

# A timidilát bioszintézis és a genomi integritás preventív védelme

Doktori értekezés

**Hirmondó Rita**  
Okleveles biológus

Témavezető: **Dr. Tóth Judit**

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola,  
Szerkezeti Biokémia Program



A doktori iskola vezetője: **Prof. Erdei Anna**  
Programvezető: **Prof. Nyitray László**

**2015. Budapest**



Készült: Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi  
Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Köszönetnyilvánítás .....	4
A dolgozatban gyakran használt rövidítések jegyzéke .....	5
Egyéni szerepem a disszertáció elkészítésében.....	8
1 Irodalmi áttekintés.....	9
1.1 A dezoxiribonukleotidok <i>de novo</i> szintézise .....	9
1.1.1 Timidilát bioszintézis.....	10
1.1.2 A mikobakteriális timidilát bioszintézis jellegzetességei .....	12
1.1.3 A dUTPáz reakció szerepe a timidilát bioszintézisében .....	13
1.1.4 A dUTPáz szupercsalád .....	13
1.1.5 A mikobakteriális dUTPáz enzim.....	14
1.1.6 A mikobakteriális bifunkciós dCTP dezamináz: dUTPáz enzim.....	15
1.1.7 Menekítő útvonalak.....	16
1.2 A nukleotid anyagcsere hatása a DNS összetételére és a genom integritására .....	17
1.2.1 A dNTP arányok és a mutagenézis .....	17
1.2.2 A nem konvencionális nukleotidok beépülése a DNS-be.....	18
1.2.3 A nem konvencionális nukleotidok eltávolítása a dNTP készletből, a genom preventív védelme .....	20
1.2.4 A nem konvencionális nukleotidok eltávolítása a DNS-ből .....	20
1.3 A DNS károsodásra adott sejtválasz: az „SOS response”.....	23
1.4 A timidilát bioszintézis, mint gyógyszer-célpont.....	25
1.4.1 Specifikus dUTPáz inhibitorok.....	25
1.4.2 Az Stl felfedezése és szerepe .....	26
1.4.3 Az Stl, mint lehetséges általános dUTPáz inhibitor.....	26
2 Célkitűzések .....	28
3 Anyagok és módszerek.....	29
3.1 Szekvencia analízis és homológia modellezés.....	29
3.2 Bakteriális törzsek, táptalajok és sejtfenntartási körülmények .....	29
3.3 A klónozáshoz használt reagensek és körülmények .....	29
3.4 DNS konstruktok elektroporálása <i>M. smegmatis</i> -ba.....	30
3.5 Rekombináció alapuló allélcseré <i>Mycobacterium</i> -ban .....	30
3.6 A p2Nbk-duth vektor klónozása a <i>dut</i> kiütéséhez.....	30
3.7 A vad típusú (wt) és a mutáns komplementáló vektorok klónozása.....	31
3.8 A p2NIL-dcd:dut A115F vektor klónozása.....	32
3.9 A pGem-Stl vektor klónozása .....	33

3.10	A tetraciklin-indukálható pKW08-Stl klónozása .....	33
3.11	A <i>dut</i> kiütése .....	34
3.12	A <i>dut</i> mutáns sejtvonalak létrehozása .....	35
3.13	A <i>dcd:dut</i> mutáns sejtvonala létrehozása .....	36
3.14	Az Stl fehérjét expresszáló <i>M. smegmatis</i> sejtvonala létrehozása .....	36
3.15	A tetraciklin-indukálható Stl expressziós <i>M. smegmatis</i> sejtvonalak létrehozása .....	36
3.16	A genomi DNS izolálása .....	36
3.17	Southern-blot analízis .....	37
3.18	A fehérje expresszió ellenőrzése Western blot-tal .....	37
3.19	Növekedési tesztek folyadékkultúrában .....	38
3.20	A kolóniaképzés vizsgálata .....	38
3.21	A mikobaktérium sejtvonalak mutációs rátájának meghatározása .....	38
3.22	Az <i>rpoB</i> gén hot-spot régiójának mutációs analízise .....	38
3.23	A genomi uraciltartalom meghatározása .....	39
3.24	dNTP extrakció .....	39
3.25	A dNTP pool meghatározása .....	39
3.26	A dUTP sejtbeli koncentrációjának meghatározása .....	40
4	Eredmények és megvitatásuk .....	41
4.1	A timidilát bioszintézis konzerváltsága mikobaktérium fajokban .....	41
4.2	A dUTPáz kódoló <i>dut</i> gén esszenciális <i>M. smegmatis</i> -ban .....	44
4.3	A mutáns dUTPáz enzimek tervezése .....	45
4.4	A mutáns <i>M. smegmatis</i> sejtvonalak létrehozása .....	47
4.5	A mikobaktérium-specifikus hurok eltávolítása letális hatású .....	48
4.6	A Dut vagy a Dcd:dut dUTPáz aktivitása is elegendő a <i>M. smegmatis</i> normál növekedéséhez .....	49
4.7	Mutátor fenotípus és mutációs mintázat .....	51
4.8	A <i>dut</i> mutáns sejtvonalak uracilt halmoznak fel a genomi DNS-ükben .....	53
4.9	Megváltozott dNTP készlet a mutáns sejtvonalakban .....	54
4.10	Az Stl gátolja a <i>M. tuberculosis</i> dUTPáz <i>in vitro</i> enzimaktivitását .....	59
4.11	Az Stl fehérjét expresszáló <i>M. smegmatis</i> sejtvonalak létrehozása .....	61
4.12	Az Stl expressziója magas sejtbeli dUTP szintet okoz <i>M. smegmatis</i> -ban .....	62
4.13	Az Stl expressziója megzavarja <i>M. smegmatis</i> sejtvonalak telepkezését .....	63
5	Következtetések .....	67
6	Összefoglalás .....	70
7	Summary .....	72
8	Irodalomjegyzék .....	74
9	Közlemények listája .....	86

9.1	A doktori értekezés témájához kapcsolódó közlemények .....	86
9.1.1	Referált szakmai folyóiratban megjelent közlemények .....	86
9.1.2	Referált szakmai folyóiratban közlés alatt álló publikációk (megosztott első szerzők*) .....	86
9.2	További, a doktori értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények ....	86
9.3	Konferencián tartott szóbeli előadások (Az előadó neve aláhúzva) .....	86
9.4	Konferencián tartott poszter előadások (Az előadó neve aláhúzva) .....	87
10	Függelék .....	89
10.1	A dUTPáz manipulációjával okozott hatások gyűjteménye különböző organizmusokban .....	89
10.2	A dolgozatban felhasznált primerek listája .....	92
10.3	A mutációs analízishez használt PERL szkriptek .....	95

## Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Tóth Juditnak, hogy szakértelemmel és odafigyeléssel irányított, a felmerülő problémák megoldásában segített, és támogatta részvételemet konferenciákon és szakmai gyakorlatokon. Szeretnék köszönetet mondani Prof. Vértessy Beátának, aki lehetővé tette, hogy a csoportjában dolgozzak, és mindig lelkesen támogatott.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Pécsi Ildikónak, aki korábbi munkájával számos e dolgozatban bemutatott eredményt alapozott meg. Ezen túl sokat segített a kezdeti szakmai tapasztalatok elsajátításában. Köszönet jár kollégáimnak, Lopata Annának, Szabó Judit Eszternek, Nyíri Kingának és Dobrotka Paulának, akik számos *in vitro* kísérleti eredménnyel járultak hozzá dolgozatomhoz, valamint számos ötlettel és javaslattal támogatták munkámat. Köszönetet szeretnék mondani Tarjányi Szilviának, aki szakdolgozóként és tudományos diákköri hallgatóként vett részt a munkákban az irányításom alatt, és végig rendkívüli lelkesedéssel és érdeklődéssel követte az elvégzett kísérleteket. Köszönet jár még Dr. Horváth Andrásnak és Dr. Merényi Gábornak, akik segítségemre voltak a genomi uracil mérés és nukleotid készlet mérés technikák elsajátításában, valamint hasznos tanácsaikkal és meglátásaikkal segítettek az eredmények szélesebbkörű interpretálását.

Köszönet illeti továbbá a Genom Metabolizmus Kutatócsoportjának minden munkatársát, akik segítették munkámat.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Leendert Hamoen-nak, akinek a laborjában 2014-ben három hónapot tölthettem az Amszterdami Egyetemen, és számos tapasztalatot szerezhettem a bakteriális sejtbiológia területén.

Végül szeretnék köszönetet mondani Prof. Buday Lászlónak, az Enzimológiai Intézet igazgatójának, aki lehetővé tette, hogy az Intézeti infrastruktúrát kísérleteimhez hasznosítsam.

## A dolgozatban gyakran használt rövidítések jegyzéke

5FdU	5-fluoro-dezoxiuridin
5FU	5-fluorouracil
A	adenin
ADP	adenozin-difoszfát
AP-hely	bázismentes hely a DNS-ben
Ape1	AP endonukleáz 1
ATP	adenozin-trifoszfát
BER	báziskivágó javítás
bp	bázispár
C	citozin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CDP	citidin-difoszfát
CFU	telep képző egység (colony forming unit)
Ct	qPCR kvatifikációs ciklus, az a ciklusszám, melynél a felszaporítás során a DNS koncentráció elér egy bizonyos küszöbértéket
C-terminális	karboxi-terminális
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
dADP	dezoxiadenozin difoszfát
dAMP	dezoxiadenozin monofoszfát
dATP	dezoxiadenozin trifoszfát
Dcd	dCTP dezamináz
Dcd:dut	bifunkciós dCTP dezamináz : dUTPáz
dCDP	dezoxicitidin difoszfát
dCMP	dezoxicitidin monofoszfát
Dctd	dezoxicitidin monofoszfát dezamináz
dCTP	dezoxicitidin trifoszfát
dGDP	dezoxiguanozin trifoszfát
dGMP	dezoxiguanozin monofoszfát
dGTP	dezoxiguanozin trifoszfát
DHF	dihidrofolát
Dhfr	dihidrofolát reduktáz
dNDP	dezoxiribonukleotid difoszfát

dNMP	dezoxiribonukleotid monofoszfát
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleotid trifoszfát
DSB	dupla szálú DNS törés
dTDP	dezoxitimidin-difoszfát
dTMP	dezoxitimidin-monofoszfát
dTTP	dezoxitimidin-trifoszfát
dUDP	dezoxiuridin-difoszfát
dUMP	dezoxiuridin-monofoszfát
dUTP	dezoxiuridin-trifoszfát
Dut, dUTPáz	dezoxiuridin-trifoszfát pirofoszfatáz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FADH <sub>2</sub>	redukált flavin adenin dinukleotid
G	guanin
GDP	guanozin-difoszfát
Gfp	zöld fluoreszcens protein (green fluorescent protein)
GTP	guanozin-trifoszfát
HIV	humán immundeficiencia vírus
MDR, XDR	multi drog-rezisztens, extrém drog-rezisztens
<i>M. jannaschii</i>	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>M. ulcerans</i>	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
mRNS	hírvivő/messenger RNS
MRSA	meticillin-rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
mTHF	metilén-tetrahidrofolát
MTX	metotrexát
NDP	ribonukleotid-difoszfát
Ndk	nukleotid-difoszfátkináz
Nk	nukleotid kináz
NMP	ribonukleotid-monofoszfát
Nmpk	nukleotid-monofoszfát kináz
Nrd	nukleozid-difoszfát reduktáz enzim

N-terminális	amino-terminális
NTP	ribonukleotid-trifoszfát
OD <sub>600</sub>	600 nm-es hullámhosszon mért optikai denzitás
PCR	polimeráz láncreakció
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	fenilmetánszulfonil fluorid
PVDF	polivinilidén fluorid
qPCR	kvantitatív valós idejű PCR
RecA	az eukarióta Rad51 <i>Escherichia coli</i> homológia
RNAi	RNS interferencia
RNázH	ribonukleáz H
RNS	ribonukleinsav
ROS	Reactive oxygen species - reaktív oxigén gyökök
RTX	Raltitrexed /Tomudex (TDX)
<i>S. cerevisie</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SaPI	<i>Staphylococcus aureus</i> patogenicitási sziget
SSB	egyres szálú DNS törés
ssDNS	egyres szálú DNS
T	timin
TBC	tuberkulózis, tüdőgümőkór
THF	tetrahidrofolát
ThyA	klasszikus timidilát szintáz
ThyX	flavin-függő vagy alternatív timidilát szintáz
Tk	timidin kináz
Tmpk	timidilát kináz
TRIS	2-Amino-2-hidroximetil-propán-1,3-diol
Ts	timidilát szintáz
U	uracil
Udg, Ung	uracil DNS glikoziláz, uracil N-glikoziláz
UDP	uridin-difoszfát
Ugi	uracil glikoziláz inhibitor
wt	vad típus
X-gal	5-bromo-4-kloro-indolil-β-D-galaktopiranozid

## Egyéni szerepem a disszertáció elkészítésében

Doktori dolgozatom a 9. fejezetben felsorolt első és megosztott első szerzős közleményeken alapul. A társszerzőim által végzett kísérletek közül azokat mutatom be, melyek meghatározó szereppel bírnak az eredményekből levonható következtetések megalkotásában, a doktori dolgozat jelen formájának kialakulásában. A dolgozatban minden közreműködő kollégámat külön megemlítem a releváns kísérleteknél.

A doktori értekezésemben közölt eredmények több kutató közös munkájának eredményei, ezért a dolgozatomban mindenhol többes szám első személyben fogalmaztam.

## 1 Irodalmi áttekintés

Dolgozatomban elsősorban a dUTPáz reakció szerepét vizsgáltam a mikobakteriális timidilát bioszintézis útvonalban. Ehhez szeretném áttekinteni a nukleotid anyagcserével és a genom stabilitását biztosító rendszerekkel kapcsolatos folyamatokat elsősorban a bakteriális enzimekre koncentrálva.

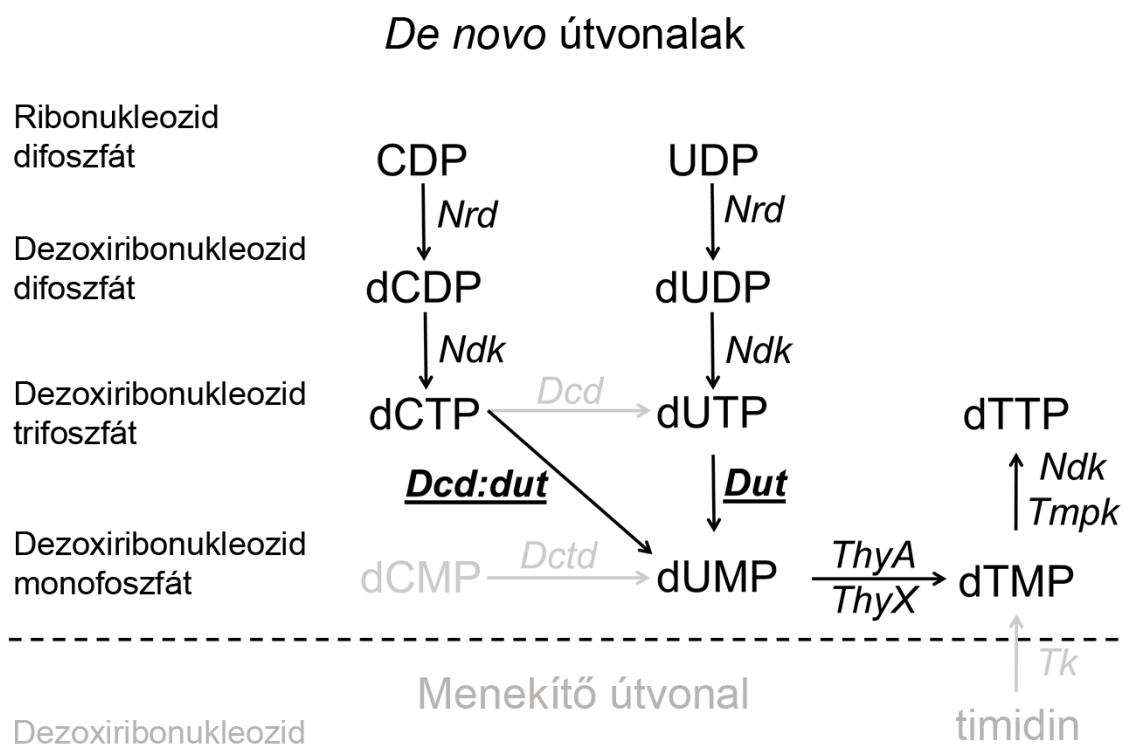
### 1.1 A dezoxiribonukleotidok *de novo* szintézise

Az élővilágban a genetikai információt a dezoxiribonukleotidokból felépülő dezoxiribonukleinsav, a DNS hordozza. Emiatt a DNS az RNS-nél jóval stabilabb, kevésbé reaktív, amit a komplementer kettős szálú hélix szerkezet, valamint az építőkövek szerkezete is biztosít, ugyanis a DNS-t ribonukleotid-monofoszfátok (NMP) helyett a 2'-hidroxil csoporttal nem rendelkező dezoxiribonukleotid-monofoszfátok (dNMP) építik fel. Ezzel ellentétben a DNS és az RNS báziskomponenseik összetételében csak minimálisan különböznek, ugyanis a DNS-ben az RNS-re jellemző uracil helyett a szerkezetileg nagyon hasonló, de 5-metilcsoporttal is rendelkező timin fordul elő. A többi három bázis (citozin, guanin, adenin) megegyezik. A DNS szintézisét a DNS polimerázok végzik dezoxiribonukleotid trifoszfát (dNTP) szubsztrátokból, melyek koncentrációja a sejtben szigorúan szabályozott. A négy kanonikus DNS-alkotó dNTP közül három (dATP, dCTP és dGTP) a szerkezetileg megfelelő ribonukleozid difoszfát redukálásával keletkezik [1]. A reakciót a nukleozid difoszfát reduktáz (Nrd) enzim végzi, amely kétféle alegységből alkot funkcionális enzimet. Az enzim szabályozása több szinten is megvalósulhat, egyrészt a sejtciklus során transzkripcionális reguláció, másrészt a DNS replikációja során pedig bonyolult allosztérikus szabályzás biztosítja a nukleotidok megfelelő sejtbeli arányát és koncentrációját [2]. Az allosztérikus szabályozás az enzim aktivitását és specificitását is befolyásolja. A sejtbeli ATP/dATP arány meghatározza az enzim aktivitását a nagy alegység ( $\alpha$ ) úgynevezett *a*-helyére (activity-site) történő kötődésén keresztül. Ezáltal az enzim érzékeli a sejtbeli dNTP koncentrációt, és ahhoz hangolja a katalitikus aktivitását. A specificitást meghatározó allosztérikus helyre (*s*-hely, „specificity-site”) dATP, ATP, dGTP és dTTP is kötődhet. Attól függően, hogy az *s*-helyre melyik nukleotid kötődik, a közeli katalitikus hely konformációváltozása befolyásolja az NDP molekulák kötődését és azok enzimatisz redukcióját. A dTTP kötődése a GDP, a dGTP kötődése az ADP redukcióját, míg az ATP vagy a dATP kötődése a CDP és az UDP redukcióját segíti elő. Ezáltal a négy dNTP-t a DNS replikációjához szükséges koncentrációban és arányban tartja. Ettől az egyensúlyi helyzettől

való eltérés mutagén hatású több megfigyelt organizmus esetében is, pl. az Nrd s-helyét érintő mutációk *E. coli* sejtekben a dNTP készlet egyensúlyát felborítják és jelentős mutátor hatást indukálhatnak [3,4]. A reakcióban keletkező dNDP molekulák dNTP-vé való foszforilálását a nukleozid difoszfát kináz (Ndk) enzim katalizálja [5]. Ezzel szemben a dTTP közvetlen ribonukleotid megfelelője hiányzik a NTP készletből, ezért a timidin bioszintézise az alábbiakban ismertetett független útvonalakon keresztül valósul meg.

### 1.1.1 Timidilát bioszintézis

A dTTP *de novo* bioszintézise általában valamilyen uraciltartalmú köztiterméken át történik az élővilág nagy részében, ugyanis a timidilát szintáz reakció közvetlen szubsztrátjaként a dUMP szolgál (1. Ábra). A legtöbb élőlényben a dUMP fő forrása citozin dezoxinukleotid dezaminálásából származik (dCMP vagy dCTP), míg a dUDP defoszforilációja kisebb jelentőséggel bír [6–8]. Enterobaktériumokban, mikobaktériumokban és plazmódiumban jelentős útvonalat képvisel a dezoxiuridin trifoszfát (dUTP) pirofoszforolízis reakciója dUMP-vé. A reakciót az élővilágban széleskörűen elterjedt dUTPáz enzim katalizálja, ami a dUMP előállításán túl a genom uracilosodását is megelőzi azáltal, hogy lebontja a sejtben keletkező dUTP-t [9]. A dUTP származhat a dCTP dezaminálásából, amit a Gram negatív baktériumokra jellemző dCTP dezamináz (Dcd) végez, valamint az Nrd termékéből (dUDP), amit aztán az Ndk enzim foszforilál dUTP-vé. Bizonyos baktériumokban, mint a *Methanocaldococcus jannaschii*, vagy a *Mycobacterium tuberculosis*, egy bifunkciós dCTP dezamináz : dUTPáz (Dcd:dut) enzim helyettesíti a Dcd enzimet, mely dCTP-ből a dezamináz és hidrolízis reakció katalizálásával egy lépésben dUMP-t állít elő [10,11]. Mindhárom enzim (Dcd, dUTPáz, Dcd:dut) a dUTPáz szupercsaládba tartozik és szerkezetileg nagyon hasonló. Eukariótákban és Gram pozitív baktériumokban a citozin dezaminálása a monofoszfát-nukleotidok szintjén történik és a dCMP dezamináz (Dctd) enzim katalizálja. A dezaminációs reakció nyújt lehetőséget a dCTP:dTTP nukleotidok arányának beállítására is, ugyanis a Dctd, a Dcd és a Dcd:dut enzim is allosztérikus szabályozással rendelkezik. A Dctd esetében a dCTP aktiválja, míg a dTTP mindhárom enzim esetén gátolja dezaminációs reakciókat [8,11-14].



**1. Ábra. A dTTP bioszintézis útvonalak és az útvonalakban résztvevő enzimek** A legtöbb élőlényben de novo és menekítő útvonalak is részt vesznek a timidilát bioszintézisében. Ezzel ellentétben a mikobaktériumokban csak a dCTP dezamináz és dUTPáz reakciókat katalizáló enzimek génjei (*dcd:dut; dut*) vannak a genomban kódolva. A mikobaktériumokban hiányzó reakcióutakat szürkével jelöltem. Rövidítések: *Dcd* – dCTP dezamináz, *Dut* – dUTPáz, *Dctd* – dCMP dezamináz, *Dcd:dut* – bifunkciós dCTP dezamináz : dUTPáz, *Nrd* – Nukleozid difoszfát reduktáz, *Ndk* – Nukleozid difoszfát kináz, *Tmpk* – dTMP kináz, *Tk* – Timidin kináz, *ThyA, ThyX* – timidilát szintáz.

A fentiekben ismertetett reakciókban keletkező dUMP metilációját a timidilát szintáz (Ts) enzim katalizálja redukáló kofaktor jelenlétében. A timidilát szintáz enzim legtöbbször esszenciális, vagy hiánya timidin auxotrófiát eredményez. Az élővilágban két különböző timidilát szintázt írtak le a különböző fajokban (*ThyA* és *ThyX*), amelyek különböző enzimatisz mechanizmussal rendelkeznek, valamint a szerkezetük is eltérő. A *ThyA* enzimet konvencionális vagy klasszikus timidilát szintáznak nevezik. Az enzim kofaktoraként és metil-donoraként metilén-tetrahidrofolátot (mTHF) használ, amelyet az enzim az uracil metilálását követően dihidrofoláttá alakít (DHF) [13]. Mivel a redukált folátok számos biológiai folyamathoz szükségesek, a dihidrofolát reduktáz enzim (*Dhfr*; *Escherichia coli*-ban a *folA*, *Mycobacterium tuberculosis*-ban a *dfrA* nevű gén kódolja) alakítja vissza tetrahidrofoláttá (THF). A prokarióták egy csoportjára azonban egy nemrégiben felfedezett, nem kanonikus, a *ThyA*-val nem rokon, az ún. flavin-függő vagy alternatív timidilát szintáz (*ThyX*) jellemző. A *ThyX* enzim metil donorként szintén mTHF-et, viszont kofaktorként

redukált flavin adenin dinukleotidot (FADH<sub>2</sub>) használ [14]. A két különböző reakció során keletkező THF-ot a szerin hidroximetil transzferáz enzim alakítja vissza mTHF-tá. A fentiekben ismertetett reakcióban keletkező dTMP molekulák dTTP-vé való foszforilálását a timidin monofoszfát kináz (Tmk) és a nukleozid difoszfát kináz (Ndk) enzim katalizálja.

### 1.1.2 A mikobakteriális timidilát bioszintézis jellegzetességei

A *Mycobacterium tuberculosis* által okozott tüdőgümőkór (tuberkulózis) cseppfertőzés útján terjedő betegség, melyet még ma is súlyos, világszerte jelenlévő egészségügyi problémaként tartanak számon. A tuberkulózisos betegek száma a HIV fertőzöttek és a hajléktalanok körében jelentős, ugyanis a tuberkulózis elsősorban a valamilyen okból legyengült immunrendszerrel rendelkező embereknél alakul ki. Súlyosbítja a helyzetet, hogy az utóbbi években ismét megnövekedett a fertőzöttek száma az újonnan kialakult multi drog-rezisztens (MDR) és extrém drog-rezisztens (XDR) törzsek megjelenése miatt. Ezért új hatékony és specifikus gyógyszer-célpontok azonosítására és új gyógyszerek fejlesztésére van szükség.

Mikobaktériumokban a timidilát bioszintézis több specifikus jellegzetességgel is bír, ezért a benne szereplő enzimek jó gyógyszer-célpontként szolgálhatnak. Egyrészt a dUMP termelése kizárólagosan a dCTP dezamináz és dUTPáz reakciókon keresztül történik [9]. A dCTP dezaminálását a dCTP dezamináz (Dcd), *M. tuberculosis* esetén a bifunkciós Dcd:dut végzi. A sejtben keletkező dUTP-t a Dut enzim bontja dUMP-vé, a timidilát szintáz enzimek szubsztrátjává. A bifunkciós Dcd:dut dUTPáz aktivitással is rendelkezik, ezáltal *M. tuberculosis*-ban két enzim is képes a dUTP hidrolízisére. Még nem ismert, hogy a többi mikobakteriális faj enzime is rendelkezik-e dUTPáz aktivitással, ezért bioinformatikai analízissel megvizsgáltuk a mikobakteriális Dcd enzimeket. A vizsgálat eredményeit később, az Eredmények fejezetben ismertetem. Másrészt a legtöbb élőlény genomjában csak az egyik timidilát szintáz gén van kódolva, viszont mikobaktériumokban mindkét típusú enzim (ThyA, ThyX) génje megtalálható. A *thyX* kiütése letálisnak bizonyult a másik timidilát szintáz (ThyA) megléte mellett is, ezért hatékony és specifikus gyógyszer-célpontnak bizonyulhat a tuberkulózis elleni gyógyszer fejlesztésben [15].

Az általunk modellként használni kívánt mikobaktériumok ezért ideális modell szervezetek lehetnek a dUTPáz reakció sejtbeli vizsgálatára, valamint egy esetleges új gyógyszer-célpont azonosítása nagy hatással lehet a tuberkulózis ellen irányuló gyógyszerkutatásra.

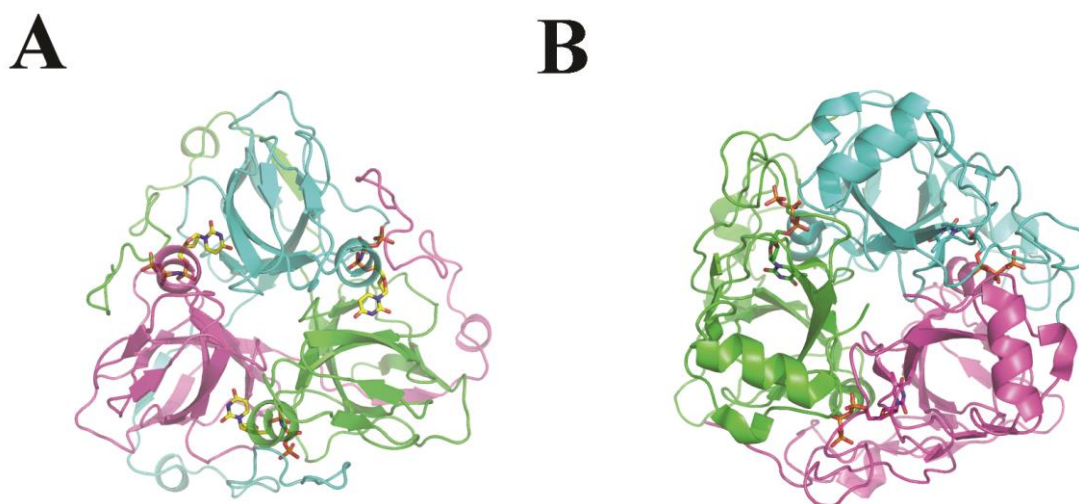
### 1.1.3 A dUTPáz reakció szerepe a timidilát bioszintézisében

A dCMP útvonallal rendelkező élőlényekben a dUMP fő forrása a Dctd enzim által katalizált dCMP dezamináció, valamint a dUTPáz enzim által katalizált hidrolízis reakció. Ezzel ellentétben a dCTP útvonallal rendelkező élőlényekben csak a dUTPáz reakción keresztül keletkezhet a timidilátszintézishez nélkülözhetetlen dUMP [7]. Ezekben az élőlényekben a Dut enzim kiütése gyakran letalitást, vagy timidin auxotrófiát eredményez. Bonyolítja az okozott fenotípus pontos megértését, hogy egyes esetekben, pl. a dCTP útvonalat és menekítő útvonalat is tartalmazó *E. coli*-ban a *dut*- letalitás menekíthető az *ung* (uracil DNS glikoziláz enzim) csendesítésével és a *dut*-, *ung*- genotípusú baktérium timidint tartalmazó táptalajon való növesztésével [16]. Ez arra utal, hogy a dUTPáz enzim genomi integritás megőrzésében játszott szerepe is nagyon fontos. Hasonlóan, a dCMP útvonalat kódoló *S. cerevisiae* és *C. elegans* esetében a *dut*- fenotípus szintén menekíthető az *ung* inaktivációjával [17,18]. Ezzel szemben a menekítő útvonalakat nem tartalmazó *Trypanosoma brucei* esetén a *dut* csendesítése nem menekíthető az *ung* inaktivációjával, sőt a hibajavító enzim elrontása súlyosbítja a *dut* csendesítés citotoxikus hatásait [19]. A különböző élőlények dUTPáz enzimét érintő manipulációk (kiütés, mutációk, csendesítés) hatását taglaló irodalmi adatokat a függelékben található táblázatban foglaltam össze. Mikobaktériumokban szintén nincs menekítő útvonal, így ezekben az élőlényekben a timidilát bioszintézis kizárólag a dCTP dezamináz és dUTPáz reakciókon alapul. *M. tuberculosis*-ban a dUTPáz mellett a dCTP dezamináz enzimnek szintén van dUTPáz aktivitása [11], megerősítve ezzel a reakció fontosságát a baktériumban.

### 1.1.4 A dUTPáz szupercsalád

A dUTPáz szupercsaládba tartozó enzimek (Dut, Dcd és Dcd:dut) szerkezetileg és szekvenciálisan is nagyon hasonlóak (2. Ábra), egymással homológok. Míg a Dcd és a Dcd:dut enzimek jellemzően csak a dCTP dezaminációján keresztül vezető útvonal enzimeiként fordulnak elő, addig a dUTPáz az élővilágban általánosan elterjedt. Egyes élőlényekben a dUTPáz reakciót a homotrimer dUTPáz helyett a dUTPáz szupercsaláddal nem homológ, dimer szerkezetű dUTPáz enzimek katalizálják [20,21]. A katalitikusan aktív enzim három alegységből épül fel a szupercsalád minden enzime esetében. A középpontos szimmetriával rendelkező homotrimer enzimben az egyes alegységek egy központi csatornát ölelnek körül. Az aktív helyek a szomszédos alegységek határán alakulnak ki, kialakulásukhoz az egyes alegységek C-terminális flexibilis karja is hozzájárul. Habár az enzimmagok az egyes enzimcsaládokban szerkezetileg nagyon hasonlóak, a N- és C-

terminális részek között apró különbségek találhatóak. A dUTPázok esetében az egyes alegységek C-terminális karja néhány kivételtől eltekintve a távoli alegységek által közrezárt aktív hely kialakításában vesz részt, ezzel szemben a Dcd és Dcd:dut enzimekben a C-terminális kar visszahajlásával a saját alegységéhez közeli aktív hely kialakításában vesz részt. Ezen túlmenően a dUTPázokban erősen konzervált, a  $\gamma$ -foszfát koordinálásában és az átmeneti állapot stabilizálásában szerepet játszó P-loop-szerű V. motívum [22] a Dcd és Dcd:dut enzimekben hiányzik. Mindhárom enzim esetében a C-terminális kar csak szubsztrát-kötött állapotban látszik a kristályszerkezetben, ami azt jelenti, hogy a szubsztrát kötődése rendezi és stabilizálja az amúgy flexibilis kart. Emellett az aktív helyek felépítése is nagyon hasonló a katalizált reakciók rokonsága miatt. Ennek köszönhető, hogy a bifunkciós Dcd:dut enzim egyazon aktív helyen mindkét reakciót képes katalizálni [23].



**2. Ábra. A *M. tuberculosis* dUTPáz a bifunkciós dCTP dezamináz:dUTPáz szerkezete.** A) A *M. tuberculosis* dUTPáz (PDB: 2PY4) és B) a *M. tuberculosis* bifunkciós dCTP dezamináz:dUTPáz (PDB: 2QLP) szerkezete. Látható, hogy a két enzim szerkezete nagyon hasonló, kivéve a C-terminális kar elhelyezkedését, valamint a Dcd:dut egy-egy  $\alpha$ -helikális inszerciót tartalmaz az N-terminális régióban. A szubsztrátot ( $\alpha$ - $\beta$ -imido-dUTP (dUPNPP), illetve dTTP) pálcika ábrázolással, atomi színezéssel ábrázoltuk (sárga szénatomok a dUPNPP esetén), az alegységeket külön színeztük. Az ábrák PyMol szoftverrel készültek.

### 1.1.5 A mikobakteriális dUTPáz enzim

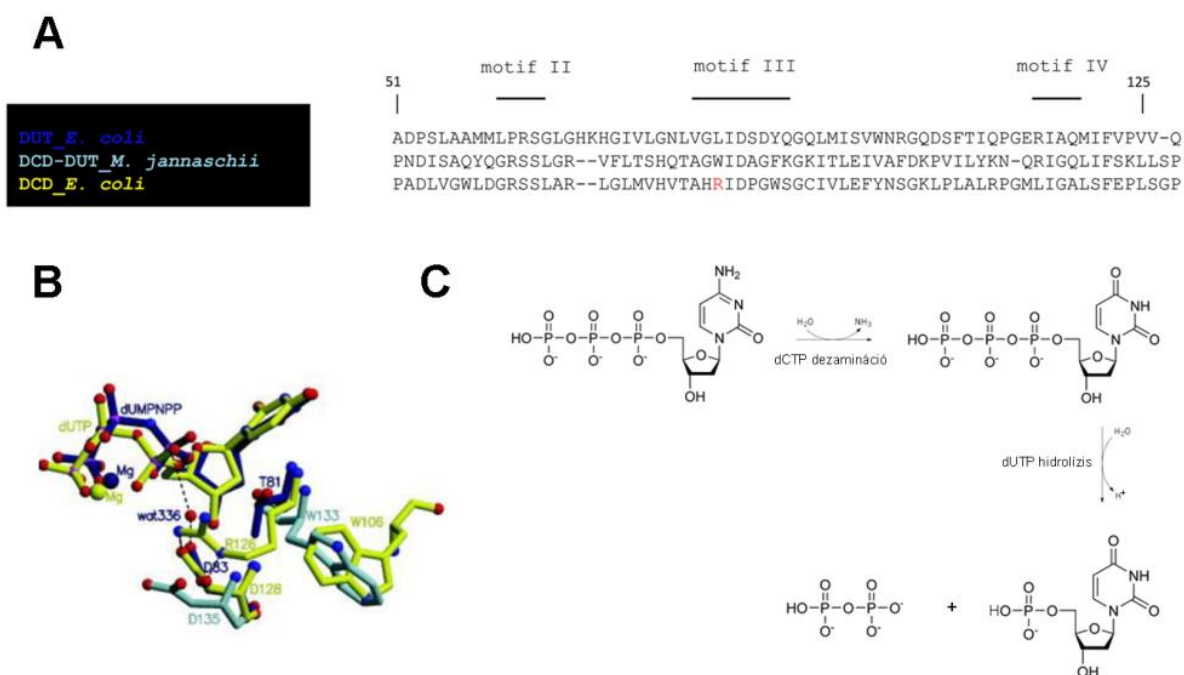
A dUTPáz enzimek a dUTP foszfát láncának hidrolitikus hasítását katalizálják az  $\alpha$  és  $\beta$  foszfát között. A reakció végterméke dUMP és pirofoszfát, valamint a katalízis közben proton szabadul fel. A homotrimer enzim három aktív helyet is tartalmaz, melyek az alegységek közötti árokban helyezkednek el. A hatékony katalízishez mind az öt konzervált motívum (I-V. motívum) szükséges mindhárom alegységből [9]. Egy-egy aktív helyet az első alegység I.,

II. és IV. motívuma, a második alegység III. motívuma és a harmadik alegység C-terminális karján található V. motívuma alakít ki. A C-terminális kar konzervált V. motívuma egy P-loop szerű motívum, ami a nukleotid hidrolízist katalizáló enzimekre jellemző és számos hidrogén-híd és ionos kölcsönhatást létesít a dUTP foszfát láncával, amelyek szükségesek a hidrolízishez kedvező konformációjú aktív hely kialakulásához. A szubsztrát megkötése rendkívül specifikus [24], a Mg•dUTP koordinálásában a II-IV. motívumok vesznek részt. A harmadik motívumban található erősen konzervált aszpartát (Asp83 *M. tuberculosis* enzim esetén) felelős a katalitikus víz aktivációjáért, amely nukleofil támadást indít a dUTP  $\alpha$ -foszfát csoportján, a reakció végterméke dUMP és pirofoszfát [25]. A *M. tuberculosis* dUTPáz központi csatornájában az eukarióta és virális enzimek központi csatornájával szemben hidrofób kölcsönhatások jönnek létre, ezáltal stabilizálva a homotrimer szerkezetet. A mikobakteriális enzim felszínén megfigyelhető egy jellegzetes hurok motívum a kristályszerkezetben (PDB: 2PY4), amely jól megkülönbözteti a mikobakteriális dUTPázokat a többi faj enzimétől.

#### 1.1.6 A mikobakteriális bifunkciós dCTP dezamináz: dUTPáz enzim

A korábban dCTP dezaminázként annotált *M. tuberculosis* bifunkciós dCTP dezamináz: dUTPáz enzim a dCTP dezaminációját és a reakcióban keletkező dUTP trifoszfát-hidrolízisét is katalizálja, tehát dCTP-ből kapcsolt reakcióban állítja elő a dTTP bioszintézis prekursorát, a dUMP-t [11] (3. Ábra). A bifunkciós Dcd:dut enzim tartalmazza a dUTPáz szupercsalád enzimeire jellemző I-IV. konzervált motívumot, viszont a dUTPázokra jellemző V. motívumot nem tartalmazza, hasonlóan a dCTP dezamináz enzimekhez. A dUTPáz reakció meglétéhez elengedhetetlen aminosavak (Ser102, Asp119 és Gln148; *M. tuberculosis* Dcd:dut számozás, [11]) konzerváltak a *M. tuberculosis* és *M. jannaschii* bifunkciós Dcd:dut enzimekben, valamint a konvencionális dUTPázokban is. A katalitikus víz koordinációjáért felelős Asp119 aminosav a dUTPázokban interakcióba lép a kötött nukleotid 3'-OH csoportjával [25]. Ez az aszpartát az egész szupercsaládban konzervált. A monofunkciós dCTP dezaminázok ellenben tartalmazznak egy erősen konzervált arginint (Arg126 *E. coli* Dcd enzimben), amely elfoglalja a katalitikus víz helyét a szerkezetben, valamint sóhidat képez a katalitikus aszpartáttal (Asp128 *E. coli*-ban) (2. Ábra). Emiatt a monofunkciós dCTP dezaminázokban nem mehet végbe a dUTPáz reakció [23]. A dUTP-t hidrolizálni képes bifunkciós Dcd:dut enzimekben (*M. jannaschii*, *M. tuberculosis*) arginin helyett ebben a pozícióban egy aromás aminosav van (Phe, Trp). A monofunkciós dUTPázokhoz [26] képest

ezekben az enzimekben több nagyságrenddel kisebb a dUTP hidrolízisének katalitikus hatékonysága [11].



**3. Ábra. A dCTP deamináz és dUTPáz reakció és a reakcióhoz szükséges aminosavak.** A) *E. coli* dCTP deamináz, dUTPáz és *M. jannaschii* bifunkciós dCTP deamináz:dUTPáz szekvenciák többszörös illesztése. A monofunkcionalitásért felelős Arg126 aminosavat pirossal emeltük ki. B) *E. coli* dCTP deamináz (sárga), *M. jannaschii* bifunkciós dCTP deamináz:dUTPáz (PDB: 1OGH, világoskék) és *E. coli* dUTPáz (PDB: 1DUD, sötétkék) enzimek aktív helyének egymásra illesztett szerkezete. Az ábra Eva Johansson et al. J. Biol. Chem. 2005 cikkéből [27] származik. C) A dCTP deamináz és dUTPáz reakció. A bifunkciós dCTP deamináz:dUTPáz enzim mindkét reakciót, a dUTPáz csak a dUTP foszfát láncának hidrolitikus hasítását katalizálja az  $\alpha$  és  $\beta$  foszfát között.

Random mutagenézisen alapuló kísérletek szerint a bifunkciós enzim jelenléte nem szükséges a *M. tuberculosis* baktérium növekedéséhez, ezzel ellentétben a Dut enzimet esszenciálisnak prediktálták [28,29].

### 1.1.7 Menekítő útvonalak

A legtöbb élőlény a *de novo* timidilát bioszintézis útvonalakon kívül rendelkezik egyfajta menekítő útvonallal, mely az intracellulárisan elérhető timidin foszforilálásán alapul. Ezt a reakciót a timidin kináz (Tk) enzim katalizálja. Az emlősök többféle dezoxinukleotid kinázzal is rendelkezhetnek [30], viszont a Gram pozitív baktériumok általában csak egy, a humán Tk1 enzimmel homológ timidin kinázt, míg a Gram negatív baktériumok egy evolúciósan független timidin kinázt kódolnak [31]. A timidin kinázok szerepe a *de novo* bioszintézis

útvonalak és a dNTP metabolizmus zavara során értékelődhet fel, valamint fontos orvosi biológiai szerepük is van, ugyanis a vírus és rákellenes terápiákban használatos különböző dezoxiribonukleozid analógok aktiválásában fontos szerepet töltenek be. Egyes baktériumok, mint például a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Helicobacter pylori*, valamint a *M. tuberculosis*, nem kódolnak timidin kinázt a genomjukban [31], ez arra utal, hogy a timidin kináz valószínűleg elveszett az evolúció során néhány baktérium esetében. Az általunk modellorganizmusként használni kívánt mikobaktériumok ezért is ideális modell szervezetek a dUTPáz reakció sejtbeli vizsgálatára, hiszen ezekben az élőlényekben a timidilát bioszintézise kizárólag a dCTP dezamináz és dUTPáz reakciókon keresztül folyik. Az útvonal konzerváltságát a génuszon belül az eredmények szekcióban mutatom be.

## 1.2 A nukleotid anyagcsere hatása a DNS összetételére és a genom integritására

A DNS-t felépítő nukleotid komponensek sejtbeli koncentrációja nem egyenlő, ráadásul a nukleotid készletben fellelhető arányaik a DNS-beli előfordulásukat sem tükrözik. Például a dTTP sejtbeli koncentrációja a legmagasabb ( $37 \pm 30 \mu\text{M}$ ), míg a dATP koncentrációja csak  $24 \pm 22 \mu\text{M}$ , ezzel szemben a dCTP sejtbeli koncentrációja  $29 \pm 19 \mu\text{M}$ , míg a dGTP koncentrációja csak  $5,2 \pm 4,5 \mu\text{M}$  [32] egy átlagos sejtben. Az egyes nukleotidok sejtbeli koncentrációjának pontos szabályozása elengedhetetlen a genom hatékony és pontos replikációjához, valamint a genomi integritás fenntartásához [33,34].

### 1.2.1 A dNTP arányok és a mutagenézis

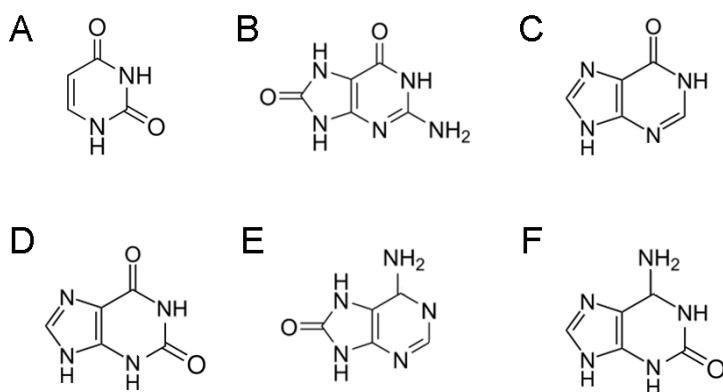
Több tanulmányban is leírták, hogy a dNTP készletbeli egyensúly felborulása mutagén hatású lehet [3,4,35,36]. Kumar és kollégái azt találták, hogy az egyensúly kismértékű dNTP eltolódása is erősen mutagén hatású volt *Saccharomyces cerevisiae*-ben, habár a különböző egyensúlytalanságok mértéke nem korrelált direkt módon a mutagén hatás mértékével [37].

A sejtbeli nukleotidok koncentrációjának megemelkedése szintén jelentős mutátor hatást okozhat [38,39]. Wheeler és munkatársai az Nrd enzim túltermelésével a nukleotid koncentrációk arányos növekedését idézték elő *E. coli*-ban, ami a dNTP készlet növelése mellett a mutációs gyakoriságot is jelentősen fokozta [40]. Ez azzal magyarázható, hogy a DNS polimerázok kettős aktivitásának (nukleotid beépítés vs. hibajavítás) egyensúlya ideiglenesen eltolódik a nukleotid beépítés javára, ezzel csökkentve a polimeráz proofreading aktivitását [38]. Vagyis miután a polimeráz beépít egy nukleotidot és továbbmozdul a replikálódó DNS-en, a következő dNTP beépítéséig kijavíthatja a hibásan beépült nukleotidot. Amennyiben a következő nukleotidnak megfelelő dNTP lokális koncentrációja magas, a nukleotid beépülése

gyorsabb lesz, csökkentve ezzel a hibajavításra fordítható időt és ezzel a javítás hatékonyságát a korábban beépült nukleotidra nézve. Ezt az irodalomban következő nukleotid effektusnak ('next nucleotide effect') nevezik. A dNTP készlet megnövekedése általános válasz a DNS károsodás okozta stresszre [1,2,39] és valószínűleg a genotoxikus stressz tolerálására szolgálhat, ugyanis a mutációs ráta átmeneti növekedésével lehetőség nyílik az adaptációs folyamatok felgyorsítására. Abban viszont nincs egyetértés, hogy a dNTP készlet depléciója milyen hatással van a mutációs rátára és a genomi integritásra. Bester és munkatársai azt találták, hogy a karcinogenezisben túlexpresszált gének inaktivációja csökkenti a dNTP készletet a genom instabilitását okozva [41]. Ezzel ellentétben a dNTP készlet csökkentése Laureti és munkatársai szerint növelte a replikáció hűségét [42].

### 1.2.2 A nem konvencionális nukleotidok beépülése a DNS-be

Az előbbieken bemutatott példákon keresztül láthattuk, hogy a nukleotid készletben fellelhető arányok eltolódása, vagy az össznukleotid készlet mennyiségének megváltozása mind mutagén hatású lehet. A DNS-ben azonban megjelenhetnek a konvencionális nukleotidoktól eltérő módosult szerkezetű bázisok is. A bázisok módosulása történhet a DNS-en, illetve a környezeti hatásoknak sokkal nagyobb mértékben kitett nukleotid készletben is. A módosult bázisok gyakran az eredeti bázistól eltérő kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek és különböző mértékben mutagén hatásúak is lehetnek. Ezek a bázisok a konvencionális bázisok metabolikus útvonalának enzimeit által (pl. dUTP), vagy valamilyen környezeti stressz által (pl. 8-oxo-dGTP) módosított származékai. A sejt metabolikus útvonalai ugyanis állandó jelleggel termelnek különböző melléktermékeket, valamint különböző stresszhatások (pl. oxidatív stressz) által is módosulhatnak a már megszintetizált nukleotidok. A környezeti hatások mellett a sejt normál metabolikus útvonalaiban is keletkezhetnek toxikus anyagok. A legismertebb ilyen stresszorok a sejtlégzés során keletkező reaktív oxigén gyökök. A leggyakrabban előforduló nem kanonikus nukleotidok a dUTP, 8-oxo-dGTP, 8-oxo-dATP, dITP, dXTP, illetve a 2-oxo-dATP (4. Ábra), melyek valamelyik kanonikus nukleotid dezaminálódásával, illetve oxidálódásával keletkeznek.



**4. Ábra. Gyakran előforduló természetes bázis módosulások.** A) Uracil B) 8-oxo-Guanin C) Inozin D) Xantin E) 8-oxo-Adenin F) 2-oxo-Adenin

A különböző DNS polimerázok ugyan magas szelektivitást mutatnak a dezoxiribonukleotidokra (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) a ribonukleotidokkal (ATP, UTP, CTP, GTP) szemben, de az első szénatomon elhelyezkedő bázissal szemben csak nagyon limitált szelektivitást mutatnak. Kincaid és munkatársai azt találták, hogy az általuk vizsgált polimerázok a bázis helyén szubsztituált benzimidazolokat tartalmazó nem konvencionális nukleotidokat is elfogadták szubsztrátként [43]. Ehhez hasonló módon számos nem kanonikus nukleotid képes beépülni a genomi DNS-be a replikáció során, melyek eltérő kémiai tulajdonságaik miatt nem a megfelelő bázissal szemben beépülve mutációkat hozhatnak létre. A nem kanonikus nukleotidok hidrolizálása és ezáltal a nukleotid készlet tisztán tartása megfelelő védekezésként szolgálhat a sejtben a DNS károsodások létrejöttének megakadályozására. Az ilyen nukleotid-hidroláz enzimek, az úgynevezett 'house-cleaning' enzimek párhuzamosan dolgoznak a már a polimerázok által beépített, vagy a DNS-en keletkező nem konvencionális bázisok javításán dolgozó rendszerekkel, ezáltal együtt biztosítják a genomi integritás megőrzését. A nem konvencionális nukleotidok eltávolításában szerepet játszó hibajavító rendszerek enzimeit az 1. Táblázatban ismertetem.

Régóta ismert, hogy a replikatív polimerázok a ribonukleozid trifoszfátokat is elfogadhatják szubsztrátként, habár sokkal kisebb valószínűséggel, mint a dezoxi-ribonukleotidokat. Habár a polimerázok a ribonukleotidokat szubsztrátként felismerő képessége nem számottevő a dezoxinukleotidokhoz történő affinitásukhoz képest, a magas sejtbeli koncentrációjuk miatt mégis potenciális veszélyforrást jelenthetnek. Két független tanulmány is körülbelül 1 : 2500 bázisra becsüli a NTP beépülést a replikáció során élesztőben és *E. coli*-ban is [44,45].

### 1.2.3 A nem konvencionális nukleotidok eltávolítása a dNTP készletből, a genom preventív védelme

Mivel a nukleotid hidroláz enzimek szubsztrátjai a kanonikus nukleotidokhoz képest igen kis mennyiségben vannak jelen a sejtben, ezeknél az enzimeknél általában igen magas szubsztrátspecifitást ( $K_M$  a mikromoláris tartományban) figyelhetünk meg. Ezek a nukleotid pirofoszfataz enzimek legalább négy, szerkezetileg különböző szupercsaládba sorolhatóak: Nudix hidrolázok (pl. MutT), trimer dUTPázok, ITPázok és az all- $\alpha$  NTP pirofoszfatazok (pl. MazG) [46] (I. Táblázat). A teljes genomok szekvenálásából és annotálásából származó adatok azt sugallják, hogy a house-cleaning rendszerek számos, egymással analóg és átfedő aktivitással rendelkező enzimekből állnak, valamint a korábbiakban gondoltaknál jóval elterjedtebbek és fontosabb szerepet töltenek be a genom integritásának fenntartásában. A különböző baktériumokban és élesztőben végzett globális mutagenézis tanulmányok arra utalnak, hogy a dUTPáz kivételével a nukleotid hidroláz enzimek általában nem töltenek be esszenciális szerepet [28,47]. Ez valószínűleg az egymással legalább részben átfedő aktivitásuknak köszönhető. Például a 8-oxo-dGTPáz enzimet kódoló *mutT* null-mutációja nem okoz semmilyen jól detektálható fenotipikus változást *E. coli*-ban, viszont a mutációs ráta jelentős (~100-szoros) növekedését okozza [48]. Több tanulmány is igazolta, hogy a különböző mutátor sejtvonalak fitnesze lecsökkent több generációs növesztést követően a mutációk felhalmozása miatt [49,50]. Funchain és munkatársai azt találták, hogy a vizsgált mutátor sejtvonalak legtöbbje körülbelül ~1000 generációt követően kisebb méretű telepeket képzett, 4 % kihalt, 55 % auxotróf lett (minimál táptalajon nem növekedett), valamint a mutátor sejtvonalak 26 %-a hőmérsékletérzékeny is vált [50]. Emellett a house-cleaning enzimekben mutáns sejtvonalak gyakran mutatnak szintetikus letalitást egy másik gén kiütésére (a két gén mutációja külön-külön nem, viszont együtt letális fenotípust eredményez). Például az inozin/xantozin trifoszfatazt kódoló *rdgB*, és a *recA* vagy a *recBC* együttes mutációja is letális *E. coli*-ban [51]. Egy-egy ilyen mutáció következménye többsejtű élőlényekben még látványosabb lehet, például egérben az MTH1, a MutT ortológjának mutációja drasztikusan megemeli a rákos elfajulások előfordulását [52,53].

### 1.2.4 A nem konvencionális nukleotidok eltávolítása a DNS-ből

A nem kanonikus nukleotidok DNS-ből való eltávolításáért különböző hibajavító mechanizmusok felelősek a sejtben. A hiba felismerése a nukleotidok rendellenes bázispárosodásán, ezáltal a DNS szerkezeti torzulásán, vagy közvetlenül a hibás bázis

felismerésén alapul. A direkt javítómechanizmusok többnyire közvetlenül a módosult bázist alakítják vissza az eredeti, konvencionális bázissá.

A báziskivágó javító mechanizmus (BER) glikoziláz enzimei a különböző módosult bázisokat hasítják ki a DNS-ből. Ezek a DNS hélix letapogatásával specifikusan ismerik fel a hibás bázist, majd kifordítják az aktív helyük felé. A monofunkcionális DNS glikozilázok egy katalitikus vízmolekula aktiválásával hasítják az N-glikozidos kötést, a reakció egy ún. abázikus-helyet (AP-helyet) eredményez.

Protein	Funkció	Szerep
MutT1	8-oxoGTP hidrolízis	preventív, a beépülés megelőzése
MutT2		
MutT3		
MutT4		
Dut	dUTP hidrolízis	
Dcd:dut		
RdgB	dITP, dXTP hidrolízise	
MutY	glikoziláz, adenin, guanin, timin kivágása a 8-oxoG-nal szemben	BER (bázis kivágó javítás)
MutM (Fpg1)	glikoziláz, 8-oxoG kivágása, AP-hely endonukleáz aktivitás	
MutM2	pszeudogén, nincs DNS kötődés és glikoziláz aktivitása	
Nth	glikoziláz, oxidált pirimidinek kivágása, AP-hely endonukleáz aktivitás	
Nei1	oxidált pirimidinek kivágása, a guaninnal szemben lévő 8-oxoG-t is javítja, AP-hely endonukleáz aktivitás, dRP csoport eltávolítás	
Nei2		
Ung	uracil kivágás	
UdgB	uracil, hipoxantin, etenocisztein kivágása	
TagA	3-metiladenin and 3-metilguanin kivágása	
Mpg	3-metiladenin kivágása	
End	AP endonukleáz	
XthA	exonukleáz	
UvrA	timin-dimerek, abázikus helyek, DNS keresztkötés, száltörések javítása	NER (nukleotidot kivágó javítás)
UvrB		
UvrC	endonukleáz	
UvrD	DNS helikáz	
Mfd	transzkripcióhoz kapcsolt javítás, Uvr proteinek toborzása	
AlkA	metilált bázisok direkt javítása	Direkt javítás
Ogt	alkilguanin DNS alkiltranszferáz	
PolA	repair szintézis	
LigB, C, D	foszfodiészter kötések ligálása	

**1. Táblázat.** A nem konvencionális nukleotidok eltávolításában szerepet játszó hibajavító rendszerek enzimei mikobaktériumokban

Számos DNS glikoziláz (pl. MutM, Nth) az N-glikozidos kötés hasítása mellett a DNS cukor-foszfát gerincének 3' irányban történő hasítását is katalizálja egyes száltörést létrehozva. A bifunkciós DNS glikozilázok egy része (pl. Nei1, Nei2) emellett a dezoxiribóz-foszfát (dRP) eltávolítását is katalizálja. A monofunkcionális DNS glikozilázok (pl. Ung, MutY) után hátramaradt abázikus helyet az AP endonukleáz (End) processzálja 5'-dRP és 3'-OH szálvégeket eredményezve (I. Táblázat). A báziskivágó javítás kétféle módon történhet a javítás során eltávolított szakasz hosszától függően [54]. Az ún. „short patch” BER során csupán egy nukleotid vágódik ki, míg a „long patch” BER során a 3'-dRP csoportot, illetve további 2-8 nukleotidot egy endonukleáz enzim távolít el. A hiba eltávolítása után a polimeráz és ligáz enzimek segítségével történik a nukleotidok visszaépítése és a DNS végek összekapcsolása.

Dolgozatomban szempontjából fontos szerepe van az uracil kivágásában szerepet játszó uracil DNS glikoziláz (Udg) enzimeknek. A szupercsalád fő képviselője az evolúciósan igen elterjedt és sikeres Ung enzim, mely baktériumokban és eukariótákban egyaránt jelen lehet. Az Ung enzim mellett az emlősök további három, uracil javításában szerepet játszó enzimet (Tdg, Smug, Mbd4) kódolnak, míg a mikobaktériumok egy további enzimet (UdgB), mely az archea típusú enzimekkel mutat homológiát [55]. Az Udg enzimek fontos szerepet töltenek be a genomi integritás fenntartásában, ugyanis a pirimidin és purin bázisok spontán dezaminálódása igen gyakori folyamat mind a szabad nukleotidoknál, mind a DNS-be már beépült nukleotidok szintjén. Például ismert, hogy a virális genom uracilosodása erősen befolyásolja a HIV vírus fertőző képességét [56,57]. Ezért a vírusok nagyrésze dUTPáz és / vagy Ung enzimet kódol [58,59]. Ezzel szemben ismert, hogy a *Bacillus subtilis* PBS2 fág uracil szubsztituált genomot tart fenn, és az Ugi fehérje termelésével gátolja a gazdasejt Ung enzimének működését a fág genom fragmentálódásának elkerülése érdekében [60].

A hibás pár javítás (MMR) a hibás párok okozta helytelen illeszkedés miatti DNS szerkezetbeli torzulások felismerésére specializálódott. A hibás pár felismerését baktériumokban a MutS végzi, amely homodimer formában aktív. A felismerést követően a szintén homodimer MutL kötődik a komplexhez. A hibás pár mutáns nukleotidjának meghatározása szempontjából kulcsfontosságú lépés, hogy a rendszer meg tudja különböztetni a frissen szintetizálódott DNS szálat a régitől. A DNS szál diszkriminációja baktériumok esetén a GATC szekvenciák segítségével történik, melyek adeninje metilált (G meATC) a régi szálon. Ezzel ellentétben eukariótákban még nem ismert a szál diszkrimináció pontos mechanizmusa. A MutH endonukleáz a metilátlan GATC motívum

alapján a frissen szintetizált szálát ismeri fel és hasítja el. A MMR több kilobázis hosszúságú nukleotid szakasz eltávolításával jár, ami a sejt számára energetikailag megterhelő. Érdekes, hogy mikobaktériumokban nincsenek jelen a MMR rendszer enzimeinek homológjai. Ezen hibajavító enzimek hiánya hozzájárulhat a mikobaktérium fajok különösen jó adaptálódási képességéhez is [61]. Ismert, hogy a *M. tuberculosis*-ban gyakran fellépő gyógyszer rezisztencia mutációk nagyrészt pontmutációk segítségével alakulnak ki [62], míg *E. coli* vagy *S. aureus* esetén a horizontális géntranszferrel továbbított rezisztencia markerek terjedése sokkal jelentősebb [63,64].

A nukleotid kivágó javítás (NER) nagyobb, a DNS kettős hélixet torzító módosulások eltávolítására specializálódott. Fontos szerepe van a nukleotidok közötti keresztkötések és beékelődő komplexek javításában. *E. coli*-ban az UvrA-UvrB komplex végzi a DNS szerkezeti torzulásának felismerését, míg az endonukleáz aktivitásért az UvrC, a DNS szál kitekeréséért pedig a helikáz aktivitással bíró UvrD felelős (1. Táblázat). A nukleotid kivágó javító mechanizmusok emellett rendkívül fontosak az ultraviola (UV) sugárzás okozta DNS károsodások javításában, például az *uvrA*, *uvrB* és *uvrC* mutáns *Halobacterium* törzsek hiperszenzitívnek bizonyultak az UV sugárzás okozta DNS károsodásokra [65].

### 1.3 A DNS károsodásra adott sejtválasz: az „SOS response”

A különböző genotoxikus anyagok, hatások okozta DNS károsodás és a replikáció megakadása során indukálódó úgynevezett SOS válasz Gram pozitív és Gram negatív baktériumokban egyaránt általánosan előforduló jelenség, amely a sejtciklus és a sejtosztódás megakadásával jár [66]. A sejtciklus leállításával lehetősége van a DNS hibajavító rendszereknek a DNS károsodások (például száltörések) javítására. Az SOS regulon génjeit a LexA és a RecA proteinek szabályozzák [66]. A sejtben az elakadó replikációs komplex közelében jelenlévő szimpla szálú DNS szakasz szolgál az SOS válasz indukálásához szükséges szignálként, ehhez kötődik hozzá a RecA. Az aktív RecA a DNS kötése miatt bekövetkező konformációváltozással jön létre valamilyen nukleozid trifoszfát, általában (d)ATP jelenlétében. Ezek után a RecA indukálja az SOS regulon represszorának, a LexA fehérjének katalitikus önhasítását [67]. A represszor inaktiválásával számos SOS gén (jelenleg több, mint 30 ismert gén) expresszálódik [68–70]. A különböző SOS gének indukációjának időbeli lefolyását a LexA represszor kötődésének affinitása határozza meg a különböző úgynevezett SOS-box szabályozó régiókhoz. A korai SOS válasz során hibamentes (error-free) javító folyamatok indukálódnak, viszont ha a DNS károsodása nagymértékű volt,

úgynevezett error-prone útvonalak is aktiválódnak, ezzel átmenetileg megnövelve a baktérium mutációs rátáját. *E. coli*-ban az SOS válasz részeként a DNS polimeráz II (*polB*), a DNS polimeráz IV (*dinB*) és a DNS polimeráz V (*umuD*) expressziója indukálódhat [71,72]. A DNS polimeráz IV és V is az Y DNS polimerázok családjába tartozik és nincs „proofreading” aktivitásuk ezért az alacsonyabb fidelitással bíró polimerázok közé sorolják őket. Ugyan a transzléziós DNS szintézis általában magas fidelitással zajlik, de az SOS válasz során indukálódó polimerázok, főként a PolV jóval magasabb rátával épít be mutációt az újonnan szintetizálódó DNS szakaszba [71]. Mivel ekkor a fő prioritás a stresszhatás túlélése, ezért a letális DNS száltörések, léziók kijavítása az elsődleges feladat, míg a genetikai információ pontos visszaállítása csak másodlagos szerepet tölt be. Habár a létrejött mutációk többsége nem előnyös az adott baktériumnak, kis számban a populáció szempontjából előnyös módosulások is létrejöhetnek, melyek hosszú távon evolúciós előnyökkel járhatnak az adott populáció számára az adott stressz túléléséhez. A RecA aktiválódásához a szimpla szálú DNS kötésén kívül nukleozid-trifoszfát kofaktor kötődésére is szükség van. Kimutatták, hogy a különböző (d)NTP-k eltérő hatékonysággal képesek a RecA aktivációját elősegíteni *in vitro* körülmények között, leghatékonyabb aktivátornak a dATP bizonyult, míg a többi nukleotid akár gátolhatta is az aktív konformáció kialakulását [73]. Érdekes módon nukleozidok, vagy szabad bázisok adása a médiumhoz is hasonló hatást vált ki, az adenin adása segíti az SOS válasz kialakulását, míg a citozin vagy guanin adása gátló hatású volt [74]. Hasonlóan, a dCTP nukleotidot túltermelő *ndk* és *dcd* mutánsok kismértékben szupresszálták a konstans SOS indukciót mutató *recA* mutáns *E. coli* sejtvonalak mutátor fenotípusát [35,75]. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a nukleotid készletben fellépő változások befolyásolják a RecA aktivitását, ezáltal pedig befolyásolhatják az SOS válasz kialakulását és lefolyását is. Például az Nrd enzim túltermelése, és ezáltal a dNTP készlet megnövekedése magas mutációs rátát okoz *E. coli*-ban [40,76], azonban Wheeler és munkatársai azt találták, hogy az SOS válasz indukálódása ebben nélkülözhetetlen szerepet játszik [40]. Az előző fejezetek alapján láthatjuk, hogy a sejtbeli dNTP készlet nemcsak a DNS szintézis építőköveiként szolgál, hanem a replikáció fidelitását is nagyban meghatározza. Láthattuk, hogy az egyes nukleotidok egymáshoz viszonyított aránya befolyásolja a DNS polimerázok által beépített hibás bázisok előfordulásának valószínűségét [3,4], valamint a dNTP készlet össz mennyisége meghatározza a polimerázhibák kijavításának lehetőségét is (következő nukleotid effektus) [38]. Ezek alapján várhatóan a replikációhoz hasonlóan az SOS mutagenézis is érzékeny a dNTP készletbeli változásokra.

## 1.4 A timidilát bioszintézis, mint gyógyszercélpont

Mivel a timidilát bioszintézise egy kulcsfontosságú folyamat az élővilágban, ezért az útvonal enzimei számos betegség (rákos, virális megbetegedések) kezelésére kedvelt célpontként szolgálnak. Kemoterápiás kezelésekben gyakran alkalmazzák például az 5-fluorouracil származékokat (5-fluorouracil (5FU) és 5-fluoro-dezoxiuridin (5FdU)), amelyek metabolitja, az 5-fluoro-dUMP a timidilát szintáz irrevezibilis inhibitora [77,78]. A fluorouracil származékok mellett számos antifolát analóg is létezik, amely hatással van a timidilát bioszintézisre. A metotrexát (MTX) a Dhfr ismert inhibitora, ugyanis a timidilát szintáz reakcióhoz szükséges metil transzfer létrejöttét gátolja a folát ciklus gátlása révén [79]. Más antifolát származékok, mint a raltitrexed (RTX vagy más néven tomudex, TDX) közvetlenül a timidilát szintáz enzimet gátolják [80–82].

A mikobaktériumok közé olyan veszélyes kórokozók tartoznak, mint a tuberkulózist okozó *M. tuberculosis*, a leprás megbetegedéseket okozó *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), vagy a Buruli ulcer nevű, Közép- és Dél-Afrikában előforduló betegség okozója a *Mycobacterium ulcerans* (*M. ulcerans*) és a szarvasmarhát és embert egyaránt fertőzni képes, tuberkulózis szerű betegséget okozó *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Az előbbieken felsorolt betegségek közül a tuberkulózis okozza a legnagyobb problémát világszerte, leginkább a drogrezisztens törzsek terjedése miatt. Ezért sürgető igény jelentkezett új gyógyszer hatóanyagok felfedezése iránt, melyek alternatívát jelenthetnek a manapság használatos kombinált kezelésekre. A timidilát szintáz reakció gátlására már számos inhibitor használnak, viszont mikobaktériumokban a dUTPáz reakció is fontos célpont lehet kizárólagos szerepe miatt. Emellett, a mikobakteriális dUTPáz kristályszerkezetében látható egy mikobaktérium-specifikus felszíni struktúra, amely nem található meg a humán és más fajok dUTPázainak kristályszerkezetében. Amennyiben ez a felszíni motívum fontos szerepet játszik az enzim aktivitásában, jó lehetőséget kínál különböző gyógyszer-molekulák tervezéséhez, melyek szelektíven csak a mikobakteriális dUTPázra fejtenék ki hatásukat.

### 1.4.1 Specifikus dUTPáz inhibitorok

Az utóbbi években különböző kutatócsoportok több kismolekulás dUTPáz inhibitor is leírtak [83–85]. Azonban fehérje jellegű dUTPáz inhibitor csak az utóbbi időben sikerült felfedezni [86,87]. Lehetséges dUTPáz inhibitorok jelenlétét korábban már több fajban is leírták (*PBS2* bakteriofág fertőzött *B. subtilis* sejtekben és *Drosophila melanogaster* sejt extraktumokban

[88,89]), de egyik esetben sem sikerült az inhibítort izolálni, vagy a gátlást molekuláris szinten is bizonyítani.

#### 1.4.2 Az Stl felfedezése és szerepe

2010-ben a Nature folyóiratban megjelent egy cikk, melyben specifikus interakciót írtak le egy *Staphylococcus aureus* eredetű represszor fehérje és a baktériumot fertőző fág dUTPáza között [86]. Ez a represszor fehérje, az Stl a *S. aureus* egyik patogenicitási szigetének, a SaPI<sub>bov1</sub> (*Staphylococcus aureus* Pathogenicity Island) kifejeződését gátolja. A patogenicitási szigetek a genomba integrálódott, mobilis genetikai elemek, amelyek a kórokozó virulenciáját fokozó géneket (toxínokat, adhézións faktorokat és antibiotikum rezisztencia faktorokat) kódolnak. A patogenicitási szigetek horizontális géntranszferrel történő továbbadása komoly egészségügyi veszélyeket rejt, különösen az MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) törzsek esetén [90]. A *S. aureus* manapság az egyik legelterjedtebb potenciális emberi kórokozó, az egészséges emberek 20-30 %-ának bőrén megtalálható. A baktérium általában nem kódolja a patogenicitási sziget horizontális géntranszferéhez szükséges fehérjét, a transzdukción megvalósításához leggyakrabban ún. helper fágokat használnak [91,92]. Helper fágok hiányában a SaPI kifejeződését egy a patogenicitási szigeten kódolt mester represszor, az Stl gátolja. Helper fág fertőzés vagy profág aktiváció hatására azonban a patogenicitási sziget aktiválódhat. Ugyanis a helper fág egy olyan fehérjét kódol, ami specifikus interakcióval megszünteti az Stl gátló hatását, ezáltal a patogenicitási sziget genomból történő kivágódásáért és az azt követő replikációjáért felelős fehérjét kódoló gének kifejeződhetnek. A patogenicitási sziget a kivágódást és replikációt követően a baktériumot fertőző helper fág által kódolt fág részecskébe csomagolódik, majd a baktérium lízise után újabb sejteket képes fertőzni [92]. A különböző patogenicitási szigetek derepresszálásáért különböző fágok által kódolt fehérjék (pl. SaPI<sub>bov1</sub> esetén a  $\Phi 11$  fág dUTPáz) felelősek. A SaPI<sub>bov1</sub> derepresszió esetén  $\Phi 11$  fág dUTPáza specifikus kölcsönhatást alakít ki az Stl fehérjével, ezáltal megszünteti az Stl és a DNS közötti kölcsönhatást és lehetővé teszi a patogenicitási sziget aktivációját [86,87].

#### 1.4.3 Az Stl, mint lehetséges általános dUTPáz inhibitor

Csoportunkban ezután Szabó Judit Eszter és munkatársai részletesen karakterizálták a kölcsönhatást az Stl és a  $\Phi 11$  fág dUTPáza között és leírták, hogy a két fehérje által alkotott komplexben a dUTPáz aktivitása közel 100 %-ban gátolt. Viszont csak akkor tudták az enzimaktivitás gátlását kimutatni, ha az aktivitásmérést megelőzően a két fehérjét

előinkubálták egymással. A részletes *in vitro* vizsgálatok arra utaltak, hogy az Stl kötődése sokkal lassabb a dUTPázhoz, mint a szubsztrát dUTP kötődése, valamint a dUTP és az Stl között kompetíció lép fel a dUTPázhoz való kötődés során [87]. Ezek alapján egy lassú, de igen erős kötődést írtak le, valamint egy modellt is közöltek.

A modell szerint a patogenicitási szigetek aktiválódása csak megfelelő, dUTP-mentes környezetben történhet meg. A *S. aureus* törzsek érdekes módon nem kódolják az élővilágban amúgy általánosan elterjedt dUTPáz enzimet. Ezért feltételezhetően a többi élőlénynél magasabb sejtbeli dUTP szinttel rendelkeznek. A helper fág fertőzése után a fág dUTPáza csak azután lesz képes leszorítani az Stl-t a DNS-ről, miután csökkentette a sejtbeli dUTP készletet így biztosítva a patogenicitási sziget uracilmentesen tartását a horizontális géntranszfer alatt [87]. Szintén magasabb sejtbeli dUTP szint és a dUTPáz expresszió csökkenése figyelhető meg differenciálódott immunsejtekben, pl. makrofágokban is, ami a HIV fertőzés során hasonlóan fontos szerepet játszhat [56–58].

Az előzőekben leírtak alapján láthatjuk, hogy az Stl képes gátolni a *S. aureus*  $\Phi 11$  fág dUTPáz enzimaktivitását [87]. Ezek alapján az Stl az első fehérje jellegű inhibítor, ami képes a dUTPáz enzimaktivitásának gátlására. Analóg módon az uracil DNS-glikoziláz (Ung) esetében is létezik egy fág eredetű inhibítor, az Ugi (Uracil glikoziláz inhibítor), ami viszont az Ung enzim aktivitását gátolja [60,93] és emiatt széles körben Ung inhibítorként alkalmazzák.

Az Stl és a  $\Phi 11$  fág dUTPáz közötti interakció részletes feltárása után felmerült, hogy megvizsgáljuk, vajon az Stl más fajokból származó dUTPázokkal is képes-e kölcsönhatni és gátolni őket. Ennek vizsgálatára a humán, *Drosophyla melanogaster*, *E. coli* és *M. tuberculosis* dUTPázok és az Stl közötti kölcsönhatásokat vizsgáltuk meg. Dolgozatomban a *M. tuberculosis* dUTPázzal történő interakció *in vitro* körülmények közötti vizsgálatát és *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) sejtben történő expressziójának hatását vizsgáltam és mutatom be.

## 2 Célkitűzések

Az előző fejezetek alapján láthatjuk, hogy a mikobaktériumok természetesen előforduló modellként szolgálhatnak mind a dUTPáz reakció sejtbeli lefolyásának tanulmányozására, mind a dUTP elimináció és dTTP bioszintézis útvonalak fiziológiás kapcsolódásának felderítésére. Mivel mikobaktériumokban a timidilát bioszintézise kizárólagosan a dUTPáz reakció közreműködésével valósulhat meg, ezekben az organizmusokban nem zavarja a reakció követését más forrásokból megjelenő dUMP vagy dTMP. A menekítő útvonalak általi dTMP szintézis ugyanis más modell organizmusokban gyakran elfedi a dUTPáz reakció hatékonyságának megváltoztatását, például a dUTPáz csendesítése humán sejtekben alig van hatással a dTTP és dUTP szintekre. A képet tovább bonyolítja a dUTPáz genomi integritás fenntartásában betöltött szerepe.

A dUTPáz timidilát bioszintézisében és a genom preventív védelmében betöltött szerepének vizsgálatára az alábbi célokat tűztük ki:

1. dUTPáz kiütésével vizsgálni kívántuk az enzim timidilátszintézisben betöltött szerepének fontosságát.
2. A dUTP elimináció és a dTTP bioszintézis fiziológiás kapcsolódásának, valamint a Dut és a bifunkciós enzim (Dcd-dut) timidilátszintézis útvonalban betöltött szerepét és fiziológiás funkcióját kívántuk feltárni.
3. Valamint célunk volt még egy nemrég felfedezett fehérje természetű dUTPáz inhibitor és a mikobakteriális dUTPáz lehetséges kölcsönhatásának feltárása mind *in vitro*, mind sejtes körülmények között.

### 3 Anyagok és módszerek

#### 3.1 Szekvencia analízis és homológia modellezés

A mikobakteriális timidilátszintézis útvonalban fontos szerepet játszó enzimeket protein-protein BLAST segítségével (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) hasonlítottuk össze, hogy meghatározhassuk a különböző fajok (*M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis*, *M. ulcerans* and *M. marinum*) enzimei közötti hasonlóságot. A blast során az alapértelmezett paramétereket használtuk. Többszörös szekvencia illesztésre a ClustalW szoftvert használtuk. A *M. smegmatis* dCTP dezamináz enzim 3D szerkezetét (Uniprot: A0QQ98) összehasonlító homológia modellezéssel a SWISS-MODEL szerver (<http://swissmodel.expasy.org/>) [94] használatával prediktáltuk. Templátként a *M. tuberculosis* Dcd:dut enzimének apo kristályszerkezetét (PDB: 2QLP) használtuk. A két enzim között 87%-os szekvencia azonosságot találtunk. A létrehozott modell minőségét az ANOLEA [95], QMEAN [96] és PROCHECK [97] programokkal ellenőriztük.

#### 3.2 Bakteriális törzsek, táptalajok és sejtfenntartási körülmények

*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>-155 törzset Lemco (folyadék) médiumban vagy 15 g L<sup>-1</sup> Bacto agart (szilárd táptalaj) tartalmazó Petri-csészében növesztettük az irodalomban leírtaknak megfelelően [98]. A különböző antibiotikumokat (20 µg/ml kanamicin, 100 µg/ml higromicin B, és 10 µg/ml gentamicin) a megadott koncentrációban alkalmaztuk. A rekombináns sejtvonalak szelekciójához a tápoldatokhoz 5 % (wt/v) szukrózt alkalmaztunk. A kék-fehér telepek szelekciójához 40 µg/ml X-Gal-t (5-bróm-4-klór-3-indol-β-D-galaktopiranozid) használtunk.

#### 3.3 A klónozáshoz használt reagensek és körülmények

A restriktós emésztéssel nyert DNS fragmensek valamint PCR amplifikátumok izolálását és tisztítását a Qiagen Gél-izoláló és PCR tisztító Kit-tel végeztük a gyártó használati utasítása szerint. A specifikus PCR termékeket 1%-os agaróz gélen 100 V-on választottuk el. A DNS minták koncentrációját Nanodrop ND-1000 Spektrofotométer (Thermo Scientific) készülékkel határoztuk meg. A klónozási lépéseket valamint a restriktós enzimekkel végzett endonukleáz emésztést a New England Biolabs által gyártott enzimekkel végeztük, standard körülmények között.

### 3.4 DNS konstruktok elektroporálása *M. smegmatis*-ba

Elektrokompetens *M. smegmatis* sejtekbe 0,5-5 µg DNS plazmidot elektroporáltunk. 0,2 cm rés méretű, jégben előhűtött elektroporáló küvettákat (BTX) használtunk. A sejtek elektroporálását egyszeri pulzust alkalmazva X Cell Gene Pulser (Bio-Rad) műszerrel végeztük 2,5 kV feszültség, 25 µF kapacitás, és 1000 Ω ellenállás beállítása mellett. A transzformált sejteket 37 °C-on 2 óráig 150 rpm-en rázattuk 5 mL Lemco tápoldatban. Az inkubációs idő leteltével a baktériumokat 4000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk, majd a sejtszuszpenziót a megfelelő antibiotikumot tartalmazó agar lemezekre szélesztettük ki. Az antibiotikum rezisztens transzformáns kolóniákat 37 °C-os, 4-6 napig tartó inkubáció elteltével izoláltuk.

### 3.5 Rekombináción alapuló allélcseré *Mycobacterium*-ban

Az allélcserékhez egy homológ rekombináción alapuló úgynevezett flexibilis kazetta módszert alkalmaztunk [99]. Az általunk és egyik leggyakrabban használt negatív szelekciós marker a *Bacillus subtilis* *sacB* génje által kódolt levanszukróz, amely a mikobaktériumokban szukróz jelenlétében letalitást okoz [98]. Egy másik hatékonyan alkalmazható marker a kék színreakciót eredményező *lacZ* gén által kódolt β-galaktozidáz [98]. Ha a médium X-galt tartalmaz azok a sejtek amelyek expresszálják a β-galaktozidázt kék színűek lesznek, így a többi kolóniától jól elválaszthatók. A *lacZ* gén indukciójához esetünkben nem szükséges IPTG-t használni, ugyanis a génmeghajtást saját mikobakteriális promotor (*Ag85a*) végzi. A mutáns sejtvonalak létrehozásához egy olyan homológ szakaszt kódoló vektort hoztunk létre, mely nem tartalmaz mikobaktérium-specifikus replikációs origót, így nem képes mikobaktériumban replikálódni. Ezért csak úgy maradhat fent a baktériumban, ha homológ rekombináció segítségével integrálódik a mikobakteriális genomba.

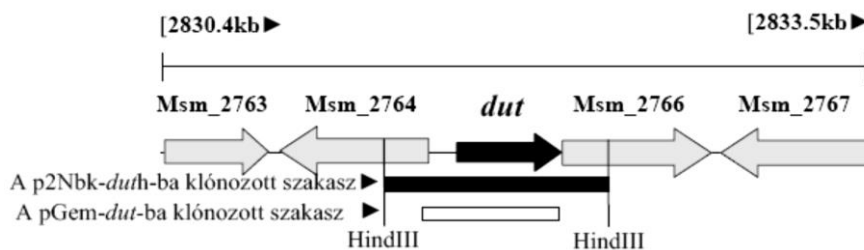
### 3.6 A p2Nbk-duth vektor klónozása a *dut* kiütéséhez

A *dut* kiütéséhez a *M. smegmatis* genomból polimeráz-lánreakcióval (PCR) egy 2,1 kbp méretű szakaszt amplifikáltunk, amely a *dut* gént, továbbá a rekombinációhoz szükséges túlnyúló végeket tartalmazott (5. Ábra). Majd ezt a 2,1 kb méretű szakaszt a p2NIL [99] vektorba klónoztuk *HindIII* restrikciós hely segítségével. A funkcióképtelen dUTPázt kódoló allélt egy higromicin marker kazetta *AgeI* restrikciós helyre történő beklónozása eredményezte, ami által egy 1,8 kb méretű higromicin rezisztenciát kódoló szekvenciával megszakított, azaz funkcióképtelen dUTPázt kódoló *dut* gént kaptunk. A higromicin marker

kazettát a pGOAL19 [99] plazmidról PCR reakcióval amplifikáltuk. Ezután a pGOAL17 plazmidból származó, 6,1 kb méretű LacZ és SacB szelekciós markereket tartalmazó kazettát a p2NIL vektorba klónoztuk a vektor *PacI* restrikciós helyét felhasználva (6. Ábra). A klónozásokhoz és a mutációk létrehozásához tervezett és felhasznált primereket a függelékben tüntettem fel. A DNS konstrukciókat ezután minden esetben restrikciós emésztéssel, valamint szekvenálással ellenőriztük (Eurofins MWG Operon, Németország).

### 3.7 A vad típusú (wt) és a mutáns komplementáló vektorok klónozása

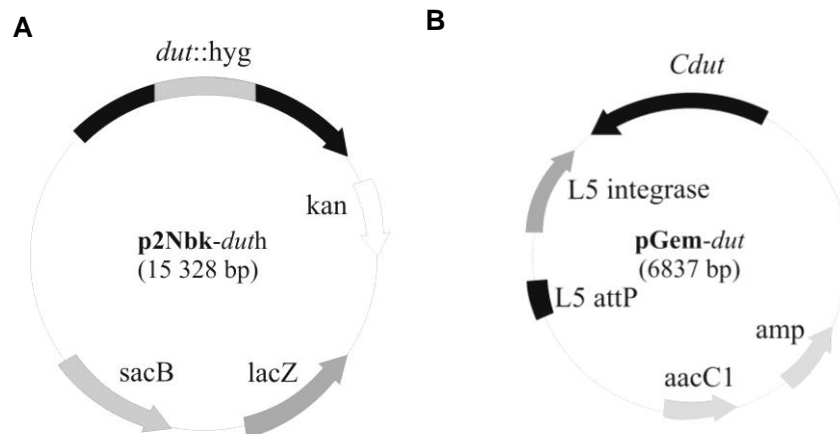
A génkiütés menekítéséhez vad típusú és különböző pontmutáns *dut* gént kódoló komplementáló vektorokat (6. Ábra) hoztunk létre. A wt *dut* komplement vektor (pGem-*dut*) elkészítéséhez a teljes *dut* gént a natív promoterével együtt (5. Ábra) PCR reakcióban felszaporítottuk.



**5. Ábra.** A *M. smegmatis* genom dUTPáz (*dut*) génjének kromoszómális környezete. A vektorok klónozásához szükséges szekvencia részeit fekete illetve fehér téglalappal jelöltem.

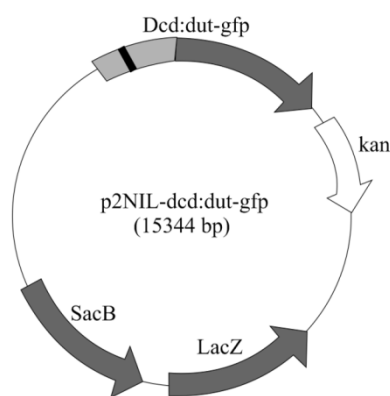
Ezt követően a PCR termék végeire adenin bázisokat szintetizáltattunk Taq polimerázzal, majd a pGEM T-easy vektorba (Promega) klónoztuk. Az antibiotikum szelekcióért és a helyspecifikus integrációért felelős Gm-Int kazettát a pUC-Gm-Int [100] vektorból *HindIII* restrikciós helyek segítségével klónoztuk be.

A mutáns komplementáló vektorokat QuikChange irányított mutagenézis kit-tel (Stratagene) hoztuk létre. A PCR reakcióban templákként a fentiekben ismertetett pGem-*dut* vektort használtuk. A klónozásokhoz és a mutációk létrehozásához tervezett és felhasznált primereket a függelékben tüntettem fel. A konstrukciókat ezután minden esetben restrikciós emésztéssel, valamint szekvenálással ellenőriztük.



**6. Ábra A dUTPáz génkiütött mutáns *M. smegmatis* sejtvonal előállításához készített DNS plazmidok.** **A)** A p2Nbk-duth vektor a dUTPáz kódoló *dut* gént tartalmazza, amelybe egy 1,8 kb higromicin rezisztenciát kódoló marker kazetta lett klónozva, így egy funkcióképtelen enzimet kaptunk (*dut::hyg*). **B)** A funkcióképtelen dUTPáz komplementálásához szükséges pGem-dut vektor, amely a *dut* génszekvenciáját a saját promotorával együtt tartalmazza (*Cdut*). *hyg*= higromicin rezisztencia gén; *kan*= kanamicin rezisztencia gén; *lacZ*=  $\beta$ -galaktozidáz; *sacB*= szukróz rezisztencia gén; *amp*= ampicilin rezisztencia gén; *aacC1*=gentamicin rezisztencia gén; *L5attP*= hely specifikus integrációért felelős szekvencia.

### 3.8 A p2NIL-dcd:dut A115F vektor klónozása



**7. Ábra. Az inaktív mutáns, gfp-vel jelölt *dcd:dut* gént kódoló DNS plazmid.** A p2NIL-dcd:dut-gfp vektor a *dcd:dut* gént tartalmazza, amelyet egy pontmutációval inaktiváltunk és gfp tag-gel jelöltünk. *kan*= kanamicin rezisztencia gén; *lacZ*=  $\beta$ -galaktozidáz; *sacB*= szukróz rezisztencia gén.

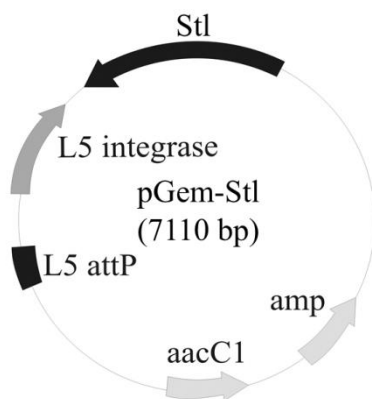
A *dcd:dut* gén inaktiválásához a *M. smegmatis* genomból a *dcd:dut* gént és a rekombinációhoz szükséges túlnyúló végeket tartalmazó 3,5 kb méretű szakaszt amplifikáltunk fel és klónoztunk be a p2NIL [99] vektorba *Hind*III restrikciós hely segítségével. A mutáció létrehozásához a QuikChange módszer egy módosított verzióját [101] használtuk. A pontmutáns *dcd:dut* gén után a zöld fluoreszcens fehérje (*gfp*) mikobaktériumokra optimalizált kódoló régióját fúzionáltattuk [102]. Ezután a pGOAL17 plazmidból [99]

származó 6,1 kb méretű LacZ és SacB szelekciós markereket tartalmazó kazettát a p2NIL vektorba klónoztuk a vektor *Pac*I restrikciós helyét felhasználva (7. Ábra). A klónozásokhoz és a mutációk létrehozásához tervezett és felhasznált primereket a függelékben tüntettem fel.

A DNS konstrukciókat ezután minden esetben restrikciós emésztéssel, valamint szekvenálással ellenőriztük.

### 3.9 A pGem-Stl vektor klónozása

A dUTPáz sejtbeli gátlásához az Stl nevű potenciális dUTPáz inhibítort szeretnénk volna *M. smegmatis* sejtekben expresszálni. A stabil expressziót biztosító vektor elkészítéséhez egy erős promótert (kanamicin rezisztencia gén promótere) szaporítottunk fel a p2NIL plazmidról. A PCR terméke adenin bázisokat szintetizáltattunk Taq polimerázzal, majd a pGem-T-easy vektorba (Promega) klónoztuk. Az antibiotikum szelekcióért és helyspecifikus integrációért felelős Gm-Int kazettát a pUC-Gm-Int [100] vektorból *Hind*III restrikciós helyek segítségével

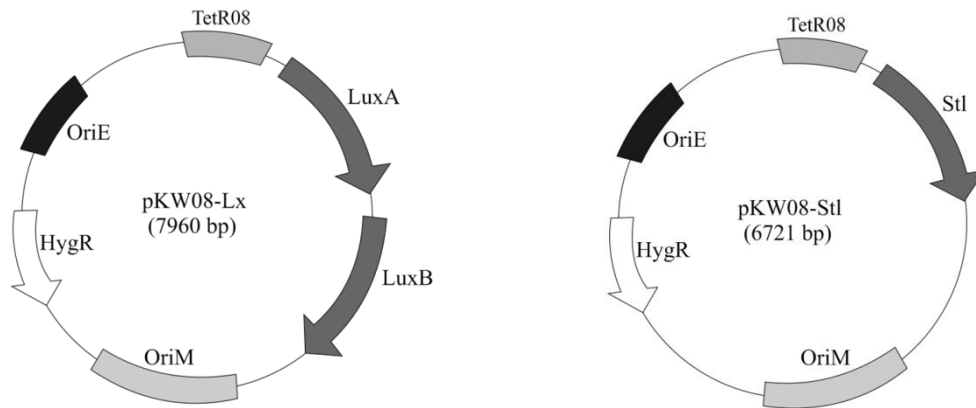


**8. Ábra.** Az *Stl* konstans expressziójához készített genomba integrálódó DNS plazmid. Az *Stl* konstans expressziójához alkalmazott pGem-Stl vektor, amelyben az *Stl* génszekvenciáját egy erős promóter mögé klónoztuk. amp= ampicilin rezisztencia gén; aacC1= gentamicin rezisztencia gén; L5attP= hely specifikus integrációért felelős szekvencia.

klónoztuk be. Az így kapott üres (Stl kódoló szekvenciát nem tartalmazó) vektort használtuk a kísérletekhez kontrollként. Az Stl kódoló régiót a pGEX-4T-1 expressziós vektorról [87] szaporítottuk fel és jelöltük AU-1 tag-gel. Az inszertet a promóter mögé klónoztuk *Nhe*I restrikciós enzimek segítségével (8. Ábra). A klónozásokhoz és a mutációk létrehozásához tervezett és felhasznált primereket a függelékben tüntettem fel. A DNS konstrukciókat minden esetben restrikciós emésztéssel, valamint szekvenálással ellenőriztük.

### 3.10 A tetraciklin-indukálható pKW08-Stl klónozása

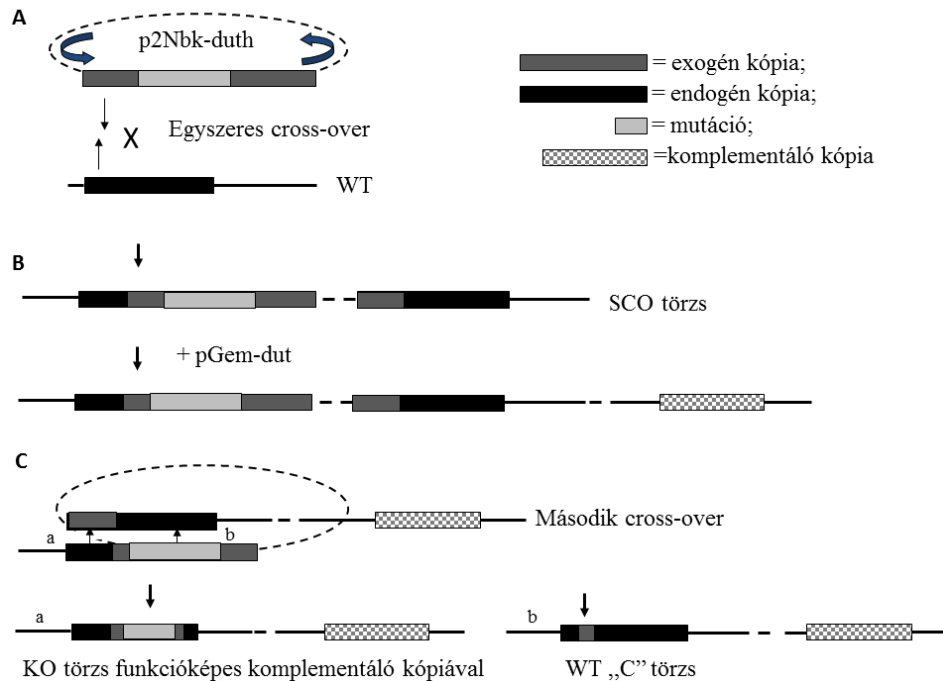
Az indukálható expressziót biztosító vektor elkészítéséhez az Stl kódoló régióját a pGEX-4T-1 expressziós vektorról [87] szaporítottuk fel és AU-1 taggel jelöltük. Ezután a pKW08-Lx [103] (Addgene) vektorba klónoztuk az *Lx* gén helyére *Bam*HI és *Hind*III restrikciós hasítóhelyek segítségével (9. Ábra). A klónozásokhoz és a mutációk létrehozásához tervezett és felhasznált primereket a függelékben tüntettem fel. A DNS konstrukciókat minden esetben restrikciós emésztéssel, valamint szekvenálással ellenőriztük.



**9. Ábra.** Az *Stl* indukálható expressziójához alkalmazott DNS plazmidok. **A)** A kontrollként alkalmazott pKW08-Lx vektor. **B)** A tetraciklin-indukálható *Stl* expressziót biztosító plazmid. HygR= higromicin rezisztencia gén; OriE= *E. coli* replikációs origó; OriM= mikobakteriális replikációs origó; TetR08= Tet-represszor kötő régió.

### 3.11 A *dut* kiütése

A *dut* kiütéséhez 5 µg DNS plazmidot elektrokompetens *M. smegmatis* sejtekbe elektroporáltunk, majd az egyszeri rekombinációs eseményeken (single cross over, SCO) átesett transzformánsokat kanamicint, higromicint és X-Gal-t tartalmazó táptalajon szelektáltuk. A merodiploid (a kérdéses gént diploid formában kódoló baktérium sejtvonala) sejtvonalaikat a komplementáló plazmid SCO sejtvonalaiba történő elektroporálásával állítottuk elő, majd kanamicin, higromicin és gentamicin tartalmú agar táptalajon szelektáltuk. A kettős rekombinációs eseményen (double cross over, DCO) átesett sejtvonalaik szelekciója szukrózt, gentamicint és X-Gal-t tartalmazó médiumon történt az irodalomban korábban leírtaknak megfelelően [98]. A potenciális DCO-k fehérek, szukróz- és gentamicin- rezisztensek voltak, mivel elvesztették ezeket a markereket a második rekombinációs esemény hatására. Kolónia PCR-rel azonosítottuk, hogy vad típusú (wt) vagy az elrontott *dut* mutáns allélnak megfelelő genotípussal rendelkezik-e az adott sejtvonala (10. Ábra). Ha a kérdéses gén esszenciális, csak akkor kaphatunk mutáns génkópiát a genomi kópia helyén a rekombinációs események után, ha egy második lókusztól expresszáljuk a fehérjét a baktériumban, azaz a baktérium merodiploid az adott génre.



**10. Ábra.** A *dUTPáz* génkiütött mutáns *M. smegmatis* sejtvonalak sematikus ábrázolása. **A-B)** egyszeri rekombinációval létrejött SCO és a funkcionális *dUTPáz*t tartalmazó merodiploid sejtvonalak. **C)** A második rekombinációs esemény eredményeképpen létrejöhet a deléciós *dut* mutánst vagy a vad genotípust hordozó sejtvonala, melyekben megtalálható a helyspecifikusan integrálódott menekítő *dut* kópia is.

### 3.12 A *dut* mutáns sejtvonalak létrehozása

A *dut* mutáns sejtvonalak létrehozásához a *dut* KO SCO sejteket használtuk kiindulási alapként, különböző *dut* mutáns komplementáló vektorokkal menekítve az amúgy letális génkiütést. A mutáns komplementáló vektorok létrehozásánál a QuikChange módszert (Stratagene) alkalmaztuk, templátként a vad típusú pGem-*dut* menekítő vektort [104] használva. A mutáns sejtvonalat a következőképp hoztuk létre: a mutáns komplementáló plazmidokat elektroporálással juttattuk az SCO sejtvonalba, így merodiploid sejtvonala hozva létre. A második rekombinációs esemény után azokra a DCO telepekre szelektáltunk, amelyek a komplementáló mutáns *dut* kópia mellett a nem funkcionális, kiütött *dut* gént tartalmazták. A kiválasztott sejtvonala genotípusát kolónia PCR mellett Southern blottal és a megfelelő genomi régió szekvenálásával is ellenőriztük. Minden mutánsból három párhuzamos sejtvonala választottunk ki a további kísérletekre. A klónozásra, mutagenézisre és a genotípus tesztelésére használt primereket a függelékben tüntettem fel.

### 3.13 A *dcd:dut* mutáns sejtvonallétrehozása

A *dcd:dut* mutáns sejtvonallétrehozásához a vad típusú dUTPázal menekített *dut* KO sejteket (*Dut-::dut<sub>wt</sub>*) használtuk kiindulási alapként. 5 µg p2NIL-*dcd:dut<sub>A115F</sub>* plazmidot elektrokompetens *Dut-::dut<sub>wt</sub>* *M. smegmatis* sejtekbe elektroporáltunk, majd az egyszeri rekombinációs eseményeken (single cross over, SCO) átesett transzformánsokat kanamicin, higromicin és X-Gal-t tartalmazó táptalajon szelektáltuk. A kettős rekombinációs eseményen átesett sejtvonalat szukrózt, gentamicint és X-Gal-t tartalmazó médiumon szelektáltuk. A potenciális DCO-k fehérek és szukróz rezisztensek voltak, mivel elvesztették ezeket a markereket a második rekombinációs esemény hatására. Kolónia PCR-rel azonosítottuk, hogy vad típusú (wt) vagy *dcd:dut* mutáns allélnak megfelelő genotípussal rendelkezik-e az adott sejtvonallétrehozás. A kiválasztott sejtvonallétrehozás genotípusát kolónia PCR mellett Southern blottal és a megfelelő genomi régió szekvenálásával is ellenőriztük. Minden mutánsból három párhuzamos sejtvonallétrehozást választottunk ki a további kísérletekre. A klónozásra, mutagenézisre és a genotípus tesztelésére használt primereket a függelékben tüntettem fel.

### 3.14 Az Stl fehérjét expresszáló *M. smegmatis* sejtvonallétrehozása

0,5-0,5 µg pGem-Stl és pGem-empty (kontroll) plazmidot elektroporáltunk elektrokompetens wt *M. smegmatis* törzsbe. Három párhuzamos sejtvonallétrehozást választottunk ki a további kísérletekre. A klónozásra, mutagenézisre és a genotípus tesztelésére használt primereket a függelékben tüntettem fel.

### 3.15 A tetraciklin-indukálható Stl expressziós *M. smegmatis* sejtvonallétrehozása

0,5-0,5 µg pKW08-Stl és pKW08-Lx (kontroll) plazmidot elektroporáltunk elektrokompetens wt *M. smegmatis* törzsbe. Három párhuzamos sejtvonallétrehozást választottunk ki a további kísérletekre. A klónozásra, mutagenézisre és a genotípus tesztelésére használt primereket a függelékben tüntettem fel.

### 3.16 A genomi DNS izolálása

10 mL overnight *M. smegmatis* sejt kultúrát 4000 rpm-en 10 percig centrifugáltunk, ezt követően a sejteket 1 mL 10 mM TRIS pH =7,5 oldatban felfuszpendáltuk és 0,1 mm átmérőjű üveggyöngyöket adtunk a sejtekhez. Folyamatos vortexelés (1 perc) és a jégben történő inkubáció (2 perc) váltakozásával megbontottuk a sejtfalat. A sejtörmelékek

lecentrifugálása után a felülúszóból a DNS-t a fenol:kloroform:izoamil-alkohol (25:24:1) oldat hozzáadásával izoláltuk az oldatból.

### 3.17 Southern blot analízis

A létrehozott sejtvonalak genotípusának megerősítésére Southern blot analízist alkalmaztunk. A próbát radioaktívan ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ ) jelöltük a DecaLabel<sup>TM</sup> DNA Labeling Kit segítségével a gyártó (Fermentas) használati utasításai szerint. Az integrálódott izotóppal jelölt nukleotid mennyiségének meghatározása után  $1,25 \cdot 10^6$  cpm/mL radioaktivitásnak megfelelő mennyiséget használtunk a hibridizációs lépésekben. 1%-os agaróz gélen 60 V-on 4 órán át agaróz gél-elektroforézissel választottuk el a megfelelő sejtvonalakból származó 7,5 µg genomi DNS fragmentumokat, melyeket 37 °C-on 12 órán át restikciós enzimekkel emésztettük. A blottolás és a hibridizációs lépés az irodalomban korábban leírtaknak megfelelően történt [105]. A membránt mosófolyadékkal (1 x SSC; 0,5 % SDS) háromszor 20 percig mostam, majd a membránt kazettába raktuk és a tetejére röntgen-filmet helyeztünk. A filmet -80 °C-on 24 órás inkubáció elteltével előhívtuk. A genomi DNS restrikciós emésztése NcoI és PstI enzimekkel történt a dUTPáz mutánsok esetében és 1,5 kb illetve 3,3 kb hosszúságú fragmenteket eredményezett a wt illetve *dut*-mutáns sejtvonalaknál. Próbaként 0,7 kb hosszú fragmenst alkalmaztunk, amely teljes egészében lefedte a *dut* gént (az alkalmazott primereket a függelékben tüntettem fel). A genomi DNS restrikciós emésztése NcoI enzimmal történt a *dcd:dut* mutáns esetében és 5,4 kb illetve 2,1 kb hosszúságú fragmenteket eredményezett a wt illetve *dcd:dut*-mutáns sejtvonalak esetén. Próbaként a *dcd:dut* gén mögé tervezett 0,5 kb hosszú fragmenst alkalmaztunk (az alkalmazott primereket a függelékben tüntettem fel).

### 3.18 A fehérje expresszió ellenőrzése Western blot-tal

Az Stl-t expresszáló *M. smegmatis* sejtvonalat 0,4–0,5 OD<sub>600</sub> értékig növesztettük, majd a sejteket centrifugáltuk. A pelleteket lízis pufferben (50 mM Tris-HCl, pH= 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5% SDS; 1% Triton X-100; 0,5 mM PMSF; 2 mM BA; 15 mM β-merkaptoetanol; 0,1 mg/ml DNáz) oldottuk vissza és szonikáltuk (Elma, S30H ElmaSonic, D78224) 4 alkalommal 5-5 percig. A felülúszó összfehérje koncentrációját Nanodrop ND-1000 készülékkel mértük meg. Az egyes mintákból azonos mennyiségű fehérjét futtattunk meg SDS-PAGE segítségével, és PVDF membránra blottoltuk. A membránt 5%-os tejporral blokkoltuk, a fehérjénket AU1 epitóp-tag specifikus ellenanyaggal (Novus Biologicals)

jelöltük. Az immunkomplexeket kemilumineszcens eljárással hívtuk elő. Loading kontrollként a Ponceau-val megfestett PVDF membránt alkalmaztuk.

### 3.19 Növekedési tesztek folyadékkultúrában

A mutáns *M. smegmatis* sejtvonalakat folyadékkultúrában növesztettük, és minden harmadik órában megmértük az optikai denzitást 600 nm hullámhosszon ( $OD_{600}$ ). Minden mutánsból három párhuzamos sejtvonalat, és minden sejtvonalból három párhuzamost használtunk (összesen 9 párhuzamos egy mutációra számolva).

### 3.20 A kolóniaképzés vizsgálata

A mutáns *M. smegmatis* sejtvonalakat folyadékkultúrában 0,4-0,5  $OD_{600}$  értékig növesztettük és 20 ng/ml tetraciklinnel indukáltuk. 10-szeres hígítási sorozatokat szélesztettünk agar lemezekre az indukció után 0, 1, 2, 4, 8 és 24 órával. 2 nap inkubáció után CFU-t számoltunk, az értékeket  $t=0$ -hoz normalizáltuk. Minden sejtvonalból három párhuzamost használtunk.

### 3.21 A mikobaktérium sejtvonalak mutációs rátájának meghatározása

A mutációs ráta meghatározásához rifampicin szenzitív kolóniákkal inokulált folyadék kultúrákat növesztettünk 37 °C-on, 150 rpm rázatással. A felnőtt kultúrákból 10-szeres hígítási sorozatokat szélesztettünk 100 µg/ml rifampicint tartalmazó és nem tartalmazó agar lemezekre és meghatároztuk a CFU értékeket a kétféle lemezen. A mutációs rátát következőképp számoltuk az egyes párhuzamosokra:  $\mu = [(m_t/N_t) - (m_0/N_0)] \times \ln (N_t/N_0)$ , ahol  $m_0$  a mutánsok száma  $t=0$  időpontban,  $m_t$  a mutánsok száma  $t$  időpontban, valamint  $N_0$  and  $N_t$  a sejtek száma  $t=0$  és  $t$  időpontban [106]. Minden mutáns esetében három párhuzamos sejtvonalat használtunk és a mutációs ráták átlagát és standard hibáját ábrázoltuk.

### 3.22 Az *rpoB* gén hot-spot régiójának mutációs analízise

A mutációs analízishez 45-45 rifampicin rezisztens wt, D83N *dut* mutáns és A115F *dcd:dut* mutáns kolóniát választottunk. A rifampicin rezisztencia génjének (*rpoB*) 1000 bp hosszú régióját (mutációs hot-spot régió) [107] PCR reakcióban amplifikáltuk és szekvenáltuk (az alkalmazott primereket a függelékben tüntettem fel).

A szekvenciákat MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) programmal illesztettük és PERL szkriptekkel analizáltuk (az alkalmazott szkripteket a függelékben tüntettem fel).

### 3.23 A genomi uraciltartalom meghatározása

A genomi uraciltartalom meghatározására egy valós-idejű kvantitatív PCR alapú mérést használtunk [108]. A módszer alapja, hogy a Pfu polimeráz nem képes uraciltartalmú templát DNS-t amplifikálni. A minták Pfu és Taq polimerázzal történő amplifikálását követően a két polimeráz adott templáton történő reakció hatékonyságának összevetésével a minta relatív uraciltartalma meghatározható. A méréshez genomi DNS-t izoláltunk a fent leírtaknak megfelelően és BamHI restrikciós enzimmal emésztettük. Az 5 kbp hosszúságú DNS darabokat gélből izoláltuk és tisztítottuk, ezzel felszaporítottuk a kívánt DNS szakasz relatív mennyiségét a mintában. A real-time PCR reakciókat Mx3000P qPCR készülékben (Agilent Technologies) futtattuk EvaGreen festéket (Biotium) és PfuTurbo Hotstart DNS polimerázt (Stratagene) illetve Mytaq Hotstart DNS polimerázt (Bioline) alkalmazva. 1017 bp hosszúságú szegmenst amplifikáltunk a reakció során. Kétszeres hígítási sorozatot készítettünk a mintákból, minden mutánsból három párhuzamos sejtvonalat vizsgáltunk.

### 3.24 dNTP extrakció

Exponenciális fázisú sejt kultúrákat megfelelő antibiotikumok jelenlétében növesztettünk. Meghatároztuk az egyes kultúrák CFU számát, majd a sejteket előkészítettük a dNTP extraháláshoz. A mosott sejtsapadékokat 0,5 ml jég hideg 60%-os metanolban overnight - 20 °C-on extraháltuk majd 5 percet forraltuk. A sejttörmelékét centrifugálással távolítottuk el (20 perc, 13000 rpm). Ezután a felülúszót, amely az oldható dNTP frakciót tartalmazta, vákuum-száritó (Eppendorf) segítségével 45 °C-on 40 perc alatt beszárítottuk. A beszárított frakciót 100 µl dUTPáz pufferben (30 mM Tris-HCL, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) oldottuk vissza és a felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

### 3.25 A dNTP pool meghatározása

A szabad dTTP koncentráció meghatározásához az irodalomban már jól ismert és gyakran alkalmazott enzimátikus eljárást alkalmaztuk [109]. A módszer lényege, hogy egy polimerizációs reakcióban, a megfelelő nukleotid összetételű és szekvenciájú (a kérdéses dNTP nukleotidra specifikus) primer és templát oligonukleotid jelenlétében a Klenow-fragment általi polimerizáció mértéke egyenesen arányos a rendszerhez adott dNTP-extraktum kérdéses dNTP koncentrációjával. A polimerizáció mértékét a reakcióhoz adott, a kérdéses dNTP nukleotiddal nem megegyező radioaktívan jelzett dNTP nukleotid beépülésének arányával tudjuk nyomon követni. A reakcióelegy (50 µl) a következő

komponensekből állt: Klenow puffer; 0,5 egység exonukleáz-negatív Klenow-fragment (Fermentas); 0,25  $\mu\text{M}$  dTTP/dUTP specifikus templát és primer; 8  $\mu\text{l}$  dNTP-extraktum; 2,5  $\mu\text{M}$   $^*\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dATP (1,5 Ci/mmol) (American Radiolabeled Chemicals, Inc.). A reakciókat 37 °C-on 45 percig inkubáltuk, majd minden reakcióból 40  $\mu\text{l}$ -t DE81 filter papírra (Sigma-Aldrich) csepegtettünk és szobahőn teljesen beszárítottuk. A be nem épült radioaktív nukleotidok minél hatékonyabb eltávolítása érdekében a filter papírokat 5%-os  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  oldattal (3 x 10 percig), desztillált vízzel (1 x 3 percig) és 96%-os etanollal (1 x 30 másodpercig) mostuk. Az alapos mosást követően a filter papírokat ismételtelen beszárítottuk, és a minták radioaktivitását Wallac szcintillátor (PerkinElmer) segítségével meghatároztuk. A dCTP mérés esetében Taq polimerázt (RedTaq, Sigma) használtunk, mivel a Klenow polimeráz az extraktumban jelen lévő CTP és GTP nukleotidokat is beépítheti [110]. Ebben az esetben 48 °C-on 1 óráig inkubáltuk a reakciókat. Kétszeres hígítási sorozatot készítettünk a mintákból, minden mutánsból három párhuzamos sejtvonalat vizsgáltunk.

### 3.26 A dUTP sejtbeli koncentrációjának meghatározása

A dUTP koncentrációt az irodalomban már korábban leírt módon határoztuk meg [111]. A módszer lényege, hogy adott sejtvonalból származó dNTP-extraktum azonos térfogathányadában jelenlévő dUTP nukleotidot *in vitro* rekombináns dUTPáz segítségével elbontjuk, illetve a parallel mintában nem bontjuk el. Majd a két minta dTTP koncentrációját a fentiekben leírt módon meghatározzuk és a minták közötti eltérést kiszámolva megkapjuk az érintett sejtekben jelenlévő dUTP koncentrációt. A minták egyik részéhez 40 ng rekombináns dUTPázt adtunk és 37 °C-on 45 percig inkubáltuk. A reakció végén az enzimet 60%-os metanollal precipitáltuk, majd centrifugálást követően a felülúszót ismét beszárítottuk és steril nukleáz-mentes vízben visszaoldottuk.

## 4 Eredmények és megvitatásuk

### 4.1 A timidilát bioszintézis konzerváltsága mikobaktérium fajokban

A mikobakteriális timidilát bioszintézisben szerepet játszó enzimekre kiterjedt összehasonlító aminosav-szekvencia analízist végeztünk. P-Blast analízissel összehasonlítottuk a *Mycobacterium* fajok (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. ulcerans* és *M. marinum*) timidilát anyagcserében szereplő fehérjéit az általunk modellként használni kívánt *M. smegmatis* enzimeivel. A 2. Táblázatban látható, hogy a timidilát-szintáz útvonal a mikobaktérium fajokban ugyanazzal az enzimmérettel rendelkezik és erősen konzervált. A mikobakteriális timidilát anyagcserében résztvevő enzimek 80% feletti szekvencia azonosságot mutatnak az általunk vizsgált fajok között, a timidilát kináz enzim esetében a szekvencia azonosság 66-69%. A dCTP dezamináz és a dUTPáz enzimek 85-87% és 84-86%-os szekvencia azonossággal rendelkeznek.

Enzim	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. leprae</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. marinum</i>
<b>Dcd</b>	87	87	87	85	85
<b>Dut</b>	85	84	84	85	86
<b>Ndk</b>	80	82	82	84	84
<b>Tdk</b>	64	69	66	68	67
<b>ThyA</b>	87	84	89	88	87
<b>ThyX</b>	86	82	86	88	89

2. Táblázat A mikobakteriális timidilát bioszintézis útvonalban résztvevő enzimek százalékos szekvencia azonossága a *M. smegmatis* enzimeihez viszonyítva

Az összehasonlító szekvencia analízis során a menekítő útvonalban résztvevő timidin-kináz homológot, vagy a másik *de novo* útvonal fő enzimét, a dCMP dezaminázt nem tudtuk azonosítani a mikobaktériumok genomjában. Ez arra enged következtetni, hogy mikobaktériumokban a timidilát bioszintézis kizárólagosan a dCTP dezamináz és dUTPáz reakciók közreműködésével történik, tehát ezek az organizmusok nem rendelkeznek menekítő útvonalakkal.

Helt és munkatársai bizonyították, hogy a korábban dCTP dezaminázként annotált *M. tuberculosis* enzim dUTPáz funkcióval is rendelkezik, így dCTP-ből kapcsolt reakcióban képes a dTTP bioszintézis prekurzorát, a dUMP-t előállítani [11]. Összehasonlító szekvencia analízis vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy az útvonal enzimeit nagyfokú hasonlóságot mutatnak a különböző fajokban. Viszont vizsgálataink szempontjából alapvető jelentőséggel

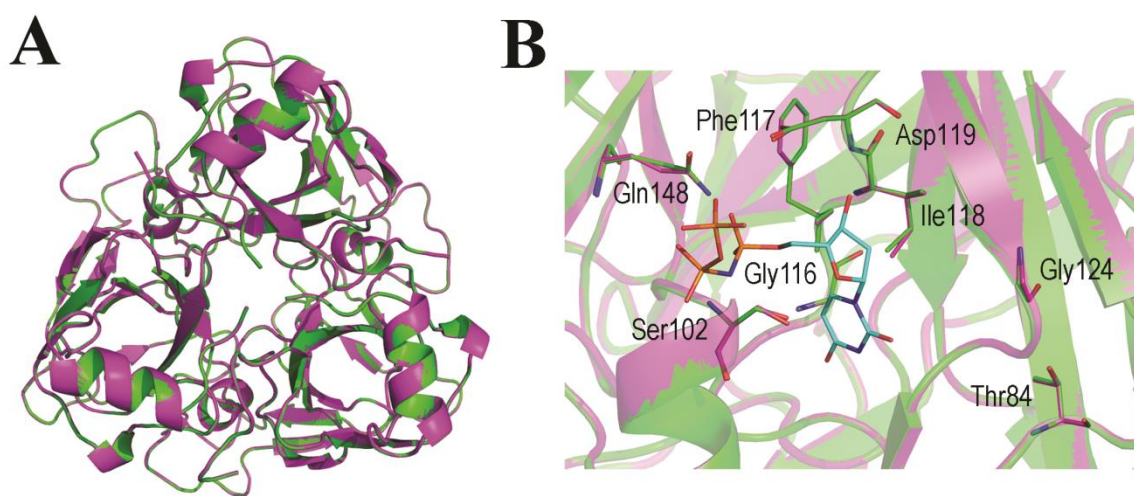
bír, hogy a mikobaktériumokban ugyanaz az enzimekészlet felelős-e a dUMP előállításáért. Ezért többszörös szekvencia illesztéseket végeztünk, hogy megvizsgáljuk a különböző fajokból származó monofunkciós dUTPázokat, ténylegesen annotált és lehetséges bifunkciós Dcd:dut enzimeket és a ténylegesen monofunkciós dCTP dezaminázokat. A különböző szekvenciák összehasonlításával azt találtuk, hogy a dCTP dezamináz enzimeként annotált mikobakteriális enzimek, a *M. tuberculosis* Dcd:dut enzimhez hasonlóan tartalmazták mindazokat a konzervált aminosavakat (Ser102, Asp119 és Gln148; *M. tuberculosis* alapú számozás, [11]) melyek a dUTPáz reakcióhoz szükségesek (11. Ábra). Ezek az aminosavak konzerváltak a mikobakteriális dCTP dezaminázokban, a bifunkciós Dcd:dut enzimeként annotált *M. tuberculosis* és *Methanocaldococcus jannaschii* dCTP dezaminázokban, valamint a konvencionális dUTPázokban is (11. Ábra). A katalitikus víz koordinációjáért felelős Asp119 aminosav (*M. tuberculosis* Dcd:dut számozás) a dUTPázokban interakcióba lép a kötött nukleotid 3'-OH csoportjával [25]. Az ábrán látható, hogy ez az Asp az egész szupercsaládban konzervált. A monofunkciós dCTP dezaminázok mellett tartalmaznak egy erősen konzervált Arg-t (Arg126 *E. coli* Dcd enzimben), amely elfoglalja a katalitikus víz helyét a szerkezetben, valamint sóhidat képez a katalitikus Asp-al (Asp128 *E. coli*-ban [27]). Emiatt a monofunkciós dCTP dezaminázokban nem mehet végbe a dUTPáz reakció. A dUTP-t hidrolizálni képes bifunkciós Dcd:dut enzimekben (*M. jannaschi*, *M. tuberculosis*) Arg helyett ebben a pozícióban egy aromás aminosav van (Phe, Trp) hasonlóan a többi mikobakteriális dCTP dezaminázhoz.

	91	motif II	motif III	motif IV	155
DUT_ <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	PFGMVGLVHPR	SGLATRVGLSIVNSP	GTIDAGYRGEIKVALINLDPAAPIVVHRGD	RIAQLLVQRVELV	
DUT_ <i>Mycobacterium smegmatis</i>	PHGMVGLVHPR	SGLAARVGLSIVNSP	GTIDAGYRGEIKVSLINLDPQTPVVISRGD	RIAQLLVQRVELP	
DCD-DUT_ <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	PNDISAQYQGR	SSLG-RVFLTSHQTAG	WIDAGFKGKITLEIVAFD-K-PVILYKNQ	RIGQLIFSKLLSP	
DCD-DUT_ <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	PDNLAGRLEGK	SSLG-RLGLLTHSTAG	FIDPGFSGHITLELSNVA-NLPITLWPGM	KIGQLCMLRLTSP	
DCD_ <i>Mycobacterium smegmatis</i>	PDDLGRLEGK	SSLG-RLGLLTHSTAG	FIDPGFSGHITLELSNVA-NLPITLWPGM	KIGQLCMLRLTSP	
DCD_ <i>Mycobacterium ulcerans</i>	PGDLGRLEGK	SSLG-RLGLLTHSTAG	FIDPGFSGHITLELSNVA-NLPITLWPGM	KIGQLCMLRLTSP	
DCD_ <i>Mycobacterium leprae</i>	PEDLAGRLEGK	SSLG-RLGLLTHSTAG	FIDPGFSGHITLELSNVA-NLPITLWPGM	KIGQLCMLRLTSP	
DCD_ <i>Mycobacterium bovis</i>	PDNLAGRLEGK	SSLG-RLGLLTHSTAG	FIDPGFSGHITLELSNVA-NLPITLWPGM	KIGQLCMLRLTSP	
DCD_ <i>Haemophilus influenzae</i>	PANIIGWLDGR	SSLA-RLGLMVHVTAR	HDPGWEGKIVLEFYNSG-KLPLALRPNMVIGALSFEVLSGE		
DCD_ <i>Escherichia coli</i>	PADLVGWLDGR	SSLA-RLGLMVHVTAR	HDPGWSGCIVLEFYNSG-KLPLALRPGMLIGALSFEPLSGP		
DCD_ <i>Salmonella paratyphi</i>	PPDLVGWLDGR	SSLA-RLGLMVHVTAR	HDPGWSGCIVLEFYNSG-KLPLALRPGMLIGALSFEPLSGP		

11. Ábra. A dUTPáz reakcióban szerepet játszó konzervált aminosavak a szupercsalád enzimeiben. Szürke háttérrel a dUTPáz reakcióban fontos szerepet játszó, fekete háttérrel a dCTP dezamináz monofunkcionalitást biztosító aminosavakat jelöltem.

Ezt követően kollégámmal, Lopata Annával egy 3D szerkezeti modellt építettünk a *M. smegmatis* dCTP dezaminázára a *M. tuberculosis* bifunkciós Dcd:dut enzim

kristályszerkezetét templátként használva (a két enzim 87%-os szekvencia azonosságot mutat). A *M. smegmatis* és a *M. tuberculosis* enzimek szerkezete a modellünk szerint nagy hasonlóságot mutat (összevetve a fehérjékben található összes atomot, 0,33 Å RMSD értéket kaptunk), illetve az összes dUTPáz reakcióban résztvevő, a bifunkciós Dcd:dut enzimekre jellemző [11,27], konzervált aminosav azonos pozícióban helyezkedik el a két fehérjében (12. Ábra). Adataink alapján nemcsak a *M. tuberculosis* enzime, hanem a *M. smegmatis* és az egyéb mikobakteriális dCTP dezaminázok is katalizálják a dCTP dezamináláson túl a dUTPáz reakciót is, tehát bifunkciós Dcd:dut enzimek. Ez megerősíti azt a feltételezést is, miszerint a dUTPáz reakció a mikobaktériumokban kiemelkedő fontossággal bír.



**12. Ábra. A *M. smegmatis* dCTP dezamináz prediktált szerkezete.** **A)** A *M. tuberculosis* bifunkciós dCTP dezamináz/dUTPáz (zöld színnel jelölve) és a *M. smegmatis* dCTP dezamináz (magenta színnel jelölve) enzimek egymásra illesztett szerkezete. **B)** A két enzim aktív centrumának felnagyított képe. A nem hidrolizálható szubsztátanalógot ( $\alpha$ - $\beta$ -imido-dUTP (dUPNPP)) az aktív helyre modelleztük, a konzervált aminosavakat és a dUPNPP-t pálcika ábrázolással, atomi színezéssel ábrázoltuk (zöld, magenta és cián szénatomok a *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* enzimek és a dUPNPP esetén). A szerkezetek PyMol szoftverrel készültek.

Ezt követően különböző fajokból származó (*Escherichia coli*, *Equine infectious anemia virus*, *Vaccinia virus*, *Saccharomyces cerevisiae* és *Homo sapiens*) dUTPáz-ok C-terminális aminosav szekvenciáit illesztettük az általunk kiválasztott mikobaktérium fajok dUTPáz szekvenciáihoz ClustalW program alkalmazásával. Illesztésünk alapján, a mikobakteriális dUTPázok tartalmaznak egy 5 aminosav hosszú inszert szekvenciát (13. Ábra), amely a kristályszerkezetben is látható hurok motívumot alkot az enzim felszínén, és egyértelműen megkülönbözteti a mikobakteriális dUTPázokat a humán és más fajokban található dUTPázoktól.

	120		170
<i>M. tuberculosis</i>	LDPAAPIVVHRGDRIAQLLVQRVELVELVEVSSFDE	<b>AGLAS</b>	TSRGDGGHGSSGGHASL
<i>M. bovis</i>	LDPAAPIVVHRGDRIAQLLVQRVELVELVEVSSFDE	<b>AGLAS</b>	TSRGDGGHGSSGGHASL
<i>M. leprae</i>	LDPVEPLVVHRGDRIAQLLVQRVELVELVEVSSFDE	<b>AGLAE</b>	TSRGDGGHGSSGGHASL
<i>M. marinum</i>	LDPATPIVVNRGDRIAQLLVQRVELLELVEVSSFDE	<b>AGLAA</b>	TSRGDGGHGSSGGHASL
<i>M. smegmatis</i>	LDPQTPVVISRGDRIAQLLVQRVELPELVEVTSFDE	<b>AGLAD</b>	TTRGDGGHGSSGGHASL
<i>H. sapiens</i>	FG-KEKFEVKKGDRIAQLICERIFYPEIEEVQALDD	----	TERGSGGFGSTGKN---
<i>E. coli</i>	RG-QDSFTTIQPGERIAQMI FVPVQAEFNLVEDFDA	----	TDRGEGGFGHSGRQ---
EIAV	IG-KSNIKLIEGQKFAQLIILQHHSNSRQPWDENKI	----	SQRGDKGFGSTGVF---
	Motif IV		M.I. Motif V

**13. Ábra. Különböző fajokból származó dUTPáz szekvenciák többszörös illesztése.** Szürke háttérrel a dUTPáz reakcióban fontos szerepet játszó konzervált motívumokat, fekete kerettel a mikobaktériumokra specifikus öt aminosavból álló inszertet jelöltem.

Az általunk elvégzett összehasonlító szekvenciaanalízis egyértelműen igazolta, hogy a mikobaktériumok timidilát anyagcseréjében azonos kulcsenzimek vesznek részt és ezek az enzimek nagyfokú hasonlósággal rendelkeznek. Eredményeink szerint a *M. smegmatis* jól alkalmazható modell organizmus a mikobakteriális timidilátszintézis vizsgálatára, valamint a dUTPáz enzimek kizárólagos szerepe miatt a dUTPáz reakció élő sejtben történő vizsgálatára.

#### 4.2 A dUTPázt kódoló *dut* gén esszenciális *M. smegmatis*-ban

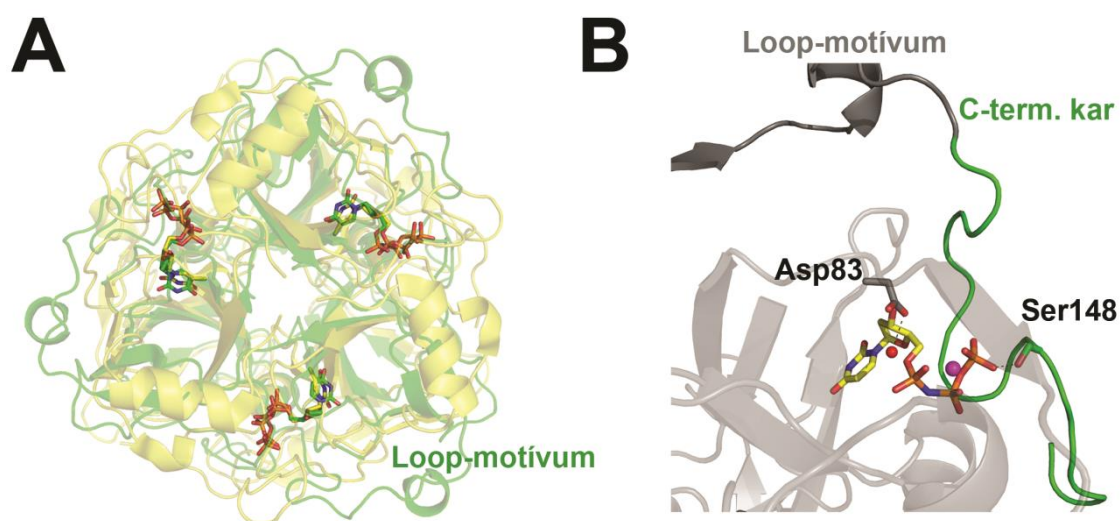
A *dut* genomból történő kiütését Pécsi Ildikó kollégámmal egy megbízható, hatékony, kétlépcsős rekombinációs stratégia [99] alkalmazásával valósítottuk meg. Első lépésben az endogén *dut* mellett egy higromicin marker kazettával megszakított funkcióképtelen *dut* gént hordozó mutáns sejtvonalat hoztunk létre, a p2Nbk-duth mikobaktériumokban nem replikálódó vektort (6. Ábra) elektroporálva *M. smegmatis* sejtekbe. Higromicint, kanamicint, és X-gal-t tartalmazó táptalajon azokra a kolóniákra szelektáltunk, amelyekben homológ rekombinációval a vektorunk integrálódott a *M. smegmatis* genomjába (SCO sejtek). Az így izolált SCO sejtek növesztése után szukrózt és X-gal-t tartalmazó táptalajon azokra a kolóniákra szelektáltunk, amelyekben egy második rekombinációs lépés után valamelyik *dut* kópia (az endogén vagy az általunk bevitt funkcióképtelen kópia) kiesett és ezáltal a *LacZ*, valamint a negatív *sacB* szelekciós markert is elveszítette a baktérium (DCO sejtek). Az így izolált potenciális DCO-n átesett sejtvonalakból kolónia PCR reakcióval határoztuk meg, hogy a vad típusú vagy a deléciós *dut* mutáns allél mintázattal rendelkezett-e az adott kolónia.

Azt találtuk, hogy a *dut* kiütése letális fenotípust eredményez, mivel deléciós *dut* mutáns alléllal rendelkező baktérium sejtvonalat csak abban az esetben tudtunk izolálni, ha egy

komplementáló plazmidon funkcionális *dut* gént biztosítottunk a baktérium számára (pGem-*dut*). Ezek az eredmények alapvető bizonyítékot szolgáltatnak, hogy a *dut* gén esszenciális *M. smegmatis*-ban, valamint nagy valószínűséggel a többi mikobaktérium fajban is a timidilát bioszintézis útvonal nagyfokú konzerváltsága miatt.

#### 4.3 A mutáns dUTPáz enzimek tervezése

A laborunkban történt humán és *E. coli* dUTPáz enzimeken folytatott vizsgálatok alapján [112,22], olyan fokozatosan csökkenő aktivitással rendelkező mutáns enzimeket terveztünk, melyek egy vagy több nagyságrendű enzimaktivitás csökkenést mutatnak. A mutáns *M. tuberculosis* enzimeket irányított mutagenézissel hoztuk létre és *in vitro* mérésekkel karakterizáltuk. A T138stop, S148A és  $\Delta$ -loop mutáns *M. tuberculosis* dUTPáz fehérjék *in vitro* karakterizálását Lopata Anna kollégám végezte. Ezek után az ismert aktivitáscsökkenéssel bíró enzimeket egyetlen kópiaként kódoló *M. smegmatis* sejtvonalakat hoztunk létre, melyek felhasználásával az élő sejtben vizsgálhattuk a dUTPáz aktivitás csökkenésének hatásait.



**14. Ábra. A dUTPáz enzimek szerkezete és az aktív centrum felnagyított képe.** A) A *M. tuberculosis* dUTPáz (PDB: 2PY4, zöld színnel jelölve) és bifunkciós dCTP dezamináz:dUTPáz (PDB: 2QLP, sárga színnel jelölve) egymásra illesztett szerkezete. Látható, hogy a két enzim szerkezete nagyon hasonló. B) A dUTPáz aktív centrumának felnagyított képe. A nem hidrolizálható szubsztátanalógot ( $\alpha$ - $\beta$ -imido-dUTP (dUPNPP)) és az általunk elmutált aminosavakat pálcika ábrázolással, atomi színezéssel ábrázoltuk (sárga szénatomok a dUPNPP esetén). A C-terminális kart, amelyet töröltünk a T138stop mutációval, zöld színnel jelöltük. A szerkezetek PyMol szoftverrel készültek.

A katalitikus Asp83 elmutálásával (D83N) elrontottuk a katalitikus vízmolekula koordinációját. A mutáció hatására az enzimaktivitás közel nullára csökkent (14. Ábra, 3. Táblázat) hasonlóan ahhoz, amit az *E. coli* enzim mutációjánál tapasztaltunk [112]. A Michaelis állandót ( $K_M$ ) nem tudtuk pontosan meghatározni a drasztikusan lecsökkent enzimaktivitás okozta mérési nehézségek miatt. A  $K_M$  ebben az esetben jobban becsülhető a mutáns dUTPáz és a nem hidrolizálható szubsztrát analóg  $\alpha,\beta$ -imido-dUTP (dUPNPP) által alkotott komplex disszociációs állandójából ( $K_d$ ). A D83N.dUPNPP komplex disszociációs állandója méréseink szerint nagyon hasonló volt a wt.dUPNPP komplex  $K_d$  értékéhez (3. Táblázat), tehát nem a kötődés, hanem a katalízis elomlása okozza a fent említett változást.

A T138Stop mutáns nem tartalmazza az V. konzervált motívumot, ami fontos szerepet tölt be a hidrolízis reakció lejátszódásában (14. Ábra). Ez a P-loop-szerű motívum a szubsztrát kötődés hatására konformációváltozáson esik át és ezáltal pozicionálja a nukleotid trifoszfát csoportját elősegítve a hatékony katalízist [22,113–115]. Amint vártuk, a T138Stop mutáns szintén alacsony enzimaktivitással rendelkezett, csupán 3-szor magasabb aktivitással bírt, mint a korábban ismertetett D83N mutáns (3. Táblázat). Az enzim.dUPNPP komplex disszociációs állandója, valamint a reakció  $K_M$  értéke körülbelül 4-szer magasabbnak adódott a wt komplexben mért értékeknél.

A S148A mutációval elrontottuk az egyik hidrogénkötést a P-loop-szerű motívum és a szubsztrát között, amely a dUTP  $\gamma$ -foszfát csoportját koordinálta a reakció során (14. Ábra). A S148A mutáns enzim egy nagyságrendű aktivitáscsökkenést mutatott a steady-state aktivitás mérések során (3. Táblázat) hasonlóképp a korábban tapasztalt aktivitáscsökkenéshez az S148A mutációval analóg humán mutánsban [22]. A  $K_M$  és a  $K_d$  körülbelül 2-szeresére emelkedett a wt enzimben mért értékekhez képest (3. Táblázat).

Szekvencia analízisünk igazolta, hogy a mikobakteriális dUTPázok C-terminális részén egy 5 aminosavból álló konzervált inszert szekvencia található, amely egy jellegzetes hurok motívum kialakításáért felelős (14. Ábra). Ezen motívum fiziológiai szerepéről nincsenek irodalmi adatok, pedig ez a mikobaktérium-specifikus felszíni struktúra, amennyiben fontos szerepet játszik az enzim aktivitásában, jó lehetőséget kínálhat különböző gyógyszermolekulák tervezéséhez, melyek szelektíven csak a mikobakteriális dUTPázra fejtenék ki hatásukat, ugyanis ez az inszert szekvencia nem található meg a humán és más fajok dUTPáz szekvenciáiban. Ezért a hurok kialakításáért felelős konzervált 5 aminosavat (AGLAS) irányított mutagenézissel kitöröltük. A  $\Delta$ -loop mutáns enzim steady-state aktivitása

nem csökkent jelentős mértékben a vad típushoz képest (3. Táblázat). A steady-state aktivitás, valamint a közel azonos  $K_M$  állandók azt mutatják, hogy a dUTPáz enzim katalitikus aktivitását a hurok eltávolítása kevésbé változtatta meg. Ellenben fluorimetriás és cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai titrálási méréseink arra utalnak, hogy a hurok struktúra kis mértékben részt vesz a szubsztrátkötésben [104].

Enzim	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu M$ )	$K_{d,dUPNPP}$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	Hatékonyság	Ref.
wt Dut	$1,22 \pm 0,06$	$1,7 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,5$	$1,36E+06$	1	L.A. mérése
$\Delta$ -loop Dut	$0,88 \pm 0,02$	$1,1 \pm 0,2$	$3,9 \pm 2,4$	$0,8E+06$	0,6	L.A. mérése
S148A Dut	$0,43 \pm 0,04$	$1,5 \pm 0,6$	$1,8 \pm 1,0$	$2,87E+05$	0,2	L.A. mérése
T138stop Dut	$0,0035 \pm 0,0001$	$6,7 \pm 0,4$	$3,9 \pm 1,3$	$5,22E+02$	0,0004	L.A. mérése
D83N Dut	$0,0013 \pm 0,0005$	$7,7 \pm 6,7^*$	$1,5 \pm 0,1$	$1,69E+02^*$	0,0001	saját mérés
wt Dcd:dut	$0,33 \pm 0,02$	$73 \pm 9$	n.d.	$4,18 E+03$	0,003	Helt et al., 2008

**3. Táblázat. A wt és mutáns dUTPázok, a bifunkciós Dcd:dut kinetikai paramétereit, valamint a dUTPáz-dUPNPP komplexek disszociációs állandóit.** A csillaggal jelölt paraméterek nem megbízhatóak a drasztikusan lecsökkent enzimaktivitás okozta mérési nehézségek miatt; L.A. =Lopata Anna mérése. A táblázatban a bifunkciós Dcd:dut enzim esetén a dUTPáz reakció paramétereit tüntettem fel.

Az általunk tervezett és létrehozott, fokozatosan csökkenő aktivitású mutáns enzimek a várt módon viselkedtek az *in vitro* kísérletekben. A S148A és a T138stop *dut* mutációk, melyekkel egy vagy több interakciót is elrontottunk a P-loop szerű motívum és a szubsztrát trifoszfát csoportja között, egy illetve több mint 3 nagyságrendű aktivitáscsökkenést okoztak és a szubsztrát kötődését is befolyásolták (a  $K_d$  és a  $K_M$  értéke is nőtt az érintett kölcsönhatások számának függvényében, 3. Táblázat). A D83N mutánsban a katalitikus víz koordinációjának elrontása a szubsztrát kötődését nem befolyásolta, viszont az enzim szinte teljes inaktivitását okozta (3. Táblázat). Ezzel szemben, a  $\Delta$ -loop mutáns enzim kvázi vad típusú aktivitást mutatott, viszont a motívum hiánya kismértékben befolyásolta a szubsztrát kötődését.

#### 4.4 A mutáns *M. smegmatis* sejtvonalak létrehozása

Vizsgálataink fő célja az volt, hogy a dUTPáz aktivitáscsökkenésének hatásait a sejtben elemezzük. Ezért a fentiekben ismertetett mutációkat ( $\Delta$ -loop, S148A, T138Stop és D83N) egyetlen dUTPáz kópiában kódoló mutáns *M. smegmatis* sejtvonalakot kívántunk létrehozni.

A *M. tuberculosis* és *M. smegmatis* dUTPázok 85 % szekvencia azonossággal rendelkeznek (ez az érték 100 % a konzervált motívumokon belül), ezért valószínűsíthetően a két enzimben létrehozott azonos mutációk azonos módon viselkednek. A mutánsok létrehozásához a fentiekben ismertetett módszert használtuk, amelyben a *dut*-kiütött sejtvonalunkat egy funkcionális *dut* kópiával menekítettük. Ebben az esetben viszont az általunk létrehozott mutáns *dut* gént ( $\Delta$ -loop, S148A, T138Stop és D83N) kódoló komplementáló plazmidokkal menekítettük a letális *dut* KO fenotípust. Ezáltal olyan mutáns dUTPázokat kódoló *M. smegmatis* sejtvonalakt kaptunk, amelyek nem tartalmaztak wt dUTPázt. A sikeres allélcserét Southern blot segítségével, a mutációk meglétét pedig az adott genomi régió szekvenálásával bizonyítottuk.

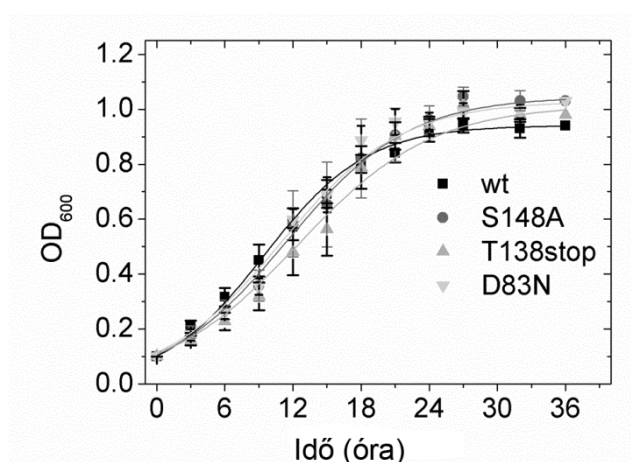
#### 4.5 A mikobaktérium-specifikus hurok eltávolítása letális hatású

A  $\Delta$ -loop mutáns esetében nem tudtunk életképes *dut* génkiütött mutáns sejtvonalat izolálni a  $\Delta$ -loop komplementáló háttérben, ami arra enged következtetni, hogy a loop motívum esszenciális a *M. smegmatis* növekedéséhez így specifikus gyógyszer célpontként alkalmazható. A mutáns enzim *in vitro* karakterizálásakor azt találtuk, hogy a motívum eltávolítása csekély hatással bír az enzimkatalízisre az aktívhely mutáns enzimek (S148A, T138stop, D83N) több nagyságrendű aktivitáscsökkenéséhez viszonyítva. Mivel a hurok motívumot nem tartalmazó dUTPáz ennek ellenére nem menekítette a vad típusú dUTPáz hiányát, ezért nagy valószínűséggel részt vesz valamilyen esszenciális folyamatban. Az irodalomban eddig esszenciálisnak talált fehérjemotívumok döntő többsége a fehérje enzimaktivitásában játszott nélkülözhetetlen szerepet [116,117]. Mivel a mikobaktérium dUTPáz esetében ez a specifikus motívum nem játszik döntő szerepet az enzimaktivásban, ezért feltételezzük, hogy az elhelyezkedéséből adódóan valamilyen kötőfelszínként szolgálhat egy még ezidáig ismeretlen kötőpartner számára. Ma már ismert, hogy a dUTPáz fehérjék különböző szabályozási folyamatokban is részt vehetnek [86,118,119]. A laborunkban kimutatták, hogy a dUTP kötődése gátolja a  $\Phi 11$  fág dUTPáz Stl nevű represszor fehérjével való kölcsönhatását, amely egy mobilis genetikai elem (SaPI: *S. aureus* patogenicitási sziget) aktiválódását szabályozza *Staphylococcus aureus*-ban [87,120]. Ehhez hasonlóan valószínűleg a mikobakteriális dUTPázoknak is van egy még ismeretlen másodlagos (moonlighting), de esszenciális funkciója. A lehetséges másodlagos funkció és a kölcsönható partnerek feltárására laborunkban különböző kísérletek folynak. Ezeket a kísérleteket doktori dolgozatomban nem tárgyalom.

A *de novo* timidilátszintézis (1. Ábra) kulcsenzimei kedvelt gyógyszer-célpontok a tuberkulózis kutatásban. Manapság a leggyakrabban használt gyógyszer-célpontok a mikobaktériumokban esszenciális ThyX [15,28,121] és az élővilágban általánosan jelenlévő ThyA timidilát szintáz [122,123] enzimek. Az útvonal konzerváltsága és a dUTPáz enzimek hasonlósága miatt a mikobaktériális hurok motívum valószínűsíthetően a patogén mikobaktérium fajokban is esszenciális szerepet tölt be, ezért a dUTPáz a timidilát szintáz enzimhez hasonlóan jó célpont lehet a tuberkulózis ellen irányuló terápiákban. A *M. tuberculosis* mellett a *M. leprae*, a lepra kórokozója, valamint a *M. ulcerans*, a Buruli ulcers nevű betegség kórokozója szintén súlyos egészségügyi problémákat jelent [124]. Emellett a *M. bovis* jelentős egészségügyi és mezőgazdasági szereppel is bír, ugyanis ez a patogén faj széles gazda spektrummal rendelkezik és a tuberkulózishoz hasonló betegséget okoz többek között szarvasmarhában és emberben is.

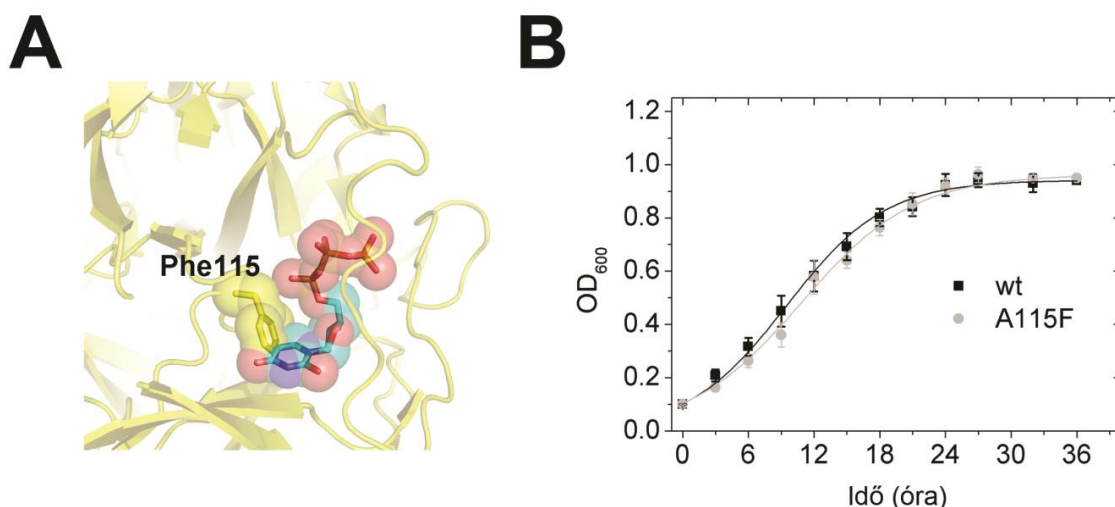
#### 4.6 A Dut vagy a Dcd:dut dUTPáz aktivitása is elegendő a *M. smegmatis* normál növekedéséhez

Mindhárom további mutánsunk (S148A, T138stop és D83N) életképesnek bizonyult, és meglepetésünkre nem mutattak semmiféle növekedéssel elmaradást a wt törzshöz képest folyadékkultúrában növesztve (15. Ábra). Ez arra utal, hogy a Dut mutánsokban a teljes aktivitással bíró Dcd:dut enzim dUMP termelése elegendő a dTTP normál szintéziséhez még úgy is, hogy ez az enzim a dUTPáz enzimhez képest jóval alacsonyabb dUTPáz aktivitással bír [11].



**15. Ábra. Dut mutáns és wt *M. smegmatis* sejtvonalak in vitro növekedési analízise.** A folyadékkultúrákat 2 napig 37 °C-on rázatással növesztettük. Az egyes mutáns sejtvonalakból három párhuzamos mérés átlagát és szórását ábrázoltuk. Az  $y = a/(1 + \exp(-k*(x-x_c)))$  Hill egyenlet illesztése a következő paramétereket eredményezte:  $a=0,94$ ,  $x_c=9,5$  és  $k=0,22$  a wt,  $a=1,04$ ,  $x_c=11,5$  és  $k=0,19$  az S148A,  $a=1,02$ ,  $x_c=12,4$  és  $k=0,17$  a T138stop és  $a=1,03$ ,  $x_c=11,0$  és  $k=0,19$  a D83N Dut mutáns sejtvonal esetén.

Az előbbi feltételezés igazolására egy olyan *M. smegmatis* mutáns sejtvonalat is készítettünk, amely inaktív Dcd:dut enzimet kódol. Ehhez az Ala115 aminosavat Phe aminosavra cseréltük (A115F), hogy megakadályozzuk a szubsztrátkötést az aktívhelyen. Ugyanis a Phe oldallánc csak úgy fér el a kötőzsebben, ha elfoglalja az uracilgyűrű helyét (16. Ábra). Korábban Szabó Judit Eszter kollégám már létrehozta és karakterizálta ezt a mutánst a szerkezetileg hasonló humán dUTPáz esetében, ahol a mutáns enzim nem tudott nukleotidot kötni. Judit mérései alapján a mutáció nem befolyásolta a fehérjeszerkezetet (Szabó és mtsai, kézirat). A pontmutációk alkalmazásának előnye a génkiütéssel szemben az, hogy alkalmazásukkal kivédhetők a szomszédos gének véletlen elrontásából, vagy az esetleges fehérje-fehérje kölcsönhatások megszüntetéséből eredő aspecifikus hatások. Az A115F *dcd:dut* mutáns sejtvonalat homológ rekombináción alapuló allélcserével hoztuk létre. A mutánsok hatékony megtalálása érdekében a pontmutációt hordozó gént Gfp tag-gel is elláttuk. A homológ rekombinációt wt és inaktív *dut* (D83N) mutáns háttérben is indukáltuk. A sikeres allélcserét Southern blot segítségével, a mutációk meglétét pedig az adott genomi régió szekvenálásával bizonyítottuk. Az A115F *dcd:dut* mutáns sejtvonalt életképesnek bizonyult, a növekedési rátája hasonlóan a *dut* mutánsokéhoz, nem különbözött a wt törzstől folyadékkultúrában növesztve (16. Ábra). Ellenben nem tudtunk olyan kettős mutáns kolóniát izolálni, amely mindkét dUTPáz enzimet inaktív formában hordozta volna (A115F *dcd:dut*, D83N *dut*). Ez arra utal, hogy a dUTPáz reakció esszenciális a baktérium életképességének megőrzésében, valamint megerősíti a korábbi eredményünket is, ami szerint a mikobaktériumok nem kódolnak alternatív útvonalakat a timidilát bioszintézisben.



**16. Ábra.** Az inaktív Dcd:dut létrehozása és a mutáció növekedésre kifejtett hatása. **A)** A mutáns bifunkciós dCTP dezamináz:dUTPáz aktív centrumának felnagyított képe. A nem hidrolizálható szubsztrátanalógot ( $\alpha$ - $\beta$ -

*imido-dUTP (dUPNPP)) az apoenzim aktív helyére modelleztük, és pálcika ábrázolással, atomi színezéssel ábrázoltuk (kék szénatomok a dUPNPP esetén). A szerkezet PyMol szoftverrel készült. B) Dcd:dut mutáns és wt *M. smegmatis* törzsek *in vitro* növekedési analízise. A folyadékkultúrákat 2 napig 37 °C-on rázatással növesztettük. A mutáns és wt törzsekből három párhuzamos mérés átlagát és szórását ábrázoltuk. Az  $y = a/(1 + \exp(-k*(x-xc)))$  Hill egyenlet illesztése a következő paramétereket eredményezte:  $a=0,94$ ,  $xc=9,5$  és  $k=0,22$  a wt, és  $a=0,96$ ,  $xc=10,8$  és  $k=0,19$  az A115F Dcd:dut mutáns sejtvonala esetén.*

A génkiütés kísérletek általában csak arra adnak választ, hogy az adott gén esszenciális-e a vizsgált organizmusban, de a gén funkciójáról vagy a letalitás hatásmechanizmusáról nem adnak mélyebb információt. A korábbi random mutagenézisen alapuló tanulmányok [28,29] *M. tuberculosis*-ban esszenciálisnak találták a *dut* gént, míg a *dcd:dut* gént nem. Ezek alapján egyáltalán nem volt világos, hogy a dUTPáz enzimek és aktivitásuk hogyan befolyásolják a sejtbeli dNTP készletet és a genom integritásának megőrzését, valamint hogy miért van szükség két dUTPáz aktivitással rendelkező enzimre a mikobaktériumokban. Az 1. Ábrán láthattuk, hogy *M. smegmatis*-ban a dTTP szintézise kizárólag a dUTPáz reakción keresztül történik, habár ezt az állítást előttünk még nem bizonyította senki, ugyanis eddig mindig csak a dUTPáz enzimek egyikét vizsgálták egyszerre [28,29,104]. További kísérleteinkkel azt igyekeztük kideríteni, hogy a két dUTPáz redundáns szerepet tölt-e be a mikobaktériumokban, vagy sajátos munkamegosztás van közöttük.

#### 4.7 Mutátor fenotípus és mutációs mintázat

Mivel egyik inaktív mutáció sem eredményezett jól érzékelhető fenotípust, pl. növekedési defektust, kíváncsiak voltunk a létrehozott mutációk hosszú távú hatásaira is. Ezért mutációs rátát mértünk az általunk létrehozott összes mutáns sejtvonalon a rifampicin antibiotikumra kialakuló rezisztencia detektálásával [106,125]. A *dut* mutáns sejtvonalakban jelentősen megemelkedett az így mért mutációs ráta, korrelálva az enzim *in vitro* aktivitáscsökkenésével (7-szeres a S148A, 9-szeres a T138stop és 15-szörös mutációs ráta emelkedés a D83N *dut* mutáns sejtvonalonban). Ezzel szemben az A115F *dcd:dut* mutáns sejtvonalonban csak kétszeres mutációs ráta növekedést tapasztaltunk (17. Ábra).

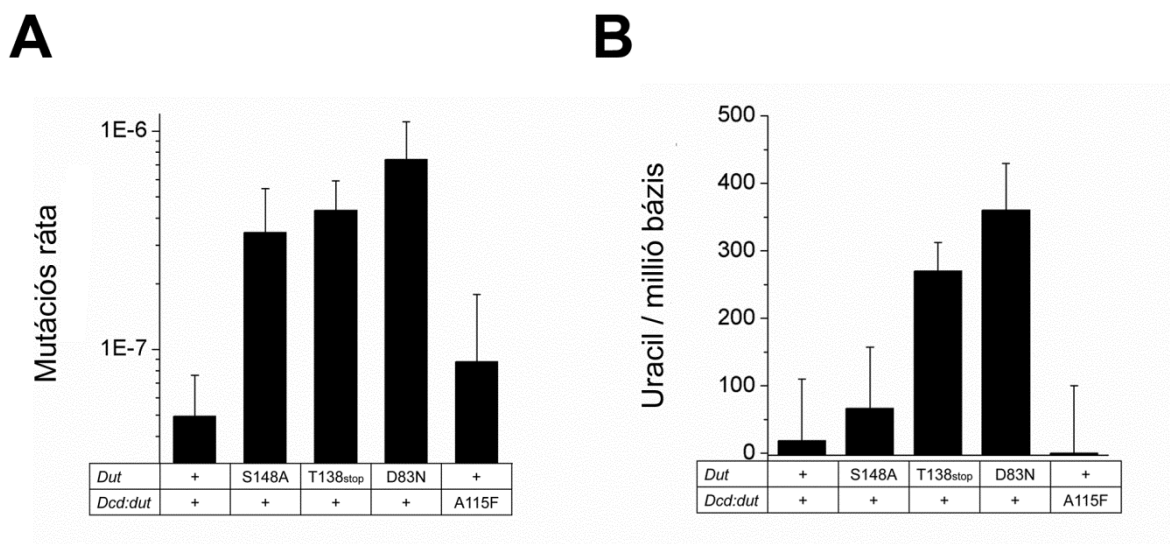
Enzim	dut		+			+	D83N					
	dcd:dut		+			A115F	+					
Mutáció	Esemény (db; %)		Arányos mutációs ráta <sup>a</sup>	Esemény (db; %)		Arányos mutációs ráta <sup>a</sup>	Növekedés <sup>b</sup>	Esemény (db; %)		Arányos mutációs ráta <sup>a</sup>	Növekedés <sup>b</sup>	
T·A→C·G	2	17	7,9E-09	2	14	1,2E-08	1,5	1	6	4,4E-08	5,5	
T·A→G·C	0	0	0	0	0	0	1	1	6	4,4E-08	+	
A·T→T·A	1	8	4,0E-09	3	21	1,8E-08	4,5	2	12	8,8E-08	22	
C·G→T·A	4	33	1,6E-08	4	29	2,5E-08	1,6	6	35	2,6E-07	16	
G·C→T·A	4	33	1,6E-08	1	7	6,1E-09	0,4	5	29	2,2E-07	14	
G·C→C·G	0	0	0	4	29	2,5E-08	+++	0	0	0	1	
inszerció (+1)	1	8	4,0E-09	0	0	0	-	2	12	8,8E-08	22	
tranzíció	6	55	2,7E-08	6	43	3,8E-08	1,4	7	47	3,5E-07	13	
transzverzió	5	45	2,2E-08	8	57	5,0E-08	2,3	8	53	3,9E-07	18	
összes <sup>c</sup>	12	100	4,94E-08	15	100	8,77E-08	1,8	17	100	7,42E-07	15	

**4. Táblázat. Mutációs mintázat a wt, a D83N dut mutáns, valamint a dcd:dut mutáns sejtvonalak esetén.** <sup>a</sup>Az adott mutációra vonatkoztatott arányos mutációs ráta a teljes mutációs ráta adott mutációra vonatkoztatott hányada: Arányos mutációs ráta = Mutációs ráta \* Mutációs esemény (%). <sup>b</sup>A táblázatban mutatott növekedés az adott mutáció típus gyakoriságának növekedése a wt törzshöz viszonyítva: Növekedés = Mutációs ráta (mutáns) / Mutációs ráta (wt). <sup>c</sup>Rifampicin rezisztens kolóniák, amelyek tartalmaztak mutációt a szekvenált régióban. Valamint '+' jellel növekedést, '+++' jellel nagymértékű növekedést jelöltem.

A megnövekedett mutációs rátához tartozó mutációs mintázat felderítése érdekében megvizsgáltuk a wt törzs, a *dcd:dut* mutáns és a legkisebb dUTPáz aktivitással bíró D83N *dut* mutáns sejtvonala mutációs mintázatát a rifampicin rezisztenciáért felelős *rpoB* gén 1000 bp hosszú mutációs hot-spot régiójának [107] szekvenálásával (rifampicin rezisztencia assay [126]). 45-45 rifampicin rezisztens kolóniát szekvenáltunk wt, D83N *dut* és A115F *dcd:dut* mutáns sejtvonalból. Az azonosított mutációkat a függelékben foglaltam össze, az eredmények értékelése a 4. Táblázatban látható. A *dcd:dut* mutáns esetében a mutátor fenotípus egy jól jellemezhető mutációs mintázat változással köthető össze: a G·C→C·G transzverziók gyakorisága 0-ról közel 30 %-ra, míg az A·T→T·A mutációk gyakorisága 8 %-ról több, mint 20 %-ra emelkedett. Ellenben a G·C→T·A tranzíciós mutációk gyakorisága 33 %-ról 7 %-ra esett. A G/C→T mutációk összesített gyakorisága így lecsökkent 66%-ról kicsit több mint az érték felére. Habár a *dut* mutáns sejtvonala mutációs rátája jóval magasabb volt, mint a *dcd:dut* mutánsé, a D83N *dut* mutáns sejtvonala esetében nem találtunk a wt-tól szignifikánsan eltérő mutációs mintázatot (4. Táblázat). A transzverziók : tranzíciók aránya 0,82-ről 1,33-ra emelkedett a *dcd:dut* mutáns, és 1,13-ra az inaktív *dut* mutáns sejtvonala esetében.

#### 4.8 A *dut* mutáns sejtvonalak uracilt halmoznak fel a genomi DNS-ükben

A laborunkban Horváth András kollégám q-PCR alapú módszerét [108] felhasználva, megmértük a mutánsok genomjába beépült uracil mennyiségét is. A mérés azon alapul, hogy a Pfu polimeráz uracilos DNS-t nem képes amplifikálni. A templát DNS-en Pfu és Taq polimerázt is alkalmazva, a polimeráz reakció hatékonyságának összehasonlításával következtetni tudunk a minta uraciltartalmára. Méréseink során azt találtuk, hogy a *dut* mutáns sejtvonalak genomi uracilszintje megemelkedett a wt törzshöz viszonyítva, és ez a megemelkedett genomi uracilszint jól korrelált az enzim *in vitro* aktivitáscsökkenésével (50, 250 és 340-el több uracilt mértünk a S148A, T138stop és D83N *dut* mutáns sejtvonalba milliő bázisonként, mint a wt törzsben) (17. Ábra). Összehasonlításként, a D83N inaktív *dut* mutáns esetében mért 340 uracil / milliő bázispár genomi uracilszint jól egyezik az *ung-E. coli*, valamint az *ung*-MEF sejtekben mért irodalmi adatokkal [108,127], míg a *dut*-*ung-E. coli* körülbelül 20-szor több uracilt tartalmaz a genomjában (kb. 8000 uracil / milliő bázis) [108]. A *dcd:dut* mutáns sejtvonalba nem tudtunk a wt törzstől eltérő uracil mennyiséget detektálni. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a mutáns Dut mellett jelenlévő *in vitro* gyengébb dUTPáz aktivitású Dcd:dut nem elegendő a sejtben keletkező dUTP teljes lebontásához, ami ezáltal képes beépülni a *dut* mutánsok genomi DNS-ébe. Ezért feltételezhetjük, hogy a Dcd:dut enzim nem vesz részt szignifikáns mértékben a dNTP készlet dUTP mentesítésében.

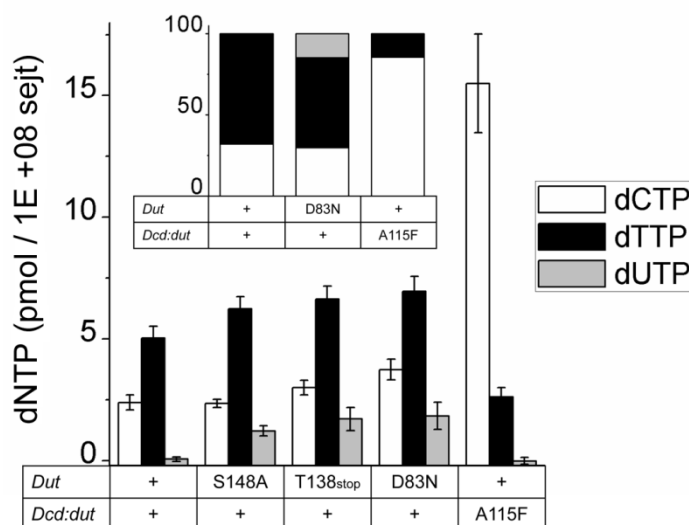


**17. Ábra. A dUTPáz enzimek mutációjának hatásai.** **A)** A vizsgált sejtvonalak mutációs rátája. A mutáns és wt törzsekből három párhuzamos mérés átlagát és hibáját ábrázoltuk, a wt enzimet '+'-al jelöltem. A mért értékek jól korrelálnak az adott mutáns enzim *in vitro* aktivitásával. **B)** A vizsgált sejtvonalak genomi uracil szintje. A mutáns és wt törzsekből három párhuzamos mérés átlagát és hibáját ábrázoltuk a legkisebb mért értékre

normálva, a wt enzimet '+'-al jelöltem. A mért értékek jól korrelálnak az adott mutáns enzim *in vitro* aktivitásával.

#### 4.9 Megváltozott dNTP készlet a mutáns sejtvonalakban

Az eddig tapasztalt eredmények (uracil felhalmozódása a *dut* mutánsokban, valamint megváltozott mutációs mintázat a *dcd:dut* mutánsokban) jobb megértéséhez meghatároztuk a mutánsok sejtbeli pirimidin nukleotid készletét. A dUTP, dTTP és dCTP szintek meghatározására egy PCR-alapú módszert [110,128] alkalmaztunk. A módszer radioaktívan jelölt dATP beépülésének követésére épül. A mérés során a tríciummal jelölt dATP beépülését a mérendő nukleotidra specifikus templátba a sejtextraktum dNTP tartalma limitálja. A dUTP szintet a sejtextraktumban található dUTP rekombináns dUTPázal való lebontásával és a dUTPáz kezeletlen mintákkal összehasonlítva határoztuk meg. Méréseink alapján, a dUTP sejtbeli koncentrációja megemelkedett az összes *dut* mutánsban (18. Ábra). A dTTP:dUTP arány a wt 100:1 arányról körülbelül 5:1 arányra emelkedett a S148A *dut* mutánsban, illetve 4:1 arányra a T138stop és D83N *dut* mutáns sejtvonalakban. Ellenben a dTTP és dCTP koncentrációja és a dTTP:dCTP arány sem változott szignifikánsan a wt törzshöz képest. Azonban, a mutáns sejtek összpirimidin szintje a mutáció aktivitáscsökkentő hatásával korrelálva gyengén megemelkedett (18. Ábra). A D83N mutáns sejtvonalban a dCTP szint 1,6-szorosára, míg a dTTP koncentráció 1,4-szeresére növekedett. Ezzel ellentétben az A115F *dcd:dut* mutáns sejtvonalban normál, alacsony dUTP szintet mértünk, viszont a dTTP:dCTP arány ebben a sejtvonalban teljesen megváltozott (18. Ábra). A dCTP koncentrációja az A115F mutáns sejtextraktumban több mint 6-szoros emelkedést mutatott, míg a dTTP szint a wt érték felére csökkent (18. Ábra). A dCTP szint megemelkedése és a dTTP szint csökkenése is megerősíti, hogy az általunk alkalmazott A115F mutáció inaktivitást okoz a Dcd:dut enzimben *in vivo* is. Eredményeinkből az is következik, hogy a Dcd:dut enzimmel ellentétben, a Dut nem vesz részt szignifikáns mértékben a dCTP és dTTP készlet szabályozásában.



**18. Ábra. A mutáns sejtvonalak pirimidin nukleotid készlete.** A dTTP, dUTP és dCTP nukleotid mennyiségét egy PCR alapú módszerrel határoztuk meg. A mutáns és wt törzsekből három párhuzamos mérés átlagát és hibáját ábrázoltuk, a wt enzimet '+'-al jelöltem. A mért értékek jól korrelálnak az adott mutáns enzim *in vitro* aktivitásával. A belső ábrán a pirimidin nukleotidok százalékos megoszlását ábrázoltam a wt, a D83N dut mutáns és az A115F dcd:dut mutáns esetén.

Az előbbieken ismertetett eredmények (mutációs ráta, genomi uracilszint, dNTP készletbeli változások) jól korrelálnak egymással (5. Táblázat) és a mutáns enzim aktivitáscsökkenésével is, viszont függetlenek az alkalmazott mutációk hatásmechanizmusától (pl. a T138<sup>stop</sup> és D83N mutációk esetén jól látható, hogy csakis az enzim katalitikus aktivitása határozza meg a mutáció okozta fenotípus súlyosságát). Eredményeink alapján a Dcd:dut és a Dut egymástól jól elhatárolódó szerepet töltenek be a pirimidin nukleotidok sejtbeli koncentrációjának szabályozásában és a genom integritásának fenntartásában.

Sejt-vonal	Életképes	Növekedés	dUTP konc.	Genomi uracil	dTTP konc.	dCTP konc.	dCTP:dTTP	Mutációs ráta	Mutációs spektrum	Szerep
wt	igen	normál	wt	wt	normál	normál	normál	wt	wt	
dut-	igen	normál	magas	magas	kvázi normál	kvázi normál	normál	15x	wt	genomi integritás
dcd:dut-	igen	normál	wt	wt	0.5x	6x	eltolódott	2x	dNTP készlet változásokkal korrelál	dTTP szintézis
kettős mutáns	nem									

#### 5. Táblázat. A mutáns sejtvonalak *in vivo* karakterizálásának összefoglalása

A fokozatosan csökkenő aktivitással rendelkező Dut mutáns sejtvonalak megnövekedett mutációs rátával rendelkeznek, amely jól korrelál a genomi uracilszintben mérhető emelkedéssel (18. Ábra). A mikobaktériumok genomjában a konvencionális *ung* mellett egy archea típusú uracil DNS glikoziláz, az *udgB* is kódolva van [129,130], lehetővé téve az igen hatékony uracil kivágó javítást ezekben a baktériumokban [130]. Ez is megerősíti, hogy az uracil felhalmozódása egy nem kívánt folyamat, és valószínűleg együtt járhat a dUTPáz deficiens populáció lassú leromlásával a megemelkedett mutációs ráta következtében. A lehetséges ok, hogy az uracil mégis felhalmozódhat a *dut* mutáns sejtvonalak genomi DNS-ében az, hogy a polimerázok általában nem tesznek különbséget az egyetlen metilcsoportban eltérő dTTP és dUTP között, és kvázi hasonló hatékonysággal építik be a két nukleotidot az adenin bázissal szemben. Tehát a dUTP beépülését a sejtbeli koncentrációja határozza meg. Ha ez magas, mint a *dut* mutánsok esetében, több uracil épül be a replikáció során a genomba. Habár az uracil DNS glikoziláz enzimek nagy hatékonysággal távolítják el a beépült uracilt, a polimeráz nagy valószínűséggel újra visszaépíti az uracilt a sejtbeli magas dUTP koncentráció miatt (20-25x dUTP szint növekedés a mutánsokban, 18. Ábra). Az adeninnel szemben beépült uracilok (U·A párok) nem számítanak mutagénnek [131], ezzel ellentétben az abázikus helyek mutagén hatásairól már megoszlanak a vélemények az irodalomban [132–134]. Emellett a folytonosan beépülő, kivágódó és újra beépülő uracilok feltehetőleg stresszt és genomi instabilitást is okozhatnak a baktériumban. Az *ndk* mutáns *E. coli* sejtvonalon a megnövekedett dUTP szint és az uracil kivágó mechanizmus által generált replikációs intermedierek több százszoros mutációs ráta növekedést okoztak a baktériumban. Az *ung* elmutálásával azonban részben menekíthető volt a mutagén hatás, mivel így lehetővé vált az uracil stabil beépülése a genomba [36]. Az uracil hibajavítás megemelkedett gyakorisága, ami rövid, vagy hosszú DNS szakasz kivágásával is történhet ('short patch' vagy 'long patch' BER [54]), szintén felelős lehet a mutációk megjelenéséért. A *dut* mutációja kismértékben megnövelte a dCTP és dTTP szintjét is [36]. Ehhez hasonlóan a *dut* mutációk *M. smegmatis*-

ban is kismértékű növekedést okoztak a sejtbeli pirimidinek koncentrációjában. Több tanulmányban is leírták, hogy a dNTP készlet megnövekedése általános válasz a DNS károsodás okozta stresszre [1,2,135] és valószínűleg a genotoxikus stressz tolerálására szolgálhat. Ugyanis a megemelkedett dNTP szint megnöveli a mutációs rátát [3,37–39] azáltal, hogy a DNS polimerázok kettős aktivitásának egyensúlya ideiglenesen eltolódik a nukleotid beépítés javára, ezzel csökkentve a polimeráz proofreading aktivitását [38]. Ezt nevezik az irodalomban következő nukleotid effektusnak ('next nucleotide effect'). Ezek a megfontolások a mi eredményeinkkel is összhangban vannak. Ha a beépült uracil vagy az uracil javítása során megjelenő köztitermék, az abázikus helyek bírnának közvetlenül mutagén hatással, akkor a megjelenő mutációk között a timin bázisokat érintő mutációk gyakoriságának dúsulását várnánk. Ezzel szemben, a T·A bázispárokat érintő mutációk gyakorisága nem változott szignifikánsan a *dut* mutáns sejtvonalonban.

Érdekes, hogy a dTTP:dCTP arány teljesen eltolódott a *dcd:dut* mutáns sejtvonalonban, a mutációs rátában mégis csak kétszeres növekedést detektáltunk. Ezek az eredmények szintén összhangban vannak korábbi irodalmi adatokkal, ahol szintén kétszeres mutációs ráta növekedést mértek az általunk is használt rifampicin rezisztencia assay-vel *dcd* mutáns *E. coli*-ban [133]. Azonban azt is sikerült megállapítaniuk, hogy az alkalmazott kísérleti rendszer erősen befolyásolja a talált mutagenicitás mértékét. A tanulmányukban rifampicin rezisztencia alapú mutációs ráta assay-t alkalmazva kétszeres mutációs ráta növekedést tapasztaltak, míg egy LacZ alapú rendszert alkalmazva a mutációs ráta sokkal nagyobbak adódtak (42-szeres növekedés) [133]. Sajnos ez a rendszer jelenleg csak *E. coli*-ban történő vizsgálatokra elérhető, ezért mi a rifampicin rezisztens kolóniák *rpoB* génjének szekvenálásával határoztuk meg a mutációs mintázatot a mutáns *M. smegmatis* sejtvonalakban. Eredményeink szerint a wt és *dut* mutáns sejtvonalakban túlnyomórészt előforduló G·C→T·A mutációk jelentősen lecsökkentek, míg a G·C→C·G mutációk gyakorisága pedig jelentősen nőtt a *dcd:dut* mutáns sejtvonalonban. Ezek a változások logikusnak tekinthetők, mivel a nukleotidok versengenek egymással a polimeráz reakció során. Magas dCTP:dTTP aránynál kevésbé valószínű, hogy a timin hibás bázisként épüljön be, míg a citozin beépülésének valószínűsége megnő. Másrészt a beépülésnél soron következő nukleotid magas koncentrációja megnöveli a szál továbbépítésének valószínűségét akár olyan áron is, hogy a hibásan beépült bázis kijavíthatatlan marad [136–138]. Így a soron következő dCTP a vezető szálon, vagy dGTP a követő szálon megnövelheti az adott pozícióban előforduló mutációk valószínűségét magas sejtbeli dCTP koncentráció esetén. Ez a hatás kimutatható a *dcd:dut* mutánsban is, mivel itt a mutációk 86

%-a citozin előtt található a vezető szálon, míg 58 %-a pedig guanin előtt a követő szálon (7-7 % timin vagy adenin előtt a vezető szálon, és 14 % adenin előtt, míg 28 %-a citozin előtt található a követő szálon). A mutációs mintázat analízis során kapott eredmények részletes bemutatása a függelékben található.

Az irodalmi adatok ellentmondóak arra nézve, hogy a dNTP készletbeli egyensúly felborulása okoz-e mutátor hatást. Kumar és kollégái azt találták, hogy a kismértékű dNTP egyensúly felborulás is erősen mutagén hatású *Saccharomyces cerevisiae*-ben. Habár a különböző egyensúlytalanságok mértéke nem korrelált direkt módon a mutagén hatás mértékével [37]. Míg Nordman és Wright szerint az *ndk* mutáns *E. coli*-ban a mutátor hatás kialakulását nem a dNTP készlet egyensúlyának felborulása okozta [36]. Eredményeink szerint a dCTP:dTTP arány felborulása egy erős “next nucleotide” effektust eredményez, de ez alacsonyabb mutagén hatással rendelkezik, mint a DNS uracilossá válása.

Érdekes módon a felére csökkent dTTP koncentráció nem limitálta a *dcd:dut* mutáns növekedését, és mivel a mutánsok generációs ideje sem változott meg, valószínűsíthetően a DNS replikáció sebességét sem befolyásolta. Ezért úgy tűnik, hogy bármelyik dUTPáz enzim aktivitása már elegendő a dTTP szintézishez elengedhetetlen mennyiségű dUMP termeléséhez és a *M. smegmatis* megfelelő növekedéséhez. A *S. cerevisiae* és *Caenorhabditis elegans* organizmusokban (dCMP dezamináz enzimmel és menekítő útvonallal is rendelkeznek) a *dut* inaktivációja letális. Az *ung* csendesítése / inhibíciója viszont menekíti a fenotípust [17,18] hangsúlyozva ezáltal a genomi uraciláció veszélyét. Ezzel ellentétben a *Trypanosoma brucei* esetén, ahol nincs dCTP / dCMP dezamináz és a dUMP keletkezése teljes egészében a dUDP/dUTP hidrolízis reakción alapszik, az *ung* inaktiválása nemhogy nem menekíti a *dut* csendesítés fenotípusát, de még súlyosbítja is az alacsony dUMP szint okozta citotoxikus hatásokat [19]. A fenti megfontolások alapján a mikobaktériumokban a bifunkciós dCTP dezamináz-dUTPáz megléte a széleskörben előforduló monofunkciós dUTPáz mellett előnyt jelenthet, ugyanis ezekben az organizmusokban a dUTPáz reakció kizárólagos szereppel rendelkezik a dTTP bioszintézis útvonalban.

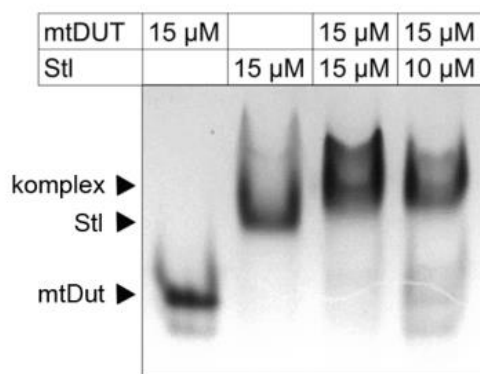
Eredményeinkből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a dUMP keletkezése és a dTTP szintézis a bifunkciós enzim szabályozása alatt áll, annak ellenére hogy a Dcd:dut enzim sokkal kevésbé hatékony dUTPáz, mint a Dut [11,26]. Ez azt sugallja, hogy a mechanisztikus különbségek a két dUTPáz enzim között sokkal nagyobb szerepet játszanak, mint csupán a katalitikus hatékonyság kérdése. A Dcd:dut képes dTTP-t is kötni, aminek a kötődése gátolja

az enzimaktivitást [12]. Ez a negatív visszacsatolás lehetővé teszi a sejtbeli dCTP:dTTP koncentrációk pontos szabályozását. A Dut ezzel szemben csak dUTP-t képes kötni a kötőzseb szigorúbb diszkriminációja miatt, és nincs lehetőség az allosztérikus szabályozásra sem az enzimben [139]. Eredményeink alapján a Dut szerepe a sejtbeli dUTP hatékony lebontása, így biztosítva a genom integritását. Ezzel szemben a bifunkciós Dcd:dut fenntartja és finomhangolja a sejtbeli dCTP:dTTP pirimidin nukleotidok koncentrációját és egymáshoz viszonyított arányát. Az ilyen funkcionális szétválásnak sokféle előnye lehet. A dUTP folyamatosan keletkezik a sejtben a dUDP foszforilálásával a nukleozid difoszfát kináz (Ndk) enzim közreműködésével, vagy a dCTP spontán dezaminációja során. Az így keletkező dUTP felhalmozódását előzi meg a monofunkcionális Dut enzim a dUTP igen hatékony lebontásával. Így “tisztán tartja” a sejt dNTP készletét és megakadályozza a genomban az uracil felhalmozódását. A szabályozás képessége viszont a másik, szerkezetileg nagyon hasonló enzimben, a Dcd:dut-ban van kódolva. Ez az enzim egyébként nem bizonyult túl hatékony dNTP készlet “tisztogató” enzimnek, de ezzel szemben nagyon hatékonyan képes biztosítani a DNS szintézishez alapvetően szükséges pirimidin koncentrációk állandó szinten tartását, valamint ezek pontos arányát is a sejtben (18. Ábra). A bifunkciós enzim jelenlétének másik előnye, hogy a dCTP dezaminálása után a veszélyes köztitermék, a dUTP nem lép ki a sejtbe, hanem az enzimen belül megtörténik a továbbalakítása dUMP-vé [10,11].

Ez a funkciószétválás valószínűleg olyan más organizmusokban is megtörtént, amelyekben egyéb dTTP bioszintézis útvonalak is jelen vannak. A Dut az élővilágban széleskörűen elterjedt, emellett nagyon hatékony dUTP lebontó enzimnek mutatkozott az eddig vizsgált fajokban is [9]. A pirimidin nukleotidok koncentrációjának szabályozása viszont úgy tűnik, hogy a dCTP és/vagy dCMP dezamináz enzimekhez kötődik. A dCTP és dCMP dezaminázok egyaránt allosztérikus szabályzással bírnak, habár nem rendelkeznek szerkezeti homológiával [10,140,141,12,142]. A funkciószétválás mélyebb szintű kutatása segítséget jelenthet a DNS evolúció folyamatának, pl. a timin DNS-ben történő megjelenésének és az uracil DNS-ből való kizárásának a megértéséhez.

#### 4.10 Az Stl gátolja a *M. tuberculosis* dUTPáz *in vitro* enzimaktivitását

Mivel a Dut esszenciális mikobaktériumokban [104], ezért a dUTPáz gátlása új lehetőségeket nyithat a mikobakteriális patogének (*M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis*) elleni küzdelemben. A laborunkban történt korábbi vizsgálatok alapján a *Staphylococcus aureus* patogenicitási sziget (SaPI<sub>bov1</sub>) mester represszora, az Stl képes komplexet alkotni a S.



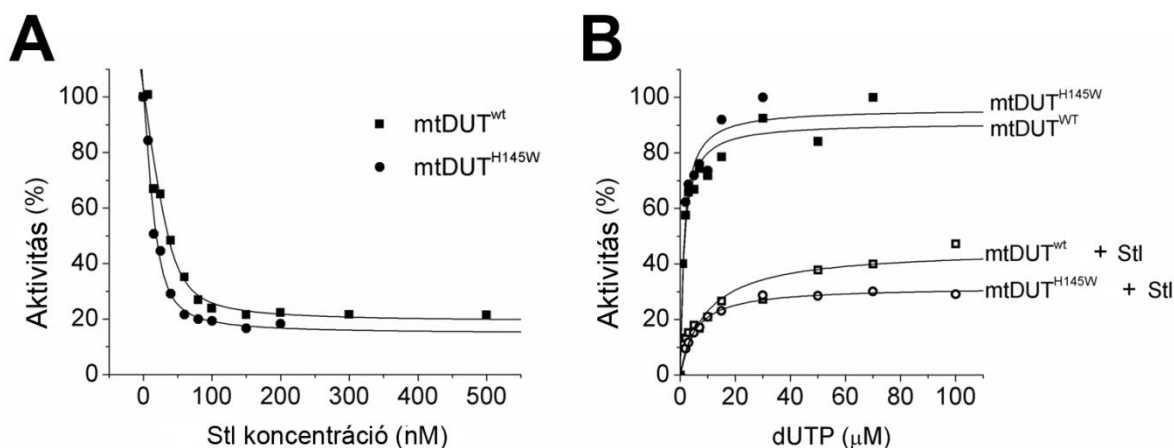
**19. Ábra.** Az *Stl* és a *M. tuberculosis* dUTPáz (*mtDut*) komplexálódása natív gélen. Az alkalmazott fehérjék koncentrációját monomerekben adtuk meg.

*aureus*  $\Phi 11$  fág dUTPáz fehérjéjével, és a dUTPáz enzimatis aktivitása ebben a komplexben gátolt [87]. Natív gélelektroforézissel vizsgáltuk, hogy az *Stl* vajon egy filogenetikailag távoli genusz, a mikobaktériumok dUTPázához is képes-e kötődni. Vizsgálatainkhoz a *M. tuberculosis* dUTPáz (*mtDut*) enzimet választottuk. A gélelektroforézis vizsgálatokat Nyíri Kinga kollégám végezte. Amint a 19. Ábrán is látszik, amennyiben az *Stl* és *mtDut* fehérjék

előinkubált keverékét futtattuk a gélen, a szabad fehérjék futási pozíciójának megfelelő sáv eltűnik és egy új sáv jelenik meg a szabad fehérjék pozíciójánál magasabb pozícióban, amely valószínűsíthetően a két fehérje által alkotott komplexnek felel meg. A legteljesebb komplexálódás *Stl* : *mtDut* = 1:1 alegység aránynál figyelhető meg.

Mivel a natív gél kísérlet alapján a két fehérje egymással kölcsönhat, ezért az *Stl* jelenlétében dUTPáz aktivitás méréseket is végeztünk, hogy megállapítsuk, az *Stl* képes-e gátolni a mikobakteriális dUTPáz enzimaktivitását. A steady-state aktivitás és gátlás méréseket Szabó Judit Eszter és Dobrotka Paula végezték. A gátlási vizsgálatokat vad típusú (*mtDut*<sup>wt</sup>) enzimen és a kvázi vad típusú (*mtDUT*<sup>H145W</sup>), az aktívhelyen triptofánt tartalmazó variánson végeztük [26,115]. A dUTPázok ezzel a pozícióval homológ pozícióban egy konzervált aromás aminosavat (Phe/ Tyr/ Trp) hordoznak, amely átlapol a szubsztrát uracil gyűrűjén, ezáltal koordinálva a szubsztrátot a dUTPáz reakció során [115]. Az aromás aminosav Trp aminosavra cserélése nem befolyásolja a reakció mechanizmusát, viszont a Trp fluoreszcens jelének változásával a reakció követhető [139].

Mindkét enzim variáns esetében azt találtuk, hogy az *Stl* igen erősen gátolja a dUTPáz enzimatis aktivitását (20. Ábra). A gátlás során mind a  $k_{cat}$  és a  $K_M$  értéke megváltozott, ezzel egy kevert típusú gátlásra utalva. A korábbi  $\Phi 11$  dUTPázzal végzett kísérletekhez hasonlóan [87] gátlást csak akkor figyeltünk meg, amennyiben a dUTPáz enzimet preinkubáltuk az *Stl* proteinnel a reakció indítását szolgáló dUTP hozzáadását megelőzően. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a *mtDut*:*Stl* komplex kialakulása elhanyagolhatóan lassú a dUTPáz szubsztrátkötéséhez viszonyítva.



**20. Ábra.** Az Stl gátló hatása a mikobakteriális dUTPáz (mtDUT<sup>wt</sup>, mtDUT<sup>H145W</sup>) aktivitására. **A)** Az adatokat a két dUTPáz variáns gátlóhatására normáltuk. Az adatokra kvadratikus egyenletet illesztve a következő paramétereket kaptuk: látszólagos  $K_i = 5,5 \pm 4,6$  nM a mtDUT<sup>wt</sup> és  $4,4 \pm 2,8$  nM a mtDUT<sup>H145W</sup> enzimre. Az aktivitás csökkenés maximális amplitúdója  $83,8 \pm 6,7$  % volt a mtDUT<sup>wt</sup> és  $87,1 \pm 5,8$  % a mtDUT<sup>H145W</sup> enzimre. **B)** A mtDUT<sup>wt</sup> és mtDUT<sup>H145W</sup> enzimaktivitásának szubsztrátfüggése az Stl jelenlétében és hiányában. Az adatokra Michaelis-Menten egyenletet illesztve a következő paramétereket kaptuk:  $K_M = 1,4 \pm 0,3$   $\mu$ M a mtDUT<sup>wt</sup> és  $1,3 \pm 0,4$   $\mu$ M a mtDUT<sup>H145W</sup> enzimre Stl hiányában, illetve  $K_M = 9,7 \pm 2,5$   $\mu$ M a mtDUT<sup>wt</sup> és  $5,3 \pm 0,4$   $\mu$ M a mtDUT<sup>H145W</sup> enzimre 150 nM Stl jelenlétében. Az adatokat a  $V_{max}$  értékekre normáltuk.

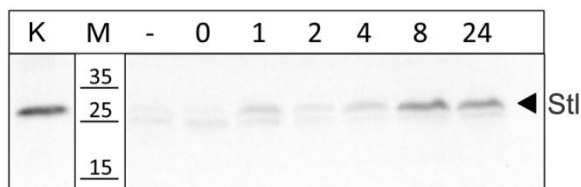
A különböző Stl koncentrációkkal való titrálás eredménye szerint a látszólagos gátlási állandó nagyon alacsony (nanomoláris nagyságrendű  $K_i$  érték, 20. Ábra). Ez az érték ugyanabba az alacsony tartományba esik, mint a *S. aureus*  $\Phi 11$  fág dUTPáz esetén [87]. Eszerint az Stl a *S. aureus*  $\Phi 11$  fág dUTPázal és a *M. tuberculosis* dUTPázal is hasonlóan stabil komplexet képez, viszont az Stl okozta maximális gátlás a mtDut esetén csak hozzávetőleg 80 %, szemben a 100 %-os  $\Phi 11$  fág dUTPáz gátlással, ami a két dUTPáz gátlásában mechanisztikus különbségekre utalhat.

A dUTPáz aktivitás szubsztrátfüggését is vizsgáltuk Stl hiányában és jelenlétében. Eredményeink szerint mindkét enzim (wt és H145W mutáns) maximális enzimaktivitása hasonló mértékben csökkent Stl jelenlétében, míg a Michaelis konstans ( $K_M$ ) megemelkedett (20. Ábra). Ezek az adatok mind arra utalnak, hogy az Stl a mikobakteriális dUTPázal ugyanúgy lassú, de szoros kölcsönhatást alakít ki, mint a  $\Phi 11$  dUTPáz esetén [87]. A gátlás mechanizmusának megértésére végzett további kinetikai kísérleteket doktori dolgozatomban nem tárgyalom.

#### 4.11 Az Stl fehérjét expresszáló *M. smegmatis* sejtvonalak létrehozása

Az *in vitro* gátlási kísérletek eredményei után szeretnénk volna megvizsgálni a kölcsönhatást az élő sejtben is. A sejtbeli gátlás vizsgálatára kétféle *M. smegmatis* sejtvonalat hoztunk létre. Az egyik sejtvonal genomjába az *attB* helyre integráltuk az Stl kódoló szekvenciáját egy

folyamatosan kifejeződő, erős promóter meghajtásával (pGem-Stl). Az alternatív sejtvonal olyan episzómális plazmidot hordozott, amelyről az Stl expressziója tetraciklin hozzáadásával



**21. Ábra.** Az Stl expressziója az általunk létrehozott *M. smegmatis* sejtvonalakban. K-val a konstans expressziót, M-el a markert jelöltem. A számok az indukálás után eltelt időt jelölik órában megadva.

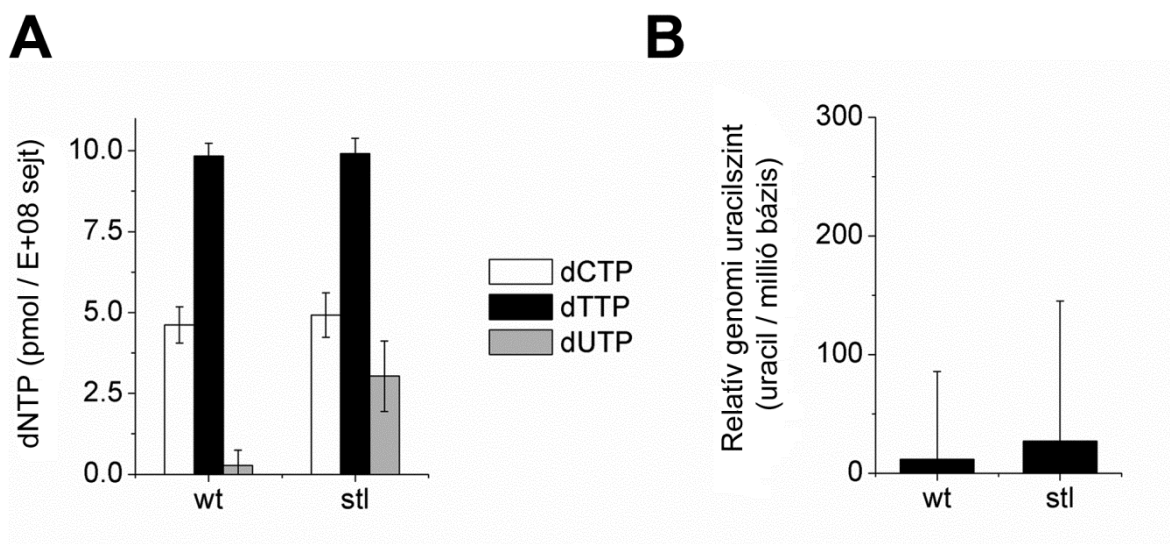
indukálható (pKW08-Stl). Ehhez elektrokompetens vad típusú *M. smegmatis* sejteket transzformáltunk a pGem-int-Stl, illetve a pKW08-Stl plazmiddal. Az AU-1 taggel ellátott Stl protein expresszióját a transzformált sejtvonalakban Western blot segítségével igazoltuk (21. Ábra). Az Stl expressziója 20 ng/ml tetraciklinnel történő indukálás után 1 órával már jól látható, 8

órával az indukció után pedig már hozzámérhető a konstans expresszióval rendelkező sejtvonal expressziójához (21. Ábra). Indukció nélkül az Stl expressziója nagyon alacsony.

#### 4.12 Az Stl expressziója magas sejtbeli dUTP szintet okoz *M.smegmatis*-ban

A dolgozatomban ismertetett korábbi eredményeink szerint a dUTPáz enzimaktivitásának csökkenése egyértelműen nyomon követhető a sejtbeli dUTP koncentráció vizsgálatával. Ezért az Stl sejtbeli dUTPáz gátlásának vizsgálatára meghatároztuk a pirimidin nukleotidok sejtbeli koncentrációját a korábbiakban ismertetett módon [109]. Méréseinkhez a konstans expressziót mutató, pGem-int-Stl plazmiddal transzformált sejtvonalat használtuk, mert ebben a sejtvonalban az Stl expressziója erősebbnek bizonyult az indukálható sejtvonalban mért expressziós szintnél. Kontrollként az Stl kódoló szekvenciáját nem tartalmazó üres plazmiddal (pGem-int-empty) transzformált sejtvonalat alkalmaztuk. Eredményeink szerint a sejtbeli dTTP és dCTP koncentrációk nem különböztek szignifikánsan a kontroll sejtvonalétól, amely csak üres vektort tartalmazott. Ezzel szemben a sejtbeli dUTP koncentráció hasonló szintre emelkedett, mint a korábban ismertetett dUTPáz mutáns sejtvonalak esetében. Az Stl-t expresszáló sejtvonalak magas dUTP szintje (22. Ábra) igazolja az Stl *in vivo* dUTPáz gátló hatását. A sejtvonal normál dTTP és dCTP koncentrációja arra utal, hogy az Stl nem hat kölcsön a szerkezetileg hasonló mikobakteriális bifunkciós dCTP dezamináz:dUTPáz enzimmal. Ezek után a genomi uracil szinteket is megmértük a vizsgált sejtvonalakban a korábbiakban ismertetett módon, azonban a vizsgált sejtvonalak genomi uracil szintjében csak kismértékű növekedést detektáltunk. Ez egyáltalán nem meglepő, ugyanis *in vitro* méréseink szerint az Stl csak körülbelül 80 %-os hatékonysággal gátolja a dUTPáz enzimet, szemben a több nagyságrenddel csökkent aktivitású mutáns Dut enzimekkel

(T138stop és D83N mutáns Dut) rendelkező sejtvonalakkal, ahol jelentősen magasabb genomi uracil szintet tudtunk mérni. Méréseink szerint a korábban bemutatott hasonló nagyságrendű aktivitással bíró S148A mutáns esetén sem volt jelentős a genomi uracil szint növekedése (22. Ábra).



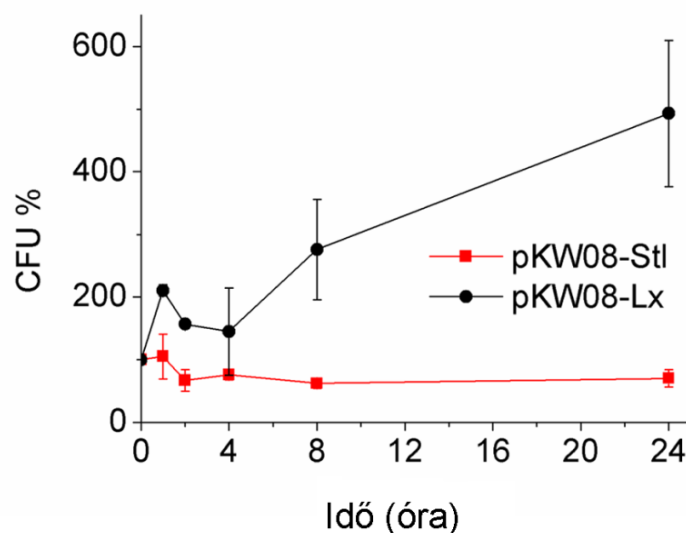
**22. Ábra. Az *Stl* gátolja a *dUTPáz* enzim aktivitását az élő sejtben.** **A)** Az *Stl*-t expresszáló sejtvonal pirimidin nukleotid készlete. A *dTTP*, *dUTP* és *dCTP* nukleotidok mennyiségét egy PCR alapú módszerrel határoztuk meg. A sejtvonalakból három párhuzamos mérés átlagát és hibáját ábrázoltuk. **B)** A vizsgált sejtvonalak genomi uracil szintje. A sejtvonalakból három párhuzamos mérés átlagát és hibáját ábrázoltuk a legkisebb mért értékre normálva.

Ez arra utal, hogy a replikáció során a megemelkedett koncentrációjú *dUTP*-t tartalmazó poolból beépülő *dUMP* jelentős részét képes a sejtbeli uracil kivágó rendszer kijavítani. A bevezető részben láthattuk, hogy mikobaktériumokban az élővilágban általánosan jelenlévő Ung enzim mellett egy az Archeákban kódolt uracil-DNS glikozilázal rokon *UdgB* enzim is jelen van [129,130], elősegítve ezzel a hatékony hibajavítást.

#### 4.13 Az *Stl* expressziója megzavarja *M. smegmatis* sejtvonalak telepkezését

A növekedési kísérletek elvégzéséhez az indukálható *Stl* expresszióval rendelkező sejtvonalakat (pKW08-*Stl* plazmiddal transzformált sejtvonal) alkalmaztuk, hogy kizárjunk bármilyen hosszú távon fellépő kompenzáló hatást. Negatív kontrollként a luciferáz gént indukálható módon expresszáló sejtvonalat (pKW08-Lx plazmiddal [103] transzformált sejtvonal) alkalmaztuk. Azt találtuk, hogy az *Stl* expresszió indukálásával a sejtvonal által képzett kolóniák száma (CFU) nem növekedett, hanem kis visszaesés után állandó maradt (23. Ábra). Ezzel szemben a kontroll sejtvonal esetén a luciferáz enzim expressziójának indukálása után a kolóniák száma exponenciálisan növekedett, ezzel arra utalva, hogy az *Stl*

kifejeződése kismértékben gátolta a sejtek osztódását. Ezt alátámasztja egy másik megfigyelésünk is, miszerint az Stl-t konstans módon expresszáló sejtvonal létrehozásakor ugyanolyan mennyiségű plazmidot elektroporálva a kontroll (pGem-int-empty) és Stl-t tartalmazó plazmidból (pGem-int-Stl), az Stl-t tartalmazó vektor esetén jóval alacsonyabb transzformációs hatékonyságot tudtunk csak elérni, mint a kontroll plazmid esetében. Hasonlóan a Dut mutáns sejtvonalakhoz, folyadékkultúrában az optikai denzitás követésével ebben az esetben sem tudtunk szignifikáns növekedés gátló hatást kimutatni, így arra következtethetünk, hogy a dolgozatomban korábban már ismertetett esszenciális mikobakteriális hurok motívum által közvetített interakciót az Stl kötődése valószínűleg nem, vagy csak kismértékben zavarja.



**23. Ábra.** Az Stl expressziójának hatása a sejtvonalak kolónia számára. A számok az indukálás után eltelt időt jelölik órában megadva.

Habár a konvencionális hibás bázispár javítás (MMR) hiánya és az error-prone polimerázok jelenléte evolúciós előnyt jelenthet és a mikobakteriális genom jól ismert változékonyságát is okozhatja [61], eredményeink arra utalnak, hogy a normál nukleotid készlet és a genom integritásának fenntartása különösen fontos a mikobaktériumokban. Ezt alátámasztja a mikobakteriális genomban többszörösen kódolt, funkcionálisan nagyon hasonló enzimek jelenléte a preventív és báziskivágó javítási mechanizmusokban is (6. Táblázat).

Fehérje	Funkció	Gén	Mtb homológ
Preventív javító útvonalak			
MutT1	8-oxoGTP hidrolízis	MSMEG_2390	Rv2985
MutT2		MSMEG_5148	Rv1160
MutT3		MSMEG_0790	Rv0413
MutT4		MSMEG_6927	Rv3908
Dut	dUTP hidrolízis	MSMEG_2765	Rv2697c
Dcd:dut		MSMEG_0678	Rv0321
Báziskivágó javítási (BER) útvonalak			
MutM1 (Fpg1)	glikoziláz, 8-oxoG eltávolítás	MSMEG_2419	Rv2924c
MutM2	pszeudogén, nincs DNS kötődés és glikoziláz aktivitása	-	Rv0944
Nei1	endonukleáz VIII, oxidált pirimidinek kivágása	MSMEG_4683	Rv2464c
Nei2		MSMEG_1756	Rv3297
Ung	uracil kivágás	MSMEG_2399	Rv2976c
UdgB	uracil, hipoxantin, etenocisztein kivágása	MSMEG_5031	Rv1259
TagA	3-metiladenin and 3-metilguanin kivágása	MSMEG_5082	Rv1210
AlkA	3-metilpurin és 7-metilpurin kivágása	MSMEG_4925	Rv1317c
Mpg	3-metiladenin kivágása	MSMEG_3759	Rv1688

6. Táblázat A mikobaktériumok genomjában többszörösen kódolt, hasonló reakciókat katalizáló hibajavító enzimek.

Az Stl-t expresszáló mikobaktérium esetén jól detektálható fenotípust (megnövekedett dUTP koncentráció és a kolóniaképzés csökkenése) tudunk megfigyelni annak ellenére, hogy az *in vitro* gátlási görbék alapján körülbelül 20 %-os dUTPáz aktivitás maradhat a sejtben. Ezzel szemben humán sejtekben a dUTPáz siRNS-sel való szinte teljes csendesítése is csak akkor mutat bármilyen detektálható fenotípust, ha emellett FdUrd-nal kezeljük a *dut*-csendesített sejteket [143,144].

Mivel a dUTPáz Stl fehérjével történő gátlása nem okoz letalitást *M. smegmatis*-ban, ez az interakció valószínűleg kevésbé lehet hasznos a mikobaktériális patogének elleni küzdelemben, ellenben *in vitro* vagy *in situ/in vivo* dUTPáz gátlási kísérletekben jól hasznosítható lehet, az Ung proteint gátló, széles körben alkalmazott, szintén fág (*Bacillus subtilis* bakteriofág PBS2) eredetű Ugi (uracil-DNS glikoziláz inhibitor) proteinhez hasonlóan [81,93,145,146]. Lehetséges dUTPáz inhibitorok jelenlétét korábban több fajban is leírták (PBS2 bakteriofág fertőzött *B. subtilis* sejtekben és *Drosophila melanogaster* sejt extraktumokban [88,89]), de egyik esetben sem sikerült az inhibitor izolálni, vagy a gátlást molekuláris szinten is bizonyítani. Kísérleteink során igazoltuk, hogy a *S. aureus* eredetű Stl, nemcsak a  $\Phi 11$  fág dUTPáz inhibitora [87], hanem a mikobaktériális dUTPázokat is hatékonyan gátolja mind *in vitro* körülmények között, mind a bakteriális sejtben. Az inhibitor használata mind *Staphylococcus*-ban, mind *Mycobacterium*-ban hatékony eszközként szolgálhat a nukleotid metabolizmus útvonalak sejt környezetben történő vizsgálatához.

További eukarióta és bakteriális dUTPázok gátlásának tesztelése is folyamatban van laborunkban.

## 5 Következtetések

A dUTPáz enzimek a dTTP bioszintézisében és a genomi integritás megőrzésében betöltött szerepét nagyon nehéz szétválasztani az eddigi tanulmányok alapján az útvonalak komplexitása és az enzimek hiányában fellépő gyakori letalítás miatt. A helyzetet tovább bonyolítja, hogy a menekítő útvonalon keletkező dTMP elfedheti az ezen enzimek funkciójának részletes feltárására irányuló kísérletek eredményeit. A mikobaktériumok egy természetesen előforduló jó modellt nyújtanak ezen reakciók, enzimek vizsgálatára, ugyanis ezekben az élőlényekben sem menekítő útvonal, sem dCMP dezamináz enzim nincs jelen, így a dTMP szintézise csakis a dUTPáz reakción keresztül valósulhat meg. Eredményeinkből kiderül, hogy a timidilát bioszintézise és a dUTP eliminálása külön szabályozás alatt áll a mikobakteriális sejtekben. Ez a megállapítás azonban nemcsak mikobaktériumokra, hanem az élővilág szélesebb körében is igaz lehet. Ismert, hogy a citozin-nukleotid dezamináz enzimek (Dcd, Dcd:dut, Dctd) mind allosztérikus szabályozhatóak, ezáltal képesek kontrollálni a pirimidin nukleotid szinteket és a nukleotidok arányát is a dNTP készletben. Ezzel szemben a dUTPáz enzim nagy specifitású és hatékonyságú reakciót katalizál, amely a sejtben képződő dUTP-t nagy hatékonysággal hidrolizálja, ezáltal tisztán tartja a dNTP készletet, és megóvjva a genomi DNS-t a replikáció során az esetleges uracilbeépüléstől. A különböző organizmusokban végzett dUTPáz manipulációk hatásait a függelékben található táblázatban gyűjtöttem össze. Ennek alapján az alábbi példák szemléltetik, hogy a dUTPáz szupercsaládon belüli funkciószétválás széleskörű lehet, és hogy a *M. smegmatis* modellben kapott eredményeink kiterjeszthetők az élővilág egy jelentős részére.

Humán sejtekben, ahol a fő dUMP input a dCMP dezamináz reakcióban keletkezik, a *dut* csendesítése nem okoz szignifikáns változást a dTTP szintjében, csak ha párhuzamosan a timidilát szintáz enzimet is gátolták [144,147,148]. A szintén dCMP dezaminázt kódoló *C. elegans* és *S. cerevisiae* esetében a dUTPáz elrontása menekíthető az Ung egyidejű inaktivációjával [17,18], amely arra utal, hogy a dUTPáz szerepe ezekben az élőlényekben is elsősorban a genomi integritás védelme. A *D. melanogaster* Dut csendesítés esetén tapasztalt DNS száltörések megléte [119] szintén a Dut genomi integritás megőrzésében való szerepét erősíti meg. Az *Arabidopsis thaliana* dUTPázának különböző mértékű csendesítésével szintén letalítást, illetve a DNS száltörések előfordulásának fokozódását írták le [149,150]. Sajnos a humán sejtvonalak kivételével egyik esetben sem vizsgálták meg a sejtek pirimidin nukleotid készletének összetételét.

A monofunkciós dCTP dezamináz enzimet kódoló *E. coli*-ban már valamivel fontosabb szerep jut a dUTPáz enzimnek a dTTP bioszintézisében is, mivel a dezamináz reakció terméke itt a dUTP, amit még a dUTPáz enzimnek hidrolizálnia kell, hogy a dTMP bioszintézis prekursora, a dUMP keletkezzen. Hochhauser és munkatársai azt találták, hogy az általuk vizsgált *dut* mutánsok kb. 90 % aktivitáscsökkenéssel, jelentősen megemelkedett mutációs rátával, és lassabb növekedési képességgel rendelkeztek [151]. Ahogy korábbi organizmusok esetén is láthattuk, *E. coli*-ban is képes menekíteni a dUTPáz elrontása okozta fenotípust mind az Ung inaktivációja (genomi integritás megőrzésében való szerep), mind pedig külső timidin adása a tápfolyadékhoz [16,152,153]. Ez a timidin bioszintézis reakció robosztusságára utal, hogy az egyes reakcióutak képesek átvenni egymás feladatát. Ezzel szemben a *dut* kiütés okozta letalitást nem menekítette sem az *ung* inaktivációja, sem külső timidinforrás adása sem *E. coli* esetén [154].

*T. brucei*-ben a dUMP bioszintézise kizárólagosan a dUTPáz reakción keresztül történik, ugyanis ebben az organizmusban sem dCTP, sem dCMP dezamináz enzimek nem találhatók. Ezért az UDP-ből induló Nrd enzim által katalizált reduktáz reakció sokkal nagyobb szerepet kap, mint az élővilág más részeiben. A Tk enzim által katalizált menekítő útvonal a dUTPáz hiányában szintén nagy szerepet kap a timidilát bioszintézisében. Ezzel összhangban a dUTPáz csendesítés és kiütés menekíthető külső timidin forrás adásával [155], tehát a menekítő útvonal át tudja venni a dUTPáz timidin bioszintézisben betöltött szerepét. Viszont az Ung inaktiválása itt csak súlyosbítja az amúgy is erős citotoxikus hatásokat [19]. Azt is sikerült kimutatniuk, hogy a dUTPáz csendesítése növeli a mutációs rátát, valamint a DNS száltörések előfordulását is [156].

Az előbbieken ismertetett irodalmi adatok alapján láthatjuk, hogy ez a funkciószétválás valószínűleg olyan más organizmusokban is megtörtént, amelyekben egyéb dTTP bioszintézis útvonalak is jelen vannak. A funkciószétválás mélyebb szintű kutatása segítséget jelenthet a DNS evolúció folyamatának, pl. a timin DNS-ben történő megjelenésének, valamint az uracil DNS-ből való kizárásának a megértéséhez is.

Továbbá kísérleti eredményeink alapján azt a következtetést is levonhatjuk, hogy a mikobakteriális dUTPáznak valamilyen ismeretlen, második funkciója is van, melyet a mikobaktérium-specifikus hurok motívum közvetít. Ugyanis a hurok eltávolítása letális hatású volt, ezért ez a motívum hatékony és feltételezhetően specifikus gyógyszercélpontként szolgálhat. Ezirányban laborunk további kutatásokat végez.

Azt is kimutattuk, hogy a mikobakteriális dUTPáz aktivitása gátolható a *S. aureus* eredetű Stl fehérjével. A gátlás a dUTP szint növekedését eredményezi, valamint zavart okoz az Stl-t expresszáló sejtvonalak telepképzésében. Eredményeink szerint az Stl a dUTPáz enzimek általános inhibítora lehet, analóg módon az Ugi-Ung kölcsönhatáshoz. A további eukarióta és bakteriális dUTPázok gátlásának tesztelése is folyamatban van laborunkban.

## 6 Összefoglalás

A dTTP bioszintézise és a genomi uracilfelhalmozódás megelőzése két, a dUTPáz reakció által összekapcsolt folyamat. A dUTPáz hidrolízis reakció végterméke, a dUMP prekursoraként szolgál a dTTP bioszintéziséhez, míg a sejtbeli dUTP elbontása azt szolgálja, hogy a sejt hatékonyan elkerülhesse az uracil beépülését a DNS-be a replikáció során. Annak érdekében, hogy ezt a kettős szerepet megvizsgáljuk, pontmutáns *M. smegmatis* sejtvonalakokat hoztunk létre és karakterizáltuk az enzimaktivitás változásokat *in vitro* körülmények között, illetve ezek hatását a sejten belül. Ehhez a mikobaktériumok jó modellként szolgálnak, ugyanis a dUMP keletkezése ezekben az élőlényekben kizárólag a két dUTPáz enzim által katalizált reakción keresztül történik.

Kísérleteinkhez olyan *M. smegmatis* sejtvonalakokat hoztunk létre, melyekben a Dut aktivitását különböző pontmutációk alkalmazásával fokozatosan csökkentettük. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a *dut* mutánsokban a mutációs ráta és a genomi uracilszint az aktivitás csökkenésének függvényében emelkedett, míg a mutációk típusai nem változtak számottevően a vad típusú sejtvonallalhoz viszonyítva. Ezzel szemben a *dcd:dut* mutáns sejtvonalonban erősen eltolódott dNTP arányokat és mutációs spektrumot detektáltunk. Kimutattuk, hogy az egyébként nagyon hasonló szerkezettel rendelkező dUTPáz (*dut*) és a bifunkciós dCTP dezamináz/dUTPáz (*dcd:dut*) funkciója evolúciója különvált a genomi integritás fenntartására és a dNTP készlet szabályozására. A dNTP bioszintézis szabályozásának és a DNS-be beépíthető dUTP alacsony szinten tartásának evolúciós szétválása valószínűsíthetően előnyös a genomi integritás fenntartásában.

Szintén megmutattuk, hogy egy mikobaktérium-specifikus motívum törlése a Dut felszínéről letális hatású. E specifikus motívum eltávolítása ezzel szemben az *in vitro* enzimaktivitást nem befolyásolta jelentősen, így valószínűsíthetően az általunk detektált letalitást egy még ismeretlen, feltérképezésre váró kölcsönhatás okozhatja. Eredményeink alapján a Dut enzim antituberkulotikus hatóanyagok célpontjaként szolgálhat a génusz-specifikus felszíni huroknak köszönhetően.

Egyéb szervezetekben már azonosítottak a dUTPázzal kölcsönható fehérje partnert. Egy ilyen kölcsönhatás vizsgálata laboratóriumunkban is folyik. Ennek részeként megállapítottuk, hogy a *Staphylococcus* patogenezisi sziget represszor fehérje, az úgynevezett Stl<sub>SaPIbov1</sub> (Stl) képes gátolni a dUTPáz reakciót mikobaktériumban is. Ismereteink szerint ez az első irodalmi adat,

amelyben különböző fajok fehérjéi között működő gátlást írtak le dUTPázok esetén. Eredményeink szerint a *S. aureus* Stl és a *M. tuberculosis* dUTPáz stabil komplexet képeznek, amelyben a dUTPáz aktivitása erősen gátolt. Emellett az Stl-t mikobakteriális sejtben expresszálva a sejtbeli dUTP szint megemelkedését detektáltuk, valamint a dUTPáz inhibitor sejtbeli expressziója zavart okozott a *M. smegmatis* kolóniaképzésében is. Eredményeink szerint az Stl potenciális általános dUTPáz inhibitor lehet, valamint fontos reagensként használhatjuk különböző *in vitro/in situ* vagy *in vivo* dUTPáz gátlási kísérletekben.

## 7 Summary

dTTP biosynthesis and the exclusion of uracil from DNA for genomic stability are linked through the dUTPase reaction. The hydrolysis product dUMP has exclusive biosynthetic role in dTTP biosynthesis while the elimination of excess dUTP prevents DNA uracilation. We combined enzymology and genetics to investigate this potential double role in *Mycobacterium smegmatis* beneficially conferring two dUTPases and no alternative ways to produce dUMP.

We created mutant bacterial strains in which *dut* activity was gradually tuned down. We detected that the mutation rate and genomic uracil content increased in correlation with the engineered *in vitro* activity-loss while the mutational spectrum and the dNTP balance remained normal in *dut* point mutant strains. In contrast, mutants carrying inactive *dcd:dut* exhibited a highly perturbed dNTP balance and markedly changed mutational spectrum. We showed that dUTPase (*dut*) and the bifunctional dCTP deaminase/dUTPase (*dcd:dut*) sharing the same core structure and reaction product seem to be adapted to the distinct roles of genome integrity maintenance and dNTP pool balancing. We suggest that de-coupling of dNTP regulation and uracil elimination is advantageous for maintaining genome integrity.

We also demonstrated that the genus-specific loop on the surface of the mycobacterial dUTPase molecule confers a yet unknown but essential function. We also showed that the deletion of the mycobacteria-specific loop has no major effect on dUTPase enzymatic properties *in vitro* and thus a yet to be identified loop-specific interaction seems to be essential within the bacterial cell context. Our results indicate the potential of dUTPase as a target for antitubercular drugs and identify a genus-specific surface loop on the enzyme as a selective target.

We also reported that a *Staphylococcus* pathogenicity island repressor protein called Stl<sub>SaPIbov1</sub> (Stl) exhibits potent dUTPase inhibition in *Mycobacteria*. To our knowledge, this is the first indication of a cross-species inhibitor protein for any dUTPase. We demonstrated that the *Staphylococcus aureus* Stl and the *Mycobacterium tuberculosis* dUTPase form a stable complex and that in this complex, the enzymatic activity of dUTPase is strongly inhibited. We also found that the expression of the Stl protein in *Mycobacterium smegmatis* led to highly increased cellular dUTP levels in the mycobacterial cell, this effect is in agreement with its dUTPase inhibitory role. In addition, Stl expression in *M. smegmatis* decreased colony forming ability, as well. Therefore, we propose that Stl can be considered a potent cross-

species dUTPase inhibitor and may be used as an important reagent in dUTPase inhibition experiments either *in vitro/in situ* or *in vivo*.

## 8 Irodalomjegyzék

- [1] P. Nordlund, P. Reichard, Ribonucleotide reductases., *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 681–706. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142443.
- [2] S. Gon, J. Beckwith, Ribonucleotide Reductases: Influence of Environment on Synthesis and Activity, *Antioxidants Redox Signal.* 8 (2006).
- [3] D. Ahluwalia, R.J. Bienstock, R.M. Schaaper, Novel mutator mutants of *E. coli* nrdAB ribonucleotide reductase: insight into allosteric regulation and control of mutation rates., *DNA Repair (Amst.)* 11 (2012) 480–7. doi:10.1016/j.dnarep.2012.02.001.
- [4] D. Ahluwalia, R.M. Schaaper, Hypermutability and error catastrophe due to defects in ribonucleotide reductase., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 18596–601. doi:10.1073/pnas.1310849110.
- [5] M.A. Bernard, N.B. Ray, M.C. Olcott, S.P. Hendricks, C.K. Mathews, Metabolic functions of microbial nucleoside diphosphate kinases., *J. Bioenerg. Biomembr.* 32 (2000) 259–67.
- [6] H. Mollgard, J. Neuhard, Deoxycytidylate Deaminase from *Bacillus subtilis*, *J. Biol. Chem.* (1978).
- [7] J. Neuhard, E. Thomassen, Deoxycytidine triphosphate deaminase: identification and function in *Salmonella typhimurium*., *J. Bacteriol.* 105 (1971) 657–65.
- [8] V. Bianchi, E. Pontis, P. Reichard, Regulation of pyrimidine deoxyribonucleotide metabolism by substrate cycles in dCMP deaminase-deficient V79 hamster cells., *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987) 4218–24.
- [9] B.G. Vértessy, J. Tóth, Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases., *Acc. Chem. Res.* 42 (2009) 97–106. doi:10.1021/ar800114w.
- [10] J.H.B. Siggaard, E. Johansson, T. Vognsen, S.S. Helt, P. Harris, S. Larsen, et al., Concerted bifunctionality of the dCTP deaminase-dUTPase from *Methanocaldococcus jannaschii*: a structural and pre-steady state kinetic analysis., *Arch. Biochem. Biophys.* 490 (2009) 42–9. doi:10.1016/j.abb.2009.08.005.
- [11] S.S. Helt, M. Thymark, P. Harris, C. Aagaard, J. Dietrich, S. Larsen, et al., Mechanism of dTTP inhibition of the bifunctional dCTP deaminase:dUTPase encoded by *Mycobacterium tuberculosis*., *J. Mol. Biol.* 376 (2008) 554–69. doi:10.1016/j.jmb.2007.11.099.
- [12] E. Johansson, M. Thymark, J.H. Bynck, M. Fanø, S. Larsen, M. Willemoës, Regulation of dCTP deaminase from *Escherichia coli* by nonallosteric dTTP binding to an inactive form of the enzyme., *FEBS J.* 274 (2007) 4188–98. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05945.x.
- [13] C.W. Carreras, D. V Santi, The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase., *Annu. Rev. Biochem.* 64 (1995) 721–62. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.003445.
- [14] S.G. Gattis, B.A. Palfey, Direct Observation of the Participation of Flavin in Product Formation by *thyX*-Encoded Thymidylate Synthase, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 832–833. doi:10.1021/ja0432214.

- [15] A.S. Fivian-Hughes, J. Houghton, E.O. Davis, Mycobacterium tuberculosis thymidylate synthase gene thyX is essential and potentially bifunctional, while thyA deletion confers resistance to p-aminosalicylic acid., Microbiology. 158 (2012) 308–18. doi:10.1099/mic.0.053983-0.
- [16] H.R. Warner, B.K. Duncan, C. Garrett, J. Neuhard, Synthesis and metabolism of uracil-containing deoxyribonucleic acid in Escherichia coli., J. Bacteriol. 145 (1981) 687–95.
- [17] M. Dengg, T. Garcia-Muse, S.G. Gill, N. Ashcroft, S.J. Boulton, H. Nilsen, Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates., EMBO Rep. 7 (2006) 1046–51. doi:10.1038/sj.embor.7400782.
- [18] M. Guillet, P.A. Van Der Kemp, S. Boiteux, dUTPase activity is critical to maintain genetic stability in Saccharomyces cerevisiae., Nucleic Acids Res. 34 (2006) 2056–66. doi:10.1093/nar/gkl139.
- [19] V.M. Castillo-Acosta, F. Aguilar-Pereyra, D. García-Caballero, A.E. Vidal, L.M. Ruiz-Pérez, D. González-Pacanowska, Pyrimidine requirements in deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase deficient Trypanosoma brucei mutants, Mol. Biochem. Parasitol. 187 (2013) 9–13. doi:10.1016/j.molbiopara.2012.11.003.
- [20] M. Harkiolaki, E.J. Dodson, V. Bernier-Villamor, J.P. Turkenburg, D. González-Pacanowska, K.S. Wilson, The crystal structure of Trypanosoma cruzi dUTPase reveals a novel dUTP/dUDP binding fold., Structure. 12 (2004) 41–53.
- [21] A. Camacho, F. Hidalgo-Zarco, V. Bernier-Villamor, L.M. Ruiz-Pérez, D. González-Pacanowska, Properties of Leishmania major dUTP nucleotidohydrolase, a distinct nucleotide-hydrolysing enzyme in kinetoplastids., Biochem. J. 346 Pt 1 (2000) 163–8.
- [22] I. Pécsi, J.E. Szabó, S.D. Adams, I. Simon, J.R. Sellers, B.G. Vértessy, et al., Nucleotide pyrophosphatase employs a P-loop-like motif to enhance catalytic power and NDP/NTP discrimination., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108 (2011) 14437–42. doi:10.1073/pnas.1013872108.
- [23] J.L. Huffman, H. Li, R.H. White, J. a. Tainer, Structural Basis for Recognition and Catalysis by the Bifunctional dCTP Deaminase and dUTPase from Methanococcus jannaschii, J. Mol. Biol. 331 (2003) 885–896. doi:10.1016/S0022-2836(03)00789-7.
- [24] C.D. Mol, J.M. Harris, E.M. McIntosh, J. a Tainer, Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits., Structure. 4 (1996) 1077–92.
- [25] O. Barabás, V. Pongrácz, J. Kovári, M. Wilmanns, B.G. Vértessy, Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase., J. Biol. Chem. 279 (2004) 42907–15. doi:10.1074/jbc.M406135200.
- [26] B. Varga, O. Barabás, E. Takács, N. Nagy, P. Nagy, B.G. Vértessy, Active site of mycobacterial dUTPase: structural characteristics and a built-in sensor., Biochem. Biophys. Res. Commun. 373 (2008) 8–13. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.130.
- [27] E. Johansson, M. Fanø, J.H. Bynck, J. Neuhard, S. Larsen, B.W. Sigurskjold, et al., Structures of dCTP deaminase from Escherichia coli with bound substrate and product: reaction mechanism and determinants of mono- and bifunctionality for a family of enzymes., J. Biol. Chem. 280 (2005) 3051–9. doi:10.1074/jbc.M409534200.

- [28] C.M. Sassetti, D.H. Boyd, E.J. Rubin, Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis., *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 77–84.
- [29] J.E. Griffin, J.D. Gawronski, M. a Dejesus, T.R. Ioerger, B.J. Akerley, C.M. Sassetti, High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism., *PLoS Pathog.* 7 (2011) e1002251. doi:10.1371/journal.ppat.1002251.
- [30] M.P.B. Sandrini, J. Piskur, Deoxyribonucleoside kinases: two enzyme families catalyze the same reaction., *Trends Biochem. Sci.* 30 (2005) 225–8. doi:10.1016/j.tibs.2005.03.003.
- [31] M.P.B. Sandrini, A.R. Clausen, B. Munch-Petersen, J. Piškur, Thymidine Kinase Diversity in Bacteria, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 25 (2006) 1153–1158. doi:10.1080/15257770600894469.
- [32] T.W. Traut, Physiological concentrations of purines and pyrimidines., *Mol. Cell. Biochem.* 140 (1994) 1–22.
- [33] C.K. Mathews, Deoxyribonucleotides as genetic and metabolic regulators., *FASEB J.* (2014) 1–9. doi:10.1096/fj.14-251249.
- [34] B. a Kunz, Mutagenesis and deoxyribonucleotide pool imbalance., *Mutat. Res.* 200 (1988) 133–47.
- [35] D. Gawel, I.J. Fijalkowska, P. Jonczyk, R.M. Schaaper, Effect of dNTP pool alterations on fidelity of leading and lagging strand DNA replication in *E. coli.*, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 759 (2014) 22–8. doi:10.1016/j.mrfmmm.2013.11.003.
- [36] J. Nordman, A. Wright, The relationship between dNTP pool levels and mutagenesis in an *Escherichia coli* NDP kinase mutant., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 10197–202. doi:10.1073/pnas.0802816105.
- [37] D. Kumar, J. Viberg, A.K. Nilsson, A. Chabes, Highly mutagenic and severely imbalanced dNTP pools can escape detection by the S-phase checkpoint., *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 3975–83. doi:10.1093/nar/gkq128.
- [38] S. Gon, R. Napolitano, W. Rocha, S. Coulon, R.P. Fuchs, Increase in dNTP pool size during the DNA damage response plays a key role in spontaneous and induced-mutagenesis in *Escherichia coli.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 19311–6. doi:10.1073/pnas.1113664108.
- [39] M.B. Davidson, Y. Katou, A. Keszthelyi, T.L. Sing, T. Xia, J. Ou, et al., Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype., *EMBO J.* 31 (2012) 895–907. doi:10.1038/emboj.2011.485.
- [40] L.J. Wheeler, I. Rajagopal, C.K. Mathews, Stimulation of mutagenesis by proportional deoxyribonucleoside triphosphate accumulation in *Escherichia coli.*, *DNA Repair (Amst).* 4 (2005) 1450–6. doi:10.1016/j.dnarep.2005.09.003.
- [41] A.C. Bester, M. Roniger, Y.S. Oren, M.M. Im, D. Sarni, M. Chaoat, et al., Nucleotide Deficiency Promotes Genomic Instability in Early Stages of Cancer Development, *Cell.* 145 (2011) 435–446. doi:10.1016/j.cell.2011.03.044.

- [42] L. Laureti, M. Selva, J. Dairou, I. Matic, Reduction of dNTP levels enhances DNA replication fidelity in vivo, *DNA Repair (Amst)*. 12 (2013) 300–305. doi:10.1016/j.dnarep.2013.01.009.
- [43] K. Kincaid, J. Beckman, A. Zivkovic, R.L. Halcomb, J.W. Engels, R.D. Kuchta, Exploration of factors driving incorporation of unnatural dNTPS into DNA by Klenow fragment (DNA polymerase I) and DNA polymerase alpha., *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 2620–8. doi:10.1093/nar/gki563.
- [44] N.Y. Yao, J.W. Schroeder, O. Yurieva, L.A. Simmons, M.E. O'Donnell, Cost of rNTP/dNTP pool imbalance at the replication fork., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 12942–7. doi:10.1073/pnas.1309506110.
- [45] S.A. Nick McElhinny, D. Kumar, A.B. Clark, D.L. Watt, B.E. Watts, E.-B. Lundström, et al., Genome instability due to ribonucleotide incorporation into DNA., *Nat. Chem. Biol.* 6 (2010) 774–81. doi:10.1038/nchembio.424.
- [46] M.Y. Galperin, O. V Moroz, K.S. Wilson, A.G. Murzin, House cleaning, a part of good housekeeping., *Mol. Microbiol.* 59 (2006) 5–19. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04950.x.
- [47] P. Ross-Macdonald, P.S. Coelho, T. Roemer, S. Agarwal, A. Kumar, R. Jansen, et al., Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption., *Nature*. 402 (1999) 413–8. doi:10.1038/46558.
- [48] M. Yamada, M. Shimizu, A. Katafuchi, P. Grúz, S. Fujii, Y. Usui, et al., Escherichia coli DNA polymerase III is responsible for the high level of spontaneous mutations in mutT strains., *Mol. Microbiol.* 86 (2012) 1364–75. doi:10.1111/mmi.12061.
- [49] C. Daurel, A.-L. Prunier, F. Chau, L. Garry, R. Leclercq, B. Fantin, Role of hypermutability on bacterial fitness and emergence of resistance in experimental osteomyelitis due to Staphylococcus aureus., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51 (2007) 344–9. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00310.x.
- [50] P. Funchain, A. Yeung, J.L. Stewart, R. Lin, M.M. Slupska, J.H. Miller, The Consequences of Growth of a Mutator Strain of Escherichia coli as Measured by Loss of Function Among Multiple Gene Targets and Loss of Fitness, *Genetics*. 154 (2000) 959–970.
- [51] J.S. Bradshaw, A. Kuzminov, RdgB acts to avoid chromosome fragmentation in Escherichia coli., *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 1711–25.
- [52] T. Tsuzuki, A. Egashira, H. Igarashi, T. Iwakuma, Y. Nakatsuru, Y. Tominaga, et al., Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 11456–61. doi:10.1073/pnas.191086798.
- [53] M. Sekiguchi, T. Tsuzuki, Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention., *Oncogene*. 21 (2002) 8895–904. doi:10.1038/sj.onc.1206023.
- [54] J.S. Sung, D.W. Mosbaugh, Escherichia coli uracil- and ethenocytosine-initiated base excision DNA repair: Rate-limiting step and patch size distribution, *Biochemistry*. 42 (2003) 4613–4625. doi:10.1021/bi027115v.
- [55] V.S. Malshetty, R. Jain, T. Srinath, K. Kurthkoti, U. Varshney, Synergistic effects of UdgB and Ung in mutation prevention and protection against commonly encountered DNA damaging

- agents in *Mycobacterium smegmatis*., *Microbiology*. 156 (2010) 940–9. doi:10.1099/mic.0.034363-0.
- [56] N. Yan, E. O'Day, L.A. Wheeler, A. Engelman, J. Lieberman, HIV DNA is heavily uracilated, which protects it from autointegration., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 9244–9. doi:10.1073/pnas.1102943108.
- [57] A.F. Weil, D. Ghosh, Y. Zhou, L. Seiple, M.A. McMahon, A.M. Spivak, et al., Uracil DNA glycosylase initiates degradation of HIV-1 cDNA containing misincorporated dUTP and prevents viral integration, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) E448–E457. doi:10.1073/pnas.1219702110.
- [58] S. Priet, J. Sire, G. Quérat, Uracils as a cellular weapon against viruses and mechanisms of viral escape., *Curr. HIV Res.* 4 (2006) 31–42.
- [59] R. Chen, H. Wang, L.M. Mansky, Roles of uracil-DNA glycosylase and dUTPase in virus replication., *J. Gen. Virol.* 83 (2002) 2339–45.
- [60] Z. Wang, D.W. Mosbaugh, Uracil-DNA glycosylase inhibitor gene of bacteriophage PBS2 encodes a binding protein specific for uracil-DNA glycosylase., *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 1163–71.
- [61] B. Springer, P. Sander, L. Sedlacek, W.-D. Hardt, V. Mizrahi, P. Schär, et al., Lack of mismatch correction facilitates genome evolution in mycobacteria., *Mol. Microbiol.* 53 (2004) 1601–9. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04231.x.
- [62] H. Ohno, H. Koga, S. Kohno, [Multidrug-resistant tuberculosis. 2. Mechanisms of drug-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*--genetic mechanisms of drug-resistance]., *Kekkaku*. 73 (1998) 657–63.
- [63] A. Leimbach, J. Hacker, U. Dobrindt, *Between Pathogenicity and Commensalism*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013. doi:10.1007/978-3-642-36560-7.
- [64] J.A. Lindsay, *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer., *Int. J. Med. Microbiol.* 304 (2014) 103–9. doi:10.1016/j.ijmm.2013.11.010.
- [65] D.J. Crowley, I. Boubriak, B.R. Berquist, M. Clark, E. Richard, L. Sullivan, et al., The *uvrA*, *uvrB* and *uvrC* genes are required for repair of ultraviolet light induced DNA photoproducts in *Halobacterium* sp. NRC-1., *Saline Systems*. 2 (2006) 11. doi:10.1186/1746-1448-2-11.
- [66] C. Janion, Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*., *Int. J. Biol. Sci.* 4 (2008) 338–44.
- [67] D.G. Ennis, N. Ossanna, D.W. Mount, Genetic separation of *Escherichia coli* *recA* functions for SOS mutagenesis and repressor cleavage., *J. Bacteriol.* 171 (1989) 2533–41.
- [68] A.R. Fernández De Henestrosa, T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J.J. Hayes, H. Ohmori, et al., Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*., *Mol. Microbiol.* 35 (2000) 1560–72.
- [69] K.L. Smollett, K.M. Smith, C. Kahramanoglou, K.B. Arnvig, R.S. Buxton, E.O. Davis, Global analysis of the regulon of the transcriptional repressor LexA, a key component of SOS

- p>response in
- Mycobacterium tuberculosis*
- .,
- J. Biol. Chem.*
- 287 (2012) 22004–14. doi:10.1074/jbc.M112.357715.
- [70] B.M. Walter, M. Rupnik, V. Hodnik, G. Anderluh, B. Dupuy, N. Paulič, et al., The LexA regulated genes of the *Clostridium difficile*., *BMC Microbiol.* 14 (2014) 88. doi:10.1186/1471-2180-14-88.
- [71] M. Tang, P. Pham, X. Shen, J.S. Taylor, M. O'Donnell, R. Woodgate, et al., Roles of *E. coli* DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis., *Nature.* 404 (2000) 1014–8. doi:10.1038/35010020.
- [72] R. Napolitano, R. Janel-Bintz, J. Wagner, R.P. Fuchs, All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis., *EMBO J.* 19 (2000) 6259–65. doi:10.1093/emboj/19.22.6259.
- [73] E.M. Phizicky, J.W. Roberts, Induction of SOS functions: regulation of proteolytic activity of *E. coli* RecA protein by interaction with DNA and nucleoside triphosphate., *Cell.* 25 (1981) 259–67.
- [74] M. Llagostera, R. Guerrero, A. Villaverde, J. Barbé, Effect of adenine, cytidine and guanosine on the expression of the SOS system in *Escherichia coli*., *J. Gen. Microbiol.* 131 (1985) 113–8.
- [75] K.H. Maslowska, K. Makiela-Dzbenska, I.J. Fijalkowska, R.M. Schaaper, Suppression of the *E. coli* SOS response by dNTP pool changes., *Nucleic Acids Res.* (2015). doi:10.1093/nar/gkv217.
- [76] S. Gon, R. Napolitano, W. Rocha, S. Coulon, R.P. Fuchs, Increase in dNTP pool size during the DNA damage response plays a key role in spontaneous and induced-mutagenesis in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) 19311–19316. doi:10.1073/pnas.1113664108.
- [77] A.F. Vercammen-Grandjean, R. Arnould, A. Libert, F.J. Lejeune, Effects of 5-fluorouracil on various melanoma cell metabolisms. Its use for assessing the cold thymidine pool, *Anticancer Res.* 2 (1982) 133–139.
- [78] W. Rode, A. Leś, Molecular mechanism of thymidylate synthase-catalyzed reaction and interaction of the enzyme with 2- and/or 4-substituted analogues of dUMP and 5-fluoro-dUMP., *Acta Biochim. Pol.* 43 (1996) 133–42.
- [79] J.J. McGuire, Anticancer antifolates: current status and future directions., *Curr. Pharm. Des.* 9 (2003) 2593–613.
- [80] S.J. Clarke, D.C. Farrugia, G.W. Aherne, D.M. Pritchard, J. Benstead, A.L. Jackman, Balb/c mice as a preclinical model for raltitrexed-induced gastrointestinal toxicity., *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 285–96.
- [81] Y. Luo, M. Walla, M.D. Wyatt, Uracil incorporation into genomic DNA does not predict toxicity caused by chemotherapeutic inhibition of thymidylate synthase., *DNA Repair (Amst).* 7 (2008) 162–9. doi:10.1016/j.dnarep.2007.09.001.
- [82] N.L. Lehman, P. V. Danenberg, Modulation of RTX cytotoxicity by thymidine and dipyridamole in vitro: implications for chemotherapy., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 45 (2000) 142–8. doi:10.1007/s002800050022.

- [83] S. Miyahara, H. Miyakoshi, T. Yokogawa, K.T. Chong, J. Taguchi, T. Muto, et al., Discovery of a novel class of potent human deoxyuridine triphosphatase inhibitors remarkably enhancing the antitumor activity of thymidylate synthase inhibitors., *J. Med. Chem.* 55 (2012) 2970–80. doi:10.1021/jm201628y.
- [84] H. Miyakoshi, S. Miyahara, T. Yokogawa, K. Endoh, T. Muto, W. Yano, et al., 1,2,3-Triazole-containing uracil derivatives with excellent pharmacokinetics as a novel class of potent human deoxyuridine triphosphatase inhibitors., *J. Med. Chem.* 55 (2012) 6427–37. doi:10.1021/jm3004174.
- [85] B.G. Vertessy, P. Zalud, P.O. Nyman, M. Zeppezauer, Identification of tyrosine as a functional residue in the active site of *Escherichia coli* dUTPase., *Biochim. Biophys. Acta.* 1205 (1994) 146–50.
- [86] M.A. Tormo-Más, I. Mir, A. Shrestha, S.M. Tallent, S. Campoy, I. Lasa, et al., Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands., *Nature.* 465 (2010) 779–82. doi:10.1038/nature09065.
- [87] J.E. Szabó, V. Németh, V. Papp-Kádár, K. Nyíri, I. Leveles, A.Á. Bendes, et al., Highly potent dUTPase inhibition by a bacterial repressor protein reveals a novel mechanism for gene expression control., *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 11912–20. doi:10.1093/nar/gku882.
- [88] A. Price, J. Frato, *Bacillus subtilis* deoxyuridinetriphosphatase and its bacteriophage PBS2-induced inhibitor., *J. Biol. Chem.* (1975). <http://www.jbc.org/content/250/22/8804.short> (accessed January 27, 2015).
- [89] M.D. Nation, S.N. Guzder, L.E. Giroir, W. a Deutsch, Control of *Drosophila* deoxyuridine triphosphatase. Existence of a developmentally expressed protein inhibitor., *Biochem. J.* 259 (1989) 593–6.
- [90] H. McCarthy, J.K. Rudkin, N.S. Black, L. Gallagher, E. O'Neill, J.P. O'Gara, Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5 (2015) 1. doi:10.3389/fcimb.2015.00001.
- [91] I. Mir-Sanchis, R. Martínez-Rubio, M. Martí, J. Chen, Í. Lasa, R.P. Novick, et al., Control of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island excision., *Mol. Microbiol.* 85 (2012) 833–45. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08145.x.
- [92] R.P. Novick, G.E. Christie, J.R. Penadés, The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria., *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 541–51. doi:10.1038/nrmicro2393.
- [93] S.E. Bennett, D.W. Mosbaugh, Characterization of the *Escherichia coli* uracil-DNA glycosylase.inhibitor protein complex., *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 22512–21.
- [94] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling., *Bioinformatics.* 22 (2006) 195–201. doi:10.1093/bioinformatics/bti770.
- [95] F. Melo, E. Feytmans, Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy, *J. Mol. Biol.* 277 (1998) 1141–1152. doi:10.1006/jmbi.1998.1665.

- [96] P. Benkert, M. Biasini, T. Schwede, Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models., *Bioinformatics*. 27 (2011) 343–50. doi:10.1093/bioinformatics/btq662.
- [97] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291. doi:10.1107/S0021889892009944.
- [98] T. Parish, A.C. Brown, *Mycobacteria Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 2009. doi:10.1007/978-1-59745-207-6.
- [99] T. Parish, N.G. Stoker, Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* tlyA plcABC mutant by gene replacement., *Microbiology*. 146 (Pt 8 (2000) 1969–75.
- [100] E. Mahenthiralingam, B.I. Marklund, L.A. Brooks, D.A. Smith, G.J. Bancroft, R.W. Stokes, 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.* 66 (1998) 3626–34.
- [101] H. Liu, J.H. Naismith, An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol., *BMC Biotechnol.* 8 (2008) 91. doi:10.1186/1472-6750-8-91.
- [102] V. Srivastava, C. Rouanet, R. Srivastava, B. Ramalingam, C. Locht, B.S. Srivastava, Macrophage-specific *Mycobacterium tuberculosis* genes: identification by green fluorescent protein and kanamycin resistance selection., *Microbiology*. 153 (2007) 659–66. doi:10.1099/mic.0.2006/000547-0.
- [103] K.J. Williams, G. Joyce, B.D. Robertson, Improved *Mycobacterial* Tetracycline Inducible Vectors, 64 (2012) 69–73. doi:10.1016/j.plasmid.2010.04.003.Improved.
- [104] I. Pecsí, R. Hirmondo, A.C. Brown, A. Lopata, T. Parish, B.G. Vertessy, et al., The dUTPase enzyme is essential in *Mycobacterium smegmatis*., *PLoS One*. 7 (2012) e37461. doi:10.1371/journal.pone.0037461.
- [105] M. Green, J. Sambrook, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2012.
- [106] H.L. David, Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*., *Appl. Microbiol.* 20 (1970) 810–4.
- [107] I. Bergval, B. Kwok, A. Schuitema, K. Kremer, D. van Soolingen, P. Klatser, et al., Pre-existing isoniazid resistance, but not the genotype of *Mycobacterium tuberculosis* drives rifampicin resistance codon preference in vitro., *PLoS One*. 7 (2012) e29108. doi:10.1371/journal.pone.0029108.
- [108] A. Horváth, B.G. Vértessy, A one-step method for quantitative determination of uracil in DNA by real-time PCR, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) e196. doi:10.1093/nar/gkq815.
- [109] P.A. Sherman, J.A. Fyfe, Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers., *Anal. Biochem.* 180 (1989) 222–226. doi:10.1016/0003-2697(89)90420-X.

- [110] P. Ferraro, E. Franzolin, G. Pontarin, P. Reichard, V. Bianchi, Quantitation of cellular deoxynucleoside triphosphates., *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) e85. doi:10.1093/nar/gkp1141.
- [111] S.E. Koehler, R.D. Ladner, Small interfering RNA-mediated suppression of dUTPase sensitizes cancer cell lines to thymidylate synthase inhibition., *Mol. Pharmacol.* 66 (2004) 620–6. doi:10.1124/mol.66.3.
- [112] O. Barabás, V. Pongrácz, J. Kovári, M. Wilmanns, B.G. Vértessy, Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase., *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 42907–15. doi:10.1074/jbc.M406135200.
- [113] J. Nord, M. Kiefer, H.W. Adolph, M.M. Zeppezauer, P.O. Nyman, Transient kinetics of ligand binding and role of the C-terminus in the dUTPase from equine infectious anemia virus., *FEBS Lett.* 472 (2000) 312–6.
- [114] H. Shao, M.D. Robek, D.S. Threadgill, L.S. Mankowski, C.E. Cameron, F.J. Fuller, et al., Characterization and mutational studies of equine infectious anemia virus dUTPase., *Biochim. Biophys. Acta.* 1339 (1997) 181–91.
- [115] I. Pecsí, I. Leveles, V. Harmat, B.G. Vértessy, J. Toth, Aromatic stacking between nucleobase and enzyme promotes phosphate ester hydrolysis in dUTPase., *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 7179–86. doi:10.1093/nar/gkq584.
- [116] T.R. Raghunand, W.R. Bishai, Mapping essential domains of *Mycobacterium smegmatis* WhmD: insights into WhiB structure and function., *J. Bacteriol.* 188 (2006) 6966–76. doi:10.1128/JB.00384-06.
- [117] K.M. Sinha, M.S. Glickman, S. Shuman, Mutational analysis of *Mycobacterium* UvrD1 identifies functional groups required for ATP hydrolysis, DNA unwinding, and chemomechanical coupling., *Biochemistry.* 48 (2009) 4019–30. doi:10.1021/bi900103d.
- [118] M.-E. Ariza, M. V Williams, A human endogenous retrovirus K dUTPase triggers a TH1, TH17 cytokine response: does it have a role in psoriasis?, *J. Invest. Dermatol.* 131 (2011) 2419–27. doi:10.1038/jid.2011.217.
- [119] V. Muha, A. Horváth, A. Békési, M. Pukáncsik, B. Hodoscsek, G. Merényi, et al., Uracil-containing DNA in *Drosophila*: stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement., *PLoS Genet.* 8 (2012) e1002738. doi:10.1371/journal.pgen.1002738.
- [120] I. Leveles, V. Németh, J.E. Szabó, V. Harmat, K. Nyíri, Á.Á. Bendes, et al., Structure and enzymatic mechanism of a moonlighting dUTPase., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69 (2013) 2298–308. doi:10.1107/S0907444913021136.
- [121] P. Sampathkumar, S. Turley, C.H. Sibley, W.G.J. Hol, NADP<sup>+</sup> expels both the co-factor and a substrate analog from the *Mycobacterium tuberculosis* ThyX active site: opportunities for anti-bacterial drug design., *J. Mol. Biol.* 360 (2006) 1–6. doi:10.1016/j.jmb.2006.04.061.
- [122] A. Chernyshev, T. Fleischmann, A. Kohen, Thymidyl biosynthesis enzymes as antibiotic targets., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74 (2007) 282–9. doi:10.1007/s00253-006-0763-1.
- [123] A. Jarmuła, Antifolate inhibitors of thymidylate synthase as anticancer drugs., *Mini Rev. Med. Chem.* 10 (2010) 1211–22.

- [124] C.L. Cosma, D.R. Sherman, L. Ramakrishnan, The secret lives of the pathogenic mycobacteria., *Annu. Rev. Microbiol.* 57 (2003) 641–76. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.091033.
- [125] C.F. Pope, D.M. O’Sullivan, T.D. McHugh, S.H. Gillespie, A practical guide to measuring mutation rates in antibiotic resistance., *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 1209–14. doi:10.1128/AAC.01152-07.
- [126] J.H. Miller, P. Funchain, W. Clendenin, T. Huang, A. Nguyen, E. Wolff, et al., *Escherichia coli* strains (ndk) lacking nucleoside diphosphate kinase are powerful mutators for base substitutions and frameshifts in mismatch-repair-deficient strains., *Genetics.* 162 (2002) 5–13.
- [127] S.-U. Lari, C.-Y. Chen, B.G. Vertéssy, J. Morré, S.E. Bennett, Quantitative determination of uracil residues in *Escherichia coli* DNA: Contribution of ung, dug, and dut genes to uracil avoidance., *DNA Repair (Amst).* 5 (2006) 1407–20. doi:10.1016/j.dnarep.2006.06.009.
- [128] R. Martí, B. Dorado, M. Hirano, Measurement of Mitochondrial dNTP Pools, *Methods Mol. Biol.* 837 (2012) 135–148. doi:10.1007/978-1-61779-504-6.
- [129] P. Kumar, S.K. Bharti, U. Varshney, Uracil excision repair in *Mycobacterium tuberculosis* cell-free extracts., *Tuberculosis (Edinb).* 91 (2011) 212–8. doi:10.1016/j.tube.2011.02.001.
- [130] T. Srinath, S.K. Bharti, U. Varshney, Substrate specificities and functional characterization of a thermo-tolerant uracil DNA glycosylase (UdgB) from *Mycobacterium tuberculosis*., *DNA Repair (Amst).* 6 (2007) 1517–28. doi:10.1016/j.dnarep.2007.05.001.
- [131] B.K. Duncan, B. Weiss, Specific mutator effects of ung (uracil-DNA glycosylase) mutations in *Escherichia coli*., *J. Bacteriol.* 151 (1982) 750–5.
- [132] B.J. Glassner, L.J. Rasmussen, M.T. Najarian, L.M. Posnick, L.D. Samson, Generation of a strong mutator phenotype in yeast by imbalanced base excision repair., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 9997–10002. doi:10.1073/pnas.95.17.9997.
- [133] R.M. Schaaper, C.K. Mathews, Mutational consequences of dNTP pool imbalances in *E. coli*, *DNA Repair (Amst).* 12 (2013) 73–79. doi:10.1016/j.dnarep.2012.10.011.
- [134] B.K. Duncan, B. Weiss, Specific mutator effects of ung (uracil-DNA glycosylase) mutations in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 151 (1982) 750–755.
- [135] M.B. Davidson, Y. Katou, A. Keszthelyi, T.L. Sing, T. Xia, J. Ou, et al., Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype, *EMBO J.* 31 (2012) 895–907. doi:10.1038/emboj.2011.485.
- [136] T.A. Kunkel, R.M. Schaaper, R.A. Beckman, L.A. Loebg, On the Fidelity of DNA Replication. Effect of the Next Nucleotide on Proofreading, *J. Biol. Chem.* (1981) 9883–9889.
- [137] T. a Kunkel, F. Eckstein, a S. Mildvan, R.M. Koplitz, L. a Loeb, Deoxynucleoside [1-thio]triphosphates prevent proofreading during in vitro DNA synthesis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 6734–8.
- [138] T. a Kunkel, DNA replication fidelity., *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 16895–8. doi:10.1074/jbc.R400006200.

- [139] J. Tóth, B. Varga, M. Kovács, A. Málnási-Csizmadia, B.G. Vértessy, Kinetic mechanism of human dUTPase, an essential nucleotide pyrophosphatase enzyme., *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 33572–82. doi:10.1074/jbc.M706230200.
- [140] H.F. Hou, Y.H. Liang, L.F. Li, X.D. Su, Y.H. Dong, Crystal Structures of Streptococcus mutans 2'-Deoxycytidylate Deaminase and Its Complex with Substrate Analog and Allosteric Regulator dCTP-Mg<sup>2+</sup>, *J. Mol. Biol.* 377 (2008) 220–231. doi:10.1016/j.jmb.2007.12.064.
- [141] A. Marx, A. Alian, The First Crystal Structure of a dTTP-bound Deoxycytidylate Deaminase Validates and Details the Allosteric-Inhibitor Binding Site, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 682–690. doi:10.1074/jbc.M114.617720.
- [142] R. Kadirvelraj, N.C. Sennett, S.J. Polizzi, S. Weitzel, Z. a. Wood, Role of packing defects in the evolution of allostery and induced fit in human UDP-glucose dehydrogenase, *Biochemistry.* 50 (2011) 5780–5789. doi:10.1021/bi2005637.
- [143] M. V Williams, a W. Studebaker, Down-regulation of human deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase (dUTPase) using small interfering RNA (siRNA)., *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids.* 23 (2004) 1467–70. doi:10.1081/NCN-200027684.
- [144] G. Merényi, J. Kovári, J. Tóth, E. Takács, I. Zagyva, A. Erdei, et al., Cellular response to efficient dUTPase RNAi silencing in stable HeLa cell lines perturbs expression levels of genes involved in thymidylate metabolism., *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids.* 30 (2011) 369–90. doi:10.1080/15257770.2011.582849.
- [145] Z. Wang, D.W. Mosbaugh, Uracil-DNA glycosylase inhibitor of bacteriophage PBS2: cloning and effects of expression of the inhibitor gene in Escherichia coli., *J. Bacteriol.* 170 (1988) 1082–91.
- [146] N.A. Begum, K. Kinoshita, N. Kakazu, M. Muramatsu, H. Nagaoka, R. Shinkura, et al., Uracil DNA glycosylase activity is dispensable for immunoglobulin class switch., *Science.* 305 (2004) 1160–3. doi:10.1126/science.1098444.
- [147] S.E. Koehler, R.D. Ladner, Small interfering RNA-mediated suppression of dUTPase sensitizes cancer cell lines to thymidylate synthase inhibition., *Mol. Pharmacol.* 66 (2004) 620–6. doi:10.1124/mol.66.3.
- [148] A.W. Studebaker, W.P. Lafuse, R. Kloesel, M. V Williams, Modulation of human dUTPase using small interfering RNA., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327 (2005) 306–10. doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.021.
- [149] N. Siaud, E. Dubois, S. Massot, A. Richaud, E. Dray, J. Collier, et al., The SOS screen in Arabidopsis: a search for functions involved in DNA metabolism., *DNA Repair (Amst).* 9 (2010) 567–78. doi:10.1016/j.dnarep.2010.02.009.
- [150] E. Dubois, D. Córdoba-Cañero, S. Massot, N. Siaud, B. Gakière, S. Domenichini, et al., Homologous recombination is stimulated by a decrease in dUTPase in Arabidopsis., *PLoS One.* 6 (2011) e18658. doi:10.1371/journal.pone.0018658.
- [151] S.J. Hochhauser, B. Weiss, Escherichia coli mutants deficient in deoxyuridine triphosphatase., *J. Bacteriol.* 134 (1978) 157–66.

- [152] E.A. Kouzminova, A. Kuzminov, Chromosomal fragmentation in dUTPase-deficient mutants of *Escherichia coli* and its recombinational repair., *Mol. Microbiol.* 51 (2004) 1279–95. doi:10.1111/j.1365-2958.2003.03924.x.
- [153] A.F. Taylor, B. Weiss, Role of exonuclease III in the base excision repair of uracil-containing DNA., *J. Bacteriol.* 151 (1982) 351–7.
- [154] H.H. el-Hajj, H. Zhang, B. Weiss, Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in *Escherichia coli*., *J. Bacteriol.* 170 (1988) 1069–75.
- [155] V.M. Castillo-Acosta, A.M. Estévez, A.E. Vidal, L.M. Ruiz-Perez, D. González-Pacanowska, Depletion of dimeric all-alpha dUTPase induces DNA strand breaks and impairs cell cycle progression in *Trypanosoma brucei*., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 2901–13. doi:10.1016/j.biocel.2008.06.009.
- [156] V.M. Castillo-Acosta, F. Aguilar-Pereyra, J.-M. Bart, M. Navarro, L.M. Ruiz-Pérez, A.E. Vidal, et al., Increased uracil insertion in DNA is cytotoxic and increases the frequency of mutation, double strand break formation and VSG switching in *Trypanosoma brucei*., *DNA Repair (Amst)*. 11 (2012) 986–95. doi:10.1016/j.dnarep.2012.09.007.
- [157] H. Ting, E.A. Kouzminova, A. Kuzminov, Synthetic lethality with the dut defect in *Escherichia coli* reveals layers of DNA damage of increasing complexity due to uracil incorporation., *J. Bacteriol.* 190 (2008) 5841–54. doi:10.1128/JB.00711-08.
- [158] M.H. Gadsden, E.M. McIntosh, J.C. Game, P.J. Wilson, R.H. Haynes, dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*., *EMBO J.* 12 (1993) 4425–31.

## 9 Közlemények listája

### 9.1 A doktori értekezés témájához kapcsolódó közlemények

#### 9.1.1 Referált szakmai folyóiratban megjelent közlemények

Pécsi Ildikó, **Hirmondó Rita**, Amanda C. Brown, Lopata Anna, Tanya Parish, Vértessy G. Beáta, & Tóth Judit (2012). The dUTPase enzyme is essential in *Mycobacterium smegmatis*. PLoS One, 7(5), e37461. doi:10.1371/journal.pone.0037461

**Hirmondó Rita**, Szabó Judit Eszter, Nyíri Kinga, Tarjányi Szilvia, Dobrotka Paula, Tóth Judit, & Vértessy G. Beáta (2015). Cross-species inhibition of dUTPase via the Staphylococcal Stl protein perturbs dNTP pool and colony formation in *Mycobacterium*. DNA Repair. doi:10.1016/j.dnarep.2015.03.005

#### 9.1.2 Referált szakmai folyóiratban közlés alatt álló publikációk (megosztott első szerzők\*)

**Hirmondó Rita\***, Lopata Anna\*, Vértessy G. Beáta, & Tóth Judit. Distinct control of dNTP biosynthesis and genome integrity maintenance by dUTPases. Bírálattal, NAR

### 9.2 További, a doktori értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények

Könnyű Balázs, Kashif S. Sadiq, Turányi Tamás, **Hirmondó Rita**, Barbara Müller, Hans-Georg Kräusslich, Peter V. Coveney, & Müller Viktor. (2013). Gag-Pol processing during HIV-1 virion maturation: a systems biology approach. PLoS Computational Biology, 9(6), e1003103. doi:10.1371/journal.pcbi.1003103

### 9.3 Konferencián tartott szóbeli előadások (Az előadó neve aláhúzva)

**Hungarian Molecular Life Sciences 2013** (Siófok, 2013) Hirmondó R., Lopata A., Pécsi I., Vértessy B. and Tóth J.: *In vivo* enzymology: distinct control of dTTP biosynthesis and dUTP elimination

**MBKE Jelátviteli Szakosztályának III. Konferenciája** (Esztergom, 2012) Hirmondó R., Lopata A., Pécsi I., Vértessy B. and Tóth J.: Fehérjétől a sejtig: mutáns dUTPázok élettani hatásainak *in vivo* vizsgálata *Mycobacterium smegmatis*-ban

**Kálmán Erika Doktori Konferencia** (Mátraháza, 2012) Hirmondó R., Lopata A., Pécsi I., Vértessy B. and Tóth J.: Fehérjétől a sejtig: mutáns dUTPázok élettani hatásainak *in vivo* vizsgálata *Mycobacterium smegmatis*-ban

**Straub Napok** (Szeged, 2012) R. Hirmondó, J.E. Szabó, I. Pécsi, A. Lopata, B.G. Vértessy and J. Tóth: Guardians of the thymidylate gate in *Mycobacterium*

**International PhD Scientific Meeting 2012** (Budapest, 2012) R. Hirmondó, I. Pécsi, A. Lopata, A.C. Brown, T. Parish, B.G. Vértessy and J. Tóth: The mycobacterial dUTPase: biochemistry, physiology and molecular intervention

**IX. Hungarian Biometrical, Biomathematical and Bioinformatical Meeting** (Budapest, 2011) Könnyű Balázs, Turányi Tamás, Hirmondó Rita, Barbara Müller, S. Kashif Sadiq, Peter Coveney, Hans-Georg Kräusslich and Müller Viktor: Reaction kinetic model of HIV-1 proteolytic maturation

**9th Hungarian Congress of Genetics, XVI. Cell and Developmental Biology Days** (Siófok, 2011) Pécsi I., Hirmondó R., A.C. Brown, Lopata A., T. Parish, Vértessy B. and Tóth J. Micobacterium-specific loop motif of dUTPase is essential: new target for antitubercular drug design

#### 9.4 Konferencián tartott poszter előadások (Az előadó neve aláhúzva)

**Hungarian Molecular Life Sciences Conference** (Eger, 2015) R. Hirmondó, Sz. Tarjányi, J.E. Szabó, K. Nyíri, B. Kőhegyi, J. Tóth, and B.G. Vértessy: Using a molecular switch to decipher protein-protein interactions within the living cell

**EMBO Conference on Microbiology after the genomics revolution: Genomes 2014** (Pasteur Institute, Paris, France, 2014) Hirmondó R., Lopata A., Pécsi I., Vértessy B., and Tóth J.: Distinct control of dTTP biosynthesis and dUTP elimination. (Poster presentation)

**EMBO|EMBL Symposium: New Approaches and Concepts in Microbiology** (EMBL Heidelberg, Germany, 2013) R. Hirmondó, A. Lopata, B.G. Vértessy and J. Tóth: Distinct control of dTTP biosynthesis and dUTP elimination in *Mycobacterium smegmatis*

**FEBS 3+ Meeting** (Opatija, Croatia, 2012) R. Hirmondó, I. Pécsi, A. Lopata, A.C. Brown, T. Parish, B.G. Vértessy, J. Tóth: The mycobacterial dUTPase: biochemistry, physiology and molecular intervention

**Straub Napok** (Szeged, 2012) R. Hirmondó, I. Pécsi, A. Lopata, A.C. Brown, T. Parish, B.G. Vértessy, J. Tóth: The mycobacterial dUTPase: biochemistry, physiology and molecular intervention

**75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award** (Szeged, 2012) R. Hirmondó, I. Pécsi, A. Lopata, A.C. Brown, T. Parish, B.G. Vértessy, J. Tóth: The mycobacterial dUTPase: biochemistry, physiology and molecular intervention

**3rd EMBO Meeting: Advancing The Life Sciences** (Vienna, Austria, 2011) R. Hirmondó, I. Pécsi, A. Lopata, A.C. Brown, T. Parish, B.G. Vértessy, J. Tóth: In vivo enzymology: parallel characterisation of dUTPase mutants by quantitative structural biology and phenotype analysis in *Mycobacterium smegmatis*

**MBKE Éves Vándorgyűlés** (Pécs, 2011) Pécsi Ildikó, Hirmondó Rita, Amanda C.Brown, Lopata Anna, Tanya Parish, Vértessy G. Beáta, and Tóth Judit: dUTPase is essential in *Mycobacterium smegmatis*, the non-pathogen model of the causative agent of TB

Hirmondó Rita, Pécsi Ildikó, Lopata Anna, Vértessy G. Beáta, and Tóth Judit: From proteins to the cell: In vivo investigation of mutant dUTPases in *Mycobacterium smegmatis*

**Keystone Symposia Global Health Series; Tuberculosis: Immunology, Cell Biology and Novel Vaccination Strategies** (Vancouver, Canada, 2011) I. Pécsi, R. Hirmondó, A. C.Brown, A. Lopata, T. Parish, B. G. Vértessy and J. Tóth: Proving the essentiality of dUTPase mediated by its mycobacterium-specific structural motif identifies a novel TB drug target

**Straub Napok** (Szeged, 2010) I. Pécsi, R. Hirmondó, T. Parish, A.C. Brown, B.G. Vértessy and J. Tóth: Essentiality of dUTPase, a key enzyme in the thymidylate synthesis pathway in mycobacteria

**XVIII. International AIDS Conference** (Vienna, Austria, 2010) B. Könnyű, T. Turányi, R. Hirmondó, B. Müller, J. Konvalinka, S. K. Sadiq, P. Coveney, H. Kräusslich, and V. Müller: Reaction kinetics model of proteolytic processing during HIV-1 virion maturation

**6th European HIV Drug Resistance Workshop** (Budapest, Hungary, 2008) J. Kornai, R. Hirmondó, I. Bartha, J. Bodem and V. Müller: Covariation Analysis of the Amino Acid Sequence of HIV-1 Subtype B Protease and its Gag-Pol Cleavage Sites.

## 10 Függelék

### 10.1 A dUTPáz manipulációjával okozott hatások gyűjteménye különböző organizmusokban

dUTPáz módosítása	Organizmus / útvonal	Hatékonyság	Menekítés?	dNTP készlet	Mutagenicitás	Egyéb	Referencia
termoszenzitív dut allél (dut1)	<i>E. coli</i> (Dcd, Dut, Tk)	5% aktivitás (25°C)	ung- (de lassabb növekedés)	magas dUTP (10x), dTTP (3x) szintek	nd	fonális sejtek, 'hyperrec' fenotípus (DNS száltörések)	[16]
termoszenzitív dut allél (dut1-dut5)		90% vagy magasabb aktivitás csökkenés	szintetikus letalitás pyrE génnel, külső timidin forrás adása nem menekíti a dut mutánsok lassabb növekedését	nd	spontán mutációs ráta növekedése (5-15x)	megnövekedett generációs idő, 5'-FdUrd szenzitivitás, magas rekombinációs ráta (hyper-Rec), növekedési gátlás 2 mM uracil jelenlétében	[151]
KO		KO	nincs (timidin, deoA, ung, dcd, cdd mutációk)	nd	nd	letalitás	[154]
termoszenzitív dut allél (dut1 / dut11)		< 1% aktivitás (37°C) (5%, 25°C)	dcd-, ung- menekíti a dut-xth- letalitást, a timidin auxotrófiát nem	nd	nd	szintetikus letalitás xth génnel (ExoIII) 37-42°C-on; timidin auxotróf 37-42°C-on, fonális sejtek	[153]
Thr25Ile (dut1)/ Gly147Asp (dut11)		2-10% aktivitás	szintetikus letalitás recA vagy recBC mutánsokkal; de ung, dcd vagy pst inaktiváció menekíti a dut, rec letalitást: kromoszóma fragmentáció csökken	nd	nd	életképes, bár valamivel lassabban nő, kromoszóma fragmentáció; nem kell külső timidin forrás	[152]
termoszenzitív dut allél (dut)		nd	szintetikus letalitás degP, polA, recA, recB, recC, ruvA, ruvB, ruvC, tdk, és xthA mutánsokkal; DE ung- menekít, kivéve: tdk	nd	nd	konklúzió: nem a timidin hiánya okozza a dut KO letalitását	[157]

dUTPáz módosítása	Organizmus / útvonal	Hatékonyság	Menekítés?	dNTP készlet	Mutagenicitás	Egyéb	Referencia
D83N pontmutáció	<i>M. smegmatis</i> (Dcd:dut, Dut)	kvázi inaktív	nd	20x dUTP szint	~15x emelkedés	nd	Hirmondó et al., 2015, közlés alatt
RNAi	<i>T. brucei</i> (Dut, Tk)	Western blottal nincs detektálható protein	nincs, ung- növeli a citotoxicitást	magas dUTP szint	9x emelkedés	sejtciklus abnormalitások, masszív dUTP beépülés a genomba, kromoszóma fragmentációk	[156]
RNAi		90%os fehérjeszint csökkenés	külső timidin forrás	magas dUTP szint (9x)	nd	MTX szenzitivitás, sejtciklus blokk, DNS fragmentáció	[155]
KO		KO	külső timidin forrás, ung- növeli a citotoxicitást	nd	nd	letalitás	[19]
RNAi	<i>C. elegans</i> (Dctd, Dut, Tk)	nd	ung1, clk2 RNAi (mutáció is) (timidinforrás csak részben)	nd	nd	embrionális letalitás; ATL1, RAD51 foci = S-fázis checkpoint aktiváció	[17]
RNAi	<i>D. melanogaster</i> (Dctd, Dut)	Western blottal nincs detektálható protein	nd	uracil a DNS-ben	nd	letalitás korai bábállapotban, DNS száltörések	[119]
KO	<i>S. cerevisiae</i> (Dctd, Dut) nincs Tk	KO	külső timidilát (dTMP), ung- (dut1 ung1 dupla mutáns, de a timidin éheztetés sejtciklus leállást és sejthalált okoz)	nd	nd	dTMP auxotrófia (nincs Tk)	[158]
Gly82Ser pontmutáció		<10% aktivitás	ung inaktiváció menekít, APE inaktivációja nem, csökkent életképesség	nd	igen (főleg AT → CG)	növekedési visszamaradás, sejtciklus abnormalitások	[18]

dUTPáz módosítása	Organizmus / útvonal	Hatékonyság	Menekítés?	dNTP készlet	Mutagenicitás	Egyéb	Referencia
RNAi	HT29 (Dctd, Dut, Tk)	50% aktivitás csökkenés	nd	nincs szignifikáns változás, csak ha +TS inhibíció (teljes dTTP elimináció, magas dUTP)	nd	nincs hatással a DNS károsodás mennyiségére és a kemoszenzitivitásra	[147]
	SW620 és MCF-7 sejtvonalak (Dctd, Dut, Tk)	75% aktivitás csökkenés				FdUrd szenzitivitás, DNS dupla száltörések	
RNAi	HeLa, HT29, és SW620 sejtvonala (Dctd, Dut, Tk)	~95% aktivitás csökkenés	nd	szignifikáns növekedés az intracelluláris dUTP szintben (8-12x HeLa és SW620 sejtekben)	nd	proliferáció csökkenés	[148]
RNAi	HeLa (Dctd, Dut, Tk)	17x csökkenés mRNS szinten, ~6% aktivitás	Dut, Tmk dupla csendesítés érzékeny FU származékokra	dUTP 2x; dTTP 1,5x növekedés	nd	Tmk, Tk expresszió szintek növekedése (3,2; 2x), szenzitivitás FU származékokra	[144]
RNAi	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Dctd, Dut, Tk)	nd	nd	nd	nd	letalitás, vagy sterilitás, szenzitivitás FU származékokra	[149]
RNAi		12% és 34% mRNS szint	nincs kritikus partner	nd	nd	primer transzformások nagyrésze elpusztul, szenzitivitás FU származékokra, DNS károsodás, rekombinációs események növekedése	[150]

## 10.2 A mutációs mintázat vizsgálatával kapott eredmények részletes bemutatása

A magas inkorrekt/korrekt dNTP arány, vagy a magas következő dNTP koncentráció (következő nukleotid effektus) is okozhatta a detektált mutációkat (szürke háttérrel).

Pozíció	Konszenzus nukleotid	Mutáció	wt	A115F	D83N	Konszenzus aa.	Mutáció	Következő nukleotid (szensz)	Következő nukleotid (antiszensz)
1071	G	T			1	357 E	D	G	A
1073	T	A		2		358 V	D	C	G
1075	G	A			1	359 D	N	A	C
1076	A	C			1		A	C	G
1077	C	T			1		csendes	G	A
1078	G	T			1	360 D	Y	A	C
1108	C	T			2	370 R	C	G	G
1109	G	T			1		L	C	C
1287	G	T			1	429 Q	H	T	A
1291	A	T			1	431 M	L	T	C
1295	A	T		1		432 D	V	C	G
1295	A	G		1			G	C	G
1312	T	C		1		438 S	P	C	G
1325	A	G	1			442 H	R	C	C
1531	G	T	1			511 E	stop	A	C
1624	A	T			1	542 N	Y	A	G
1733	T	A	1			578 V	E	G	G
1789	C	T		1		596 A	V	T	G
1877	C	G		2		626 A	G	G	G
1897	G	T		1		633 V	F	T	G
1899	C	T		1			csendes	G	T
1904	C	T		1		635 A	V	C	G
1909	A	G	1		1	637 K	E	A	C
1914	C	T			1	638 T	I	G	C
1937	C	G		2		646 A	G	C	G
1957		T insz.	1		2		frame-shift	C	
1958	C	A			1	653 A	D	C	G
1959	C	T	2		1		csendes	G	C
1970	C	T		1		657 T	M	G	A
1977	G	T	3			659 Q	H	T	A
1979	C	T	2			660 S	F	C	T

## 10.3 A dolgozatban felhasznált primerek listája

Primer szekvencia	Felhasználás	
5'- CTACGAAGCTTACCCTGATCTTGGTCTCGGC -3'	<i>dut</i> gén és flanking régiók amplifikálása a p2NIL-duth klónozásához	
5'- CTACGAAGCTTACCGAGCCGCGCGTGACCGG -3'		
5'- CGTCACCGGTGCAGTCCTCCACGGGCAGCTCGT -3'	higromicin marker gén amplifikálása a <i>dut</i> gén elrontásához	
5'- CGTCACCGGTCTGAAGGTGGCATTTCGCGCAG -3'		
5'- CGCCGATTTTCGGCACCTCGG -3'	<i>dut</i> gén amplifikálása saját promóterrel a pGEM-dut klónozásához	
5'- CGTCAAGCTTTTCACAAACTCGCATGTCCGCC -3'		
5'- CTAGCTAGCTCACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCAAACTCGCA TGTC -3'	flag-tagelt komplementvektor	
5'- TACTAGCTAGCTCGACCAAGACGATCACC -3'		
5'- GGTGGCTGGGGTTCCGCCGGCGGACATGCG -3'	S148A mutáns	QuikChange mutagenézis a mutáns mtDut enzimek létrehozására
5'- CGCATGTCCGCCGGCGGAACCCAGCCACC -3'		
5'- CGTCGTTTCGACGAGACATCCCGCGGCGAC -3'	Δ-loop mutáns	
5'- GTCGCCGCGGGATGTCTCGTCGAACGACG -3'		
5'- GGGCTGGCCTCGTGATCCCGCGGCGACGG -3'	T138stop mutáns	
5'- CCGTCGCCGCGGGATCACGAGGCCAGCCC -3'		
5'- CCGGGCACCATCAACGCGGGTTATCGTGGGG -3'	D83N mutáns	
5'- GGCCCGTGGTAGTTGCGCCCAATAGCACCCC -3'		
5'- CGGTCACGGTTCCGCCGGCGGACATGCG -3'	S148A mutáns	QuikChange mutagenézis a komplementáló <i>dut</i> mutáns pGem vektorok létrehozására
5'- CGCATGTCCGCCGGCGGAACCGTGACCG -3'		
5'- CCTCGTTTCGACGAGACAACCCGTGGCG -3'	Δ-loop mutáns	
5'- CGCCACGGGTTGTCTCGTCGAACGAGG -3'		
5'- GCCGGTTTGGCGGACTGAACCCGTGGCG -3'	T138stop mutáns	
5'- CGCCACGGGTTCACTCCGCCAAACCGGC -3'		
5'- CCGGCACGATCAACGCCGGCTACCG -3'	D83N mutáns	
5'- CGGTAGCCGGCGGTTGATCGTGCCGG -3'		
5'- CAACCTGGATCCGCAGACG -3'	SCO, DCO screen, <i>dut</i> mutánsok	
5'- CACCTTCCTGCACGACTTCG -3'		
5'- CGTCTGCGGATCCAGGTTG -3'		
5'- GAACCACCAGAACCATCGGG -3'	A komplement vektorok genomi integrációjának megerősítése	
5'- CAGTACGCGAAGAACCACGCC -3'		
5'- GGCGGACCTTTCCGGAGAGG -3'	<i>dut</i> próba, Southern blot	
5'- CGGGGGCCAGTTCGACGTTC -3'		
5'- TTCCTGAGCACACCGTGACC -3'		
5'- GTTCCGAGAATTGCTGCGACG -3'	SCO, DCO screen, <i>dcd:dut</i> mutáns	
5'- CGCCAATTCACTTGCGTCTCAC -3'		
5'- ACGTGACACCGATCGACTTGAGAT -3'	A115F <i>dcd:dut</i> próba, Southern blot	
5'- GCTGACGCACTCGACCTTCGGCTTCATCGATCCGGG -3'		
5'- CCCGGATCGATGAAGCCGAAGGTCGAGTGCGTCAGC -3'	QuikChange mutagenézis az A115F mutáns <i>dcd:dut</i> létrehozására	
5'- TACTAAGATCTGCCCCGCCGAAGGAGATATACATATGAGTAAA GGAG -3'		
5'- TAGTAAGATCTTCATTTGTATAGTTCATCCATGCC -3'	Gfp fúziós protein klónozása az A115F <i>dcd:dut</i> mögé	

5'- TCTCAACCGAAGAGTTCACC -3'	Genomi uracil qPCR
5'- ATTCCGTAGTCATCCTGTGG -3'	
5'- GTACCTGGTGCGTCTGC -3'	<i>rpoB</i> gén 1 kbp hot-spot régió PCR amplifikálása
5'- AGGCGGTAGGACTGACG -3'	
5'- TTTGTTTGTGTTGTTGTTGGGCGGTGGAGGCGG -3'	dNTP készlet mérés
5'- TTATTATTATTATTATTAGGCGGTGGAGGCGG -3'	
5'- CCGCCTCCACCGCC -3'	
5'- TAATCGATCGTATGTAGCGATACGTATCCATAACACCCCTTGTATT ACTG -3'	konstans Stl expressziót biztosító vektor klónozása
5'- GTCATCACCGAAACGC -3'	
5'- ATTAAGCTAGCGCGGCCGCTTAGTTGGTATC -3'	
5'- ATTAACGATCGCATATGGAAGGCGCGGGCC -3'	
5'- ATTA AAAAGCTTGCGGCCGCTTAGTTGGTATC -3'	indukálható Stl expressziót biztosító vektor klónozása
5'- AATTAGGATCCATGGATACGTATCGCTACATAGCTAGCC -3'	

## 10.4 A mutációs analízishez használt PERL szkriptek

```
#!/usr/bin/perl -w

#Hasznalat: Az illesztés alapján jellemzi az egyes pozíciókban
előforduló aminosavak számát

open (IN, "alignment.aln.out") || die "can't open inputfile!";
$k = 0;
while (<IN>) {
    $k++;
    print "Working with $k. line!\n";
    chomp $_;
    @darabok = split (/ /,$_);
    $seq = pop (@darabok);
    @amino = split (//,$seq);
    $i = 0;
    foreach $x (@amino) {
        $i++;
        if ($x ne "-" && $x ne "_" && $x ne "\/") {
            if ($data{$i,$x}) {
                $data{$i,$x}++;
            }
            else {
                $data{$i,$x} = 1;
            }
        }
    }
}
close (IN);
open (OUT, ">positions.out") || die "can't open outputfile!";
foreach $y (keys %data) {
    print OUT "$y,$data{$y}\n";
}
close (OUT);
```

```
#!/usr/bin/perl -w

#Hasznalat: A pozíciók jellemzése alapján előallítja a
consensus seq-t

open (IN, "positions.out") || die "can't open inputfile!";
$h = 1;
$k = 0;
while (<IN>) {
    $k++;
    if ($k == 100) {
        $l = $h * $k;
        print "Working with $l. line!\n";
        $h++;
        $k = 0;
    }
    chomp $_;
    ($pos, $baxis, $num) = split (/,/, $_);
    if ($data[$pos]) {
        if ($num > $data[$pos]) {
            $data[$pos] = $num;
            $cons[$pos] = $baxis;
        }
    }
    else {
        $data[$pos] = $num;
        $cons[$pos] = $baxis;
    }
}
close (IN);
open (OUT, ">consensus.out") || die "can't open outputfile!";
select (OUT);
print "CONSENSUS";

foreach $x (@cons) {
    print OUT $x;
}
close (OUT);
```

```
#!/usr/bin/perl -w

#Használat: A pozíciók jellemzése alapján kiszámítja, hogy egy
adott pozícióban mely aminosav hány százalékában fordul elő

open (IN, "positions.out") || die "can't open inputfile!";
$h = 1;
$k = 0;
while (<IN>) {
    $k++;
    if ($k == 100) {
        $l = $h * $k;
        print "Working with $l. line!\n";
        $h++;
        $k = 0;
    }
    chomp $_;
    ($pos, $amino, $num) = split (/,/, $_);
    if ($data[$pos]) {
        $data[$pos] .= "," . $amino . ":" . $num ;
    }
    else {
        $data[$pos] = $pos . "," . $amino . ":" . $num;
    }
    if ($n[$pos]) {
        $n[$pos] += $num;
    }
    else {
        $n[$pos] = $num;
    }
}
close (IN);
open (OUT, ">allpositions_rend.out") || die "can't open
outputfile!";
select (OUT);
for ($i = 1; $i <= 5000; $i++) {
    @darabok = split (/,/, $data[$i]);
    $pos = shift (@darabok);
    print "$pos:";
    foreach $x (@darabok) {
        ($amino,$num) = split (":", $x);
        $percent = $num / $n[$pos];
        print "$amino,$num,$percent;";
    }
    print "$n[$pos]\n";
}
close (OUT);
```