hyg*). (B) A funkcióképtelen dUTPáz komplementálásához szükséges pGem-dut vektor, amely a *dut* génszekvenciáját a saját promoterével együtt tartalmazza (*Cdut*). *hyg*= higromicin rezisztencia gén; *kan*=kanamicin rezisztencia gén; *lacZ*= β -galaktozidáz; *sacB*= szukróz rezisztencia gén; *amp*= ampicilin rezisztencia gén; *aacC1*=gentamicin rezisztencia gén; *L5attP*= hely specifikus integrációért felelős szekvencia. Ábra forrása: Pecsí et al, bírálat alatt a *Journal of Bacteriology*-nál.

3.3.7. Az SCO, a merodiploid és „delinquens” sejtvonalak létrehozása: UV-fénnyel előkezelt 5 μ g DNS plazmidot [87] kompetens *M. smegmatis* sejtekbe elektroporáltam [88], majd az egyszeri rekombinációs eseményeken (single cross over, SCO) átesett transzformánsokat kanamicin, higromicin és X-Gal-t tartalmazó táptalajon szelektáltam (11A. ábra). A merodiploid sejtvonalaikat a megfelelő komplement plazmidok SCO sejtvonalba történő elektroporálásával állítottam elő, majd kanamicin, higromicin és gentamicin tartalmú agar táptalajon szelektáltam a transzformánsokat. A kettős rekombinációs esemény (double cross over, DCO) előfordulási gyakoriságának a növelése érdekében antibiotikum nélküli táptalajra szélesztettem úgy a vad típus, mint a merodiploid sejtvonalaikat (11B. ábra). A DCO-on átesett sejtvonalaikat szelekciója szukrózt, gentamicint és X-Gal-t tartalmazó médiumon történt az irodalomban korábban leírtaknak megfelelően [75]. A potenciális DCO-k fehérek, szukróz és gentamicin rezisztensek voltak. Továbbá kolónia PCR-rel gén-specifikus primereket és a Red-Taq polimeráz enzimet használva azonosítottam, hogy a vad típusnak (WT) vagy az elrontott *dut* mutáns allélnak megfelelő genotípussal (delinquens) rendelkezett-e az adott sejtvonala (11C. ábra).



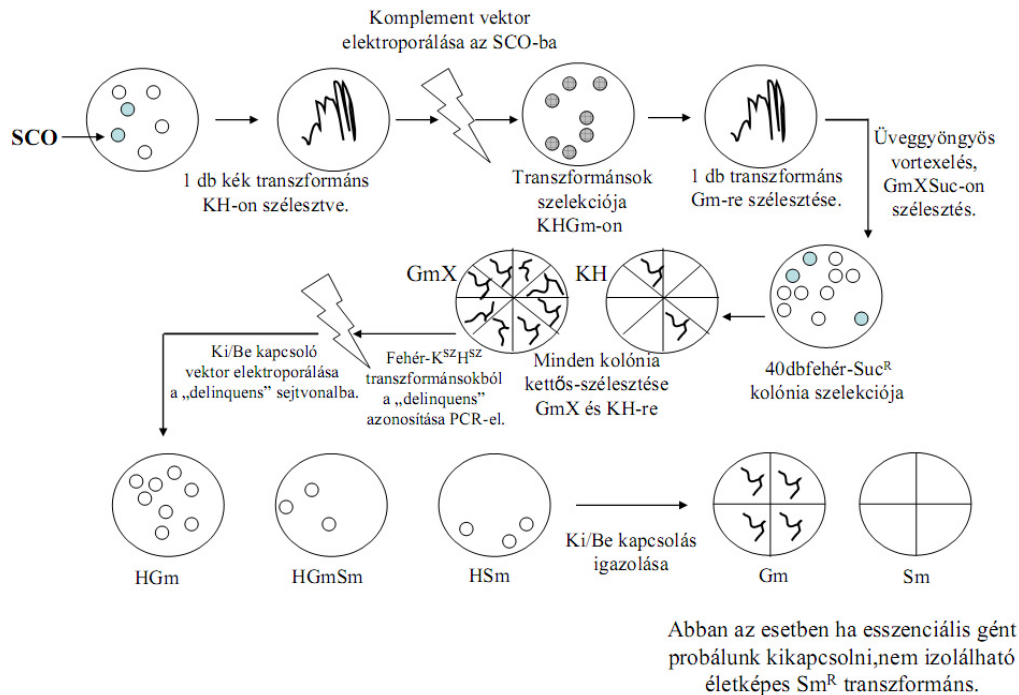
11. ábra A dUTPáz géniütött mutáns *M. smegmatis* sejt vonalak sematikus ábrázolása

(A-B) egyszerű rekombinációval létrejött SCO és a funkcionális dUTPáz-t tartalmazó merodiploid sejt vonalak. (C) a második rekombinációs esemény eredményeképpen létrejöhet a deléciós *dut* mutáns (delinquens) vagy a vad genotípust hordozó sejt vonal, valamint mind a két esetben hely specifikusan a funkcióképes *dut* kópia is megtalálható.

3.3.8. Southern-blot analízist alkalmaztam a PCR termékek genotípus-mintázatainak végső azonosítására. Ehhez PCR reakcióban 0,7 kb méretű DNS próbát amplifikáltam amely a teljes dUTPáz kódoló *dut* gént tartalmazta. A radioaktívan ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$) jelölt próbát a DecaLabel™ DNA Labeling Kit-tel (Fermentas) készítettem a gyártó használati utasításai szerint. A módszer alapja, hogy egy minta DNS-ről ez esetben a próbáról egy polimeráz enzim (Klenow Fragment, exo⁻) radioaktívan jelölt random dekanukleotid primereket szintetizál. A beintegrálódott izotóp nukleotid mennyiségének a meghatározása után $1,25 \cdot 10^6$ cpm/mL radioaktivitásnak megfelelő mennyiséget használtam a hibridizációs lépésekben. 1%-os agaróz gélen 20 V-on 12 órán át agarózgél-elektroforézissel választottam el a megfelelő sejt vonalokból származó genomi DNS fragmentumokat. Előzetesen 37 °C-on 12 órán át a *NcoI* és *PstI* enzimekkel emésztettem a genomi DNS-t. Az agarózgéleken megfuttatott DNS-ek mennyisége zsebenként 7,5 µg volt. Majd ezt követően a blottolás egy éjszakán át az irodalomban korábban leírtaknak megfelelően történt [89]. A hibridizációs lépés a Hames és Higgins 1985-ben közölt publikációnak megfelelően történt. A Hybond-N membránt mosófolyadékkal (1 x SSC; 0,5 % SDS) háromszor 20 percig mostam, majd a membránt kazettába raktam és a tetejére röntgen-filmet helyeztem. A filmet -80 °C-on 24 órás inkubáció elteltével előhívtam. A genomi DNS-ek izolálása a következőképpen történt: 10 mL *M. smegmatis* sejt kultúrát 4000 rpm-en 10 percig centrifugáltam, ezt követően a sejteket 1 mL 10 mM Tris pH =7,5 oldatban felfuszpendáltam. Majd 2 mL térfogategységnek megfelelő 0,1 mm átmérőjű üvegyöngyöket adtam a sejtekhez, amivel megbontottam a sejtfalat a folyamatos kevertetés (1 perc) majd a jeges inkubáció (2 perc) váltakozásával, amit háromszor

megismétlem. A sejtörmelékek lecentrifugálása után a felülúszóból a DNS-t a phenol:chloroform:IAA (25:24:1) oldat hozzáadásával rutinszerűen kicsaptam az oldatból.

3.3.9. *Gén-esszencialitás bizonyítása a „switching” módszerrel.* A módszer azon alapszik, hogy a genomba már előzőleg integrálódott vektort egy másik vektor, amely eltérő antibiotikum szelektációs markerrel és rekombinááz forrással rendelkezik, el tud távolítani/ki tud vágni a genomból, majd annak a helyére beintegrálódik (lásd 12-es ábra). Ez az esemény magas gyakorisággal fordul elő [90].



12. ábra Esszenciális gének azonosítása a „switching” módszerrel

Minden esetben egy SCO sejtvonalból kell kiindulni, amelyet előzőleg egy öngyilkos vektornak (az általunk vizsgálni kívánt gént funkcióképtelen formában tartalmazza) egy WT sejtjébe való elektroporálásával hozhatunk létre. Komplementáló vektor (az általunk vizsgálni kívánt már funkcióképes gént tartalmazza) bejuttatása az SCO-ba, majd DCO-k izolálása ott ahol a kromoszomális kópia deléciója megtörtént (delinquens sejtjébe). A delinquens sejtjébe az üres vektor elektroporálása majd megfelelő antibiotikumot tartalmazó táptalajon a vizsgált gén esszencialitásának igazolása. H; higromicin, K; kanamicin, Gm; gentamicin, Sm; sztreptomycin, X; X-Gal, Suc; szukróz. R- index; az adott anyaggal szemben rezisztens, SZ- az adott anyaggal szemben érzékeny. Ábra forrása: Mycobacteria Protocols, Parish és Brown 2008.

Egy üres vektornak (ami az általunk vizsgálni kívánt gént nem tartalmazza) a delinquens sejtjébe történő transzformálása az integrált komplement vektor kivágását eredményezi, abban az esetben, amikor nem létfontosságú (esszenciális) génről van szó, viszont amennyiben létfontosságú génről beszélünk a sejtek életképtelenek lesznek, azaz egyetlen transzformáns sem izolálható. Az adott genomban egyetlen egy kópiában található integrálódott funkcionális gén amennyiben az létfontosságú az adott organizmus számára nem lehet kikapcsolni, ami további bizonyítékot szolgáltat az adott gén létfontosságára nézve.

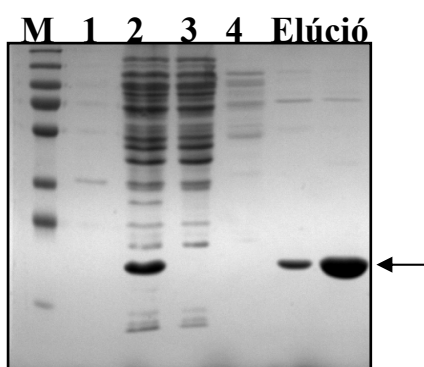
Az általam végzett kísérletekhez a pSM128 (ki/be kapcsolható) vektort használtam az irodalomban eddig leírtaknak megfelelően [90-92]. A delinquens (az endogén *dut* a funkcióképtelen exogén *dut* allélra cserélődött a rekombináció során, valamint a funkcióképes komplementáló *dut* helyspecifikusan integrálódott a genomba) és a WT *M. smegmatis* mc²-155 sejtvonalakba amelyek már tartalmazzák a komplementáló (pGem-*dut*) plazmidot, 0,5-1 µg-nak megfelelő pSM128 plazmidot elektroporáltam. Ez a plazmid egy eltérő szelekciós markerrel a sztreptomycin-el és az integráz enzimen kívül egy kivágó enzimmal (excisionase) is rendelkezik. Ennek megfelelően abban az esetben, ha nem létfontosságú a dUTPáz akkor a pSM128 plazmid a komplementáló vektort (pGem-*dut*) képes kivágni / eltávolítani a genomból, viszont amennyiben létfontosságú a dUTPáz a baktérium számára a komplementáló vektor eltávolítása nem történhet meg. A transzformánsokat sztreptomycint is tartalmazó táptalajon izoláltam. A pSM128 plazmid hely specifikus integrációja során a pGem-*dut* ki/be kapcsolás tényleges bekövetkeztenek igazolásához a megfelelő antibiotikumok meglétére/elvesztésére szelektáltam a sejteket.

3.4. Fehérjék előállítása

3.4.1. *Irányított mutagenézis:* A mutáns *M. tuberculosis* és humán dUTPáz fehérjék létrehozásához a Stratagene cég QuikChange irányított mutagenézis kit-jét a gyártó utasításai szerint használtam. A dolgozatomban tárgyalt mutáns mikobakteriális és humán dUTPáz fehérjék létrehozásához a vad típusú enzimek génszekvenciáját tartalmazó plazmidokból (*M. tuberculosis* dUTPáz: pET19b-*dut*; *H. sapiens* dUTPáz:pET22b-*dut*) indultam ki. A szekvenciákat a mutagenézist követően szekvenálással ellenőriztem (Eurofins MWG Operon, Németország). A pontmutációkhoz tervezett és felhasznált primereket az 1-es táblázatban foglaltam össze (a dolgozat végén a táblázatok fejezetben található).

3.4.2. *Fehérjék expressziója, feltárása és tisztítása:* a különböző fent említett mutációkat már tartalmazó *M. tuberculosis* (pET19b-*dut*) és humán dUTPáz enzimeket (pET22b-*dut*) kódoló plazmidokat *E. coli* BL21pLysS sejtekbe transzformáltam, amelyek tartalmazták a T7 RNS polimerázt kódoló génszekvenciát [93]. A transzformált sejteket ampicillint (50 µg/mL) és klóramfenikolt (34 µg/mL) tartalmazó Luria-Bertani (LB)-agaron növesztettem egy éjszakán át 37 °C-on. A felnőtt telepeket másnap steril körülmények között 500 mL LB tápoldatba oltottam és az exponenciális növekedési fázis elérésekor izopropil-β-D-tiogalaktosziddal (IPTG- az oldatban 0,5 mM a végkoncentráció) indítottam be a T7 RNS polimeráz expresszióját és ezzel a különböző mutáns *M. tuberculosis* és humán dUTPáz

kódoló génekről történő fehérjék termelését. Indukálást követően a sejteket még 3 órán keresztül növesztettem, majd 4 °C - on lecentrifugáltam (3500 rpm, 2 X 15 perc) a két centrifugálás között a sejteket 1 X PBS pufferben (pH=7,4) szuszpendáltam fel, ezzel is maximalizálva a tápoldat (LB) teljes eltávolítását. Az így összegyűjtött sejteket majd lizis pufferben (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA és 1 mM DTT) az irodalomban eddig leírtaknak megfelelően feltártam és a fehérje elegyet a Ni-NTA töltetű oszlopon affinitás kromatográfiával megtisztítottam [94, 95]. Az eluált fehérjék beazonosítására, valamint tisztaságuk mértékének az ellenőrzésére a nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid-gélelektroforézist (SDS-PAGE) 12%-os poliakrilamid minigéleken Protean III készülékkel (Bio-Rad) végeztem [96]. A különböző fehérje mintákat tartalmazó gélt 200 V-on 30-45 percig futattam, majd az SDS kimosása után a fehérjék láthatóvá tételét a Coomassie Brilliant Blue festékkel (Biosafe Coomassie stain; Bio-Rad) végeztem, a gélek kiértékelését a GelDoc denzitométerrel (Bio-Rad) határoztam meg. Minden esetben legalább 95%-os tisztaságú fehérjét sikerült előállítanom (13. ábra).



13. ábra *A hDUT^{F158A} fehérje Ni-NTA affinitáskromatográfiás tisztítása*

M= 80 kDa fehérje marker ; 1 = csapadék; 2 = felülúszó; 3 = áteső; 4 = 50 mM-os imidazol mosás ; a 0.5 M-os imidazollal eluált 19 kDa fehérjét nyíllal jelöltem.

A megtisztított fehérje oldatokat egy éjszakán át 4 °C-on 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ és 1 mM DTT tartalmazó pufferben (pH = 7,5) folyamatos kevertetés mellett átdializáltam. Ezt a dialízis puffert használtam továbbá minden egyes spektrofotometriás illetve gyorskinetikai mérések során.

3.4.3. *Fehérjeminták koncentrációjának meghatározása:* A fehérjeminták koncentrációját Bradford-módszerrel (Bio-Rad Protein Assay) [97] és/vagy a fehérje ultraibolya (UV) spektruma alapján határoztam meg. A Bradford módszer kalibrálására a szarvasmarha-szérum albumint (BSA) használtam. A fehérjeminták UV spektrumát JASCO - 550 UV/VIS spektrofotométerrel határoztam meg. A 280 nm-en észlelt abszorpciós csúcs elsősorban a fehérjékben levő aromás triptofán, tirozin oldalláncok elnyeléséből származik. Így a fehérje aminosav összetétele alapján kiszámítható az úgynevezett fajlagos abszorpciós együttható értéke. Az együtthatók közelítő becslésére ingyenesen hozzáférhető szoftvert

használtam (<http://au.expasy.org/ProtParam>). A fehérjéknek ezzel a programmal meghatározott abszorpciós értékei a következők voltak: (a WT hDUT-nak, a hDUT^{armless} és a hDUT^{F158A}-nak $\lambda_{280} = 10555 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a hDUT^{R/K}, hDUT^{ST/AA} és a hDUT^{F158W}-nak $16055 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, az mtDUT^{H145W}-nak $8480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, és az mtDUT^{H145A}-nak $2980 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) monomer egységekre megadva.

3.4.4. Steady-state reakciósebesség mérés: A dUTPáz által katalizált reakció során felszabaduló protonok mennyiségét egy fenolvörös sav-bázis indikátor színváltozásának spektrofotometriás mérésével a korábban Vértessy és mtsai által leírtak alapján végeztem [98]. A méréseket 1 mM HEPES, (pH = 7,5) 100 mM KCl, 40 μM fenolvörös (Merck) és 5 mM MgCl₂ pufferben, 20 °C-on termosztált 10 mm-es optikai úthosszú küvettában a Specord 200 (Analytic Jena, Németországban gyártott) spektrofotométerrel végeztem. A bekövetkező abszorbancia változást 559 nm-es hullámhosszon regisztráltam. A steady-state katalitikus sebességi állandót (k_{cat}) a telítési szubsztrát-koncentrációnál mért görbéken az első 10 másodpercben észlelt meredekségből ($\Delta A/\text{sec}$) és a ΔA_{teljes} -ből számítottam (ΔA : abszorbanciaváltozás, sec: másodperc) az 1. és a 2. egyenletek alapján (a szögletes zárójel a benne foglalt anyag koncentrációját jelenti).

$$\Delta[\text{dUTP}]/\text{sec} = ([\text{dUTP}]_{\text{teljes}} * (\Delta A/\text{sec})) / \Delta A_{\text{teljes}} \quad 1.$$

$$k_{\text{cat}} = (\Delta[\text{dUTP}]/\text{sec}) / [\text{dUTPáz}] \quad 2.$$

A Michealis-állandók (K_M) értékét a szubsztrát dUTP koncentrációk függvényében kapott kezdeti sebesség görbékre való Michealis-Menten illesztésből határoztam meg [54, 66]. Az illesztést az Origin 7.5 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) programmal végeztem.

3.5. Fluoreszcencia spektroszkópiai titrálások

A különböző enzim-nukleotid komplexek disszociációs állandóját (K_d) fluoreszcens titrálással határoztam meg. Az eredetileg triptofán aminosavat nem tartalmazó enzimekbe előzetesen beépített triptofán mutáció (a humán enzimben a F158W, a mikobakteriális enzimben a H145W) lehetővé tette a fehérje nukleotid kötésének fluoreszcens vizsgálatát. A szubsztrát megkötésével járó konformációváltozás az enzim fluoreszcenciájának csökkenését eredményezi [55]. Ezeket a mutáns fehérjéket korábban kollegáim készítették el, így doktori munkám kezdetén már rendelkezésre állt. A méréseket a Jobin Yvon Spex Fluoromax-3 spektrofluoriméterrel 20 °C-on termosztálva, a 295 nm-en gerjesztett (1 nm rés) triptofán

szenzor fluoreszcencia változását követtem 347 nm emissziós hullámhosszon (5 nm-es rés). Az enzim kezdeti koncentrációja 4 μM volt, amit 1-2 μl térfogatú magas koncentrációjú szubsztrát oldat hozzáadásával titráltam. A titrálást mindaddig végeztem, amíg további szubsztrát hozzáadása már nem csökkentette az enzim fluoreszcenciáját. Mivel nagy mennyiségű szubsztrátot adtam a reakcióelegyhez ezért az esetlegesen ebből keletkező fluoreszcencia jelváltozást, valamint az inner-filter hatásokat, minden esetben korrigáltam. Továbbá a hígulással és puffer jelével való korrekció után az egyes titrálási pontokhoz tartozó relatív fluoreszcencia értékeket ábrázoltam a szubsztrát koncentráció függvényében. Az így kapott telítési pontokra a K_d értékek meghatározásához kvadratikus függvényt illesztettem (3-as egyenlet).

$$y = \frac{s + A * \left[(c + x + K) - \sqrt{(c + x + K)^2 - 4 * c * x} \right]}{2 * c} \quad 3.$$

s = a görbe kezdőpontjának relatív fluoreszcencia értéke;

A = a kezdő- és végpont közötti relatív fluoreszcencia különbség, a változás amplitudója

c = az enzim koncentrációja,

K= az enzim-ligandum komplex disszociációs állandója (K_d)

3.6. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiai titrálások

A CD spektrumok felvételét 20 °C-on termosztált, 1 cm-es optikai úthosszú kvarc küvettában a Jasco 720 Spektropolariméterrel végeztem. A következő beállítási paramétereket használtam: pásztázási sebesség 50 nm/perc, érzékenység 100 mdeg, sáv szélesség 0,5 nm. Az 50- μM koncentrációjú fehérjét a nem hidrolizálható α,β -imido-dUTP (szubsztrát-analóg) vagy a dUDP- ligandumokkal (Jena Bioscience, Németország) 10 mM kálium-foszfát (pH=7,5) és 1 mM MgCl_2 -ot tartalmazó pufferben titráltam, a megfelelő koncentrációjú nukleotidok részletekben történő adagolásával. Minden egyes nukleotid koncentrációnál egy $\lambda = 250\text{-}290$ nm közötti hullámhosszúságú (közele UV tartomány) spektrumot vettem fel. A differencia spektrumokat úgy számoltam ki, hogy kizárólag a ligandum spektrumát kivontam az ennek a ligandumnak megfelelő fehérje-ligandum komplex által indukált spektrumból. A differenciális ellipticitást $\lambda_{\text{max}} = 269$ nm hullámhosszon ábrázoltam a különböző ligandum koncentrációk

függvényében. Az így kapott pontokra kvadratikus függvényt (3). illeszttem, majd ebből a telítési görbéből határoztam meg a K_d értékeket.

3.7. Tranziens kinetikai mérések

3.7.1. Stopped-flow mérés: Az enzimek pre-steady state kinetikai tulajdonságait Applied Photophysics SX-20 stopped-flow műszerrel határoztuk meg. A méréseket témavezetőmmel Dr. Tóth Judittal közösen végeztük. A stopped-flow (megállított áramlásos) a reakció kiindulási reagentjeit egy küvetében összekeveri, és a reakció során keletkező spektroszkópai jelet méri. A használt műszer holtideje 2 ms. A mérések során egy beépített triptofán szenzort (F158W, H145W) 295 nm hullámhosszú fényel gerjesztettünk, az emisszióból származó jelet pedig 320 nm hullámhossz felett egy 320 LP szűrő segítségével mértük. A méréseket 20°C-os termosztálás mellett végeztük. A mérések során logaritmikus adatgyűjtést alkalmaztunk. Az aktívhely titráláshoz 35 μM , a dUTP kötés vizsgálatához pedig 0,25 μM enzimet használtunk (küvetta koncentráció). A reakciógörbéket különböző szubsztrát koncentrációk mellett vettük fel. A korábban Tóth és mtsai által [55] meghatározott reakció mechanizmus szerint a görbék leszálló ága a szubsztrát kötésnek, míg a felszálló ág a termék elengedésének felel meg, amelyet a lassabb hidrolízis lépés sebességi állandójával figyelünk meg. (A triptofán átlapol a bekötődő szubsztráttal ezért csökken a fluoreszcenciája, majd a termék elengedésekor ismét nő). Az egyszeres átvitel (single turnover) reakció sebességi állandóinak meghatározásához a görbékre tripla exponenciális függvényt illesztettünk:

$y = a_1 * e^{-k_1 * x} + a_2 * e^{-k_2 * x} + a_3 * e^{k_3 * x} + c$, ahol a_1 , a_2 és a_3 az egyes szakaszokra (kötés, izomerizáció, hidrolízis) jellemző fluoreszcencia változás amplitúdói, k_1 , k_2 , k_3 az előbbi folyamatokhoz tartozó sebességi állandók, c pedig a görbe végpontjának fluoreszcenciája.

A kötésre jellemző sebességi állandók meghatározásához a görbe leszálló ágára illesztettünk szimpla exponenciális függvényt:

$y = a_1 * e^{-k_1 * x} + c$, ahol az előzőhöz hasonlóan a_1 a kötés következtében bekövetkező fluoreszcencia változás amplitúdója, a k_1 a kötés látszólagos sebességi állandója (k_{obs}), c pedig a görbe végpontjának fluoreszcenciája. A dUTP kötés és disszociáció sebességi állandóinak (k_{on} és a k_{off}) meghatározásához a kapott látszólagos sebességi állandókat a szubsztrát koncentráció függvényében ábrázoltuk. A pontokra egyenest illesztettünk, melynek y tengelymetszetéből a k_{off} -ot, meredekségéből a k_{on} -t, a kettő hányadosából pedig a K_d -t határoztuk meg.

3.7.2. *Radioaktív quench-flow mérés:* A quench-flow kísérletek tervezését, elvégzését és kiértékelését témavezetőm Dr. Tóth Judit végezte az NIH Molecular Physiology laboratóriumában (USA). A mérések a RQF-3 (KinTec Corp., Austin, Texas, USA) quench-flow műszerrel történtek a korábbiakban közöltek alapján [55]. 25 μM fehérje (dUTPáz) 17,5 μM $\gamma^{32}\text{P}$ -dUTP szubsztráttal lett összekeverve és ezt követően a hidrolízis során keletkezett $^{32}\text{PP}_i$ termék felszabadulása regisztrálva. A $^{32}\text{PP}_i$ termék mennyiségének a meghatározása vízben egy folyadék szcintillációs mérés technika alkalmazásával a Wallac 1409 (Liquid Scintillation Counter, PerkinElmer, Inc.) műszer segítségével történt. A mérések 20°C-os termosztálás mellett történtek.

3.8. Röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat

A röntgendiffrakciós szerkeztelemzéssel kapcsolatos munkákban a kristályok előállítását, az adatgyűjtést, a szerkezet-meghatározást és finomítást, munkatársam Leveles Ibolya és Harmat Veronika végezte. Az mtDUT^{H145W} és mtDUT^{H145A} fehérjék az α,β -imido-dUTP szubsztrát analóggal alkotott komplexeinek az egyidejű kristályosítása a legelterjedtebb kristályosító technikával, a függőcsepp módszerrel [37] készült, amely a gőzdiffúzió jelenségén alapul. Egy légmentesen lezárt 2 ml térfogatú térrész egy 2-10 μl térfogatú fehérjetartalmú cseppet tartalmaz, amely a légtéren át 1 ml kristályosító oldattal érintkezik. A cseppben és a kristályosító oldatban lévő kicsapószer koncentráció a gőztéren át kiegyenlítődik, a csepp fehérjére nézve lassan betöményedik. E technika előnye, hogy kíméletes a fehérjével, kevés anyag felhasználásával teszi lehetővé nagyszámú körülmény kipróbálását és az optimális körülmény megtalálását. Az elkészített mutáns (mtDUT^{H145W}, mtDUT^{H145A}) *M. tuberculosis* dUTPáz:ligandum oldat 3 mg/ml enzimet, 1,25 mM α,β -imido-dUTP-t és 10 mM MgCl_2 -ot tartalmazott 50 mM Tris-HCl pufferoldatban (pH = 7,5), 1,20-1,75 M ammónium-szulfát és 10 % glicerin mellett 1:1 arányban.

Az mtDUT^{H145W} és mtDUT^{H145A} fehérjék dUPNPP-vel alkotott komplexeiről a teljes röntgendiffrakciós adatkészlet gyűjtése az EMBL/DESY kutatóközpont (European Molecular Biology Laboratory/ Deutsches Elektronen Synchrotron Facility, Hamburg, Németország) BW7B mérőhelyén történt. Az adatok feldolgozása az XDS, az XSCALE [99] és a CCP4 [100] nevű programcsomagokkal készült. Mindkét mutáns: α,β -imido-dUTP: Mg^{2+} komplex szerkezetét molekuláris helyettesítéssel oldották meg a MOLREP [101] nevű program segítségével. Kiindulási modellnek a ligandumot nem tartalmazó vad típusú mikobakteriális dUTPáz-t használták (PDB kód: 2PY4). A szerkezeti modell építése a Coot [102] programmal

történt. A B-faktorok finomítása majd a finomított modellek továbbépítése a Shelx-97 nevű programcsomaggal készültek [103].

A mikobakteriális mutáns dUTPázok fehérjeszerkezeti adatbázisba (PDB) küldött szerkezeti faktori és koordinátái a következő kódokat kapták: 3HZA (mtDUT^{H145W}) és 3LOJ (mtDUT^{H145A}).

3.9. Ioncserélő kromatográfia

Az ioncserélő kromatográfiát a Bio-Scale Q2 –es oszlopon (Bio-Rad) egy AKTA Purifier (GE Healthcare) kromatográfias rendszeren végeztük. 25 nmol dUMP/dUDP oldatot egy 20 mM HEPES (pH=7,5) 2 mM MgCl₂, 50 mM NaCl és 1 mM DTT-t tartalmazó pufferoldatban vittünk fel az oszlopra. Amit izokratikus elúció követett, azaz a mozgófázis összetétele állandó maradt a teljes elválasztási folyamat alatt. A hDUT.dUDP.BeF_x komplex összetétele a következő volt: 10 μM humán dUTPáz enzim, 50 μM dUDP, 50 μM BeCl₂ és 2 mM NaF. Mielőtt az oldatot az oszlopra vittük, néhány óra inkubációs időt alkalmaztunk annak érdekében, hogy a megfelelő katalitikusan aktív komplex kialakulhasson és a hidrolízis megtörténhessen. Továbbá a fehérjét az oldatból denaturáló körülményeket alkalmazva hősekkel kicsaptuk és centrifugálással eltávolítottuk, így az oszlopra felvitt komplex már inaktív volt.

3.10. DNS-fehérje kötési vizsgálatok (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

Elektroforetikus gél-eltolódás vizsgálatokat nagy gyakorisággal alkalmaznak fehérje és specifikus DNS szakaszok közötti kölcsönhatások kimutatására, mert egyszerű és gyorsan kivitelezhető. Mindemellett elég érzékeny módszer arra, hogy szekvensspecifikus DNS régiókhoz kötött fehérjéket teljes extraktumból nagy hatékonysággal kimutathassuk. Ezenkívül alkalmazható tisztított fehérjék specifikus DNS régióval alkotott komplexeinek a detektálására is. A Ni-NTA affinitás kromatográfás módszerrel tisztított rekombináns CES-2 (5 μM) és ATF-2 (10 μM) fehérjéket a megfelelő *lgg-1* és *bec-1* DNS oligonukleotidokkal (1 μM) 1 X TBE (19:1 bisacrylamide) pufferben 20 percig 37 °C- on inkubáltuk. Ezt követően TBE-PAGE (8%-os) natív géltre vittük a mintákat, előzőleg a gélt 1 órán át 100 V-on előfutattunk. Majd a fehérje-DNS komplex képződést etidium-bromidos festést követően UV lámpa alatt detektáltuk. A felhasznált oligonukleotidok szekvenciája az alábbi volt: *bec-1*

előre (5'GGGGCATCCGTCTGTCTGACTACGTAATCGCTCAGTGCCT3') és ellentétes irányba (3'TAGGCAGACAGCTGATGCATTAGCGAGTCACGGAAGCGGG5'); *bec-1* mutáns előre (5'GGGGCATCCGTCTGTCTGACAATGTTGTCTGCTCAGTGCCT3') ellentétes irányba (3'TAGGCAGACAGCTGTTACAACAGCGAGTCACGGAAGCGGG5'); *lgg-1* előre (5'GGGGTTTTATATAGATTTTCGCAATGTGTTATCGAATCGG 3') ellentétes irányba (3'AAAATATATCTAAAGCGTTACACAATAGCTTAGCCAGGGG5'); *lgg-1* mutáns előre (5'GGGGTTTTATATAGAAATTGCTGTGTGTTATCGAATCGG3') ellentétes irányba (3'AAAATATATCTTTAACGACACACAATAGCTTAGCCAGGGG5') mutató szekvenciák.

3.11. Eredmények statisztikai kiértékelése

A spektroszkópiai és kinetikai méréseket minden esetben legalább háromszor megismételtük. A mérési pontokon megadott szórás értékek standard deviációt jelentenek. Abban az esetben ahol nincs feltüntetve szórásérték ott egy reprezentatív mérést mutattam be több független mérés átlagából, és az ide tartozó értékeket beleértve a különböző paraméterek szórásait is egy táblázatban tüntettem fel. A stopped-flow kísérletek esetében tipikusan 5-8 mérést gyűjtöttünk, majd ezeket átlagoltuk. A *M. smegmatis* baktériumban végzett *in vivo* kísérletek esetében az interneten is hozzáférhető Fisher Exact tesztet (<http://www.langsrud.com/fisher.htm>) használtam a *p*-értékek szignifikanciájának meghatározásához. Ez a teszt kiválóan alkalmas kis mintaszámot tartalmazó kísérletek szignifikanciáinak eldöntéséhez [104, 105].

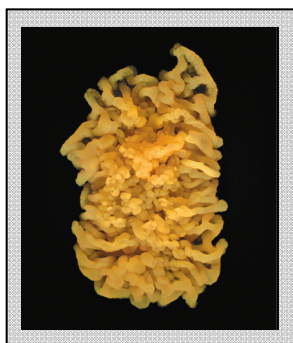
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

4.1. A dUTPáz fiziológiai szerepének *in vivo* vizsgálata *Mycobacterium smegmatis*ban

4.1.1. A *M. smegmatis*, mint érvényes *M. tuberculosis* modell organizmus

PhD tanulmányaim alatt egy EMBO és egy FEMS ösztöndíj keretében lehetőséget kaptam a Londoni Queen Mary egyetemhez tartozó Immunológia és Fertőző Betegségek kutatócsoportban vendégkutatóként több hónapot eltölteni. Az említett ösztöndíj rövidege, valamint jelenleg az Enzimológia Intézetben a 3-as biztonsági fokozatnak megfelelő felszereltséggel rendelkező (BSL-3) laboratórium hiánya miatt az *in vivo* kísérleteket a *M. smegmatis* fajban végeztem.

A *M. smegmatis* egy 3.0- 5.0 μ m hosszú pálcika alakú (14. ábra), nem patogén [106] aerob szaprofita, gyors növekedésű baktérium és BSL-1 felszereltséggel rendelkező laboratóriumban növeszthető. 3-5 nap után jól látható jellegzetes kolóniák izolálhatók. A teljes *M. smegmatis* genom szekvencia már rendelkezésre áll, amit 2006-ban a J. Craig Venter Intézet tett közzé (<http://www.jcvi.org/>).



14. ábra *Mycobacterium smegmatis* mc²-155 sejtvonalból származó kolónia

M. smegmatis sejtvonal 10 napig tartó minimál médiumon és 30 °C-on történt inkubációt követően. Képet készítette: Hera Vlamakis. (Forrás: American Society for Microbiology).

A fágok, plazmidok és más mobilis elemek (pl. transzpozonok) egyre szélesebb alkalmazhatóságuknak elterjedése lehetővé tette pl. egy adott gén létfontosságának meghatározását a különböző markereket tartalmazó szállító rendszerek segítségével [107]. A *M. smegmatis* elterjedten alkalmazzák mint *M. tuberculosis* modell organizmust legfőképp anyagcsere útvonalak tanulmányozásához [108], amihez genetikai manipulációs rendszereket (pl. flexibilis kazetta módszer [75]) használnak. Ilyen manipulációs módszerek alkalmazásával olyan jelentőségteljes kérdésekre kaphatunk választ, mint pl. a különböző

létfonosságú metabolikus folyamatokban (pl. nitrogén metabolizmusban a glutaminszintetáz) szereplő enzimek [109] egyenkénti fiziológiai funkciójának meghatározása [110].

A *M. smegmatis*-ban végzett *in vivo* kísérleteket megelőzően a timidin anyagcserében szereplő enzimekre kiterjedt összehasonlító aminosav-szekvencia analízist alkalmaztunk Hirmondó Rita munkatársammal. A p-Blast programmal a *M. smegmatis* és a *M. tuberculosis*, organizmusok timidilát anyagcserében szereplő fehérjéit hasonlítottuk össze, melynek eredményeképpen elmondható, hogy a timidin-szintáz útvonalban mindkét fajban azonos enzimek szerepelnek. Ezeknek a fehérjéknek (lásd 2-es táblázat) az aminosav-szekvencia illesztése a Blast szoftverrel egyértelműen igazolta, hogy a legnagyobb mértékű hasonlósággal a dCTPdeamináz és a dUTPáz rendelkeznek, azaz 87% és 85%-os azonossággal valamint 95% és 94 %-os hasonlósággal, egyenként. A mikobakteriális timidilát anyagcserében résztvevő többi enzim (2. táblázat) hasonlóan 80% feletti azonosságot és 90%-os hasonlóságot mutatnak a fajok között, a legtöbb eltéréssel viszont egyedül a timidilát-kináz enzim rendelkezik.

A továbbiakban a ClustalW program alkalmazásával további aminosav-szekvencia illesztéseket végeztünk a dUTPáz-ra. Ebben az esetben különböző fajokból származó (*Echerichia coli*, *Equine infectious anemia virus*, *Vaccinia virus*, *Saccharomyces cerevisiae* és *Homo sapiens*) dUTPáz-ok C-terminális aminosav szekvenciáit illesztettük releváns mikobaktérium fajokhoz. Az illesztés eredménye igazolt egy 5 aminosav hosszú inzerit szekvenciát (15. ábra), amely a mikobakteriális dUTPázokat egyértelműen megkülönbözteti a humán és más fajokban található dUTPázoktól. A *M. smegmatis* és *M. tuberculosis* fajok timidilát metabolizmusában szereplő enzimek nagyfokú hasonlósággal rendelkeznek. Az összehasonlító genomi analízis egyértelműen igazolta, hogy mind a két organizmus timidilát metabolizmusában azonos kulcsenzimek vesznek részt, ami arra engedett következtetni, hogy a *M. smegmatis*, mint érvényes *M. tuberculosis* modell organizmus ebben az esetben teljes mértékben megfeleltethető és alkalmazható. Az egyetlen különbség a két baktérium timidilát-szintézis útvonalában a kétfunkciós dCTPdeamináz / dUTPáz enzim, amelyet ez idáig csak a *M. tuberculosis* fajban azonosítottak (Rv_0321).

Ez a kétfunkciós enzim a dCTP-t dezaminálja és hidrolizálja is, így dUMP-t állít elő [111]. Korábbi tanulmányokból kiderült azonban, hogy az egyfunkciós dUTPázhoz képest (10^6 - 10^7 $M^{-1}s^{-1}$) [37] a kétfunkciós enzim lényegesen alacsonyabb katalitikus aktivitással rendelkezik (4×10^4 $M^{-1}s^{-1}$) [112], továbbá nem létfonosságú a *M. tuberculosis* számára [35]. Mindezek ismeretében megkérdőjelezhető, hogy a dCTPdeamináz/dUTPáz kétfunkciós enzim képes-e megfelelően ellátni az egyfunkciós dUTPáz feladatát. Ismert, hogy a dUMP és a dTMP

esszenciális nukleotidok szintéziséhez úgy az emberben, mint más fajokban is különböző menekítő útvonalak állnak rendelkezésre. Ezekben a menekítő útvonalakban résztvevő enzimek emberben a következők: a dCMP dezamináz (Uniprot: P32321) és a timidin-kináz (Uniprot: P04183). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk ezen útvonalak meglétét/hiányát a mikobakteriális genomokban a fent említett két enzimre további p-Blast analízist alkalmaztunk. Az összehasonlító szekvencia vizsgálat és illesztés során a fent említett egyik enzimet sem tudtuk azonosítani, úgy a *M. smegmatis*, mint a *M. tuberculosis* organizmusok genomjában. Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy a mikobaktériumok nem rendelkeznek menekítő-útvonalakkal, ami megerősíti azt a feltételezést miszerint a dUTPáz enzim a mikobaktériumokban kiemelkedő fontossággal rendelkezhet. Ennek a feltételezésnek részletes tárgyalását és igazolását a következő alfejezetben (1.2) ismertetem. Továbbá felmerült a kérdés, hogy ugyanez lehet-e a helyzet más sikeres patogén mikobaktériumok esetében is, mint pl. a *M. leprae*, *M. ulcerans*, és *M. bovis*. Ennek tanulmányozása végett, ismét p-Blast aminosav-szekvencia összehasonlítást végeztünk az itt felsorolt fajok timidilát-szintáz útvonalaiban szereplő összes eddig ismert enzim és a *M. smegmatis* organizmus releváns enzimeit között. Valamennyi enzim összehasonlítása ebben az esetben is 84% feletti hasonlóságot mutatott, míg a legtöbb eltéréssel ebben az esetekben is a timidilát-kináz (66%-os hasonlósággal) rendelkezett. Konklúzióként tehát elmondhatjuk, hogy nemcsak a *M. smegmatis* és a *M. tuberculosis* organizmusok timidilát-szintáz útvonalaiban szereplő enzimek között áll fenn nagyfokú hasonlóság, hanem más sikeres patogén mikobaktérium fajok és a *M. smegmatis* között is.

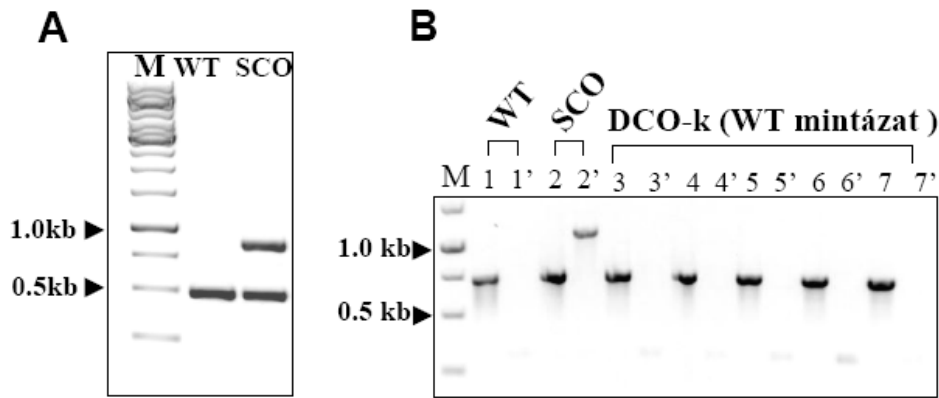
| | 120 | | 180 | |
|------------------------|-----------------|-----------------------------|-------|---------------------|
| <i>M. tuberculosis</i> | LINLDPAAPIVVHRG | IRIAQLLVQRVE-LVELVEVSSFDE | AGLAA | TSRGRDGGGHGSSGGHASL |
| <i>M. bovis</i> | LINLDPAAPIVVHRG | IRIAQLLVQRVE-LVELVEVSSFDE | AGLAA | TSRGRDGGGHGSSGGHASL |
| <i>M. leprae</i> | LINLDFVEPLVVHRG | IRIAQLLVQRVE-LVELVEVSSFDE | AGLAA | TSRGRDGGGHGSSGGHASL |
| <i>M. ulcerans</i> | LINLDPATPIVVNRG | IRIAQLLVQRVE-LLELVEVSSFDE | AGLAA | TSRGRDGGGHGSSGGHASL |
| <i>M. marinum</i> | LINLDPATPIVVNRG | IRIAQLLVQRVE-LLELVEVSSFDE | AGLAA | TSRGRDGGGHGSSGGHASL |
| <i>M. smegmatis</i> | LINLDPQTFVVISR | GRIRIAQLLVQRVE-LPELVEVTSFDE | AGLAD | TTIRGDGGGHGSSGGHASL |
| <i>H. sapiens</i> | LFNFGKEK-FEVKKG | IRIAQLICERIF-YPEIEEVQALDD | ----- | TERGSGGFGSTGKN--- |
| <i>E. coli</i> | VWNRGQDS-FTIQPG | IRIAQMIFVFPVQAEFNLVEDFD | ----- | TIRGEGGFGHSGRQ--- |
| EIAV | CTNIGKSN-IKLI | EGCKFAQLIILQHH-SNSRQPWDENKI | ----- | SQRGDKGFGSTGVF--- |
| Vaccinia virus | LINNGKCT-FNVNTG | IRIAQLIYQRIY-YPELEEVQSLDS | ----- | TNRGDQGFSTGLR--- |
| <i>S. cerevisiae</i> | LFNHSQRD-FAIKKG | IRVAQLILEKIVDDAQIVVDSLEE | ----- | SARGAGGFGSTGN--- |
| | | IV.Motívum | | M.I. V.Motívum |

15. ábra Összetett aminosav-szekvencia illesztés mikobakteriális és nem-mikobakteriális fajokból származó dUTPázok C-terminális részére

Különböző fajok dUTPáz szekvenciáinak összehasonlítása egy 5 aminosav hosszúságú inzertet (kék kockában fehér betűkkel kiemelve) mutat, amely kizárólag a mikobakteriális genomokban fordul elő. A IV és V-ös konzervált motívumokat szürke háttérű kockákkal jelöltem. Az M.I. rövidítés a „mikobakteriális inzertnek” felel meg. Az aminosavak számozása a *M. tuberculosis* szekvenciájának feleltethető meg. Az ábrát a ClustalW programmal készítettem. EIAV; Equine infectious anemia virus. Ábra forrása: Pecs et al, bírálat alatt a *Journal of Bacteriology*-nál.

4.1.2. A dUTPáz kódozó *dut* gén kiütése letális a *M. smegmatis*ban

Esszenciális géneknek nevezzük definíció szerint azokat a géneket, amelyek a túléléshez nélkülözhetetlenek és mint ilyenek a kromoszómáról nem törölhetőek. Az irodalomban eddig két tanulmány olvasható, amelyben a dUTPáz gén létfontosságát már igazolták, nevezetesen az *E. coli* [32] és a *S. cerevisiae* [33, 34] fajokban. Továbbá egy teszt alapú kísérletsorozat eredményeképpen feltételezhető, hogy a dUTPáz létfontosságú lehet a *M. tuberculosis* számára is [35]. Ezen érdekes, mikobaktériumokban eddig még nem vizsgált és alapvető fontosságú kérdés megválaszolását egy megbízható, hatékony kétlépcsős rekombinációs stratégia alkalmazásával valósítottam meg. Első lépésben egy higromicin marker kazettával megszakított funkcióképtelen *dut* mutáns sejt vonalat próbáltam létrehozni és izolálni a vad típusú sejtekben, amelyek az endogén dUTPáz-t tartalmazzák. Ehhez a p2Nbk-*duth* öngyilkos vektort (10A. ábra) elektroporálással bejuttattam a *M. smegmatis* sejtekbe, majd az egyszeri rekombinánsokra (SCO) szelektáltam a sejteket Hyg, Kan, és X-gal-t tartalmazó táptalajon (16A. ábra). Majd az SCO sejteket 24 órán keresztül antibiotikum-mentes táptalajon növesztettem, így fokozva a kettős rekombinációs esemény (DCO) előfordulási gyakoriságát. Az így izolált potenciális DCO-n átesett sejt vonalakkól kolónia PCR reakcióval, specifikus primerek hozzáadásával határoztam meg, hogy a vad típusú vagy a deléciós *dut* mutáns allél mintázattal rendelkezett-e az adott sejt kolónia. Normális esetben azok a sejtek, amelyek DCO-n átesetek vagy a vad típus, vagy a deléciós *dut* mutáns mintázattal kell, hogy rendelkezzenek. Abban az esetben ellenben, amikor úgy a vad típus, mint a deléciós mutáns kópia is a genomban maradt, a sejtekben nem történt meg a kettős rekombinációs esemény. 59 potenciális DCO-t teszteltem le, amiből 49 vad típusnak megfelelő genotípussal, míg a többi 10 sejt vonal spontán szukróz rezisztenciával rendelkező SCO volt (16B. ábra).

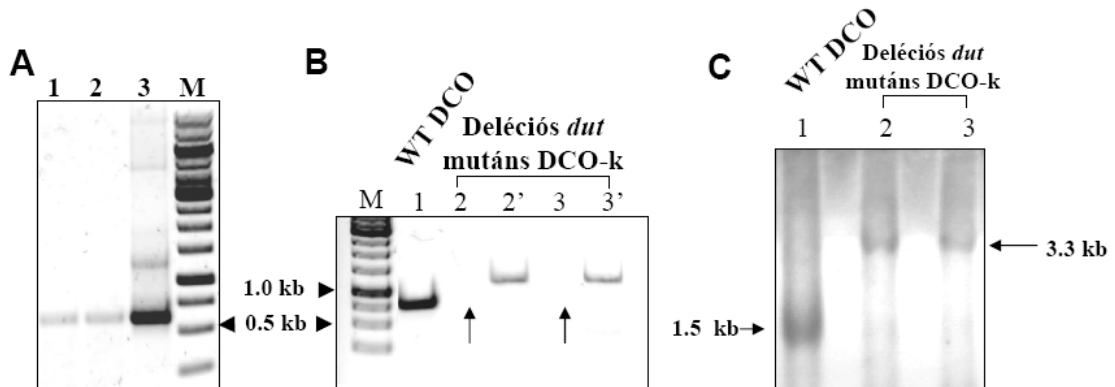


16. ábra Az SCO és DCO eseményeken átesett sejtvonalak azonosítása kolónia PCR-el

Az M mind a két gél képen 1 kb DNS markert jelöl. (A) a p2Nbk-duth öngyilkos vektor integrálódása a genomba. WT = *M. smegmatis* mc²-155 vad típus genomi DNS mint pozitív kontrol; SCO = a 0,8 kb DNS amlifikátum a *dut* deléziós mutáns integrálódását igazolja a genomba. (B) Az azonos számok ugyanazt a sejtvonalat jelentik. Mindegyik sejtvonal a vad típus (1-7-ig jelölve) és a *dut* deléziós mutáns (1'-7'-ig jelölve) génre tesztelve lett, egyenként specifikus primerszekvenciákkal WT = 0,7 kb, SCO = 1,1 kb. Pozitív controlok: WT és SCO. Az A gélképen látható termékek méretbeli különbsége a B gélképhez képest, az eltérő primereknek köszönhető. Ábra forrása: Pecsí et al, bírálattal a *Journal of Bacteriology*-nál.

Abban az esetben, amikor egy olyan génről van szó, amelynek kiütése nem eredményez letális fenotípust, az adott deléziós mutáns gént tartalmazó sejtvonal általában már kevés potenciális DCO sejtvonal tesztelése során könnyen izolálható. Ellenben amikor az adott géniütés letális a baktérium számára, nem izolálható az adott génre nézve deléziós mutáns sejtvonal, hacsak nem biztosítunk a sejt számára egy funkcióképes gént. Mivel deléziós *dut* mutáns sejtvonalat nem sikerült izolálnom a vad típusú háttérben, ezért az eddigi eredmények előzetes bizonyítékot szolgáltatottak arra nézve, hogy a dUTPáz esszenciális lehet. Ahhoz, hogy erről tényleges formális genetikai bizonyosságot nyerjek egy merodiploid sejtvonalat hoztam létre, amelyben egy komplementáló plazmidon a funkcionális *dut* gént biztosítottam a baktérium számára. Ez a komplementáló plazmid egy mikobakteriofág L5 alapú hely specifikusan beintegrálódó vektor, amely a teljes *dut* gént a saját promoterével együtt tartalmazza (10B. ábra). Miután meggyőződtem a pGem-*dut* (komplement vektor) genom-integrációjáról kolónia PCR segítségével (17A. ábra), a korábbiakban leírtaknak megfelelően, viszont most már ebben a merodiploid háttérben szintén a DCO eseményeken átesett sejtekre szelektáltam. 19 potenciális DCO tesztelése során 13 sejtvonal a *dut* vad típusnak megfelelő DCO, valamint 6 a *dut* deléziós mutáns genotípussal rendelkezett (17B. ábra). Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy a *dut* kromoszómális kópia csak akkor törölhető a *M. smegmatis* genomából, ha biztosítunk számára egy funkcionális dUTPázt. A *dut* deléziós mutáns genotípus mintázatának megerősítéséhez Southern-blot analízist

alkalmaztam, amivel kimutattam, hogy a *dut* kromoszómális kópia valóban törlődött és a deléciós *dut* kópia integrálódott a genomba (17C. ábra; 2 db sejtvonalat választottam ki a 6-ból). Ezek az eredmények alapvető bizonyítékot adnak arra nézve, hogy a *dut* gén kiütése letális fenotípust eredményez a *M. smegmatis*-ban, ugyanis csak a merodiploid háttérben sikerült *dut* deléciós mutáns sejtvonalat izolálni. (a Fisher tesztet használva a *p* érték a következőnek adódott; $p < 0,00025$).



17. ábra A merodiploid és a deléciós *dut* mutáns sejtvonalak azonosítása

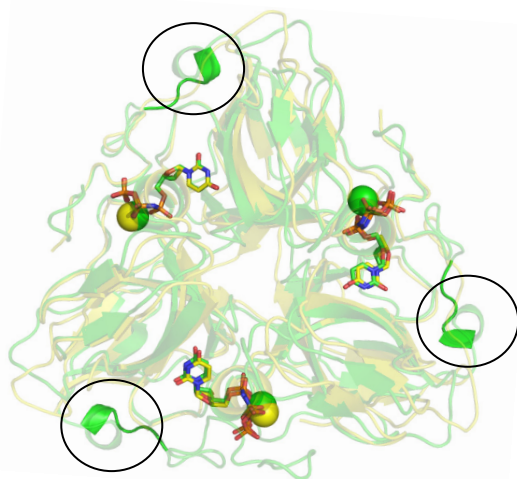
A gél képeken az M 1kb DNS markert jelöl. (A) A *pGem-dut* vektor integrálódása az *SCO* sejtvonalba. 1 és 2-es sávokban a 635 bp méretű DNS amplifikátum a *pGem-dut* integrációját igazolja. A 3-as sávban pozitív kontrollnak a *pGem-dut*-ot mint templátot használtam a PCR reakcióban. (B) **Deléciós *dut* mutánsok azonosítása.** Az azonos számok ugyanazt a sejtvonalat jelölik. 1=vad típusú kettős rekombináns; 2' 3'= deléciós *dut* mutáns integrálódott a genomba. 2 és 3-as sáv: a nyílak a *dut* kromoszómális kópia delécióját szemléltetik. (C) ***Dut* gén esszencialitásának bizonyítása Southern blot-tal.** A 0,7 kb hibridizációs próba várt mintázatai: 1: 1,5 kb vad genotípusnak megfelelő; 2 és 3: deléciós *dut* mutáns genotípusnak megfelelő 3,3 kb hibridizációs profil. Ábra forrása: Pecsí et al, bírálat alatt a *Journal of Bacteriology*-nál.

A *dut* gén a predikció szerint (<http://operondb.cbc.umd.edu/cgi-bin/operondb>) egy transzkripciós egységen (operon) belül helyezkedik el egy eddig még ismeretlen funkciójú fehérjével (*M.SMEGMATIS_2766*). Ezért joggal merülhet fel az, hogy a *dut* deléciós mutáns látszólagos életképtelenségét a szomszédos gén sérülése okozza és ún. poláros hatások következtében transzkripciója gátolt. Annak bebizonyítása érdekében, hogy valóban kizárólag a *dut* gén hiánya okoz letalitást a *M. smegmatis*-ban, a kísérleteim során a következő szempontokat vettem figyelembe. Elsősorban, a higromicin rezisztenciáért felelős marker kazettát úgy klónoztam be (a leolvasási keretet is megtartva) a dUTPáz fehérjét kódoló szekvenciába, hogy az operon, ezen belül is a promoter régió, ne sérüljön meg, így biztosítva a downstream gének helyes átírását. Másodsorban, a funkcionális *dut* gént tartalmazó merodiploid sejtvonalból elegendő mennyiségű géнкиütött mutáns sejtvonalat lehetett izolálni, ami azt bizonyítja, hogy egyedül a funkcióképes *dut* a korábbi letális fenotípust életképes

fenotípussá tudta változtatni és a downstream gének kizárólagos hozzájárulása a letalitáshoz feltehetőleg nem szignifikáns. Harmadsorban, hogy minden kétséget kizárva igazolni tudjam, hogy egyedül a *dut* gén létfontosságú, egy ún. „switching”, azaz ki-be kapcsoló stratégiát alkalmaztam. Ez a módszer azon alapszik, hogy a merodiploid sejtvonalonban egy adott gén komplementáló kópiáját egy üres vektor, amely a komplement vektorhoz képest eltérő antibiotikum rezisztenciával rendelkezik, eltávolítja / kivágja [90]. A komplementáló DNS régió nem távolítható el, amennyiben az adott gén kromoszómális kópiája funkcióképtelen, illetve az adott gén esszenciális a baktérium számára. A deléció *dut* gént komplementáló pGem-*dut* plazmidot próbáltam helyettesíteni a pSM128 üres vektorral [113, 114] ami gentamicin helyett sztreptomycin rezisztenciával rendelkezik. A pGem-*dut* plazmidot már tartalmazó merodiploid és kontrollként a vad típusú sejtvonalakba elektroporáltam a pSM128 vektort. Annak bizonyítása végett, hogy a pGem-*dut* helyettesítése a pSM128 vektorral megtörtént, 48 Hyg/Sm transzformánst Sm és Gm tartalmú táptalajra szélesztettem. Míg a Gm tartalmú táptalajon mind a 48 transzformáns növekedett, addig az Sm tartalmú táptalajon egyetlen transzformáns sem volt izolálható. Vagyis a pGem-*dut* vektort a pSM128 plazmid nem tudta helyettesíteni / kikapcsolni. A kontroll mérések esetében viszont kielégítő $0,5 \times 10^4$ / μg kikapcsolási transzformációs hatékonyságot kaptam, amikor is a pSM128 plazmid helyettesítette a pGem-*dut* vektort WT háttérben. A pSM128 plazmid transzformációs hatékonyságát a 3-as táblázatban tüntettem fel. Ezek az eredmények egyértelműen igazolták, hogy a *M. smegmatis* életképessége a komplement vektor, azaz a funkcióképes *dut* gén jelenlététől függ.

4.1.3 A mikobakteriális loop motívum deléciója letális fenotípust mutat

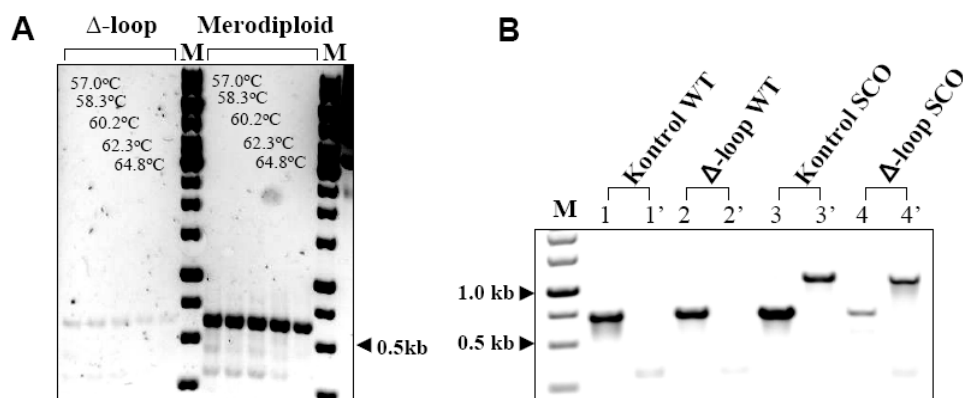
A mikobakteriális dUTPázok C-terminális részén egy 5 aminosavból álló konzervált inzert szekvencia található, amely egy jellegzetes loop, azaz hurok konformáció (lásd 18-as ábra) kialakításáért felelős. Ez az inzert szekvencia viszont nem található meg a humán és más fajok dUTPáz szekvenciáiban. Mindemellett ismereteink ezen szekvencia fiziológiai és funkcionális szerepéről meglehetősen hiányosak. Holott ez a mikobaktérium-specifikus felszíni struktúra, amennyiben esszenciális a mikobaktérium számára, jó lehetőséget kínálhat különböző gyógyszer-molekulák tervezéséhez, melyek szelektíven csak a mikobakteriális dUTPázra fejtenék ki hatásukat.



18. ábra A mikobakteriális inzert egy hurok konformációt alakít ki a dUTPáz monomer egységek felszínén

A humán (PDB kód: 3EHW) és a *M. tuberculosis* (PDB kód: 2PY4) dUTPáz enzimek egymásra illesztett szalagmodell szerkezete látható, zölddel jelölve a mikobakteriális és sárgával a humán dUTPáz. Minden monomer felszínén bekarikázva a hurok szerkezet látható. Az aktív helyen a dUPNPP ligandum (pálcikamodel) és a Mg^{2+} atom, mint gömbmodell (sárgával a humán, zölddel a mikobakteriális) van ábrázolva. Az illesztés a PyMOL programmal készült. Ábra forrása: Pecsí et al, bírálóat alatt a *Journal of Bacteriology*-nál.

Ennek az érdekes és igen fontos kérdésnek a megválaszolása érdekében a letális *dut* mutáns fenotípust próbáltuk Hirmondó Rita munkatársammal komplementálni egy olyan dUTPáz enzimmel, amely ezt a loop motívumot nem tartalmazta. Azaz egy olyan komplement vektort készítettünk, amelyben a hurok kialakításáért felelős konzervált 5 aminosavat (AGLAS) irányított mutagenézissel kitöröltük. A továbbiakban ezt a DNS konstruktot Δ -loopnak neveztem. Majd ezt a komplementáló Δ -loop plazmidot SCO sejtekbe elektroporáltuk. Miután meggyőződünk a plazmid integrációjáról (19A. ábra), a korábbiakban leírtaknak megfelelően a DCO eseményekre szelektáltuk a sejteket. 88 potenciális DCO sejt vonal tesztelése során 2 sejt vonalat tudtunk izolálni a megfelelő szelekciós markerek segítségével, amelyek a kolónia PCR eredménye alapján egy vad típus DCO és egy spontán szukróz rezisztens SCO genotípussal rendelkeztek (19B. ábra).



19. ábra A Δ -loop komplement vektor integrációja és a DCO-k azonosítása

Az M 1kb DNS markert jelöl. (A) A loop mutáns komplement vektor integrációja az SCO sejtekbe. Pozitív kontrollnak a merodiploid sejt vonalat használtam. Mindkét esetben a várt 635 bp DNS fragmens azonosítható. (B) Az azonos számok ugyanazt a sejt vonalat jelentik. 2,2' = vad típus Δ -loop DCO; 4,4' = spontán szukróz rezisztens SCO. Ábra forrása: Pecsí et al, bírálóat alatt a *Journal of Bacteriology*-nál.

Az itt bemutatott *in vivo* kísérletes eredmények alapján nem tudunk életképes *dut* génkiütött mutáns sejt vonalat izolálni a Δ -loop komplementáló háttérben, ami arra enged következtetni, hogy a loop motívum esszenciális a *M. smegmatis* növekedéséhez. A loop motívumot nem tartalmazó dUTPáz nem komplementálta a vad típusú dUTPázt. A továbbiakban felmerült a kérdés, hogy milyen hatást eredményezhet ennek az esszenciális motívumnak a hiánya az enzim szubsztrátkötésében és hidrolízisben. Ennek részletes tárgyalását az alábbiakban ismertetem.

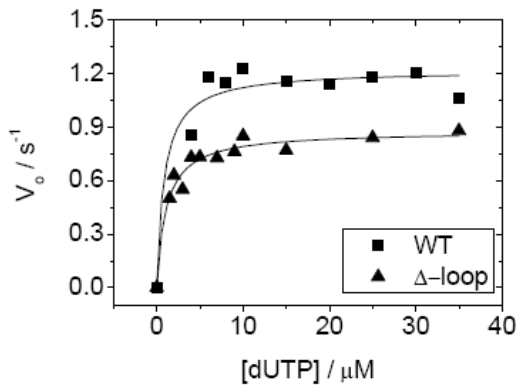
4.2. A *M. tuberculosis* Δ -loop mutáns dUTPáz enzimatis szerepének *in vitro* vizsgálata

A korábbi tanulmányok eredményeképpen rendelkezésünkre állt egy olyan *M. tuberculosis* dUTPáz fehérje (mtDUT^{H145W}), amely az aktív helyre bevitt triptofán aminosavat már tartalmazta [37, 55]. Kutatócsoportunk korábbi publikációban azt is igazolta, hogy az aktív helyre bevitt triptofánt tartalmazó mtDUT^{H145W} enzim a vad típusú dUTPázzal azonos enzimaktivitást mutat [55]. Így kontrollnak alkalmazható volt egy olyan *M. tuberculosis* dUTPáz fehérje, amely a triptofán jelet tartalmazta és vad típusú enzimaktivitással rendelkezett, amit az itt bemutatott kísérletekben, mint vad típusú dUTPázt (mtDUT^{H145W}) használtunk [38]. A Δ -loop mutáns *M. tuberculosis* dUTPázt (mtDUT ^{Δ -loop}) irányított mutagenzissel, templátként a mtDUT^{H145W} fehérjét felhasználva az öt (AGLAS) aminosav törlésével munkatársam, Lopata Anna készítette. Így az mtDUT ^{Δ -loop} mutáns is tartalmazta a fluorimetriás méréshez szükséges triptofán jelet.

4.2.1. A steady-state reakciósebesség vizsgálata

Az öt konzervált aminosav deléciójának hatását az enzim szubsztrát hidrolízisre spektrofotometriás módszerrel 0,1 μ M enzimmel vizsgáltuk. A méréseket és az ehhez tartozó ábrát munkatársam, Lopata Anna készítette. Mint ahogyan a 20-as ábrán jól látható, a mtDUT ^{Δ -loop} enzim maximális steady-state aktivitása 0,8 s⁻¹-ra csökkent a vad típusúhoz képest (1,2 s⁻¹). A Michealis állandó (K_M) mindkét enzim esetében 0,9 és 1,1 μ M között volt (4. táblázat). A megfigyelt 1,3-szoros V_{max} értékcsökkenés továbbá a közel azonos K_M

állandók azt mutatják, hogy a dUTPáz enzim katalitikus aktivitását a hurok törlése szignifikáns mértékben nem változtatta meg.

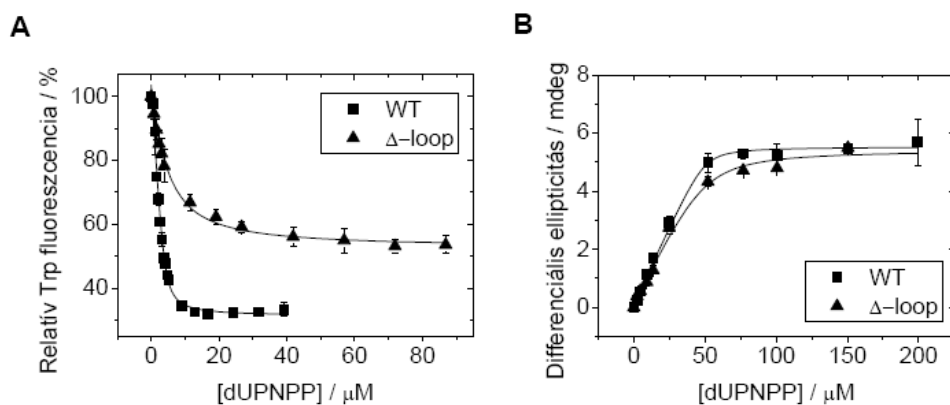


20. ábra A Δ -loop mutáció okozta hatásának vizsgálata a szubsztrát hidrolízisre

A grafikonon a mikobakteriális vad típus valamint a Δ -loop mutáns dUTPázok Michealis-Menten görbéinek összehasonlítása látható. A hiperbola illesztések a következő értékeket eredményezték: $V_{max} = 1,22 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$ a vad típus és $0,88 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ a Δ -loop mutáns esetében; $K_M 0,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ a vad típus és $1,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ a mutáns. Ábra forrása: Pecsí et al, bírálat alatt a *Journal of Bacteriology*-nál.

4.2.2. Disszociációs állandó meghatározása differenciális fluoreszcencia és CD spektroszkópiával

Korábbi kristályosítási eredmények igazolták, hogy ez a felszíni hurok struktúra viszonylagos közelségben helyezkedik el az enzim szubsztrátkötő zsebével [37]. Ezért feltételezhető, hogy ennek a huroknak a hiánya befolyásolhatja az enzim szubsztrátkötő képességét. Ennek megvizsgálása érdekében a fluorimetriás és cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai titrálási méréseket munkatársam Lopata Anna végezte a nem-hidrolizálható α - β -imido-dUTP (dUPNPP) szubsztrát analóggal. A mtDUT ^{Δ -loop} esetében a dUPNPP kötést kísérő relatív fluoreszcencia változás csökkenést tapasztaltunk a vad típushoz képest (21A. ábra), ami arra utalhat, hogy a hurok struktúra kis mértékben vesz részt a szubsztrát kötésben, mint ahogy ezt a K_d értékek is mutatják (lásd 4-es táblázat). Az enzim-szubsztrát komplex kialakulását eredményező CD jelváltozás során kapott K_d adatok is azt mutatják (21B. ábra), hogy a mutáció kis mértékben befolyásolta a dUPNPP kötést. Érdekes módon ez a hatás az enzim steady-state aktivitásában nem mutatható ki. Összességében elmondhatjuk tehát, hogy a hurok struktúra delécióna a dUTP hidrolízisre nincs számottevő hatással, viszont a dUPNPP ligandum kötés erősségét kismértékben csökkenti. Ezek az eredmények a következő érdekes kérdést vetették fel: amennyiben ez a mikobakteriális inzert nem feltétlenül szükséges az enzim katalízishez akkor, miért nem tudta komplementálni a letális mutáns *dut* fenotípust a *M. smegmatis*-ban? Ennek a kérdéskörnek részletes tárgyalását az 5. fejezetben ismertetem.



21. ábra A mikobakteriális inzert deléciójának hatása a szubsztrátkötésre

(A) Fluorimetriás titrálás. A grafikonon a WT enzimnek a dUPNPP-vel való titrálás eredménye látható az *mtDUT^{Δ-loop}*-al összehasonlítva. A mérési pontokra illesztett kvadrátikus görbe a következő K_d értékeket eredményezett: $0,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ a WT és $3,3 \pm 0,5 \mu\text{M}$ a Δ -loop esetében. (B) Enzim-szubsztrát komplex kialakulását eredményező CD jelváltozás dUPNPP titrálást követően. A mérési pontokra kvadrátikus függvényt illesztve a következő K_d adatokat kaptuk: $0,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ a WT és $3,9 \pm 2,4 \mu\text{M}$ az *mtDUT^{Δ-loop}* esetében. Ábra forrása: Pecci et al, bírálat alatt a *Journal of Bacteriology*-nál. Ábrákat készítette: Lopata Anna

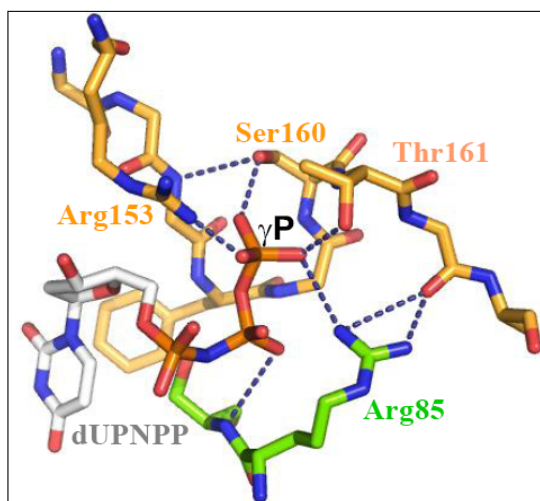
4.3. A humán és mikobakteriális dUTPáz szerkezet-funkció kapcsolatának *in vitro* vizsgálata

Korábbi cikkekből már számos dUTPáz kristályszerkezete ismert volt [36, 51, 115] és részletes oldatfázisú kísérletek, amelyek az enzimmechanizmust vizsgálják, is rendelkezésre álltak [54, 55]. Ebben a fejezetben a humán és a *M. tuberculosis* dUTPáz enzim eddig még nem vizsgált és többnyire a szubsztrát hidrolízisének specificitását, szelektivitását és módját meghatározó kérdéskört tanulmányoztuk. A kristályszerkezet alapján a homotrimer dUTPázok az aktívhelyükön egy konzervált aromás oldalláncot tartalmaznak, amely a szubsztrát uracil gyűrűjével átlapolva szoros kölcsönhatást alakít ki. Erről az aromás kölcsönhatásról a korábbi szerkezeti adatok ismeretében feltételeztük, hogy jelentős mértékben hozzájárulhat az enzim szubsztrátkötéséhez, valamint a termék (dUMP) felszabadulásához [50]. Ebből kifolyólag a következő kérdést fogalmaztuk meg: **1.) *Hogyan befolyásolja a szubsztrátkötést és a hidrolízist a dUTPázokban található konzervált aromás π - π kölcsönhatás?***

A továbbiakban a dUTPáznak egy másik igen érdekes, eddig mélységeiben még nem vizsgált sajátosságát kívántuk feltárni. Az összes eddig ismert P-hurokkal rendelkező ATP- és GTP-kötő fehérjékképesek a di- és a tri-foszfát nukleozidok megkülönböztetésére a P-hurok révén, ami a β - γ foszfát hidrolízisét katalizálja. A nukleotid hidrolázokhoz hasonlóan a homotrimer dUTPázokban is megtalálható a P-hurok motívummal közel azonos szekvencia

(7B. ábra). A dUTPáz azonban az α - β foszfátok között hasítja a dUTP-t. A kötött dUDP -nél is azonos foszfátlánc konformációt találunk (7A. ábra), ami a hidrolízis lépést elvileg lehetővé tenné, a dUDP azonban nem szubsztrátja, hanem inhibitora az enzimnek. Így joggal merülhet fel bennünk az a kérdés, hogy: **2.) Milyen mechanizmus szerint különbözteti meg a dUTPáz az NDP (nincs hidrolízis) és NTP (van hidrolízis) ligandumokat?**

Ezen két kérdéskör részletes tanulmányozásához irányított mutagenézissel a következő mutáns dUTPáz fehérjéket állítottuk elő. A humán dUTPázban az aromás kölcsönhatásért felelős fenilalanint alaninra cseréltem (hDUT^{F158A}), míg a mikobakteriális enzimben az ennek megfelelő mutációt (hisztidint alaninra mtDUT^{H145A}), munkatársam Lopata Anna végezte. Ezáltal az enzim és a szubsztrát uracil gyűrűje között kialakuló konzervált π - π kölcsönhatást megszüntettük. Továbbá a következő aminosav cserékkel a humán dUTPázban a P-loop-szerű hurok motívum és a szubsztrát γ -foszfátja közötti kölcsönhatásért felelős hidrogén kötések szüntettem meg; 160-as szerint és 161-es treonint alaninra (hDUT^{ST/AA}), a 153-as arginint lizinre (hDUT^{R/K}) valamint a 151-es treonin helyére egy stop kodont vittem be, ezáltal egy teljes karnélküli (P-loop-szerű hurok motívum mentes) mutánst (hDUT^{armless}) állítottam elő (22. ábra).



22. ábra A szubsztrát (dUPNPP) γ -foszfátjának koordinációjáért felelős és a mutagenézisnek alávetett aminosavak a dUTPáz (PDB:2HQU) C-terminális karon belül

A bevitt mutációk a γ -foszfát és az enzim közötti kölcsönhatást majdhogynem teljes mértékben megszüntették. A hidrogénkötéseket kék szaggatott vonallal jelöltem. A 85-ös arginin nem a C-terminális karon belül helyezkedik el. Ábra forrása: Pecsí et al, bírálat alatt a PNAS-nél.

Sikeres mutagenézist majd hatékony (10 mg / 0,5L) expressziót követően mindegyik fehérjét minimum 95%-os tisztasággal sikerült előállítanom (13. ábra).

4.3.1. A dUTPázok aktív helyén található fenilalanin konzervált

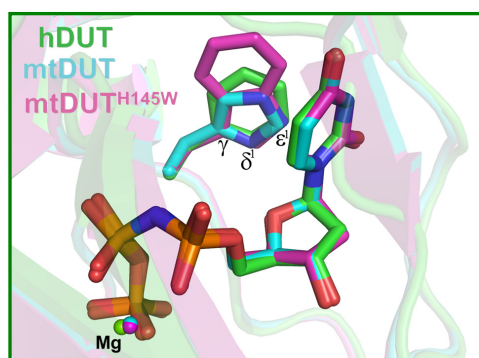
Annak tanulmányozása érdekében, hogy más fajok dUTPázában a P-loop-szerű hurok motívumban az aromás aminosavak megtalálhatóak-e és milyen mértékű hasonlóságot mutatnak a humán dUTPázzal, egy nem-redundáns fehérje szekvencia adatbázisban (NCBI) a p-blast alkalmazást használva a humán dUTPáz nukleáris izoformára homológ szekvencia keresést végeztünk. Az első 500 különböző fajból származó dUTPáz szekvencia illesztése (ClustalW 2 programmal) a következőket eredményezte: 96,4%-ban fenilalanint, 1,8%-ban hisztidint, 1,6%-ban tirozint és 0,2%-ban triptofánt találtunk. Az eukariótákban többnyire fenilalanin, míg a mikobaktériumokban hisztidin volt jelen a megfelelő (uracil gyűrűvel átlapoló) pozícióban. Az aminosav szekvencia illesztés 1. számú mellékletként a dolgozat végén látható.

4.3.2. Az $mtDUT^{H145W}$ kristályszerkezete az aromás kölcsönhatás konzerváltságát tükrözi

A vizsgálatokhoz két különböző fajból származó (humán és a *M. tuberculosis*) dUTPáz fehérjét választottunk a következő lényeges szempontok miatt: *i*) a két különböző fehérjében az általunk vizsgált pozícióban eltérő aminosavak alakítják ki a jellegzetes aromás kölcsönhatást (humán enzimben fenilalanin, míg a mikobakteriális enzimben hisztidin); *ii*) a két fehérje nagyfokú szerkezeti és szekvencia hasonlósággal rendelkezik (22. ábra A); *iii*) a humán dUTPáz részletes enzimmechanizmusát jól ismerjük; [55] *iv*) a mikobakteriális vad típusú dUTPáz valamint mutánsai könnyen kristályosíthatók. Következésképpen az $mtDUT^{H145W}$ fehérjének a dUPNPP szubsztrát analóggal alkotott kristályszerkezetéből jó minőségű röntgen diffrakciós mintázatot tudtunk detektálni. A felvett diffrakciós adatkészletből Leveles Ibolya munkatársam Harmat Veronika segítségével megoldotta a szerkezetet ($1,20\text{\AA}$ felbontásig), amit a fehérjeszerkezeti adatbázisba (PDB) 3HZA névvel ellátva tároltunk.

A humán és a mikobakteriális vad típusú dUTPázok, valamint az újonnan kristályosított $hDUT^{H145W}$ szerkezetek egymásra illesztése láthatóvá tette, hogy nemcsak az aromás oldalláncok konzerváltak, hanem azok konformációja is a szubsztráthoz képest. Továbbá mindegyik aromás gyűrű 3 atomja (γ , δ^1 , ϵ^1) egymásra illeszthető annak ellenére, hogy ezek eltérő méretűek (23. ábra). A különböző szerkezetek közötti konzerváltság úgy az aromás gyűrűk síkbeli elhelyezkedése, mint a gyűrűk által bezárt szögeket illetően arra enged

következtetni, hogy a π - π kölcsönhatásnak jelentős szerepe lehet az enzimaktivításban egy kedvező enzim-szubsztrát konformáció kialakítása által [116].



23. ábra Eltérő aromás oldalláncokat tartalmazó dUTPáz szerkezetek katalitikus helyének egymásra illesztése a dUPNPP szubsztrát analóggal és a fémionnal (Mg^{2+}) együtt ábrázolva

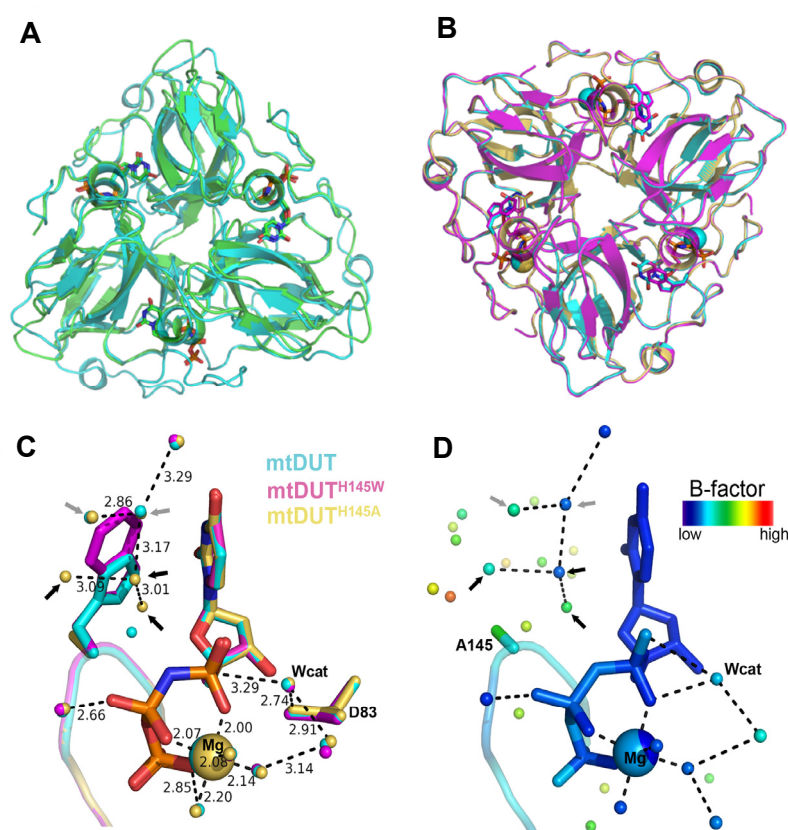
Fenilalanin (zöld), hisztidin (kék), triptofán (lila) –val jelölve. Az illesztett szerkezetek PDB kódjai a következők: 2HQU, 2PY4, 3HZA külön-külön. A dUPNPP pálcikamodellel, míg a fémion gömbmodellel ábrázolva. Ábra forrása: PeCSI et al NAR 2010 [135].

4.3.3 Az aromás kölcsönhatás megszüntetése nincs hatással a dUTPáz általános konformációjára, sem a szubsztrátkötő zseb szerkezetére

Annak érdekében, hogy mélyrehatóbban vizsgálni tudjuk az uracil és a különböző aromás oldalláncok (fenilalanin / hisztidin / triptofán) közötti interakció elvesztésének hatását a katalízisre és a fehérje konformációjának egészére, a hDUT^{F158A} és az mtDUT^{H145A} mutánsokat állítottuk elő. Általában egy ilyen radikális aminosav csere az adott fehérjében annak feltekeredésére és / vagy aktivitására kedvezőtlen hatással bírhat. Ennek okán az alanin mutáns humán és mikobakteriális dUTPáz fehérjék kristályosítását céloztuk meg. Az mtDUT^{H145A} esetében sikerült is jól diffraktáló kristályokat azonosítani. A felvett diffrakciós adatkészletből ennek a fehérjének a dUPNPP-vel komplexálódott szerkezetét (1,25Å felbontásig) Leveles Ibolya és Harmat Veronika oldott meg, amit a fehérjeszerkezeti adatbázisba (PDB) 3LOJ névvel ellátva tároltunk.

Az mtDUT^{H145A}, a vad típus és a mtDUT^{H145W} dUTPáz szerkezetek egymásra illesztése azt mutatta, hogy az aromás oldallánc delécioja nincs hatással a fehérje egészének feltekeredésére, továbbá a szubsztrátkötés módját sem befolyásolta (24A és B. ábra). A dUTPáz kristályszerkezetek jó felbontása továbbá lehetővé tette az enzim aktív helyén található vízmolekulák hálózatának részletes elemzését is. A 24-es C. ábra az aromás oldallánc elvesztését követően megjelenő vízmolekulákat mutatja. Az aromás oldallánc helyét egy jól meghatározható vízhálózat tölti ki, amely egy indol gyűrű nagyságának megfelelő helyet foglal el a szerkezetben (24D. ábra). Ez a vízhálózat a vad típusú kristályszerkezetben megfigyelt hidrogénkötések által kialakított hálózatba is jól illeszkedik.

Ezen felül az összes mutáns dUTPáz szerkezetben úgy a katalitikus vízmolekula, mint az összes konzervált aminosav és a kofaktor (Mg^{2+}) egyformán, azaz azonos pozícióban helyezkednek el egymáshoz képest (24C. ábra). Ami utalhat arra, hogy az $mtDUT^{H145A}$ reakciósebesség csökkenése, amit a következő alfejezetben ismertetek, nem a katalitikus helyen kialakult interakciós hálózatok (vízhálózat, konzervált aminosavak által kialakított H-kötések a szubsztráttal) megbontásának az eredménye. Ezen felül a vízmolekulák viszonylagos alacsony mobilitása, továbbá hogy az alanin mutánsban a vízmolekulák egy aromás oldallánc nagyságának megfelelő helyet foglalnak el, azt magyarázza, hogy a Phe/Trp/His/Tyr oldalláncok más aromás oldalláncokra cserélhetőek. Mint ahogyan ezt a dUTPáz szekvencia illesztéseink is mutatják (1. számú melléklet).

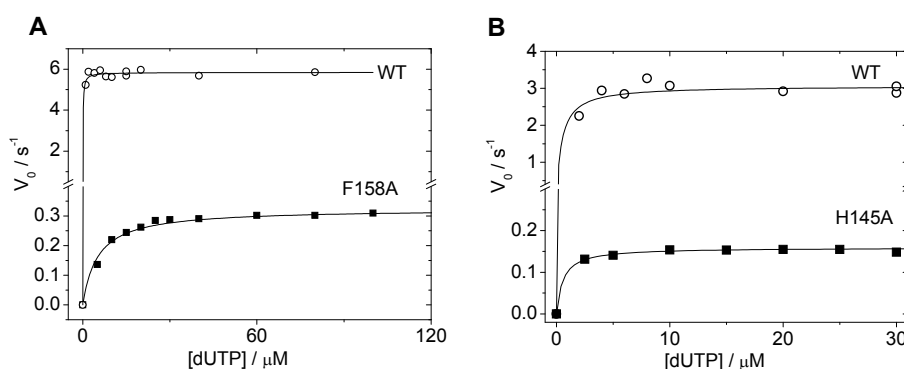


24. ábra Az újonnan kristályosított mutáns és vad típusú dUTPáz szerkezetek egymásra illesztése

(A) A vad típusú humán (zöld, PDB kód:2HQU) és *M.tuberculosis* (ciánkék, PDB kód:2PY4) dUTPázok a nem hidrolizálható dUPNPP (pálcikamoddelllel ábrázolva) szubsztrát analóggal alkotott szerkezetek illesztése nagyfokú szerkezeti hasonlóságot mutat. (B) A vad típusú mikobakteriális dUTPázt (ciánkék) a két új mutáns szerkezettel illesztettük ($mtDUT^{H145W}$ magenta, PDB kód:3HZA; $mtDUT^{H145A}$ arany, PDB kód:3LOJ) annak bebizonyítása végett, hogy az előidézett mutáció nem befolyásolta a fehérjék konformációját. (C) A fekete és szürke nyilak az $mtDUT$ és $mtDUT^{H145A}$ szerkezetekben előforduló vízmolekulákat szemléltetik. A nukleofil támadó vízmolekulát (w_{cat}) a 83-as aszpartát aminosav koordinálja H-kötésen keresztül. (D) Az $mtDUT^{H145A}$ szerkezet aktív helyének a B-faktor (mozgékonyág) szerinti ábrázolása. Megjegyzendő a triptofánt helyettesítő vízmolekuláknak (nyilakkal jelölve) a viszonylagos alacsony mobilitása. Ábra forrása: Pecsí et al, NAR 2010 [135].

4.3.4. A π - π kölcsönhatás megszüntetése csökkentette a steady-state reakciósebességet.

Korábban kutatócsoportomban munkatársaim igazolták, hogy az aktív helyre bevitt triptofán aminosav nem befolyásolja a dUTPáz enzimmechanizmusát és a vad típusal azonos enzimaktivitással rendelkezik [55, 94]. Annak megvizsgálása érdekében, hogy milyen hatással van a dUTPáz enzimaktivitására az aromás interakció megszüntetése, steady-state enzimaktivitást (az ES-komplex koncentrációja ebben az időtartományban állandó) mértem a fenolvörös pH indikátor módszerrel, amivel a hidrolízist követő proton felszabadulást regisztráltam. A hDUT^{F158A} mutáns enzimaktivitása $0,3 \text{ s}^{-1}$ -re csökkent a vad típushoz képest ($5,8 \text{ s}^{-1}$), míg a Michealis állandó (K_M) $1 \mu\text{M}$ -ról $5 \mu\text{M}$ -ra emelkedett (25A. ábra). Az mtDUT^{H145A} mutáns esetében (25B. ábra) azonosképpen 20-szoros enzimaktivitás csökkenést tapasztaltunk a vad típushoz képest, ahol a k_{cat} és a K_M értékek a következők voltak: $3,1 \text{ s}^{-1}$ -ről $0,16 \text{ s}^{-1}$ -ra, míg a $0,46 \mu\text{M}$ -ról $0,56 \mu\text{M}$ -ra változott.

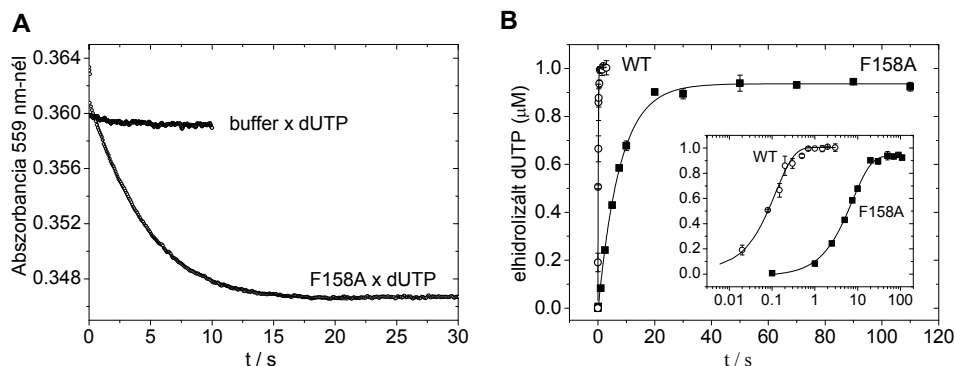


25. ábra Az aromás kölcsönhatás megszüntetése közel azonos k_{cat} csökkenést eredményezett úgy a humán, mint a mikobakteriális dUTPázban

A hDUT és a hDUT^{F158A} (paramétereket lásd az 5-ös táblázatban) valamint az mtDUT és a mtDUT^{H145A} Michealis-Menten görbéi láthatók (A-B). A hiperbolikus függvény illesztése a kapott pontokra a következő értékeket eredményezte: $k_{cat}=3,1 \pm 0,06$; $K_M=0,46 \pm 0,2 \mu\text{M}$ az mtDUT és $k_{cat}=0,16 \pm 0,001$, $K_M=0,56 \pm 0,1 \mu\text{M}$ az mtDUT^{H145A} esetében. Ábra forrása: Pecsí et al, NAR 2010 [135].

4.3.5. A hidrolízis lépés felelős a csökkent enzimaktivitásért a hDUT^{F158A} mutánsban

Korábbi publikációban témavezetőm igazolta, hogy a dUTPáz enzimatis ciklusában a reakciósebesség-meghatározó lépés a hidrolízis [55]. Ennek ismeretében a továbbiakban a vad típus és a hDUT^{F158A} hidrolízis lépés sebességének a változását vizsgáltuk a stopped-flow (26A. ábra) és a quench-flow (26B. ábra) módszerekkel. Magas enzimkoncentrációkat (35 μM és 25 μM) használtunk annak érdekében, hogy a szubsztrátkötés elegendően gyors legyen és a reakciósebességet ne befolyásolja, ily módon a hidrolízis lépés sebességét tudjuk követni. Megmértük a stopped-flow módszerrel a proton-felszabadulás kinetikáját fenolvörös indikátor segítségével. A proton felszabadulás sebességi állandója $k_p = 0,25 \text{ s}^{-1}$ közel azonosnak adódott a steady-state reakciósebességgel (lásd 5-ös táblázat). Továbbá ahhoz, hogy közvetlenül a kémiai lépést, ez esetben a hidrolízist vizsgáljuk az enzimreakcióban, quench-flow mérést alkalmaztunk, melynek során a radioaktívan jelölt dUTP hidrolízisét mértük (26B. ábra). A kapott pontokra illesztett exponenciális függvény a következő sebességi állandókat eredményezett: a hidrolízis sebességi állandója a hDUT^{F158A} esetében $k_H = 0,13 \text{ s}^{-1}$, míg a vad típusnak $k_H = 5,5 \text{ s}^{-1}$ adódott.



26. ábra a hDUT^{F158A} csökkent steady-state aktivitásáért a gátolt / lassult hidrolízis lépés tehető felelőssé

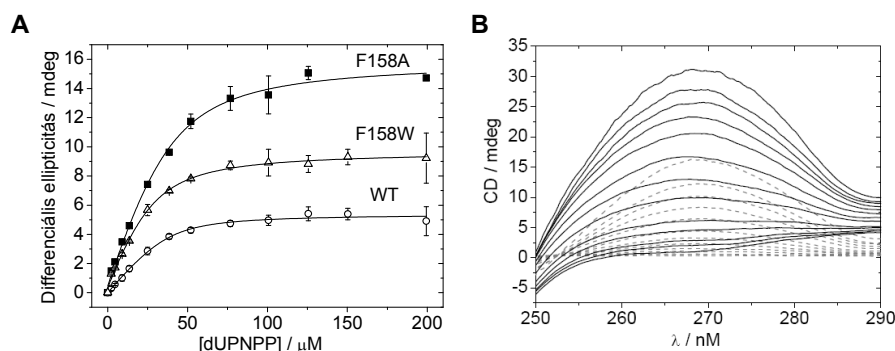
(A) Proton-felszabadulás következtében kialakult abszorbancia változás az idő függvényében ábrázolva. 35 μM hDUT^{F158A} fehérje pufferral illetve (10 μM) dUTP-vel összekeverve a stopped-flow műszerben. Exponenciális függvény illesztésével a keletkezett protonok értéke $k_{obs} = 0,23 \pm 0,007 \text{ s}^{-1}$. (B) a hDUT és a hDUT^{F158A} enzimek quench-flow módszerrel mért izotóppal jelölt dUTP szubsztrát hidrolízis sebessége az idő függvényében ábrázolva. A belső ábra ugyanezt a mérést mutatja logaritmikus skálán feltüntetve. Az ehhez tartozó sebességi állandókat az 5-ös táblázat tartalmazza. Ábra forrása: Pecsí et al, NAR 2010 [135].

Amennyiben a steady-state állandókat összevetjük a gyorskinetikai adatokkal nyilvánvaló, hogy a hDUT^{F158A} mutáns steady-state aktivitásának nagymértékű csökkenéséért a gátolt kémiai lépés (hidrolízis) a felelős (5. táblázat). Továbbá a korábbi megfigyelésekkel [55] megegyezően a hidrolízis lépésben a protonok felszabadulása, mint a hidrolízis reakció

velejáró kísérő jelensége figyelhető meg, ahogy ezt a közel azonos sebességi állandók ($k_p \sim k_H$) is igazolják. A fenti eredményeket összegezve elmondhatjuk, hogy az aromás interakció megszüntetése az enzimechanizmust alapjában nem változtatta meg, de a kémiai lépés sebességét jelentős mértékben csökkentette.

4.3.6. Az enzim-szubsztrát π - π kölcsönhatásának megszüntetése a szubsztrát kötést kismértékben befolyásolta.

Az aromás kölcsönhatások legfontosabb szerepe a molekulák felismerésében rejlik, és mint ilyenek a kölcsönható partnerek affinitását nagymértékben meghatározzák, szabályozzák. A hDUT^{F158W} és a hDUT^{F158A} fehérjék szubsztrát analóggal (dUPNPP) alkotott komplexeinek disszociációs állandóit (K_d) cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával történő titrálással határoztam meg. A hDUT, hDUT^{F158W} és a hDUT^{F158A} fehérjék ligandum (dUPNPP) kötését eredményező telítési görbe a következő K_d értékeket adta: 2, 1,5 és 4,8 μ M külön-külön (27. ábra). Ami arra utalhat, hogy egy aromás oldalláncnak egy másik, de szintén aromás oldallánca történő mutációja nem befolyásolja a dUTPáz szubsztrátkötés mértékét és az aromás oldallánc hiánya is csak 3-szoros affinitás csökkenést eredményezett a dUPNPP kötésben. Ez a viszonylag kismértékű szubsztrátkötés affinitás-csökkenés egy korábbi publikáció alapján azzal magyarázható, hogy a dUTPáznak a nagyfokú szubsztrát szelektivitásáért és specificitásáért az a konzervált antiparallel β -hajtúje felel amely hidrogén kötésekkel alakít ki a szubsztrát uracil gyűrűjével, mintegy közrezárva a szubsztrát molekulát [50]. Ez a kölcsönhatás az aktívhely eltérő régiójában alakul ki, így az általam vizsgált π - π kölcsönhatástól (fenilalanin és a szubsztrát uracil gyűrű átfedése) független.



27. ábra Az aromás kölcsönhatás megszüntetésének hatása a szubsztrát kötésre

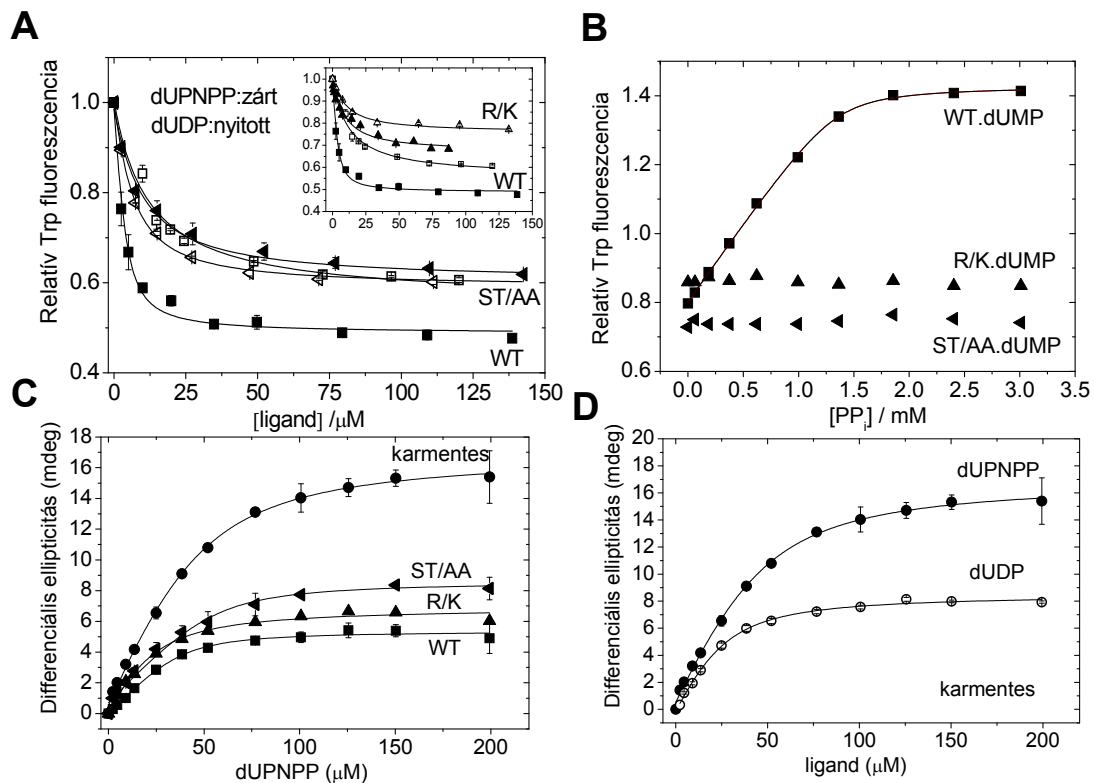
(A) Az enzim-szubsztrát komplex kialakulását eredményező CD jelváltozás 50 μ M fehérjéknek a dUPNPP szubsztrát analóggal való titrálását követően. A kapott pontokra illesztett kvadratikus függvény az 5-ös táblázatban feltüntetett K_d értékeket eredményezte. (B) A hDUT^{F158A}-nak a dUPNPP-vel (0-200 μ M) való

titrálását eredményező CD spektrumok (sima vonal) valamint referenciának a titrálással azonos koncentrációjú fehérjementes dUPNPP spektrumokat (szaggatott vonal) ábrázoltam. A kötési görbéken (A) ábrázolt mérési pontok a 269 nm-nél mért differencia spektrumokból származott. Ábra forrása: Pecci et al, NAR 2010 [135].

4.3.7. A P-loop-szerű hurok mutáns dUTPázok nem tudnak különbséget tenni a di-és a trifoszfát ligandumok között

A P-loop-szerű hurok mutáns humán dUTPáz enzimek fiziológiai ligandumaikkal kialakított kölcsönhatásainak tanulmányozásához egy, az aktív helyre beépített triptofán aminosav által közvetített fluoreszcencia jelet használtunk fel [94]. Ennek a triptofánnak (W158) a fluoreszcenciája a dUTPáz-ligandum komplexekre karakterisztikus fluoreszcencia-kioltási spektrumokat mutat az apoenzimhez képest [55]. Ezért a jellegzetes kioltásért a szubsztrát uracil gyűrűje valamint a dUTPáz P-loop-szerű hurok motívumában található konzervált aromás oldallánca között kialakuló kölcsönhatás a felelős. Az apoenzimben a P-loop-szerű hurok motívum igen nagy flexibilitással rendelkezik [71, 72], ugyanakkor az aktív hellyel állandó kapcsolatot tart fenn a nukleotid-független monomer-alegységek között kialakuló kölcsönhatások révén. A dUTPázoknak a dUDP-vel és a nem-hidrolizálható α - β -imido-dUTP (dUPNPP) szubsztrát analóggal történt fluorimetriás titrálása a 28-as A. ábrán látható. A hDUT^{ST/AA} mutánsnak a dUDP és dUPNPP ligandumokkal kialakított kötési görbéi a WT dUTPáznak a dUDP kötési görbéjével megegyező lefutású, ami azt mutatja, hogy ebben a mutánsban a dUPNPP szubsztrát kötése hasonló a vad típusú enzim dUDP kötött konformációjával. A hDUT^{R/K} mutáns a ligandumok megkötését kísérő fluoreszcencia jelintenzitás-csökkenést mutatott (belső 28A. ábra), továbbá úgy a dUDP, mint a dUPNPP komplexek kialakulását követően hasonló K_d értékeket eredményezett (7. táblázat). Mivel a karmentes mutáns (hDUT^{armless}) fluoreszcencia jelet nem tartalmazott, így cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai titrálást alkalmaztam az enzim-szubsztrát komplexek disszociációs állandóinak meghatározásához (28C. és D. ábra). A CD egyensúlyi és a fluorimetriás titrálások K_d értékei nagymértékű hasonlóságot mutattak azokban az esetekben, amikor mind a két módszert alkalmaztam (7. táblázat). A hDUT^{armless} mutáns, amely a nukleotid szubsztrát γ -foszfátjával nem mutat közvetlen kölcsönhatást, hasonló kötési állandókat eredményezett úgy a difoszfát, mint a trifoszfát ligandumokkal való CD titrálást követően (28D. ábra). A termék dUMP kötése nem mutatott szignifikáns változást a P-loop-szerű hurok motívumot érintő mutációk hatására (7. táblázat).

A γ -foszfát nélkülözhetetlen jelenlétének erős bizonyítékeként szolgál a 28B. ábrán bemutatott P-loop-szerű hurok mutáns dUTPázok szeretlen pirofoszfáttal történt fluorimetriás titrálása. A titrálás során az enzimet első lépésben a dUMP termékkel telítettük, majd a PP_i lépésenkénti adagolásával magas koncentrációk mellett az enzim.dUMP. PP_i termék komplex képződését próbáltuk detektálni a mutánsok esetében is, mint ahogy azt a vad típusú enzimben sikeresen kimutattuk. A mutánsok esetében a PP_i kötése nem volt detektálható. Ez igen magas K_d értékeket enged feltételezni, vagy a WT-hez képest egy eltérő mechanizmussal megvalósuló kötést jelenthet, amit ezzel a jellegzetes fluoreszcencia szignál változással nem detektálhatunk [55].

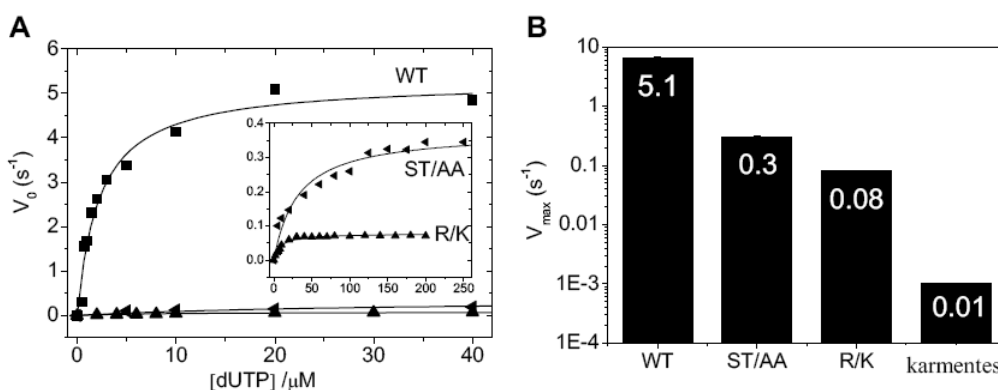


28. ábra A P-loop-szerű hurok mutációk hatása a dUPNPP és a dUDP nukleotidok valamint a pirofoszfát kötésre

Fluorimetriás (A-B) és cirkuláris dikroizmus egyensúlyi (C-D) titrálások. (A) P-loop-szerű hurok mutáns fehérjéknek (4μ M) a dUPNPP és a dUDP ligandumokkal történt titrálása. (B) A dUMP-vel telített vad és mutáns dUTPáz enzimek PP_i kötése. (C) a vad típusú és a P-loop-szerű hurok mutáns dUTPázok dUPNPP-vel való CD titrálásoknak az összehasonlítása. (D) $hDUT^{armless}$ mutáns dUTPáznak a dUDP és dUPNPP-vel való titrálása. A kapott mérési pontokra illesztett hiperbolikus függvény a 6. táblázatban feltüntetett K_d értékeket eredményezte. WT (kocka), $hDUT^{R/K}$ (háromszög), $hDUT^{ST/AA}$ (balra mutató háromszög). A szórás hibák (S. D.) 3 vagy több független mérés átlagából származnak. Ábra forrása: Pecsí et al, bírálat alatt a PNAS-nél.

4.3.8. A P-loop-szerű hurok dUTPáz mutánsok steady-state reakciósebességét érintő változásai

A P-loop-szerű hurok motívumot érintő mutációk drasztikus mértékben befolyásolták a dUTPáz katalitikus aktivitását és hatékonyságát a következő sorrendben: $hDUT^{armless} > hDUT^{R/K} > hDUT^{ST/AA} >> WT$ (29A. és B. ábra, 7. táblázat). Ezek az eredmények a vártnak megfelelőek, ugyanis míg a $hDUT^{ST/AA}$ és a $hDUT^{R/K}$ mutánsokban a γ -foszfátot koordináló mindössze néhány H-kötést szüntettünk meg, addig a $hDUT^{armless}$ esetében a szubsztrát γ -foszfátjának teljes koordinációját töröltük. Eredményeink a korábban közölt adatokkal is kiválóan egybevágnak, miszerint az *E.coli* és a Mason-Pfizer majom vírus (M-PMV) karmentes dUTPáz mutánsa majdhogynem inaktív volt [71, 117], továbbá a ló-vírus (Equine Infectious Anemia Vírus) és az M-PMV dUTPáz R/K mutánsa is a karmentes mutánshoz hasonló aktivitás-értékekkel rendelkezett [117, 118].



29. ábra a P-loop-szerű hurok mutációk hatása a dUTPáz steady-state aktivitásra

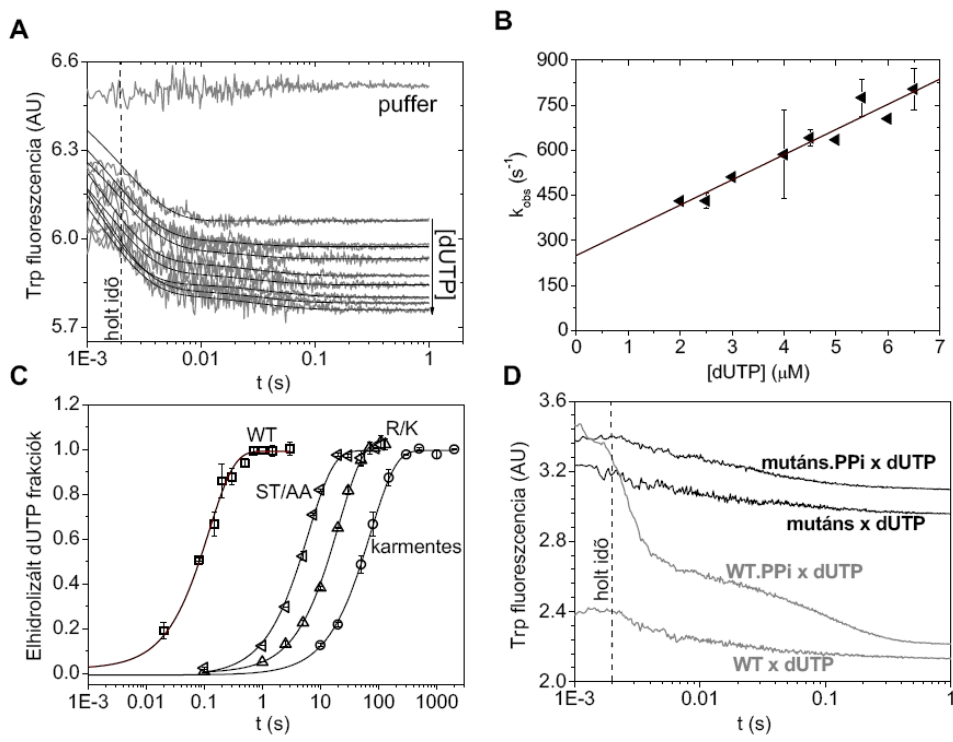
(A) Michealis-Menten görbék illesztése a mért adatpontokra a fenol vörös pH indikátor alapú módszer alkalmazását követően. A belső ábrán a $hDUT^{R/K}$ és a $hDUT^{ST/AA}$ mutánsok aktivitásának kinagyított képe látható. A Michealis-Menten egyenlet illesztése az adatpontokra a (B) ábrán oszlopdiagram formájában ábrázolt V_{max} értékeket eredményezte. A K_M értékek a következők voltak: $2,3\mu M$ a WT; $11,6 \pm 1,74 \mu M$ a $hDUT^{ST/AA}$ és $6,1 \pm 1,7 \mu M$ a $hDUT^{R/K}$ esetében. A karmentes mutáns ($hDUT^{armless}$) esetében a drasztikus aktivitás csökkenés miatt aktivitásgörbét nem lehetett meghatározni, ezért ezt a többi mutánssal együtt az összehasonlíthatóság érdekében oszlopdiagramon van ábrázolva. A szórás hibák (S. D.) 3 vagy több független mérés átlagából származnak. Ábra forrása: Pecszi et al, bírálat alatt a PNAS-nél.

4.3.9. A γ -foszfát koordinációjáért felelős aminosavak mutációi a hidrolízis lépés sebességi állandóját szignifikáns mértékben csökkentették

Annak eldöntésére, hogy a mutációk hogyan befolyásolják a dUTPáz enzim mechanizmusát, vagyis melyik kémiai lépésre és milyen mértékben vannak hatással, tranziens kinetikai méréseket végeztünk. A dUTP kötést a hDUT^{ST/AA} enzimhez és a termék disszociáció kinetikai paramétereit stopped-flow módszerrel a Trp szignált (W158) felhasználva határoztuk meg. A 30-as A. ábrán a hDUT^{ST/AA} enzimet az egyre nagyobb koncentrációjú dUTP szubsztrát mennyiséggel kevertük össze majd a fluoreszcencia változást az idő függvényében regisztráltuk. A mérési görbékre kétszeres exponenciális függvényt illesztettünk. A dUTPáz enzimmechanizmusának ismeretében [55], első lépésben egy gyors és koncentráció függő dUTP szubsztrátkötés detektálható [55], ami a hDUT^{ST/AA} mutáns esetében a következők adódtak: $k_{\text{dUTP, on}} = 84 \pm 8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $k_{\text{dUTP, off}} = 250 \pm 36 \text{s}^{-1}$. Ezek a sebességi állandók a WT-hez képest valamelyest gyorsabb dUTP kötést mutatnak (7. táblázat). A második kinetikai lépés, azaz az izomerizációs lépés sebességi állandói hasonló értékeket mutattak mindkét enzimben ($k_{\text{ISO}} = 29 \text{s}^{-1}$ a mutáns és 24s^{-1} a vad típus).

A továbbiakban a quench-flow módszerrel a reakciósebesség meghatározó lépést, a hidrolízist vettük vizsgálat alá. A 30-as C. ábrán az egyszeri átvitel (single turnover) hidrolízis sebességi görbékét láthatjuk, ahol a mutáns enzimek a vad típushoz képest több nagyságrendű hidrolízis sebesség csökkenést mutattak, ezek a hidrolízis sebességi állandók jól egybevágnak a steady-state mérések során kapott értékekkel (lásd 7-es táblázat).

A következő lépésben az enzim-termék komplexből történő PP_i felszabadulást követtük ún. chasing kísérletben, amelyben nagy koncentrációjú dUTP-vel való keverés megakadályozza a távozó PP_i visszakötődését az enzimhez. A WT-sal ellentétben, amikor a hDUT^{ST/AA} mutáns enzimmel végeztük el a kísérletet, PP_i disszociációt nem detektáltunk (30D. ábra). Ennek oka a következő lehet: *i*) a PP_i disszociációja az enzim-komplexről a dUTP bekötődésével azonos sebességű vagy gyorsabb volt. *ii*) nem képződött detektálható mennyiségű enzim.PP_i komplex. Mind a két lehetséges magyarázat arra utalhat, hogy a PP_i disszociáció a P-loop-szerű hurok mutánsokban feltehetőleg gyorsabb, mint a WT enzimben ($k_{\text{p}} = 740 \text{s}^{-1}$ [55]-ös cikkben) és így a steady-state aktivitást nem befolyásolja.



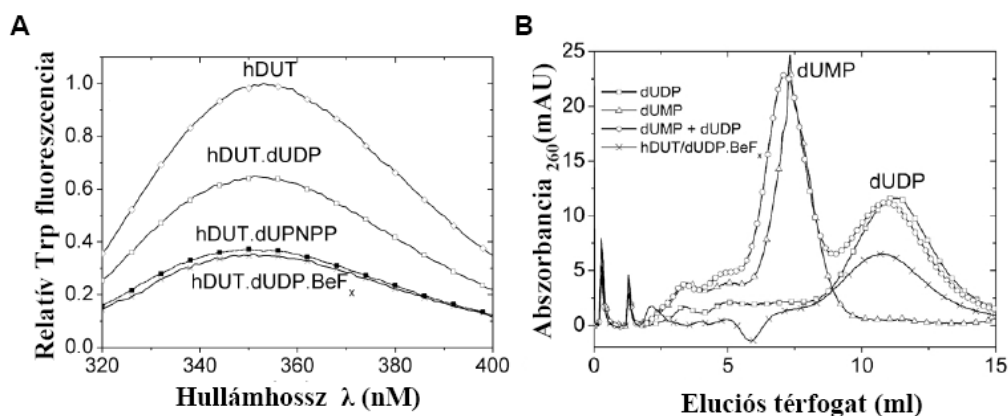
30. ábra a P-loop-szerű hurok mutáns dUTPázok tranziens kinetikai analízise

Az **A** és a **B** ábrák a hDUT^{ST/AA} mutánsnak a stopped-flow mérésben kapott dUTP kötését mutatják. (A) 0.8 μM hDUT^{ST/AA} enzimnek különböző koncentrációjú dUTP hozzáadását követően kialakult kötési görbéje látható fluoreszcencia jelváltozást regisztrálva. A görbékre dupla exponenciális függvényt illesztettünk, ennek az első kötési görbének a további analízise látható a B panelen. ($k_{obs} = 29 \pm 5 \text{ s}^{-1}$) (B) A kémiai reakció gyors kezdeti fázisában megfigyelt sebességi állandók dUTP koncentráció függése. A pontokra illesztett egyenes a következő asszociációs ($k_{on} = 84 \pm 8 \text{ μM}^{-1}\text{s}^{-1}$) és disszociációs ($k_{off} = 250 \pm 36 \text{ s}^{-1}$) sebességi állandókat eredményezte. (C) A WT és a P-loop-szerű hurok mutáns dUTPázok $\gamma^{32}\text{P}$ -dUTP hidrolízisének egyszeres átvitel sebességi állandók meghatározása quench-flow módszerrel. Az adatpontokra egyszeres exponenciális görbék illesztése a 7-es táblázatban feltüntetett hidrolízis sebességi állandókat (k_H) eredményezte. (D) A WT és hDUT^{ST/AA} enzim 1mM dUTP és 2mM PP_i reakcióoldatban a PP_i termék felszabadulásának követése az idő függvényében (stopped-flow). A dUTP kötés sebességét a PP_i disszociációs sebessége határozza meg, ami a WT esetében (szürkével) jól látható, míg a mutáns enzim esetében PP_i disszociáció nem tapasztalható. Ábra forrása: Pecsí et al, bírálat alatt a PNAS-nél.

4.3.10. A humán dUTPáz a dUTP analóg dUDP. BeF_x komplexet nem hidrolizálja el

Az előző alfejezetekben a dUTPáznak a dUTP szubsztrát kötés és hidrolízis mechanizmusát vizsgáltuk a P-loop-szerű hurok mutánsokban, ahol a γ -foszfát és az enzim közötti kölcsönhatásokat (H-kötéseket) majdhogynem teljes mértékben megszüntettük. Az is ismeretes, hogy a dUTPáz nem tudja elhidrolizálni a γ -foszfátot nem tartalmazó dUDP nukleotidot, holott a hidrolízis az α - β foszfátok között történik. Éppen ezért kíváncsiak voltunk, hogy a nukleotid analóg dUDP.BeF_x -ot el tudja-e hidrolizálni a dUTPáz. Ennek tanulmányozására ioncserélő kromatográfiás kísérleteket végeztünk. Korábban miozinokban [119, 120] és más enzimek esetében kimutatták, hogy az enzim. ADP.BeF_x komplex a

hidrolízis előtti ATP-kötött konformációs állapotot imitálni tudja. A mi esetünkben ezért feltételezhető, hogy a dUDP.BeF_x szubsztrátanalóg megfelelő kapcsolatot alakít ki az enzim P-loop-szerű hurok szegmensével és konformációs változásokat közvetít a nukleotid analóg minden egyes komponensére nézve. Ezen konformációs változások detektálására fluoreszcencia spektrumokat vettünk fel. A 31A. ábrán jól látható, hogy a Be²⁺ és a F⁻ hozzáadása a hDUT.dUDP komplexhez a Trp fluoreszcencia jelintenzitás drasztikus csökkenését eredményezte a hDUT-hoz képest ($F_{rel}=0,35$), ami a dUPNPP ligandum által indukált F-jelkioltással azonos. Ez a nagymértékű fluoreszcencia (F) jelkioltás a hDUT.dUPNPP és a hDUT.dUTP komplexek kialakulását követően detektálható [55, 94]. Ez arra utal, hogy a dUDP.BeF_x analóg hatékonyan kiváltotta a hidrolízis lépés előtti konformációs állapotot. Ezek a fluoreszcencia spektrumok azt mutatták, hogy az α - β foszfátok között nincs hidrolízis, mivel az enzim-szubsztrát komplex képződést követően több óra inkubációs idő elteltével fluoreszcencia jelváltozást nem tapasztaltunk. Ezen eredményeink megerősítése végett egy olyan kísérletet végeztünk el, ahol denaturáló körülmények között az enzim-kötött elhidrolizált termék az oldatba kiszabadulhat. Ily módon, amennyiben a dUDP nukleotid α - β foszfátja között hidrolízis van, egy a dUMP nukleozidnak megfelelő csúcsot kell detektálnunk az ioncserélő kromatográfiás elválasztás során a hDUT/ dUDP.BeF_x komplexben. Ennek a kísérletnek az eredményét a 31-es B. ábra mutatja be, ahol jól látható, hogy a dUDP és a dUMP kontroll kromatogramokhoz képest az enzim. dUDP.BeF_x komplexben valóban nem történt hidrolízis.



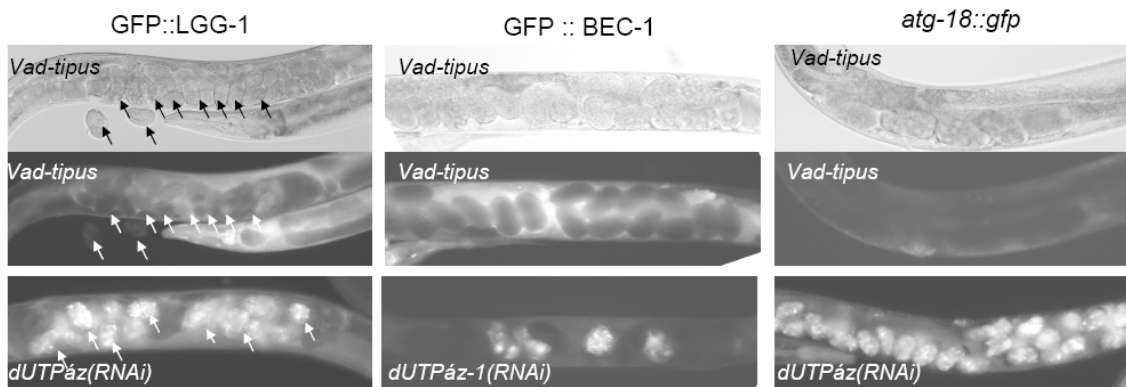
31. ábra A dUTPáznak a dUDP.BeF_x-al kialakított kölcsönhatásának fluoreszcens és ioncserélő-kromatográfiás vizsgálata

(A) A 10 μ M-os WT dUTPáz triptofán fluoreszcencia spektruma ($F_{max}=1$; kockával jelölve), 50 μ M-os dUDP-vel alkotott komplexe ($F_{max}=0,64$; háromszöggel jelölve) és az 50 μ M-os dUDP.BeF_x valamint a dUPNPP szubsztrát analógokkal képzett komplexei ($F_{max}=0,3$; X-el és fekete kockával feltüntetve). (B) A dUDP és a dUMP nukleotidok elválasztása ioncserélő kromatográfiás Q2 Bio-Scale oszlopon a dUTPáz által katalizált reakciótermékek detektálására dUDP.BeF_x -szubsztrátanalóg. Az enzim. dUDP.BeF_x komplexet (kereszttel jelölve) a kromatográfiás elválasztást megelőzően több órán át inkubáltuk. Kizárólag csak dUDP-t tudunk detektálni, ami azt mutatja, hogy az α - β foszfátok között nem volt hidrolízis. Ábra forrása: Pecsí et al, bírálat alatt a PNAS-nél.

4.4. A dUTPáz enzim fiziológiai hatásának vizsgálata *C. elegans*ban

Doktori munkám során lehetőség adódott egyik kollaborációs partnerünk Dr. Vellai Tibor által vezetett kutatócsoportjában folyó egyik munkába bekapcsolódni, amelyben a dUTPáz enzim és az autofágia szabályozó gének kölcsönhatását vizsgáltuk *C. elegans* modellben.

Egy korábbi publikációban kimutatták, hogy a *C. elegans* dUTPáz csendesítése embrionális letalitást eredményez az apoptózis útvonal aktivációja révén, amiben egy DNS-javító mechanizmus is részt vesz [17]. A dUTPáz enzim hiányának következtében fellépő morfológiai változások vizsgálatára a Vellai csoportban RNS interferenciával csendesített *dut* *C. elegans* törzset hoztak létre. A Dengg *et al.* cikkben közöltekkel megegyezően itt is embrionális letalitás volt tapasztalható [121]. Ezenfelül, számos dUTPáz csendesített embrióban a vad típushoz képest autofágia folyamatra utaló jeleket detektáltunk: kromoszóma kondenzáció, autofagoszómák, autolizoszómák jelenléte [122, 123]. Ezen eredmények alapján, a továbbiakban 3 autofágiával kapcsolatos GFP-vel fuzionált fehérje (Bec-1, Lgg-1, Atg-18) expresszióját vizsgáltuk dUTPáz csendesített és vad típusú nematodákban. Ennek eredményeképpen azt találtuk, hogy a dUTPáz csendesített hermafrodita embriókban az autofágia riporter gének expressziója drasztikusan megnőtt a kontroll egyedekéhez képest (32. ábra).

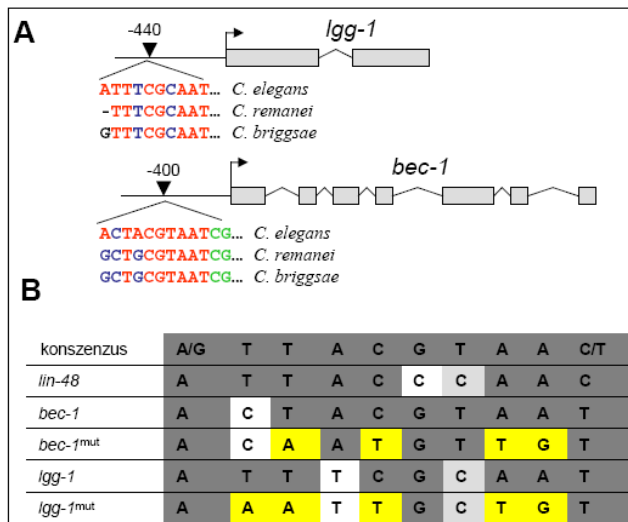


32. ábra A dUTPáz csendesítés a *C. elegans* embriókban három autofágia marker gén (GFP::LGG-1, BEC-1::GFP és az *atg-18::gfp* [123, 124]) erőteljes expresszióját indukálja

A vad típusú embriókban a GFP-vel fuzionált fehérjék gyenge expressziót mutatnak (középső képsor), ami sötét kör alakú foltokban nyilvánul meg a hermafroditákban. Az ennek megfelelő kontrasztfázisú interferencia képek (DIC) a felső sorban láthatók. Az alsó sorban a *dut* csendesített és a riporter konstrukciókat tartalmazó géneket intenzíven expresszáló (fényes fluoreszcens pontok formájában megjelenő) embriók láthatók a hermafroditákban. A BEC-1-expressziója az LGG-1 és az *atg-18* génekhez képest csökkent (néhány embrióban jól látható fehér foltok), ami a nem integrálódott BEC-1 riporter gén mozaicizmusának tulajdonítható. A nyílak a GFP::LGG-1 transzgenikus hermafroditában lévő embriókat mutatják. Ábra forrása: Erdelyi *et al*, JCS 2010 [121].

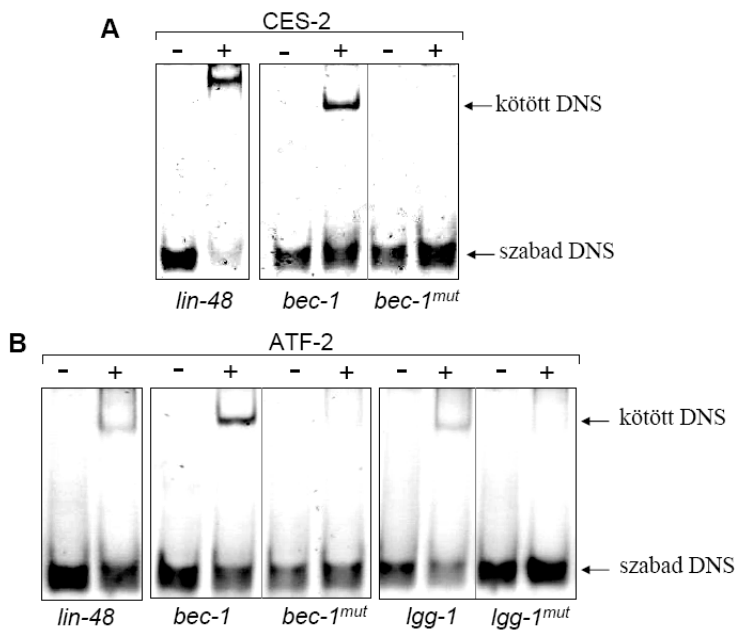
A fenti eredmények alapján elmondható, hogy az embrionális fejlődés során az autofágia gének nevezetesen a *bec-1*, *lgg-1* és az *atg-18* stressz hatására, azaz dUTPáz-hiányos állapotban felülszabályozódnak. Ezen eredmények fényében a továbbiakban szekvencia elemzésnek vetettük alá ezeknek az autofág géneknek a szabályozó régióit, és az *lgg-1* és *bec-1* promóterekben konzervált CES-2/ATF-2 kötőhelyeket találtunk. Ezek a kötőhelyek nemcsak a *C. elegans*-ban, hanem másik két nematoda fajban is konzerváltak bizonyultak (33A. ábra). A *ces-2* és az *atf-2* paralóg gének (ugyanabban az organizmusban találhatóak), a humán bZip-szerű transzkripció faktorok főreg ortológjait kódolják [125, 126].

33. ábra Az *lgg-1* és a *bec-1* autofág gének szabályozó régiói



(A) A *bec-1* és az *lgg-1* gének upstream szabályozó régiói vélhetőleg CES-2 specifikus kötő helyet tartalmaznak, amelyek konzerváltak nemcsak a *C. elegans* hanem a *C. briggsae* és *C. remanei* nematodákban is. A CES-2 specifikus kötőhelyek elhelyezkedését a *bec-1* és az *lgg-1* géneken a transzláció iniciációjához képest (nyíllal jelölve) számok jelölik. A konszenzus szekvencián belül található konzervált nukleotidokat piros, a nem-konzervált nukleotidokat kék, míg a konzervált túlnyúló rész zöld színekkel ábrázolva. (B) A *bec-1* és az *lgg-1* promóter szakaszon belül található feltételezett CES-2 kötő helyek. Konzervált bázisok szürke, míg a bevitt mutációk sárga színnel ábrázolva. Ábra forrása: Erdelyi et al, JCS 2010 [121]

A CES-2 fehérje az apoptotikus útvonal *upstream* szabályozó faktora, az *egl-1* expresszióját befolyásolja [126], aminek következtében a testvér kromatidák (NSM) eltávolításában van fontos szerepe [127]. Érdekes módon a *ces-2* gátlása nem okoz embrió letalitást és expressziója is csak néhány sejtben fejeződik ki az embriogenezis során [128]. Az *atf-2* (cAMP-függő transzkripció faktor-2) a *ces-2* egyik legközelebbi paralóg génje, amely fokozottan expresszálódik embriókban és az életképességhez nélkülözhetetlen [128]. A *ces-2* és az *atf-2* paralóg gének együtt szabályozzák a *lin-48* gén expresszióját, amely az egyedfejlődés során különböző szervek fejlődésében játszik fontos szerepet. Ezek után felmerült a kérdés, hogy a rekombináns ATF-2 és CES-2 fehérjék képesek-e kötni az imént említett gének (*lgg-1* és *bec-1*) promóter régióit *in vitro*? Ennek eldöntésére EMSA kísérleteket végeztünk.



34. ábra A CES-2 és az ATF-2 fehérje köt a *bec-1* gén promóter régiójához

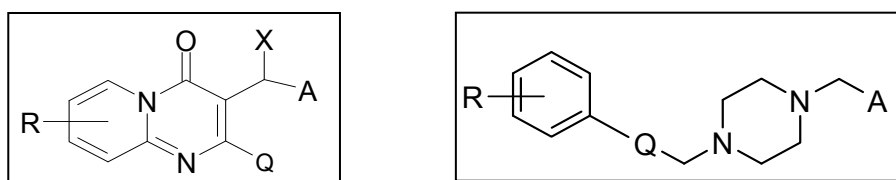
Az ATF-2 fehérje az *lgg-1* gén feltételezett kötőhelyéhez is képes *in vitro* kötni. A fehérjéket ATF-2 (10 μ M) és CES-2 (5 μ M) a megfelelő oligonukleotidokkal összekevertük (1 μ M) és natív PAGE gélen futattuk meg. A *lin-48* oligonukleotidot, mint pozitív kontrollt alkalmaztuk a Wang et al., 2006 cikk alapján. Ábra forrása: Erdelyi et al, JCS 2010 [121].

A gélshift eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a CES-2 köti a *bec-1* gén promóter szakaszát (34A. ábra) és az ATF-2 fehérje is kötődik a *bec-1* és az *lgg-1* gének promóter régióihoz (34B. ábra). Ezzel ellentétben, amikor a konzervált bázisokat elmutáltuk (33B. ábra) és a mutáns oligonukleotidokkal inkubáltuk a CES-2 és az ATF-2 fehérjéket, fehérje-DNS komplex képződést nem detektálunk egyik esetben sem (34. ábra). Következtetesként elmondhatjuk, hogy a CES-2 és az ATF-2 fehérjék *in vitro* kötődnek az *lgg-1* és *bec-1* promóterekhez.

5. EREDMÉNYEK TÁRGYALÁSA

A dUTPáz esszencialitását korábban már két organizmusban (*E. coli* és *S. cerevisiae*) kimutatták, viszont ez idáig mikobaktériumokban ilyen irányú kísérletek nem történtek. Holott, amint azt a bevezető részben ismertettem, a dUTPáz a timidilát bioszintézis útvonalban feltételezhetően kiemelkedő szereppel rendelkezik ezekben az élőlényekben. Annak érdekében, hogy a dUTPáz enzim fontosságát a mikobaktériumban vizsgáljuk, egy hatékony kétlépcsős, rekombinációs stratégiát alkalmaztunk. Ezzel a módszerrel formális genetikai bizonyítékot szolgáltatunk arra nézve, hogy a *dut* gén kiütése letális a mikobaktériumban, ugyanis kizárólag abban az esetben sikerült deléciós *dut* mutáns sejtvonalat izolálni, amikor egy komplementáló plazmidon a funkcionális dUTPáz-t biztosítottuk a baktérium számára. Ezt követően, a *dut* letális fenotípust a Δ -loop *dut* mutánssal próbáltuk komplementálni, azaz menekíteni a baktériumot. Átható DCO szelekciót követően, ebben a Δ -loop mutáns háttérben nem sikerült életképes deléciós *dut* mutáns sejtvonalat izolálni. Mivel a vad típusú dUTPáz funkcionális komplementációja a loop-ot nem tartalmazó mutáns dUTPázzal nem lehetséges, ez a mikobaktériumspecifikus szerkezeti motívum a baktérium életképességéhez nélkülözhetetlen. A Δ -loop mutáns dUTPázzal végzett spektroszkópai és steady-state kinetikai méréseink igazolták, hogy ennek a motívumnak, amely egy hurok struktúrát alakít ki az aktívhely viszonylagos közelségében, az enzimaktivitásra (katalízisre) nincs szignifikáns hatással. Az irodalomban több olyan tanulmány olvasható, ahol mikobaktériumokban esszenciális domének feltérképezésével próbálják meghatározni az adott fehérje funkcióját. Ilyen fehérjék pl. a WhiB-fehérje [129] vagy az UvrD1 fehérje [130]. Ezen fehérjék esetében viszont a vizsgált szerkezeti domén minden esetben nélkülözhetetlen volt az enzim aktivitásához. A specifikus loop motívumot tartalmazó dUTPáz esetében ellenben nem ez a helyzet, mivel itt egy, az aktivitás szempontjából nélkülözhető, ugyanakkor a baktérium életképességéhez nélkülözhetetlen motívumról van szó. Éppen ezért joggal merülhet fel a kérdés, hogy miért létfontosságú a loop struktúra a *M. smegmatis* számára? Kristályszerkezetben jól látható, hogy ez az öt aminosav (AGLAS) a homotrimer fehérje monomer egységeinek a felszínén egy hurok konformáció kialakulását indukálja [37]. Ezért feltételezhetjük, hogy egy kölcsönható partnernek, avagy ligandumnak szolgáltathat kötőhelyet. Ennek alapján továbbá vélhető, hogy ez a faj specifikus kölcsönhatás közvetítheti a loop motívum esszencialitását, amit az *in vivo* kísérletekben kimutattunk.

Egy nemrég közölt tanulmányban kimutatták, hogy különböző bakteriofágok dUTPázai genetikailag eltérő, két különböző funkcióval rendelkeznek, vagyis az aktivitás mellett más fehérje expresszióját is képesek indukálni [131]. Úgy tűnik, hogy a mikobateriális dUTPázoknál hasonló lehet a helyzet, mivel az enzimatis aktivitás mellett más funkcióval is rendelkeznek, amit egy egyedülálló és esszenciális szekvencia motívum közvetít. Mivel ez a mikobaktérium-specifikus motívum a mikobaktérium életképességéhez nélkülözhetetlen és a humán dUTPázból hiányzik, ezért ezt a molekula felszínét felhasználva hatékony és specifikus antimikobakteriális gyógyszer molekula tervezhető. Mivel kutatócsoportunk szerves része egy új antituberkulotikumokat fejlesztő konzorciumnak, ezért a *M. tuberculosis* dUTPáz loopról gyűjtött ismereteinket felhasználva erre a felszínre szelektív drogjelölt molekulákat terveztek konzorciumi partnereink. Ezeket a drogjelölteket tuberkulózissal fertőzött tengerimalac modelleken immár le is tesztelték, jó eredménnyel. Ezen konzorciális projekt munka két molekulacsald szabadalmaztatásához vezetett (35. ábra).



35. ábra *M. tuberculosis* dUTPáz loop motívumára tervezett szabadalom alatt álló két drogjelölt molekulacsald szerkezeti képlete

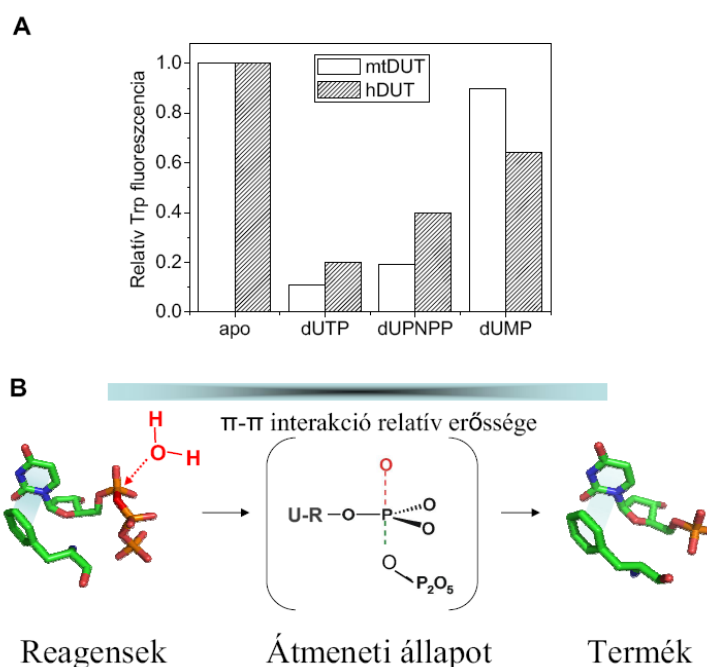
A timidin-szintáz útvonalban szereplő dUTPáz és a többi kulcsfontosságú enzimek nagyfokú hasonlóságot mutattak más sikeres patogén mikobaktériumokban (*M. leprae*, *M. ulcerans* és a *M. bovis*) is. A Buruli ulcers előfordulási gyakorisága egyes trópusi/szubtrópusi területeken mint pl. nyugat Afrikában emelkedő tendenciát mutat [132]. A *M. bovis* baktérium tuberkulózist okoz számos emlősben beleértve az embert, de főleg a szarvasmarhát fertőzve komoly gazdasági és közegészségügyi problémákat jelent napjainkban is [133]. Mindezen patogén mikobakteriumok a dUTPáz fehérjét valamint a loop motívumért felelős 5 aminosavat nagy hasonlósággal kódolják genomjukban. Ezért feltételezhetjük, hogy a dUTPáz enzim a *M. smegmatis*hoz hasonló kulcsfontosságú fiziológiai szereppel rendelkezik ezekben a patogén fajokban is.

Dolgozatom 4.3. fejezete a dUTPáz eddig még részleteikben nem ismert és többnyire a szubsztrátkötésre és a hidrolízis szelektivitására irányuló kérdések megválaszolását szolgáló kísérleteket (steady-state kinetika, tranziens kinetika, spektroszkópia, ioncserélő-kromatográfia és krisztallográfia) tartalmaz. Elsősorban a dUTPázban található konzervált

aromás aminosav (Phe158) és a ligandum uracil gyűrűjével átlapoló kölcsönhatást vizsgáltuk. Szekvencia illesztésekből származó eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a különböző fajok dUTPázaiban a szubsztrát nukleotiddal kialakított aromás kölcsönhatás konzervált. Ez a konzervált aromás aminosav (humán dUTPázban Phe158; mikobakteriális enzimben a His145;) egy másik, de szintén aromás aminosavval helyettesíthető anélkül, hogy a dUTPázra jellemző szerkezeti és aktivitásbeli módosulásokat okozna. A π - π interakció megszüntetése nem befolyásolta az aktívhely konformációjának kialakulását, ahogy azt az alanin mutáns dUTPáz kristályszerkezete is tükrözi. Ezen kölcsönhatás megszüntetése ugyanakkor a reakciósebesség meghatározó lépést, a hidrolízist szignifikáns mértékben (20-30szoros) lelassította. A továbbiakban azt vettük vizsgálat alá, hogy az aromás interakció energetikai szempontból milyen mértékben járul(hat) hozzá az enzim-szubsztrát komplex kialakulásához. A hDUT^{F158A} mutáns disszociációs állandójának ($K_{d, dUPNPP}$) kismértékű növekedése (6.táblázat) arra utalhat, hogy az aromás kölcsönhatás kismértékben stabilizálta az enzim-szubsztrát komplex kialakulását. Amennyiben ennek a konzervált fenilalaninnak a geometriáját megvizsgáljuk az uracil gyűrűhöz képest, a Phe-Phe modell rendszer ismeretében [116] azt feltételezhetnénk, hogy egy gyenge taszító kölcsönhatás van érvényben. Mindemellett, mivel az uracil egy heterociklusos nukleobázis, így kölcsönható partnerében ez esetben a Phe-ban elektromos dipólt képes indukálni [134], ezáltal az uracil és a fenilalanin interakciója révén kialakult geometriára kedvező hatással lehet.

Annak további igazolására, hogy az aromás kölcsönhatás az enzim és a szubsztrát között az átmeneti állapotot stabilizálja, a Trp szenzor fluoreszcencia jelváltozásait vizsgáltuk az enzim ciklus során. Az aktívhelyeknek a ligandum-kötött állapotát a 36-os A. ábra mutatja, ahol a hDUT^{F158W} és az mtDUT^{H145W} fehérjékben a triptofán aromás oldallánca és a ligandum uracil gyűrűje között kialakult a π - π interakció. A F-jelkioltás a dUMP megkötését követően kisebb volt, mint a lassan hidrolizálható dUPNPP szubsztrátanalóg bekötődésekor. A legnagyobb F-jelkioltást a dUTP szubsztráttal tapasztaltunk. Mivel a reakciósebességet meghatározó lépés a hidrolízis, és mivel az azt következő termék (dUMP) felszabadulása gyors, ezért nagy mennyiségű dUTP-vel a reakcióelegyben szinte az összes enzim az átmeneti állapothoz közeli, avagy hidrolízis-kompetens konformációban van. A dUPNPP és a dUTP ligandumok közötti F-jelkülönbség adódhat abból, hogy a szubsztrátanalóg dUPNPP nem tudja teljes mértékben a hidrolízis-kompetens konformáció kialakulását indukálni. Továbbá ez azt is mutatja, hogy a kötött szubsztrát állapotból a következő konformációs állapotba való átmenet további F-kioltással jár, ami feltételezhetően az enzim és a szubsztrát közötti π - π kölcsönhatás változásának tulajdonítható. A 36-os B. ábrán sematikusán bemutatott hidrolízis

reakció nagy valószínűséggel asszociatív mechanizmus szerint történik [115], ahol az átmeneti állapotban kialakult pentakovalens molekula elektron gazdag, különösen az α -foszfát környékén. A π - π kölcsönhatástól függő F jelváltozások és a reakciómechanizmus együttesen azt sugallják, hogy az átmeneti állapot stabilizációjához az aromás kölcsönhatás nagymértékben hozzájárulhat.



36. ábra π - π kölcsönhatás relatív energia változása Trp fluoreszcenciával ábrázolva (A) az asszociatív típusú hidrolízis reakció sematikus ábrázolása (B).

Ábra forrása: Pecci et al NAR 2010 [135].

Mint ismeretes, a dUTPáz enzim ciklusa során a fehérjében nem következik be nagy konformáció változás, ezért feltételezhetően katalitikus hatékonysága többnyire az átmeneti állapotban a szubsztráttal alkotott elektrosztatikus kölcsönhatás stabilizációja és/vagy geometriájának finomhangolása révén valósulhat meg, ahogy ezt kísérleteink igazolták [135].

Dolgozatom 4.3.7-10 fejezeteiben az eddig még részleteiben nem ismert következő két kérdéskört vizsgáltuk: 1.) milyen mechanizmus szerint különbözteti meg a humán dUTPáz a dUDP és dUPNPP ligandumokat annak ellenére, hogy mindkét nukleotid a hidrolízishez szükséges foszforanhidrid kötést tartalmazza; 2.) milyen mértékben járul (hat) hozzá a P-loop-szerű hurok motívum ehhez a szubsztrát szelektivitáshoz. Ahhoz, hogy az imént említett mechanizmusba betekintést nyerjünk, olyan dUTPáz mutánsokat terveztünk, amelyekkel részben, illetve teljes egészében a szubsztrát γ -foszfátja és a P-loop-szerű hurok motívum közötti másodlagos kötéseket megszüntettük. Ezt követően a megtisztított mutáns fehérjékkel

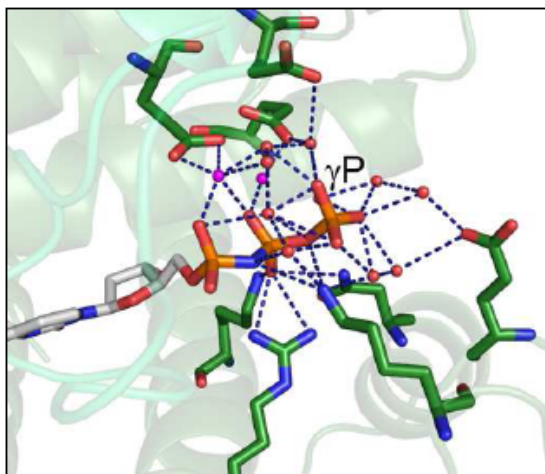
kinetikai méréseket végeztünk. A P-loop-szerű hurok motívum a dUTPáz esetében a polipeptidlánc C-terminális végén helyezkedik el. A tervezett mutációk beleértve a teljes C-terminális kar delécióját is, a fehérje egészének feltekeredését és konformációját nem változtatta meg [66, 71, 117, 136]. A fluorimetriás és quench-flow eredmények egységesen azt mutatták, hogy a másodlagos kölcsönhatások megszüntetése a P-loop-szerű hurok motívum és a szubsztrát γ -foszfátja között csökkentette az enzim-szubsztrát komplex katalitikusan kompetens konformációjának a kialakulását. Steady-state aktivitásmérésekből jól látszik, hogy a hidrolízis mindegyik mutánsban megtörténik az okozott beavatkozás mértéknek függvényében ($WT \gg hDUT^{ST/AA} > hDUT^{R/K} > hDUT^{armless}$). A γ -foszfátot szinte kizárólagosan koordináló szerkezeti elem a P-loop-szerű hurok motívum, viszont nem az egyetlen, ugyanis a 85-ös konzervált arginin a ligandum β -és γ -foszfátjának a koordinációján keresztül ugyancsak fontos szerepet tölt be az aktivitásban (22. ábra). Ennek tudható be valószínűleg a $hDUT^{armless}$ esetében tapasztalt igen alacsony aktivitás megléte annak ellenére, hogy a teljes P-loop-szerű hurok motívum hiányzik. A tranziens kinetikai méréseinkből továbbá arra következtethetünk, hogy az egyetlen kémiai lépés, ami a mutánsok steady-state sebességét meghatározza maga a hidrolízis lépés. A szubsztrát kötés és termék felszabadulás (több nagyságrenddel gyorsabb) során bekövetkező esetleges további változások a steady-state sebességet nem befolyásolják. Úgy tűnik, hogy a dUTPázban a P-loop-szerű hurok motívum a hidrolízishez nélkülözhetetlen kompetens konformáció kialakulását segíti elő és ennek köszönhetően a hidrolízis lépés előfordulási gyakoriságát növeli. Ez a jelenség azzal is magyarázható, hogy a P-loop-szerű hurok motívum az általa kialakított másodlagos kötések révén mintegy az α -foszfát körüli elektron többletet csökkenti. Ily módon hozzájárulhat az átmeneti állapot stabilizálásához, az aktivációs energia csökkentéséhez, továbbá a hidrolízis lépés előtti katalitikusan kompetens [ES] komplex konformációjának a kialakulásához.

A P-loop-szerű hurok motívum eltávolítása a vad típusú humán dUTPázhoz képest 720-szoros katalitikus hatékonyság csökkenést eredményezett. Ezért joggal feltételezhetjük, hogy a di-és a tri-foszfát nukleotidok megkülönböztetése a γ -foszfát és a P-loop-szerű hurok motívum között kialakult kölcsönhatás révén következik be, amit korábban az *E. coli* dUTPázra is javasolt Vértessy Beáta és munkatársai [66, 71].

Mindemellett a WT dUTPáznak a lehetséges dUDP hidrolízisét ioncserés kromatográfiás kísérlettel is megvizsgáltuk, a dUDP.BeF_x nukleotid analógot használva. Ebben az esetben a γ -foszfát tulajdonságait változtattuk meg, míg a P-loop-szerű hurok motívum sértetlen maradt. A szubsztrát β -foszfátja és a Be atom között feltételezhetjük, hogy kovalens kötés alakul ki [137] míg a fluor atom az oxigén atomhoz hasonlóan H-kötés kialakítására képes mintegy

imitálva a γ -foszfát jelenlétét. Ennek megfelelően azt vártuk, hogy a dUDP.BeF_x nukleotid analóg a dUTP és/vagy a dUPNPP-vel megegyező aktív konformációs állapotot tud indukálni az enzim-szubsztrát komplexben, mint ahogy ezt a fluoreszcencia eredmények maradéktalanul igazolták is (31A. ábra). Az így kialakult [ES] komplexben azonban nem detektáltunk hidrolízist, ami arra enged következtetni, hogy a γ -foszfát és a nukleotid többi része között kialakuló foszfátészter kötés teljes egészében szükségeltetik ahhoz, hogy a P-loop-szerű hurok motívum hatása a hidrolízis helyén, az α -foszfáton érvényesüljön.

Az eredmények további elemzése érdekében a dUTP-át a funkcionális szempontból legrelevánsabb enzimmel, a kétfunkciós dUDP/dUTPázal hasonlítottuk össze munkatársammal, Szabó Judit Eszterrel. A dUTP-ázal megegyezően a kétfunkciós enzim katalízise során is dUMP keletkezik, amit további kapcsolt reakció nem követ, azaz hidrolízis mechanizmusban azonosak, viszont a szubsztrát dUTP mellett az egyfunkciós dUTP-ázal ellentétben a dUDP nukleozidot is el tudják hidrolizálni, közel azonos katalitikus hatékonysággal. Mint pl. a *Leishmania major* dUDP/dUTP-áza, ahol a k_{cat}/K_M értékek a dUTP szubsztrát esetében $2,3 \times 10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$, míg a dUDP-re $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ –nak adódott [138], vagy a *Campylobacter jejuni* esetében, ahol a dUTP hidrolízise $18,6 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$ míg a dUDP katalitikus hatékonysága $3,5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ –nak bizonyult [139]. Ezeket a fehérjeszerkezeteket megvizsgáltuk és jól látható, hogy a kötött dUTP γ -foszfátját egyedül csak vízmolekulák koordinálják és az oldószernek kitett állapotban van (37. ábra).



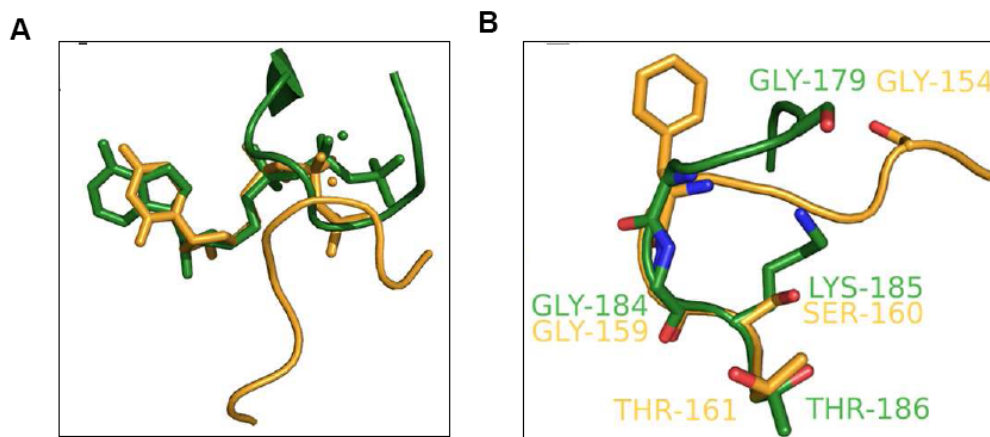
37. ábra A *Campylobacter jejuni* dUDP/dUTPáz (PDB 2C1C) aktívhelye

Míg a szubsztrát dUPNPP β -foszfátja több kölcsönhatást is kialakít a fehérjével, addig a γ -foszfátot csak víz molekulák koordinálják (piros gömbmodellel jelölve). A H-kötéseket szaggatott kék vonalak jelölik. Ábra forrása: Pecsí et al, bírálat alatt a PNAS-nél. Ábrát készítette: Szabó Judit Eszter.

Így tehát a kétfunkciós enzim esetében a szubsztrát β -foszfátja az, ami közvetlen kölcsönhatást alakít ki a megfelelő aminosav-oldalláncokkal és a Mg^{2+} kofaktorral (5A. ábra a [140] cikkben), ellentétben az egyfunkciós dUTP-ázal, ahol ez a kölcsönhatás a szubsztrát γ -foszfátja és a P-loop-szerű hurok motívum között alakul ki. Továbbá szekvencia illesztésekből kiderült, hogy a kétfunkciós dUDP/dUTPáz enzim nem rendelkezik P-loop-szerű hurok

motívummal (vagy ehhez hasonló és a γ -foszfátot koordináló szerkezeti struktúrával), ami megerősíti feltételezésünket, miszerint a dUTPázban a dUDP és a dUTP nukleotidok megkülönböztetéséért a P-loop-szerű hurok szekvencia a felelős.

Abban az esetben, amikor a dUTPáz az ATP kötő fehérjével (pl. miozin) hasonlítottuk össze megfigyelhető volt, hogy míg az ATPázokban a P-hurok motívum és a nukleotid foszfátlánca tökéletesen egymásra illeszthetők (5-ös ábra a [68]-as cikkben), addig a dUTPáznál a P-loop-szerű hurok szekvencia a szubsztrát nukleotidhoz képest eltérő konformációt vesz fel (38A. Ábra).



38. ábra. A P-hurokkal rendelkező miozin és a P-loop-szerű hurok motívummal rendelkező dUTPáz szerkezeti összehasonlítása

(A) dUTPáz (narancssárga PDB 2HQU)P-hurokszerű és a *Dictyostelium discoideum* II-es miozin (zöld PDB IMMN) P-hurok motívumok elhelyezkedésének összehasonlítása. A dUPNPP és az ATP szubsztrátokat pálcikamodell ábrázolja, a Mg^{2+} iont gömbmodell. (B) A dUTPáz (narancssárga) és a *D. d.* II-es miozin (zöld) hurok struktúrák illesztése, a Walker A motívumban található konzervált aminosavakat pálcikamodell szemlélteti. Ábra forrása: Pecsí et al, bírálat alatt a PNAS-nél. Ábrákat készítette: Szabó Judit Eszter.

A két szerkezet összeillesztéséből ugyanakkor jól látszik, hogy van szerkezeti hasonlóság a két motívum konformációja között, különösen annál az aminosavnál (Ser-160) amely a szekvenciális különbséget eredményezi a konszenzus P-hurok és a dUTPáz P-loop-szerű hurok szekvenciák között (38B. ábra). A fő különbség a miozinok és a dUTPázok konformációja között a P-hurok motívumot illetően az, hogy míg a miozinoknál a P-hurok körbeveszi mindkét foszfátot (β és γ), addig a dUTPáz esetében a P-loop-szerű hurok struktúra kizárólag a γ foszfáttal alakít ki kölcsönhatást (22 és 38A. ábra). Ez a különbség feltehetőleg a dUTPáz P-loop-szerű hurok motívumának elhelyezkedésével hozható összefüggésbe. Amíg a miozinoknál a P-hurok többnyire a fehérje magjában foglal helyet, addig a dUTázoknál a C-terminálison található, ahol szubsztrátjával (dUTP) egy fedő („eclipsed”) dUTP-kötött konformációt alakítanak ki. Mindezen konformációs tulajdonságok

is megerősítik hipotézisünket, miszerint a dUTPázok P-loop-szerű hurok motívumának szerepe a dUDP és a dUTP ligandumok közötti γ foszfát megkülönböztetésében keresendő.

A Walker-A szekvencia az irodalomban úgy ismeretes, mint a β - γ közötti kötés hasításához szükséges szerkezeti elem, egyetlen kivételnek látszik ez alól a dUTPáz, ahol az α - β közötti hasításhoz szükséges. A nukleotid pirofoszfátok di- és trifoszfát ligandumaik megkülönböztetését általában kapcsolt reakciók révén, avagy egy szerkezeti elem segítségével valósítják meg. A mai dUTPázok esetében, ilyen szerkezeti elemnek tekinthető a P-loop-szerű hurok szekvencia, amit feltételezhetően evolúciós adaptációval szerzett meg az enzim, valószínűleg a hatékony uracil-specifikus DNS javító rendszerek egyidejű megjelenésével. Ezáltal egy hatékony dUTP hidrolízist biztosító dUTPáz enzim jött létre, amely katalízise révén a DNS integritásának megőrzésében nélkülözhetetlen szerepet tölt be.

Dolgozatom 4.4. fejezetében a dUTPáz enzim fiziológiai szerepének tükrében az apoptotikus útvonal és az autofág gének kapcsolatát vettük vizsgálat alá. A dUTPáz RNAi-vel csendesített *C. elegans* hermafrodita embriókban egyértelműen megfigyelhetőek voltak az autofágia folyamatára utaló súlyos morfológiai rendellenességek. Ennek következtében 3 GFP-vel jelölt autofág gén expressziós mintázatát vizsgáltuk meg a dUTPázra csendesített és a vad típusú nematodákban. Azt találtuk, hogy e gének (*bec-1*, *lgg-1* és *atg-18*) a dUTPáz megvonására felülszabályozódnak. Az Erdélyi *et. al* publikációban munkatársaink továbbá azt is kimutatták, hogy a három autofág gén felülszabályozódása az 5-FU-lal történt kezelés vagy a *dut* gén csendesítését eredményező dUTPáz aktivitás csökkenés hatására is bekövetkezik. [121]. Ezt követően ezen autofág gének szabályozó régióinak a szekvencia elemzéseiből kiderült, hogy a *bec-1* és az *lgg-1* promóterekben CES-2/ATF-2 kötőhelyek vannak. Ezek a fehérjék az apoptotikus útvonal *upstream* szabályozó faktorai [126]. EMSA vizsgálatokkal *in vitro* kimutattuk, hogy ezek a fehérjék kötődnek *bec-1* és az *lgg-1* promóterekhez. Következtetésként elmondhatjuk, hogy az autofág gének és az apoptotikus útvonal egymást kiegészítve szabályozhatják a *C. elegans* korai egyedfejlődését [121]. Ebben a szabályozásban a dUTPáznak és a timidin anyagcserére ható molekuláknak mediátor szerepet tulajdoníthatunk, ami a megfelelő sejtbeli dUTP:dTTP arány biztosítása révén valósul meg.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeinket a 2. fejezetben (CÉLKITŰZÉSEK) korábban megfogalmazott kérdések alapján foglaltam össze.

1. Bebizonyítottuk, hogy a dUTPáz gén kiütése letális a *M. smegmatis*-ban. Annak maradéktalan igazolására, hogy kizárólag az operonikus egységen belül a *dut* gén létfontosságú a *M. smegmatis* számára, egy további „switching” módszer alkalmazásával is meggyőződünk. Szekvencia összehasonlítási vizsgálatokkal kimutattuk, hogy nemcsak a *M. smegmatis* és a *M. tuberculosis*, hanem más patogén mikobaktériumok (*M. ulcerans*, *M. bovis* és *M. leprae*) is nagyfokú hasonlósággal (94%) kódolják a dUTPáz genomjukban és a timidin bioszintézisben szereplő többi enzimek között is nagyfokú hasonlóság áll fenn.

2. Különböző fajokból származó dUTPázok C-terminális szekvenciáinak illesztése egy kizárólag mikobaktériumokban megtalálható öt aminosavból (AGLAS) álló szekvencia motívumot eredményezett. Kimutattuk, hogy ez a mikobaktérium-specifikus szerkezeti motívum a *M. smegmatis in vivo* növekedéséhez nélkülözhetetlen.

3. A mikobaktérium-specifikus rövid szekvencia egy hurok konformáció kialakításáért felelős, amely a fehérje felszínén helyezkedik el. Az enzimaktivitási és szubsztrátkötési kísérletek szerint ennek a huroknak a deléciója nem okoz szignifikáns változást a vad típushoz képest az enzimikus funkcióban.

4. Kimutattuk, hogy a dUTPázok aktív helyén található uracillal átlapoló aromás aminosav konzervált. A mikobakteriális (mtDUT^{H145W}) kristályszerkezet is ennek az aromás kölcsönhatásnak a konzerváltságát tükrözte. Az aromás kölcsönhatás megszüntetése 20-szoros enzimaktivitás csökkenést eredményezett, míg a szubsztrátkötést kismértékben befolyásolta (3-szoros csökkenés). Stopped-flow és quench-flow módszerekkel igazoltuk, hogy a mutáns hDUT^{F158A} csökkent aktivitásáért a hidrolízis lépés lelassulása a felelős. A dUTPáz általi katalízis többnyire az átmeneti állapotban a szubsztráttal alkotott elektrosztatikus kölcsönhatása révén valósulhat meg, amelyhez az enzim és a szubsztrát között kialakult π - π kölcsönhatás hozzájárul [135].

5. A másodlagos kölcsönhatások megszüntetése a P-loop-szerű hurok motívum és a szubsztrát γ -foszfátja között csökkentette az enzim-szubsztrát komplexben a katalitikusan kompetens konformáció kialakulásának valószínűségét. Steady-state aktivitásméréseink igazolták, hogy a hidrolízis mindegyik mutánsban megtörténik az okozott beavatkozás mértékének függvényében. A P-loop-szerű hurok motívum eltávolítása a vad típusú humán dUTPázhoz képest 720-szoros katalitikus hatékonyság csökkenést eredményezett. Ez azt jelzi,

hogy a di-és a tri-foszfát nukleotidok megkülönböztetése a γ -foszfát és a P-loop-szerű hurok motívum között kialakult kölcsönhatás révén következik be. Mivel az enzim.dUDP.Be.F_x komplexben nem detektáltunk hidrolízist, feltételezzük, hogy a γ -foszfát és a nukleotid többi része között kialakuló foszforanhidrid kötés szükségeltetik ahhoz, hogy a P-loop-szerű hurok motívum hatása a hidrolízis helyén, az α -foszfáton érvényesüljön. Kimutattuk, hogy a P-loop-szerű hurok motívum a katalízis hatékonyságát nagymértékben növeli és a dUDP, dUTP ligandumok megkülönböztetését a szubsztrát γ -foszfátjának koordinációján keresztül valósítja meg a dUTPáz. Más nukleotid hidrolázokkal történt összehasonlítások eredményeképpen feltételezhető, hogy a dUTPáz P-loop-szerű hurok motívumát funkcionális adaptációval szerezte meg az enzim, a DNS hibajavító rendszerek egyidejű tökéletesedésével.

6. DNS-fehérje kötési vizsgálatokkal *in vitro* kimutattuk, hogy az ATF-2 fehérje specifikusan kötődik a *bec-1* és az *lgg-1* promóterekhez. Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy az autofág gének és az apoptotikus útvonal egymást kiegészítve szabályozhatják a *C. elegans* korai egyedfejlődését. A sejtbeli dUTPáz aktivitás csökkenése és a timidin anyagcserére ható metabolitok ezt a kettős élet-halál választ hatékonyan képesek kiváltani.

7. SUMMARY

In the first part of my thesis we provided formal genetic proof of dUTPase essentiality for the first time *in vivo* in *M. smegmatis*. The sequence comparison of the C-termini of dUTPases from widely different species exposes an insert that distinguishes mycobacterial dUTPases from the human and other homologs. We also proved that this mycobacteria-specific motif is essential for growth in *M. smegmatis*. We showed that this insert has only subtle contribution to the enzymatic activity of dUTPase. Sequence comparisons of the mycobacterial dUTPases and the other enzymes of thymidylate synthesis indicates that mycobacteria share a common dTTP biosynthetic route and that our findings in *M. smegmatis* may be applied to other, pathogenic mycobacterial species.

In the second part of my thesis, yet unknown structural and functional characteristics of the C-terminal conserved motif of dUTPase (human and mycobacterial) were investigated. We found that: *i*) the geometry of the face-to face offset stacking interaction between the substrate nucleotide and dUTPase is conserved; *ii*) the aromatic residue involved in this interaction is interchangeable with another aromatic residue; *iii*) loss of the π - π interaction does not affect the ground state active-site conformation in the alanine mutant; *iv*) a significant 20-30- fold decrease was observed in the rate constant of the chemical step. The catalytic efficacy of dUTPase is mostly due to long-range electrostatic stabilization of the transition state. dUTPases can discriminate between the substrate dUTP and the inhibitor dUDP, despite the fact that the scissile bond between the α - β phosphates is present on both ligands. To gain insight into the mechanism of discrimination potentially related to the P-loop-like sequence, we designed mutants which fully or partially lost contact between the γ -P of the substrate nucleotide and the P-loop-like sequence. We found that the P-loop-like motif of dUTPase promotes catalysis and discriminates against dUDP at the same time. We demonstrated that the unique use of a P-loop-like nucleotide binding sequence in dUTPase among nucleotide pyrophosphatases is functional adaptation to high dUTP specificity likely related to the development of uracil-DNA repair systems.

In the third part of my thesis, we have demonstrated that the ATF-2 protein specifically binds to the *bec-1* and *lgg-1* promoter regions *in vitro*. As a summary we can presume that the *bec-1* and *lgg-1* autophagy-related genes together with the apoptotic pathway coregulate the early stage of *C. elegans* development. The role of dUTPase in this machinery might be a mediator between stresses and autophagy through its indispensable catalytic activity.

8.TÁBLÁZATOK

1.táblázat

A *M. tuberculosis* és humán dUTPázok kivánt pontmutációjához tervezett primer szekvenciák.

| dUTPáz enzimek | Mutáció | Primer szekvenciák |
|--|--------------|--------------------------------------|
| <i>M.tuberculosis</i> (mtDUT ^{H145A}) | H145A f | 5'-ggcgacggtggcgcggttcctccggc-3' |
| | H145A r | 5'-ggcggaggaacccgcgccaccctgcc-3' |
| <i>M.tuberculosis</i> (mtDUT ^{Δ-loop}) | A133-S137 f | 5'-cgtcgctcgacgagacatcccgcggcgac-3' |
| | A133-S137 r | 5'-gtcgcgcgggatgtctcgtcgaacgacg-3' |
| <i>H. sapiens</i> (hDUT ^{F158A}) | F158A f | 5'-ggggttcaggaggtgctggttcactgg-3' |
| | F158A r | 5'-ccagtggaaccagcacctcctgaacccc-3' |
| <i>H. sapiens</i> (hDUT ^{amless}) | T151 Stop f | 5'-gccttgatgactaggaagggttcaggagg-3' |
| | T151 Stop r | 5'-cctcctgaacccttctctagtcaccaaggc-3' |
| <i>H. sapiens</i> (hDUT ^{ST/AA}) | S160T161AA f | 5'-ggaggttttggtgccgctgaaagaattaa-3' |
| | S160T161AA r | 5'-ttaattttccagcggcaccacaaacctcc-3' |
| <i>H. sapiens</i> (hDUT ^{R/K}) | R153K f | 5'-atgacaccgaaagggttcaggagg-3' |
| | R153K r | 5'-cctcctgaaccctttcgggtgcat-3' |

A pontmutációk elnevezésében olvasható „f” betű a néma szálhoz tapadó primert, míg az „r” betű a vezető szálhoz tapadó primert jelenti. Az aminosavak egybetűs kódjával és helyének számszerű megjelölésével tüntettem fel a sikeres mutagenézist eredményező aminosavak cseréjét, a stop kodon bevitelét, valamint a loop szerkezet kialakításáért felelős 5 aminosav (AGLAS) delécióját.

2.táblázat

A *M. smegmatis* és *M. tuberculosis* fajok timidilát metabolizmus útvonalában szereplő enzimek közötti hasonlóság mértékének meghatározása Blast-p analízissel

| Enzimek | Azonosság ¹ (%) | Hasonlóság ² (%) |
|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Dezoxi-citidin-trifoszfát-deamináz | 87 | 95 |
| dUTPáz | 85 | 94 |
| Nucleozid-difoszfát-kináz | 80 | 88 |
| Timidilát-kináz | 64 | 71 |
| Timidilát-szintáz (thyA) | 87 | 92 |
| Timidilát-szintáz (thyX) | 86 | 92 |

1= 100%-ban azonos aminosavak;

2= aminosavak oldalláncainak kémiai tulajdonságai alapján történt osztályozása (pl.póláros vs.apóláros);

3. táblázat

A *dut* deléciós mutáns és a vad típus *M. smegmatis* sejtvonalakba a pSM128 plazmid elektroporálását eredményező transzformációs hatékonyságok

| Sejtvonalak | Antibiotikumok | Transzformációs hatékonyság |
|---|----------------|-----------------------------|
| <i>Dut</i> deléciós mutáns ¹ | Hyg / Gm | 6.75×10^5 |
| | Hyg / Sm | 4×10^1 |
| | Hyg / Gm / Sm | 7×10^1 |
| Vad típus ² | Gm | 4.54×10^5 |
| | Sm | 1×10^4 |
| | Gm / Sm | 3×10^1 |

1= *dut* kromozómális kópia törölve, *dut* funkcionális kópia hely specifikusan a genomba integrálódott;
2= funkcionális *dut* gént a pGem-*dut* vektoron egy WT *M. smegmatis* sejtvonalba elektroporáltam;

4. táblázat

A WT és a Δ -loop mutáns dUTPáz kinetikai paramétereit, valamint a dUTPáz-dUPNPP komplexek disszociációs állandóit

| | | WT | Δ -loop |
|------------------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Aktivitás | k_{cat} (s^{-1}) | 1.22 ± 0.06 | 0.88 ± 0.02 |
| | K_M (μM) | 0.9 ± 0.5 | 1.1 ± 0.2 |
| Fluorimetriás titrálás | A_{max} (%) | -72 ± 2 | -46 ± 1 |
| | K_d (μM) | 0.3 ± 0.1 | 3.3 ± 0.5 |
| Cirkuláris dikroizmus | K_d (μM) | 0.9 ± 0.5 | 3.9 ± 2.4 |

5. táblázat

A humán dUTPáz mutáns enzimek kinetikai és szubsztrátkötési paramétereit

| | k_{cat} (s^{-1}) | k_H (s^{-1}) | k_P (s^{-1}) |
|-----------------------|--------------------------------------|---|--|
| hDUT ^{WT} | 5.8 ± 0.5 | 8.0 ± 2 | |
| hDUT ^{F158W} | 6.8 ± 2^a | 5.5 ± 2.5^a | 6.5 ± 0.1^a |
| hDUT ^{F158A} | 0.32 ± 0.1 | 0.13 ± 0.01 | 0.25 ± 0.05 |
| | K_M (μM) | $K_{d,\text{dUPNPP}}$ (μM) | k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) |
| hDUT ^{WT} | 1.0 ± 0.4 | 2.0 ± 1 | $5.8 \cdot 10^6$ |
| hDUT ^{F158W} | 3.6 ± 2^a | 1.5 ± 1 | $1.9 \cdot 10^6$ |
| hDUT ^{F158A} | 5.2 ± 0.4 | 4.8 ± 2 | $6.2 \cdot 10^4$ |

k_H : hidrolízis lépés sebességi állandója.

k_P : protonfelszabadulás sebességi állandója.

A szórás hibák S.D. értékek három független mérés adataiból számolva.

^aToth *et al.* 2007 JBC [55].

6. táblázat

A WT és a P-loop-szerű hurok mutáns dUTPázok dUMP, dUDP és dUPNPP ligandumokkal alkotott komplexeinek disszociációs állandói triptofán fluoreszcencia vagy cirkuláris dikroizmus jeltitrálással meghatározva

| | K_d (μM) | | |
|---------------------------------|-------------------------|---------------|------------------------------|
| | dUMP | dUDP | dUPNPP |
| WT | 78 ± 4 | 12 ± 1 | 5.0 ± 3 3.4 ± 1^a |
| hDUT^{R/K} | 96 ± 14 | 12 ± 1 | 11 ± 4 10 ± 4^a |
| hDUT^{ST/AA} | 74 ± 6 | 5.6 ± 0.6 | 6.5 ± 1 6.8 ± 3^a |
| hDUT^{karmentes} | ND | 9.5 ± 3^a | 14 ± 0.4^a |

^a: differenciális CD spektroszkópiával kapott érték.

ND: nincs meghatározva.

7. táblázat

A WT és a P-loop-szerű hurok mutáns humán dUTPázok kinetikai paramétereit

| | V_{\max} (s^{-1}) | K_M (μM) | k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) | k_H (s^{-1}) | $k_{\text{dUTP, on}}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) | $k_{\text{dUTP, off}}$ (s^{-1}) | k_{ISO} (s^{-1}) |
|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--|------------------------------|--|---|---|
| WT | 6.5 ± 0.2 | 1.3 ± 0.5 | 5.0×10^6 | 5.5 ± 3^a | 120^a | 100^a | 24 ± 6 |
| hDUT^{R/K} | 0.078 ± 0.002 | 6.1 ± 1.7 | 1.3×10^4 | 0.048 ± 0.001 | ND | ND | ND |
| hDUT^{ST/AA} | 0.26 ± 0.1 | 12 ± 2 | 2.2×10^5 | 0.16 ± 0.01 | 84 ± 8 | 250 ± 40 | 29 ± 5 |
| hDUT^{karmentes} | 0.010 ± 0.0007 | ND | 7.1×10^3 _b | 0.014 ± 0.0004 | NA | NA | NA |

^a: Toth *et al.* 2007, JBC cikkben közölt adatok [55].

^b: a hDUT^{karmentes}.dUPNPP komplex K_d állandója van bemutatva a K_M érték helyett.

ND: nincs meghatározva.

NA: az alkalmazott módszerrel nem határozható meg.

9. MELLÉKLET

A dUTPázok aromás oldallánc konzerváltságát tükröző (nyílal jelölve), első 500 különböző fajból származó aminosav szekvenciáinak ClustalW programmal végzett összehasonlítása.

↓

```

gi|123499943|sp|Q2IQ00.1|DUT_A      LELV-----DALTD---SDRGAGGFGSTGQ----- 147
gi|166217603|sp|A7H9F9.1|DUT_A      LALV-----EDLAS---SGRGGGFGSTGR----- 147
gi|81558746|sp|Q5LWD3.1|DUT_SI      FELT-----BALGE---TERGAGGFSTGRG----- 151
gi|91206610|sp|Q3J0B2.1|DUT_RH      FELA-----DGLGA---TARGAGGFSTGTA----- 155
gi|123172796|sp|Q16AZ3.1|DUT_R      FELS-----DSLSE---DRSGGGFGSTGGD----- 152
gi|56404355|sp|Q6AJZ0.1|DUT_DE      WTVV-----TELEA---TERGAGGFGHTGV----- 150
gi|32171381|sp|Q8A245.1|DUT_BA      WQEV-----EVLDE---TERGAGGFGHTGRG----- 144
gi|56404345|sp|Q64ZK3.1|DUT_BA      WKEV-----EVLDE---TERGAGGFGHTGRG----- 144
gi|166217605|sp|A6L083.1|DUT_B      WQEV-----EVLDE---TERGAGGFGHTGKK----- 144
gi|189027737|sp|A5FL22.1|DUT_F      WIEV-----EELSE---TSRGEFFGHTGVK----- 144
gi|46576247|sp|Q7MVT6.1|DUT_PO      WVLT-----DELAD---TERGAGGFGHTGKE----- 144
gi|123059092|sp|Q11253.1|DUT_C      FVEV-----EELSD---SLRAAGFGSTGK----- 154
gi|22095587|sp|Q8RER7.1|DUT_FU      FVEV-----EELSD---TERGSGFGHTGK----- 146
gi|48427870|sp|P61912.1|DUT_TR      FLQK-----DELSN---TERGAGGYGSTGIA----- 144
gi|6015041|sp|Q83855.1|DUT_TRE      YVRS-----GSISL---TERKGGYGSTGVL----- 146
gi|33301048|sp|Q823Q9.1|DUT_CH      FIVVDQ-----EEGLTA---TSRGRGFGHTGEK----- 147
gi|81312861|sp|Q5L608.1|DUT_CH      FIADVQ-----EEGLT---TSRGRGFGHTGEK----- 147
gi|7674011|sp|Q9Z9C2.1|DUT_CHL      FVVK-----QESLAE---TARSGGFGHTGAS----- 145
gi|7674008|sp|Q84294.1|DUT_CHL      FVET-----QEELTA---TARGTGGFGHTGEC----- 145
gi|13878477|sp|Q9PKA2.2|DUT_CH      FVET-----QEELTA---TARGTGGFGHTGEC----- 145
gi|56404375|sp|Q6MEK7.1|DUT_PA      FVLS-----EELSE---TQRVGGFGHTG----- 150
gi|3913521|sp|Q66592.1|DUT_AQU      VVEV-----EVSQ---TQRGGGFGSTGTK----- 150
gi|48427864|sp|P61906.1|DUT_BD      FELV-----NELSD---TERGAGGFSTGRA----- 149
gi|59802556|sp|Q9X3X5.3|DUT_ZY      FCEVTD-----LDD---TQRHNGFGSTGI----- 146
gi|166218229|sp|A5VG00.1|DUT_S      FAEVSD-----LDE---TARGAGGFSTGR----- 149
gi|22095601|sp|Q9A253.1|DUT_CA      LVEVED-----LDA---TERGAGGFSTGV----- 155
gi|166217608|sp|A4YJH3.1|DUT_B      LAITTT-----LSE---TARGSGGFGSTGR----- 152
gi|166217607|sp|A5E891.1|DUT_B      LSITTT-----LSA---TARGSGGFGSTGR----- 152
gi|122477564|sp|Q21CD0.1|DUT_R      LTVAAAS-----LET---TERGSGGFGSTGR----- 152
gi|91206603|sp|Q3SWM9.1|DUT_NI      LVRAAA-----LPA---TPRSGGFGSTGR----- 152
gi|122418972|sp|Q1QS44.1|DUT_N      LARAAS-----LSA---TSRSGGFGSTGR----- 152
gi|123408923|sp|Q2J2H6.1|DUT_R      LISVET-----LSE---TARVGGFGSTGR----- 152
gi|123166747|sp|Q13EP1.1|DUT_R      LIGVET-----LSE---TARVGGFGSTGR----- 152
gi|48427869|sp|P61911.1|DUT_RH      FVAVEA-----LPE---SGRAGGFSTGR----- 152
gi|30178601|sp|O52597.2|DUT_BR      LVPVAT-----LSA---DRGAGGFSTGR----- 152
gi|189027742|sp|A7HZC0.1|DUT_P      FEEVET-----LDE---TARGAGGFSTGTGR----- 155
gi|172048045|sp|A8IPW5.1|DUT_A      LVETGN-----LGE---TARVGGFGSTGLDRT----- 157
gi|81556891|sp|Q5FN20.1|DUT_GL      WTEVET-----LDE---TARGGGFGSTGH----- 151
gi|166918315|sp|A5FZ98.1|DUT_A      WQETDD-----LDR---TARAGGFSTGLDFPMGN----- 154
gi|48427871|sp|P61913.1|DUT_WO      WDDRBE-----FCAEE---TGRNAGFGSSGR----- 153
gi|75497916|sp|Q5GST1.1|DUT_WO      WDDAER-----LCTEE---TERSAAGFGSSGR----- 156
gi|226740132|sp|B3CL69.1|DUT_W      WNNIEE-----FYAKE---TARNEGGFGSSGR----- 153
gi|81599136|sp|Q5PAE6.1|DUT_AN      WEEVNV-----SITA---TSRGGGFGSTGT----- 147
gi|123513279|sp|Q2KDD4.1|DUT_R      VTEIAA-----ASE---TARGAGGFSTGV----- 156
gi|166218216|sp|Q1MMG6.1|DUT_R      VAEITE-----ASE---TMRGAGGFSTGV----- 156
gi|22095591|sp|Q8UI11.1|DUT_AG      VSEVTE-----TSE---TARGAGGFSTGV----- 156
gi|22095598|sp|Q92SM6.1|DUT_RH      IREAGG-----ATT---TARGAGGFSTGT----- 160
gi|166218228|sp|A6UDF9.1|DUT_S      IREADG-----AST---TARGGGFGSTGLS----- 160
gi|54037009|sp|P64005.1|DUT_BR      IBERAK-----ISE---TARGAGGFSTGTA----- 157
gi|22095600|sp|Q98C10.1|DUT_RH      VEERSL-----AGG---TARGSGGFGSTGT----- 161
gi|56404367|sp|Q6G202.1|DUT_BA      VCALEP-----QQNES---TKNTVGN---RGAGGFSTGHD----- 184
gi|56404366|sp|Q6FYR2.1|DUT_BA      VCAIEP-----DQKDSSTPSNEGS---RGADFGSTGHD----- 185
gi|166217606|sp|A1URB3.1|DUT_B      VRLLDPNSDLTSSQTDLSNQPN---TGRGTGGFGSTGK----- 177
gi|91206595|sp|Q3AQ75.1|DUT_CH      FEEVAE-----LSA---TVRGGGFGHTGIASVQ----- 149
gi|166217616|sp|A1BEP9.1|DUT_C      FDEVLIT-----LAS---SSRADGGFGHTGIAGNPESKA----- 153
gi|91206605|sp|Q3B304.1|DUT_PE      FVEVDT-----LGD---TERGEGFGHTGMCQG----- 148
gi|189027744|sp|A4SFI9.1|DUT_P      FEEVSE-----LGE---TVRGDGGFGHTGTVRS----- 148
gi|22654230|sp|O68992.2|DUT_CH      FEEVES-----LSE---TARGGGFGHTGVQAKAECL----- 152
gi|91206604|sp|Q3A499.1|DUT_PE      LETVVE-----LDE---DRNEGGFGHTGF----- 147
gi|48427866|sp|P61908.1|DUT_GE      LLDVDE-----LDE---TARGDGGFGHTGR----- 149
gi|91206600|sp|Q39V99.1|DUT_GE      LVEVDE-----LDE---TARGGGFGHTGR----- 148
gi|123517494|sp|Q2LWT5.1|DUT_S      WSESGS-----LET---TTRDGGFGHTDES----- 150
gi|22095597|sp|Q92I74.1|DUT_RI      WEESIS-----LME---TMRSGGFGSTGV----- 148
gi|166218220|sp|A8GRY1.1|DUT_R      WEESIS-----LME---TMRSGGFGSTGV----- 148
gi|166918329|sp|A8FH0.1|DUT_R      WEESSS-----LME---TMRSGGFGSTGV----- 148
gi|75536552|sp|Q4ULV2.1|DUT_RI      WEESSS-----LTE---TMRSGGFGSTGV----- 148
gi|166218217|sp|A8GNB1.1|DUT_R      WEESSI-----LTE---TMRSGGFGSTGV----- 148
gi|166218219|sp|A8EZ30.1|DUT_R      WKESNT-----LEE---TVRSGGFGSTGV----- 148
gi|122425921|sp|Q1RJQ1.1|DUT_R      WKESET-----LEE---TARGSGGFGSTGVYL----- 150
gi|56404349|sp|Q68WX8.1|DUT_RI      WAETSII-----LTE---TMRGGFGSTGL----- 148
gi|7674012|sp|Q92DD2.1|DUT_RIC      WAETSII-----LTE---TMRGGFGSTGL----- 148
gi|166918327|sp|A5CD09.1|DUT_O      WELVDD-----LDE---TERCKNGFGSSGLK----- 148
gi|122314872|sp|Q0AK44.1|DUT_M      WEIADT-----LDE---TTRGTGGFGSTGT----- 152
gi|122318486|sp|Q0AYH7.1|DUT_S      FMEVKS-----LDE---TLRAGGFGHTGI----- 145
gi|91206599|sp|Q3YRU2.1|DUT_EH      WNLVKD-----LDD---TTRKRDQGFSTGI----- 153
gi|22095584|sp|Q8RA46.1|DUT_TH      IIEVEE-----LSE---TERMDRFGHTGV----- 148
gi|45593161|sp|Q8NPA9.1|DUT_CO      FEEV-----EELDDTVRGDQGYGSTGK---TA----- 149
gi|166217617|sp|A4QER2.1|DUT_C      FEEV-----EELDDTVRGDQGYGSTGK---TA----- 149
gi|48427890|sp|Q8FPH9.1|DUT_CO      FVEV-----DELDETRGDQGHGSTGRGSA----- 181
gi|48427865|sp|P61907.1|DUT_CO      FCEV-----ETLSETERGVNGYGSTGVN----- 152
gi|91206597|sp|Q4JVB1.1|DUT_CO      VEEVNV-----SVBELGVTVRGEGSYGSTGV----- 155
gi|166217628|sp|A0QW08.1|DUT_M      LVEVTSF-----DEAGLADTTRGDGGHSSGGHASL----- 154
gi|166217629|sp|A3PYI9.1|DUT_M      LVEVTSF-----DEAGLAETTRGEGGHSSGGHASL----- 154
gi|166217633|sp|A1T7Y0.1|DUT_M      LVEVTSF-----DEAGLADTTRGDGGHSSGGHASL----- 154
gi|189027740|sp|A4TCR4.1|DUT_M      LVEVTSF-----DEAGLADTTRGDGGYSSGGHASL----- 154

```




| | | |
|---------------------------------|--|-----|
| gi 48427896 sp Q9F7S4.1 DUT_PR | FEIV-----DEF-NETQRQEKGFSSGIN----- | 139 |
| gi 32129500 sp Q87F19.1 DUT_XY | LQVV-----DTF-VESGRGAGGFHGHTGVR----- | 155 |
| gi 22095605 sp Q9PGZ6.1 DUT_XY | LQVV-----DTF-VESGRGAGGFHGHTGVR----- | 155 |
| gi 75436948 sp Q5H5L9.1 DUT_XA | LQVV-----DTF-VDSARGAGGFHGHTGVR----- | 155 |
| gi 123523354 sp Q2P8A8.1 DUT_X | LQVV-----DTF-VDSARGAGGFHGHTGVR----- | 155 |
| gi 48474235 sp Q8PFR5.1 DUT_XA | LQVV-----DTF-VDSARGAGGFHGHTGVR----- | 155 |
| gi 48474736 sp Q8P458.1 DUT_XA | LQVV-----DTF-VDSARGAGGFHGHTGVR----- | 152 |
| gi 171769517 sp A1WZE9.1 DUT_H | LDYV-----SAFSATTEREGGGFGHSGTL----- | 153 |
| gi 122482386 sp Q24UJ8.1 DUT_D | FYLA-----DQL-DETRGCGGFGSTGVS----- | 151 |
| gi 1226740094 sp B7KFZ3.1 DUT_C | VEEVD-----HLSDTTRGSGGFGSTGLTSD----- | 145 |
| gi 1226697989 sp B1WN93.1 DUT_C | IQEVE-----QLSDTIRQQGGFGSTGV----- | 142 |
| gi 3913543 sp Q30931.1 DUT_CLO | IEEVK-----ELSDSERKGGFGSTGF----- | 143 |
| gi 22095599 sp Q97J61.1 DUT_CL | VEEVK-----ELSSSDRGTGGFGSTGLKK----- | 145 |
| gi 166918316 sp A6TLM6.1 DUT_A | ILEVD-----ELSDTQRAREGGFGSTGVK----- | 144 |
| gi 32171379 sp Q895R1.1 DUT_CL | IEEVK-----MLSESQRKGGFGSTGV----- | 145 |
| gi 189027734 sp A0QIN5.1 DUT_C | VEEVV-----ELTETTRGNGFGSTGV----- | 142 |
| gi 122964907 sp Q113K0.1 DUT_T | VEEVT-----QLSTQRDINGFGSTGT----- | 142 |
| gi 189027729 sp B0C9N7.1 DUT_A | IEEVT-----ELSATQRGEGGFGSTGYA----- | 143 |
| gi 189027733 sp A5N7A5.1 DUT_C | IKEVV-----ELKDTEREGGGFGSTGMT----- | 143 |
| gi 122255901 sp Q02BZ2.1 DUT_S | WLEG-----SLADSTRGAGGFSSGR----- | 147 |
| gi 122980489 sp Q1CT07.1 DUT_H | FIEC-----EQLDETSRSGGFGSTGVSKA----- | 145 |
| gi 6225288 sp Q25536.1 DUT_HEL | FIEC-----EQLDETSRSGGFGSTGVSKA----- | 145 |
| gi 7531094 sp Q92KY3.1 DUT_HEL | FIEC-----EQLDETSRSGGFGSTGVSKA----- | 145 |
| gi 123173320 sp Q17WJ4.1 DUT_H | FIEC-----EQLDETSRSGGFGSTGVSKA----- | 145 |
| gi 46576243 sp Q7M9N1.1 DUT_WO | LCEV-----ESLDETAGAGGFSTGKS----- | 149 |
| gi 48427880 sp Q7VJU0.1 DUT_HE | FTEV-----QELQSVRGERFGSSGVARKGHYQKPL | 157 |
| gi 122280505 sp Q04QV4.1 DUT_L | WELVS-----EFTDTERGTGGFGSTGH----- | 145 |
| gi 48427867 sp P61909.1 DUT_LE | WELVS-----EFDARTERGANFGSTGH----- | 145 |
| gi 3041664 sp P33316.3 DUT_HUM | IEEVOA-----LDD---TERSGGFGSTGKN----- | 252 |
| gi 14916974 sp P70583.3 DUT_RA | LEEVQT-----LDN---TERSGGFGSTGKN----- | 205 |
| gi 139356 sp P14597.1 DUT_ORFN | VQEVNC-----LDN---TDRGDSGFGSTGSGACGGNDTAWY | 157 |
| gi 461972 sp P33826.1 DUT_VARV | LKEVQS-----LDS---TDRDQGFSTGLR----- | 147 |
| gi 56404391 sp Q77527.1 DUT_CA | LKEVQS-----LDS---TDRDQGFSTGLR----- | 147 |
| gi 56404380 sp Q6RZR1.1 DUT_RA | LEEVQS-----LDS---TDRDQGFSTGLR----- | 147 |
| gi 139358 sp P17374.1 DUT_VACC | LEEVQS-----LDS---TNRDQGFSTGLR----- | 144 |
| gi 56404389 sp Q76RE7.1 DUT_VA | LEEVQS-----LDS---TNRDQGFSTGLR----- | 147 |
| gi 56404338 sp P87630.1 DUT_CW | LEEVQS-----LDS---TDRGAQGFSTGLR----- | 147 |
| gi 18203102 sp Q9J5G5.1 DUT_FO | IEVVT-----LEEINI TDRGNSGFGSTGLK----- | 145 |
| gi 418297 sp P32208.1 DUT_SWPV | MEEVKC-----LED---TERGNSGFGSSGM----- | 142 |
| gi 56404329 sp Q6TUZ4.1 DUT_YM | IKELSN-----LDC---TCRDGCGFGSSGI----- | 143 |
| gi 7531092 sp Q89662.1 DUT_ADE | LSELTQ-----LGE---TDRGASGFGSTGMGAVDRNQRSVL | 170 |
| gi 7531093 sp Q9YYSO.1 DUT_ADE | LEERSG-----LDE---TARGAAGFGST--GGFDTG----- | 156 |
| gi 13124143 sp Q9FP6Q5.1 DUT_SC | VILVES-----LEA---TVRGANGFGSTGV----- | 140 |
| gi 56404376 sp Q6MVL2.1 DUT_NE | VVEVEQ-----LEE---SVRGAGGFSTGVGSGVGEQMKN----- | 165 |
| gi 74850663 sp Q54BW5.1 DUT_DI | PLEVDE-----IDE---TQRGAGGFSTGV-----KVQN----- | 179 |
| gi 416922 sp P32518.1 DUT_SOLL | VEQVDD-----LDS---TVRSGGFGSTGV----- | 169 |
| gi 3913545 sp Q41033.1 DUT_PBC | VAVVLE-----LED---TARGGGFGSTGI----- | 141 |
| gi 1169437 sp P43058.1 DUT_CAN | EISLEE-----LDN---TEREGGFGSTGKN----- | 159 |
| gi 56404357 sp Q6BRN7.1 DUT_DE | QITABE-----LDI---TAREGGFGSTGKN----- | 160 |
| gi 56404365 sp Q6FKQ6.1 DUT_CA | VVVVES-----LED---SQRGAGGFSTGK----- | 144 |
| gi 57013824 sp P33317.2 DUT_YE | IVVVDs-----LEE---SARGAGGFSTGKN----- | 147 |
| gi 56404359 sp Q6CQN7.1 DUT_KL | IVVVES-----LEE---TQRGAGGFSTGKN----- | 148 |
| gi 56404388 sp Q74ZF0.1 DUT_AS | VVVVES-----LDE---SSRGGGFGSTGKN----- | 153 |
| gi 56404358 sp Q6C141.1 DUT_YA | VVQTNd-----LES---TERGAGGFSTGINDKKRKLDEA | 153 |
| gi 56404362 sp Q6E4Q0.1 DUT_AN | LHEVSE-----LSD---TKRSGCGWSTGIS----- | 143 |
| gi 56404412 sp Q8SRs0.1 DUT_EN | IDLVES-----LDL---TERGCLGFGSTGMK----- | 144 |

10. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

10.1. A doktori értekezés témájához kapcsolódó közlemények

Referált tudományos folyóiratban megjelent közlemények:

1.) **Pécsi Ildikó**^{*}, Leveles I^{*}, Harmat V, Vertessy BG, Toth J.

„Aromatic stacking between nucleobase and enzyme promotes phosphate ester hydrolysis in *dUTPase* „ **Nucleic Acids Res.** 2010 Nov 1;38(20):7179-86. Epub 2010 Jul 2.

^{*} megosztott első szerzők

2.) Erdélyi P, Borsos E, Takács-Vellai K, Kovács T, Kovács AL, Sigmond T, Hargitai B, Pásztor L, Sengupta T, Dengg M, **Pécsi Ildikó**, Tóth J, Nilsen H, Vértessy BG, Vellai T.

„Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in *Caenorhabditis elegans*” **J Cell Sci.** 2011 May 1;124(Pt 9):1510-8.

Referált tudományos folyóiratban elbírálás alatt lévő közlemények:

1.) **Ildiko Pecs**i, Rita Hirmondo, Amanda C. Brown, Anna Lopata, Tanya Parish, Beata G. Vertessy and Judit Toth.

„The *dUTPase* enzyme is required for mycobacterial viability” **A Journal of Bacteriology**-ban elbírálás alatt

2.) **Ildiko Pecs**i^{*}, Judit E. Szabo^{*}, Scott Adams, Istvan Simon, James R. Sellers, Beata G. Vertessy and Judit Toth.

„Nucleotide pyrophosphatase employs a P-loop-like motif to enhance catalytic power and NDP/NTP discrimination „ **PNAS**-ben elbírálás alatt. ^{*} megosztott első szerzők

Konferencián tartott szóbeli előadás (előadó neve aláhúzva)

Pécsi Ildikó, Hirmondó Rita, Amanda C. Brown, Lopata Anna, Tanya Parish, Vértessy G. Beáta és Tóth Judit.

„A *dUTPáz* enzim fajspecifikus szerkezeti motívumának esszencialitása a *Mycobacterium smegmatis*-ban: új célmolekula azonosítása a tuberkulózis gyógyszerterápiában”

IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok. Siófok, 2011. március 25-27.

Konferenciákon tartott poszter előadások (előadó neve aláhúzva):

- 1.) I. Pecsi, R.Hirmondo, A. C. Brown, A. Lopata, T. Parish, V. G. Beata and J. Toth
P1017, *A genus-specific loop in dUTPase is essential for mycobacterial viability* ”
21st ECCMID 27th ICC (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious diseases
and International Congress of Chemotherapy) Milan, Italy 7-10 May 2011.

- 2.) Ildiko Pecsi, Rita Hirmondo , Amanda C.Brown, Anna Lopata, Tanya Parish, Beata G.
Vertessy and Judit Toth.
Pos-360: *“Proving the essentiality of dUTPase mediated by its mycobacterium-specific
structural motif identifies a novel TB drug target”*
Keystone Symposia, Mycobacteria: Physiology, Metabolism and Pathogenesis- Back to the
Basics; January 15-20, 2011 Vancouver, Canada.

- 3.) Ildiko Pecsi, Tanya Parish, Amanda C. Brown, Beata G. Vertessy and Judit Toth.
Pos-B245: *“Essentiality of dUTPase, a key enzyme in the thymidylate synthesis pathway in
mycobacteria”*
The EMBO meeting 2010 Barcelona 4-7 September.

- 4.) Ildiko Pecs, Judit E.Szabo, Beata G.Vertessy, Judit Toth;
2325-Pos: *“The role of P-loop in the enzymatic mechanism of nucleotide pyrophosphatases”*
Biophysical Society; February 2010 San Francisco, California.

- 5.) Judit Toth, Ildiko Pecs, and Beata G. Vertessy.
272.02-Pos *“The Role of γ -phosphate Binding in the Catalytic Mechanism of dUTPase”*
Biophys. J. 2008 94: 272-b. San Francisco, California.

- 6.) Judit Toth, Ildiko Pecs, Scott Adams, Beata G. Vertessy.
*“The role of P-loop in the mechanism of α - β phosphate; nucleotide hydrolysis catalyzed by
dUTPase”*
The International conference on Arginine and Pyrimidines 2008 London.

7.) Pecsi Ildiko, Borsos Eva, Takacs Krisztina, Vellai Tibor, Toth Judit and Vertessy G. Beata.

“*Study of the dUTPase enzyme function and mechanism in C. elegans model organism*”
Institute of Enzymology, BRC Budapest, Faculty of Science of Eotvos Lorand University,
Department of Genetics, Budapest, Hungary 2007.

További, a doktori értekezés témájához nem kapcsolódó, konferenciákon tartott poszter előadások (előadó neve aláhúzva):

1.) Pécsi Ildikó, Pósa Anikó, Berkó Anikó, Varga Csaba, László A. Ferenc, László Ferenc.
„*A különböző ösztrogén telítettségi állapotok hatása a hem-oxigenáz izoenzimek expressziójára és aktivitására a patkányok kardiovaszkuláris rendszerében*”
Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXX. Vándorgyűlése Szeged, 2006. június 7-9.

2.) László Ferenc, Pécsi Ildikó, Molnár Andor., Priger Petra, Pósa Anikó, Berkó Anikó, Horváth Krisztina, Varga Csaba, László Ferenc A.
„*A nitrogénmonoxid szintáz és hemoxigenáz enzim interakció szerepe a vaszkuláris endotélium integritásának szexuális dimorfizmusában*”
Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXX. Vándorgyűlése Szeged, 2006. június 7-9.

3.) Pécsi Ildikó, Pósa Anikó, Berkó Anikó, Varga Csaba, László A Ferenc, Kordás Krisztina, László Ferenc
„*Hem-oxigenáz izoenzim expresszió változások a kardiovaszkuláris rendszerben különböző ösztrogén telítettségi állapotokban*”
A Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság (MEAT) XXI. Kongresszusa Debrecen
2006 május 18-20.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Portugal, F. and J. Cohen, *A Century of DNA*. 1977: Cambridge, Mass: MIT Press.
2. Noller, H.F., *The driving force for molecular evolution of translation*. RNA, 2004. **10**(12): p. 1833-7.
3. Sousa, M.M., H.E. Krokan, and G. Slupphaug, *DNA-uracil and human pathology*. Mol Aspects Med, 2007. **28**(3-4): p. 276-306.
4. Dos Vultos, T., et al., *DNA repair in Mycobacterium tuberculosis revisited*. FEMS Microbiol Rev, 2009. **33**(3): p. 471-87.
5. Kurthkoti, K. and U. Varshney, *Detrimental effects of hypoxia-specific expression of uracil DNA glycosylase (Ung) in Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol. **192**(24): p. 6439-46.
6. Malshetty, V.S., et al., *Synergistic effects of UdgB and Ung in mutation prevention and protection against commonly encountered DNA damaging agents in Mycobacterium smegmatis*. Microbiology. **156**(Pt 3): p. 940-9.
7. Fiser, A. and B.G. Vertessy, *Altered subunit communication in subfamilies of trimeric dUTPases*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(2): p. 534-42.
8. Kovari, J., et al., *Altered active site flexibility and a structural metal-binding site in eukaryotic dUTPase: kinetic characterization, folding, and crystallographic studies of the homotrimeric Drosophila enzyme*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17932-44.
9. Nyman, P.O., *Introduction. dUTPases*. Curr Protein Pept Sci, 2001. **2**(4): p. 277-85.
10. Mustafi, D., et al., *Catalytic and structural role of the metal ion in dUTP pyrophosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5670-5.
11. Vertessy, B.G. and J. Toth, *Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases*. Acc Chem Res, 2009. **42**(1): p. 97-106.
12. Visnes, T., et al., *Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. **364**(1517): p. 563-8.
13. Lari, S.U., et al., *Quantitative determination of uracil residues in Escherichia coli DNA: Contribution of ung, dug, and dut genes to uracil avoidance*. DNA Repair (Amst), 2006. **5**(12): p. 1407-20.
14. Horvath, A. and B.G. Vertessy, *A one-step method for quantitative determination of uracil in DNA by real-time PCR*. Nucleic Acids Res. **38**(21): p. e196.
15. Seno, T., et al., *Thymineless death and genetic events in mammalian cells*. Basic Life Sci, 1985. **31**: p. 241-63.
16. Ahmad, S.I., S.H. Kirk, and A. Eisenstark, *Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes*. Annu Rev Microbiol, 1998. **52**: p. 591-625.
17. Dengg, M., et al., *Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates*. EMBO Rep, 2006. **7**(10): p. 1046-51.
18. Mizushima, N., et al., *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. Nature, 2008. **451**(7182): p. 1069-75.
19. Kroemer, G. and B. Levine, *Autophagic cell death: the story of a misnomer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(12): p. 1004-10.
20. Takacs-Vellai, K., A. Bayci, and T. Vellai, *Autophagy in neuronal cell loss: a road to death*. Bioessays, 2006. **28**(11): p. 1126-31.
21. Vellai, T., et al., *The regulation of aging: does autophagy underlie longevity?* Trends Cell Biol, 2009. **19**(10): p. 487-94.
22. Maiuri, M.C., et al., *Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 741-52.
23. Baldo, A.M. and M.A. McClure, *Evolution and horizontal transfer of dUTPase-encoding genes in viruses and their hosts*. J Virol, 1999. **73**(9): p. 7710-21.

24. Payne, S.L. and J.H. Elder, *The role of retroviral dUTPases in replication and virulence*. *Curr Protein Pept Sci*, 2001. **2**(4): p. 381-8.
25. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, *5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(5): p. 330-8.
26. Huennekens, F.M., *The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents*. *Adv Enzyme Regul*, 1994. **34**: p. 397-419.
27. Moertel, C.G., *Chemotherapy for colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 1994. **330**(16): p. 1136-42.
28. Whittingham, J.L., et al., *dUTPase as a platform for antimalarial drug design: structural basis for the selectivity of a class of nucleoside inhibitors*. *Structure*, 2005. **13**(2): p. 329-38.
29. Ladner, R.D., *The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy*. *Curr Protein Pept Sci*, 2001. **2**(4): p. 361-70.
30. Wilson, P.M., et al., *Novel opportunities for thymidylate metabolism as a therapeutic target*. *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(9): p. 3029-37.
31. Wilson, P.M., et al., *Regulation of human dUTPase gene expression and p53-mediated transcriptional repression in response to oxaliplatin-induced DNA damage*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(1): p. 78-95.
32. el-Hajj, H.H., H. Zhang, and B. Weiss, *Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1988. **170**(3): p. 1069-75.
33. Gadsden, M.H., et al., *dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 1993. **12**(11): p. 4425-31.
34. Guillet, M., P.A. Van Der Kemp, and S. Boiteux, *dUTPase activity is critical to maintain genetic stability in Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(7): p. 2056-66.
35. Sasseti, C.M., D.H. Boyd, and E.J. Rubin, *Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis*. *Mol Microbiol*, 2003. **48**(1): p. 77-84.
36. Chan, S., et al., *Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis dUTPase: insights into the catalytic mechanism*. *J Mol Biol*, 2004. **341**(2): p. 503-17.
37. Varga, B., et al., *Active site of mycobacterial dUTPase: structural characteristics and a built-in sensor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **373**(1): p. 8-13.
38. Takacs, E., et al., *Direct contacts between conserved motifs of different subunits provide major contribution to active site organization in human and mycobacterial dUTPases*. *FEBS Lett*. **584**(14): p. 3047-54.
39. Furlow, B., *Tuberculosis: a review and update*. *Radiol Technol*. **82**(1): p. 33-52.
40. Jagielski, T., E. Augustynowicz-Kopec, and Z. Zwolska, *[Epidemiology of tuberculosis: a global, European and Polish perspective]*. *Wiad Lek*. **63**(3): p. 230-46.
41. WHO, *Global Tuberculosis Control: World Health Organization*. 2010.
42. Chakraborty, A., *Drug-resistant tuberculosis: an insurmountable epidemic?* *Inflammopharmacology*.
43. Jassal, M. and W.R. Bishai, *Extensively drug-resistant tuberculosis*. *Lancet Infect Dis*, 2009. **9**(1): p. 19-30.
44. Harries, A.D. and C. Dye, *Tuberculosis*. *Ann Trop Med Parasitol*, 2006. **100**(5-6): p. 415-31.
45. Kaufmann, S.H., *Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box*. *Immunity*. **33**(4): p. 567-77.
46. Calmette, A., *Sur la vaccination préventive des enfants nouveau-nés contre la tuberculose par le BCG*. *Annales de l'Institut Pasteur* 1927. **41**,201-232.
47. Fine, P.E., *Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity*. *Lancet*, 1995. **346**(8986): p. 1339-45.

48. Koul, A., et al., *The challenge of new drug discovery for tuberculosis*. Nature. **469**(7331): p. 483-90.
49. Larsson, G., L.A. Svensson, and P.O. Nyman, *Crystal structure of the Escherichia coli dUTPase in complex with a substrate analogue (dUDP)*. Nat Struct Biol, 1996. **3**(6): p. 532-8.
50. Mol, C.D., et al., *Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits*. Structure, 1996. **4**(9): p. 1077-92.
51. Dauter, Z., et al., *Crystal structure of dUTPase from equine infectious anaemia virus; active site metal binding in a substrate analogue complex*. J Mol Biol, 1999. **285**(2): p. 655-73.
52. Gonzalez, A., et al., *Atomic resolution structure of Escherichia coli dUTPase determined ab initio*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2001. **57**(Pt 6): p. 767-74.
53. Prasad, G.S., et al., *Structures of feline immunodeficiency virus dUTP pyrophosphatase and its nucleotide complexes in three crystal forms*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2000. **56**(Pt 9): p. 1100-9.
54. Larsson, G., P.O. Nyman, and J.O. Kvassman, *Kinetic characterization of dUTPase from Escherichia coli*. J Biol Chem, 1996. **271**(39): p. 24010-6.
55. Toth, J., et al., *Kinetic mechanism of human dUTPase, an essential nucleotide pyrophosphatase enzyme*. J Biol Chem, 2007. **282**(46): p. 33572-82.
56. Hobza, P. and J. Sponer, *Structure, energetics, and dynamics of the nucleic Acid base pairs: nonempirical ab initio calculations*. Chem Rev, 1999. **99**(11): p. 3247-76.
57. Blakaj, D.M., et al., *Molecular dynamics and thermodynamics of protein-RNA interactions: mutation of a conserved aromatic residue modifies stacking interactions and structural adaptation in the UIA-stem loop 2 RNA complex*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(11): p. 2548-51.
58. Hughes, R.M. and M.L. Waters, *Model systems for beta-hairpins and beta-sheets*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(4): p. 514-24.
59. Zhou, Z. and R.P. Swenson, *The cumulative electrostatic effect of aromatic stacking interactions and the negative electrostatic environment of the flavin mononucleotide binding site is a major determinant of the reduction potential for the flavodoxin from Desulfovibrio vulgaris [Hildenborough]*. Biochemistry, 1996. **35**(50): p. 15980-8.
60. Versees, W., et al., *Leaving group activation by aromatic stacking: an alternative to general acid catalysis*. J Mol Biol, 2004. **338**(1): p. 1-6.
61. Swenson, R.P. and G.D. Krey, *Site-directed mutagenesis of tyrosine-98 in the flavodoxin from Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough): regulation of oxidation-reduction properties of the bound FMN cofactor by aromatic, solvent, and electrostatic interactions*. Biochemistry, 1994. **33**(28): p. 8505-14.
62. Mao, L., et al., *Molecular determinants for ATP-binding in proteins: a data mining and quantum chemical analysis*. J Mol Biol, 2004. **336**(3): p. 787-807.
63. Guo, X., et al., *Molecular basis for differential nucleotide binding of the nucleotide-binding domain of ABC-transporter CvaB*. Biochemistry, 2006. **45**(48): p. 14473-80.
64. Rickert, K.W., et al., *Discovery and biochemical characterization of selective ATP competitive inhibitors of the human mitotic kinesin KSP*. Arch Biochem Biophys, 2008. **469**(2): p. 220-31.
65. Boehr, D.D., et al., *Analysis of the pi-pi stacking interactions between the aminoglycoside antibiotic kinase APH(3')-IIIa and its nucleotide ligands*. Chem Biol, 2002. **9**(11): p. 1209-17.
66. Vertessy, B.G., *Flexible glycine rich motif of Escherichia coli deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase is important for functional but not for structural integrity of the enzyme*. Proteins, 1997. **28**(4): p. 568-79.

67. Prasad, G.S., *Glycine rich P-loop motif in deoxyuridine pyrophosphatase*. Curr Protein Pept Sci, 2001. **2**(4): p. 301-11.
68. Smith, C.A. and I. Rayment, *Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins*. Biophys J, 1996. **70**(4): p. 1590-602.
69. Pai, E.F., et al., *Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis*. EMBO J, 1990. **9**(8): p. 2351-9.
70. Webb, M.R., et al., *The stereochemical course of phosphoric residue transfer catalyzed by beef heart mitochondrial ATPase*. J Biol Chem, 1980. **255**(24): p. 11637-9.
71. Vertessy, B.G., et al., *The complete triphosphate moiety of non-hydrolyzable substrate analogues is required for a conformational shift of the flexible C-terminus in E. coli dUTP pyrophosphatase*. FEBS Lett, 1998. **421**(1): p. 83-8.
72. Nord, J., et al., *The C-terminus of dUTPase: observation on flexibility using NMR*. FEBS Lett, 2001. **492**(3): p. 228-32.
73. Snapper, S.B., et al., *Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol, 1990. **4**(11): p. 1911-9.
74. Roberts, G., D.G. Muttucumar, and T. Parish, *Control of the acetamidase gene of Mycobacterium smegmatis by multiple regulators*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **221**(1): p. 131-6.
75. Parish, T. and N.G. Stoker, *Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked Mycobacterium tuberculosis tlyA plcABC mutant by gene replacement*. Microbiology, 2000. **146** (Pt 8): p. 1969-75.
76. Cox, M.M., *Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1999. **63**: p. 311-66.
77. Muttucumar, D.G. and T. Parish, *The molecular biology of recombination in Mycobacteria: what do we know and how can we use it?* Curr Issues Mol Biol, 2004. **6**(2): p. 145-57.
78. McAdam, R.A., et al., *In vivo growth characteristics of leucine and methionine auxotrophic mutants of Mycobacterium bovis BCG generated by transposon mutagenesis*. Infect Immun, 1995. **63**(3): p. 1004-12.
79. Balasubramanian, V., et al., *Allelic exchange in Mycobacterium tuberculosis with long linear recombination substrates*. J Bacteriol, 1996. **178**(1): p. 273-9.
80. Hinds, J., et al., *Enhanced gene replacement in mycobacteria*. Microbiology, 1999. **145** (Pt 3): p. 519-27.
81. Pelicic, V., J.M. Reyrat, and B. Gicquel, *Generation of unmarked directed mutations in mycobacteria, using sucrose counter-selectable suicide vectors*. Mol Microbiol, 1996. **20**(5): p. 919-25.
82. Machowski, E.E., S. Dawes, and V. Mizrahi, *TB tools to tell the tale-molecular genetic methods for mycobacterial research*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(1): p. 54-68.
83. Pashley, C.A., et al., *Gene replacement in mycobacteria by using incompatible plasmids*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(1): p. 517-23.
84. Pelicic, V., J.M. Reyrat, and B. Gicquel, *Genetic advances for studying Mycobacterium tuberculosis pathogenicity*. Mol Microbiol, 1998. **28**(3): p. 413-20.
85. Pelicic, V., J.M. Reyrat, and B. Gicquel, *Expression of the Bacillus subtilis sacB gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria*. J Bacteriol, 1996. **178**(4): p. 1197-9.
86. Mahenthiralingam, E., et al., *Site-directed mutagenesis of the 19-kilodalton lipoprotein antigen reveals No essential role for the protein in the growth and virulence of Mycobacterium intracellulare*. Infect Immun, 1998. **66**(8): p. 3626-34.

87. Parish, T., Stoker, N.J., *Mycobacteria protocols*. Methods in Molecular Biology. Vol. 101. 1998, Totowa, NJ: Humana Press.
88. Goude, R. and T. Parish, *Electroporation of mycobacteria*. J Vis Exp, 2008(15).
89. SAMBROOK, J.F., E.F. and MANIATIS, T.SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T., *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2 ed. 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
90. Pashley, C.A. and T. Parish, *Efficient switching of mycobacteriophage L5-based integrating plasmids in Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **229**(2): p. 211-5.
91. Parish, T., J. Lewis, and N.G. Stoker, *Use of the mycobacteriophage L5 excisionase in Mycobacterium tuberculosis to demonstrate gene essentiality*. Tuberculosis (Edinb), 2001. **81**(5-6): p. 359-64.
92. Tanya Parish , A.C.B., *Mycobacteria Protocols*. 2009, New York: Humana Press.
93. Studier, F.W., et al., *Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes*. Methods Enzymol, 1990. **185**: p. 60-89.
94. Varga, B., et al., *Active site closure facilitates juxtaposition of reactant atoms for initiation of catalysis by human dUTPase*. FEBS Lett, 2007. **581**(24): p. 4783-8.
95. Varga, B., et al., *Study of solvent-protein coupling effects by neutron scattering*. J Biol Phys, 2009.
96. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
97. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
98. Vertessy, B.G., et al., *Specific derivatization of the active site tyrosine in dUTPase perturbs ligand binding to the active site*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **219**(2): p. 294-300.
99. Kabsch, W., *Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants*. J.Appl. Cryst., 1993. **26**, **795-800**.
100. CCP4, *The CCP4 suite. Programs for protein crystallography*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1994. **50**, **760-763**.
101. Vagin, A.a.T., A., *MOLREP: an automated program for molecular replacement*. J.Appl. Cryst., 1997. **30**,**1022-1025**.
102. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
103. Sheldrick, G.M., *A short history of SHELX*. Acta Crystallogr A, 2008. **64**(Pt 1): p. 112-22.
104. Fisher, R.A., *"On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P"*. Journal of the Royal Statistical Society, 1922. **85**.
105. Fisher, R.A., *Statistical Methods for Research Workers*. 1954: Oliver and Boyd.
106. Branca, A.A. and C. Baglioni, *Evidence that types I and II interferons have different receptors*. Nature, 1981. **294**(5843): p. 768-70.
107. Champion, M.U.S.a.P.A.D., *To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about Mycobacterium tuberculosis pathogenesis?* Curr Opin Microbiol. , 2010.
108. Titgemeyer, F., et al., *A genomic view of sugar transport in Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2007. **189**(16): p. 5903-15.
109. Carroll, P., C.A. Pashley, and T. Parish, *Functional analysis of GlnE, an essential adenyl transferase in Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2008. **190**(14): p. 4894-902.

110. Glover, R.T., et al., *The two-component regulatory system senX3-regX3 regulates phosphate-dependent gene expression in Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol, 2007. **189**(15): p. 5495-503.
111. Bjornberg, O., J. Neuhard, and P.O. Nyman, *A bifunctional dCTP deaminase-dUTP nucleotidohydrolase from the hyperthermophilic archaeon Methanocaldococcus jannaschii*. J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 20667-72.
112. Helt, S.S., et al., *Mechanism of dTTP inhibition of the bifunctional dCTP deaminase:dUTPase encoded by Mycobacterium tuberculosis*. J Mol Biol, 2008. **376**(2): p. 554-69.
113. Dussurget, O., et al., *Transcriptional control of the iron-responsive fxbA gene by the mycobacterial regulator IdeR*. J Bacteriol, 1999. **181**(11): p. 3402-8.
114. Schneider, C.Z., et al., *The two chorismate mutases from both Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis: biochemical analysis and limited regulation of promoter activity by aromatic amino acids*. J Bacteriol, 2008. **190**(1): p. 122-34.
115. Barabas, O., et al., *Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42907-15.
116. Hunter, C.A., J. Singh, and J.M. Thornton, *Pi-pi interactions: the geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins*. J Mol Biol, 1991. **218**(4): p. 837-46.
117. Nemeth-Pongracz, V., et al., *Flexible segments modulate co-folding of dUTPase and nucleocapsid proteins*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(2): p. 495-505.
118. Shao, H., et al., *Characterization and mutational studies of equine infectious anemia virus dUTPase*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1339**(2): p. 181-91.
119. Ponomarev, M.A., V.P. Timofeev, and D.I. Levitsky, *The difference between ADP-beryllium fluoride and ADP-aluminium fluoride complexes of the spin-labeled myosin subfragment 1*. FEBS Lett, 1995. **371**(3): p. 261-3.
120. Fisher, A.J., et al., *X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AIF4*. Biochemistry, 1995. **34**(28): p. 8960-72.
121. Erdelyi, P., et al., *Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in Caenorhabditis elegans*. J Cell Sci. **124**(Pt 9): p. 1510-8.
122. Melendez, A., et al., *Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in C. elegans*. Science, 2003. **301**(5638): p. 1387-91.
123. Sigmond, T., et al., *Autophagy in Caenorhabditis elegans*. Methods Enzymol, 2008. **451**: p. 521-40.
124. Aladzcity, I., et al., *Autophagy genes unc-51 and bec-1 are required for normal cell size in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2007. **177**(1): p. 655-60.
125. Gems, D. and D.L. Riddle, *Longevity in Caenorhabditis elegans reduced by mating but not gamete production*. Nature, 1996. **379**(6567): p. 723-5.
126. Barrios, A., S. Nurrish, and S.W. Emmons, *Sensory regulation of C. elegans male mate-searching behavior*. Curr Biol, 2008. **18**(23): p. 1865-71.
127. Metzstein, M.M., et al., *Transcriptional regulator of programmed cell death encoded by Caenorhabditis elegans gene ces-2*. Nature, 1996. **382**(6591): p. 545-7.
128. Wang, X., H. Jia, and H.M. Chamberlin, *The bZip proteins CES-2 and ATF-2 alter the timing of transcription for a cell-specific target gene in C. elegans*. Dev Biol, 2006. **289**(2): p. 456-65.
129. Raghunand, T.R. and W.R. Bishai, *Mapping essential domains of Mycobacterium smegmatis WhmD: insights into WhiB structure and function*. J Bacteriol, 2006. **188**(19): p. 6966-76.

130. Sinha, K.M., M.S. Glickman, and S. Shuman, *Mutational analysis of Mycobacterium UvrD1 identifies functional groups required for ATP hydrolysis, DNA unwinding, and chemomechanical coupling*. *Biochemistry*, 2009. **48**(19): p. 4019-30.
131. Tormo-Mas, M.A., et al., *Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands*. *Nature*. **465**(7299): p. 779-82.
132. Cosma, C.L., D.R. Sherman, and L. Ramakrishnan, *The secret lives of the pathogenic mycobacteria*. *Annu Rev Microbiol*, 2003. **57**: p. 641-76.
133. Mustafa, A.S., et al., *Immunogenicity of Mycobacterium tuberculosis RD1 region gene products in infected cattle*. *Clin Exp Immunol*, 2002. **130**(1): p. 37-42.
134. Kulakowska, I., et al., *Dipole moments of 2,4-diketopyrimidines. II. Uracil, thymine and their derivatives*. *Biochim Biophys Acta*, 1974. **361**(2): p. 119-30.
135. Pecsí, I., et al., *Aromatic stacking between nucleobase and enzyme promotes phosphate ester hydrolysis in dUTPase*. *Nucleic Acids Res*. **38**(20): p. 7179-86.
136. Takacs, E., et al., *Molecular shape and prominent role of beta-strand swapping in organization of dUTPase oligomers*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(5): p. 865-71.
137. Petsko, G.A., *Chemistry and biology*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(2): p. 538-40.
138. Hidalgo-Zarco, F., et al., *Kinetic properties and inhibition of the dimeric dUTPase-dUDPase from Leishmania major*. *Protein Sci*, 2001. **10**(7): p. 1426-33.
139. Musso-Buendia, J.A., et al., *Kinetic properties and inhibition of the dimeric dUTPase-dUDPase from Campylobacter jejuni*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2009. **24**(1): p. 111-6.
140. Moroz, O.V., et al., *The crystal structure of a complex of Campylobacter jejuni dUTPase with substrate analogue sheds light on the mechanism and suggests the "basic module" for dimeric d(C/U)TPases*. *J Mol Biol*, 2004. **342**(5): p. 1583-97.