

Uracil-DNS metabolizmusban érintett *Drosophila* és humán enzimfehérjék molekuláris biológiai vizsgálata

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette:

Merényi Gábor

okleveles biológus

Témavezető:

Dr. Vértessy G. Beáta

A biológia tudomány doktora

A Doktori Iskola vezetője és programvezető:

Prof. Dr. Erdei Anna

Az MTA rendes tagja

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Biológiai Doktori Iskola

Immunológia Program

Készült:

Magyar Tudományos Akadémia

Enzimológiai Intézet

Genom metabolizmus és javítás kutatócsoportban

Budapest

2011

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretném megköszönni **Dr. Vértessy G. Beátának**, témavezetőmnek, az MTA Enzimológiai Intézet igazgatóhelyettesének, hogy 2006. évben csatlakozhattam kutatócsoportjához és támogatásával az ELTE TTK Doktori Iskola Immunológia Programjában hallgatóként részt vehettem. Dr. Vértessy G. Beáta kiváló szakmai vezetése, elméleti és gyakorlati útmutatása nélkülözhetetlen volt doktori munkám kísérleti és elméleti részének megvalósulásában.

Kiemelt köszönet illeti **Dr. Kovári Júlia** volt munkatársamat, aki a csoporthoz való csatlakozásomkor magas szintű elméleti és gyakorlati ismereteivel gyarapította szakmai tapasztalataimat, valamint kutatói éleslátása példaértékkel szolgált számomra.

Szeretném megköszönni a kutatócsoport **volt és jelenlegi minden tagjának** szakmai segítségét. Támogató észrevételeik nélkülözhetetlenek voltak a doktori munkám megvalósulásában.

Továbbá köszönet illeti **Dr. Német Katalint**, a Kísérleti Génterápiás csoport vezetőjét, hogy lehetővé tette számomra a lentivirális géntranszfer technológia elméleti és gyakorlati részleteinek megismerését. Köszönet illeti **Dr. Bátkainé Mónika** asszisztenst és **Dr. Várady György** tudományos munkatársat és **Türk Dórát**, hogy szakmai tapasztalataikkal segítségemre voltak a lentivirális géntranszfer gyakorlati kivitelezésében.

Továbbá köszönettel tartozom **Dr. Homolya László** tudományos főmunkatársnak, az OVSZ Sejtbiológiai laboratórium munkatársának, hogy szakmai segítséget nyújtott a konfokális mikroszkópiás felvételek elkészítésében.

TARTALOMJEGYZÉK

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	2
TARTALOMJEGYZÉK.....	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
1. BEVEZETÉS	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2. 1. Az uracil, mint „hívatlan vendég” a DNS molekulában.....	11
2. 2. Az uracil felismerése és eltávolítása a DNS molekulából.....	13
2. 2. 1. Az uracil-DNS glikozilázok.....	13
2. 2. 1. 1. Az UNG glikoziláz.....	14
2. 2. 1. 2. A SMUG1 glikoziláz.....	15
2. 2. 1. 3. A TDG glikoziláz.....	17
2. 2. 1. 4. Az MBD4 glikoziláz.....	18
2. 2. 2. Az uracil DNS degradáló faktor (UDE).....	18
2. 2. 3. A bázis excíziós javítómechanizmus (BER).....	20
2. 3. A dUTPáz enzimfehérje jellemzése.....	25
2. 3. 1. A humán dUTPáz.....	27
2. 3. 2. A <i>Drosophila melanogaster</i> dUTPáz.....	29
2. 3. 3. A dUTPáz kettős élettani szerepe.....	30
2. 3. 3. 1. A dUTPáz szerepe az intracelluláris dUTP/dTTP arány szabályozásában.....	31
2. 3. 3. 2. A dUTPáz szerepe a <i>de novo</i> dTTP bioszintézisben.....	33
2. 4. A timidilát metabolizmus, mint kemoterapeutikumok célpontja.....	36
2. 5. Fehérjék nukleáris transzportját meghatározó szekvenciák.....	39
3. CÉLKITŰZÉSEK	44
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	46
4. 1. Anyagok.....	46
4. 1. 1. Plazmidok, vektorok.....	46
4. 1. 2. Alkalmazott baktérium törzsek.....	47
4. 1. 3. Rovar- és humán sejtvonalak.....	47
4. 2. Módszerek.....	48
4. 2. 1. Baktérium törzsek-, rovar és humán sejtvonalak fenntartása és növesztése.....	48
4. 2. 1. 1. Baktérium törzsek fenntartása és növesztése.....	48

4. 2. 1. 2. Rovar sejt vonal fenntartása és növesztése	48
4. 2. 1. 3. Humán sejt vonalak fenntartása és növesztése	49
4. 2. 2. Általános molekuláris biológiai módszerek	50
4. 2. 2. 1. Kompetens <i>E. coli</i> sejtek előállítása és transzformálása	50
4. 2. 2. 2. DNS plazmid izolálás baktérium sejtől	50
4. 2. 2. 3. DNS elválasztása agaróz gélelektroforézissel	50
4. 2. 2. 4. DNS izolálása és tisztítása	50
4. 2. 2. 5. DNS restrikciós emésztése. Ligálási reakció	50
4. 2. 2. 6. DNS amplifikálás polimeráz láncreakcióval (PCR)	51
4. 2. 3. <i>Drosophila</i> fehérjék celluláris lokalizációs vizsgálatának módszertana.....	53
4. 2. 3. 1. Az UDE és a dUTPáz fehérjék Sf9 sejtben belüli lokalizációjának vizsgálatával összefüggő módszerek leírása	53
4. 2. 3. 1. 1. Riporter-konstrukciók előállítása molekuláris klónozással	53
4. 2. 3. 1. 2. Helyspecifikus mutagenézis az UDE fehérjeszekvenciában.....	55
4. 2. 3. 1. 3. Sf9 sejtek tranzienst transzfekciója	55
4. 2. 3. 1. 4. Sf9 sejtek fixálása és DAPI festése	55
4. 2. 3. 1. 5. Fluoreszcens mikroszkópia	55
4. 2. 3. 1. 6. Nukleinsav- és fehérjeszekvenciák <i>in silico</i> analízise	56
4. 2. 3. 2. Az UDE és a dUTPáz fehérjék HeLa sejtben belüli lokalizációjának vizsgálatával összefüggő módszerek leírása	57
4. 2. 3. 2. 1. UDE-riporter-konstrukciók előállítása molekuláris klónozással	57
4. 2. 3. 2. 2. dUTPáz-expressziós-konstrukció előállítása molekuláris klónozással	57
4. 2. 3. 2. 3. Humán sejtek tranzienst transzfekciója.....	58
4. 2. 3. 2. 4. Humán sejtek fixálása és DAPI festése	58
4. 2. 3. 2. 5. Humán sejtek immunitokémiás és fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálata 58	
4. 2. 3. 2. 6. Humán sejtek konfokális mikroszkópiás vizsgálata.....	59
4. 2. 4. Transzgenikus humán sejtek létrehozásával összefüggő metodikák leírása	59
4. 2. 4. 1. Lentivirális vektor-konstrukció előállítása molekuláris klónozással	59
4. 2. 4. 2. Lentivirionok termelése.....	60
4. 2. 4. 3. HEK293 sejtek vírusfertőzése	61
4. 2. 4. 4. Áramlási citometria és vírus titer meghatározása	61
4. 2. 4. 5. Transzgenikus sejt vonalak vizsgálata konfokális mikroszkópia segítségével ...	63

4. 2. 5. A humán dUTPáz és timidilát kináz RNS interferenciás csendesítésével összefüggő módszerek leírása	63
4. 2. 5. 1. RNS interferencia vektor-konstrukciók előállítása	63
4. 2. 5. 2. Stabilan transzfektált sejtvonalak előállítása	66
4. 2. 5. 3. RNS izolálás és reverz transzkripció	68
4. 2. 5. 4. Kvantitatív PCR (Q-PCR)	68
4. 2. 5. 5. dUTPáz anti-szérum előállítása	70
4. 2. 5. 6. Fehérjék immunoblot analízise	71
4. 2. 5. 7. Sejtvonalak citotoxicitási vizsgálata	72
4. 2. 5. 8. Sejtek dTTP és dUTP készletének meghatározása	73
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK.....	75
5. 1. Uracil-DNS metabolizmusban résztvevő <i>Drosophila</i> fehérjék intracelluláris lokalizációjának vizsgálata	75
5. 1. 1. Az UDE, a dUTPáz, a TDG és a SMUG1-homológ fehérjék <i>in silico</i> NLS predikciója PSORTII programmal	75
5. 1. 2. Az UDE fehérje celluláris lokalizációjának vizsgálata rovar és humán sejtben	77
5. 1. 2. 1. Az UDE ^{WT} fehérje vizsgálata Sf9 sejtben	77
5. 1. 2. 2. Az UDE C-terminálisának vizsgálata deléciós mutagenézissel Sf9 sejtben	80
5. 1. 2. 3. Az UDE NLS2 szekvenciájának karakterizálása irányított mutagenézissel Sf9 sejtben	81
5. 1. 2. 4. Az UDE NLS1 és NLS2 szekvenciáinak vizsgálata Sf9 sejtben	83
5. 1. 2. 5. Az UDE fehérje HeLa sejtben belüli lokalizációjának vizsgálata	85
5. 1. 3. A <i>Drosophila</i> dUTPáz NLS szekvenciájának jellemzése rovar és humán sejtben ..	88
5. 1. 3. 1. A dUTPáz izoformáinak vizsgálata Sf9 sejtben	88
5. 1. 3. 2. A dUTPáz NLS szekvenciájának karakterizálása Sf9 sejtben	90
5. 1. 3. 3. A dUTPáz celluláris lokalizációjának vizsgálata HeLa sejtben	94
5. 2. Az UDE fehérjét stabilan expresszáló transzgenikus humán sejtek előállítása.....	96
5. 2. 1. A _{HEK} UDE ^{WT} -eGFP és _{HEK} eGFP transzgenikus sejtvonalak előállítása lentivirális géntranszferrel	96
5. 2. 2. Homogén _{HEK} eGFP és _{HEK} UDE ^{WT} -eGFP sejt kultúrák előállítása	99
5. 3. A humán DUT és TYMK gének RNS interferenciás csendesítése és a géncsendesítés következményeinek tanulmányozása*	101
5. 3. 1. A DUT gén csendesítése és következményeinek vizsgálata	101
5. 3. 1. 1. A DUT gén hatékony csendesítése	101

5. 3. 1. 2. A DUT géncsendesítés hatása a timidilát metabolizmusban esszenciális enzimek génexpressziójára	103
5. 3. 1. 3. A DUT géncsendesítés hatása a sejtek 5FU és FUdR drogokkal szembeni érzékenységére	106
5. 3. 1. 4. A DUT géncsendesített sejt vonal dTTP és dUTP készletének vizsgálata	110
5. 3. 2. A TYMK gén csendesítése és következményei	111
5. 3. 2. 1. A TYMK gén csendesítése	111
5. 3. 2. 2. A TYMK géncsendesítés hatása a timidilát metabolizmusban esszenciális enzimek génexpressziójára	113
5. 3. 2. 3. A TYMK géncsendesítés hatása a sejtek 5FU és FUdR drogokkal szembeni érzékenységére	114
5. 3. 3. A DUT és TYMK gének szimultán géncsendesítése és következményeinek vizsgálata.....	117
5. 3. 3. 1. A DUT és TYMK gének szimultán csendesítése.....	117
5. 3. 3. 2. A DUT és TYMK gének szimultán csendesítésének hatása a timidilát metabolizmusban esszenciális enzimek génexpressziójára	119
5. 3. 3. 3. A DUT és TYMK gének szimultán csendesítésének hatása a sejtek 5FU és FUdR drogokkal szembeni érzékenységére.	120
6. ÖSSZEFOGLALÁS	125
7. SUMMARY	126
8. KÖZLEMÉNYEK.....	127
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	128

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3'-ős vég	a DNS/gén/primer utolsó nukleotidjának szabad hidroxil csoporttal záródó vége
5'-ős vég	a DNS/gén/primer első nukleotidjának foszfát csoporttal záródó vége
5FU	5-fluorouracil
A	Adenin
A, G, S, stb.. aminosav	Aminosavak elnevezése egybetűs kódjuk szerint
AID	Aktiváció indukált citozin dezamináz
ARM domén	Armadillo domén
BER	Bázis excíziós (kivágó) repair (javítómechanizmus)
C	Citozin
CpG-sziget	Citozin-foszfát-Guanin szekvencia sziget
CSR	Izotípus váltás
C-terminális	Polipeptidlánc utolsó aminosavának szabad karboxil csoportja
CTPS	CTP szintetáz
DCTD	dCMP-dezamináz (gén és fehérje)
DHF	Dihidrofolát
DHFR	Dihidrofolát reduktáz
(d)NMP	(2'-dezoxi)nukleozid-5'-monofoszfát
(d)NDP	(2'-dezoxi)nukleozid-5'-difoszfát
(d)NTP	(2'-dezoxi)nukleozid-5'-trifoszfát
<i>D. mel.</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> (Ecetmuslica)
DsRed-N1	Piros fluoreszcens fehérje
DUT	Humán dUTPáz gén
dUTPáz	dezoxiuridin-trifoszfát nukleotidhidroláz
eGFP	(erősített) Zöld fluoreszcens fehérje
eYFP	(erősített) Sárga fluoreszcens fehérje
FdUMP	5-fluoro-2'-dezoxiuridin-5'-monofoszfát
FdUTP	5-fluoro-2'-dezoxiuridin-5'-trifoszfát
FUdR	5-fluoro-2'-dezoxiuridin
G	Guanin
HeLa	humán adenokarcinóma sejtvonal
IC ₅₀	50%-os növekedési gátlásához tartozó drog koncentráció
Ig	Immunglobulin
LD-DUT	Ecetmuslica dUTPáz hosszú izoformája
MBD4	Metil-CpG kötő fehérje 4
MUG	Hibapár uracil glikoziláz
N	Bármelyik bázist jelölheti nukleotidban
NDPK/NDK	Nukleozid-difoszfát kináz

NLS	Nukleáris lokalizációs szignál
NMK	Nukleozid-monofoszfát kináz
NPC	Nukleáris pórus komplex
N-terminális	Polipeptidlánc első aminosavának szabad amino csoportja
NTT-DUT (SD-DUT)	Ecetmuslica dUTPáz rövid izoformája
ORF	Gén/mRNS fehérjét kódoló szekvenciája (és fehérje hossz)
PCR	Polimeráz láncreakció
PDB	Protein adatbázis (azonosító számmal ellátva)
pEntr	pEntr-H1-TO RNSi vektor
pSup.p	pSuperior. puro RNSi vektor
RNSi	RNS interferencia
RR	Ribonukleotid reduktáz enzimkomplex
Sf9	<i>Spodoptera</i> izeltlábú sejtvonala
SHM	Szomatikus hipermutáció
shRNS	rövid hajtú RNS
siRNS	rövid interferáló RNS
SMUG1	egyreszál szelektív monofunkciós uracil-DNS glikoziláz 1
T	Timin
TDG	Timin-DNS glikoziláz
Tet	Tetraciklin
TetO2	Tet-R kötő cisz-DNS szekvencia
Tet-R	Tet represszor
THF	Tetrahidrofolát
TK1	Timidin kináz 1, nukleáris izoforma (gén és fehérje)
TP	Timidin foszforiláz
TR-HeLa	T-Rex HeLa humán (Tet-R termelő) sejtvonala
TYMK	Timidilát kináz (gén és fehérje)
TYMS	Timidilát szintáz (gén és fehérje)
U	Uracil
UDE	Uracil-DNS degradáló faktor
UDE ^{WT}	Vad allélikus szekvenciájú UDE
UDK	Uridin-difoszfát kináz
UMK	Uridin-monofoszfát kináz
UNG1	Uracil-DNS glikoziláz 1, mitokondriális izoforma
UNG2	Uracil-DNS glikoziláz 2, nukleáris izoforma
VP-16	Etopozid

1. BEVEZETÉS

A földtörténet Archaikum korszakában a szerves élővilág kialakulásának kezdetén, az önmagukat reprodukálni képes összetettebb makromolekulák és kezdetleges életformák a saját tulajdonságaikra vonatkozó limitált információt feltehetően RNS formában tárolták és örökítették tovább [1]. Ebben az ősi RNS-világban az uracil bázisnak alapvető szerepe lehetett az adenin, guanin és citozin bázisok mellett az ősi RNS-enzimek katalitikus aktivitásának ellátásában és nem utolsó sorban az elsődleges genetikai kód rögzítésében [2]. A gyorsan változó életkörülményekhez történő alkalmazkodás jelentősen megnövelte az egyre komplexebbé váló életformák fennmaradását és továbbfejlődését biztosító genetikai állomány méretét. A kémiai és szerkezetileg is instabil RNS molekula nem bizonyult alkalmas makromolekulának egy előreláthatatlan hosszúságú genetikai evolúciós folyamat számára. Azonban a jelen élővilágban is találunk az élet határterületén lévő olyan organizmusokat, amelyek genetikai információjukat RNS formában rögzítik: ezek az RNS vírusok. Esetükben a genetikai kód RNS molekulában történő tárolása inkább csak analóg jelenség, mintsem ősi származásukat igazoló tulajdonság. Tehát a későbbi összetettebb életformák megjelenésével a genetikai kód elsődleges tárháza az RNS molekulánál kevésbé reaktív és ezáltal jóval stabilabb DNS molekula lett. A DNS-világban az uracil helyét azonban szintén egy pirimidin bázis a timin (5-metil-uracil) vette át.

A ma ismert prokarióta és eukarióta élőlényekben az uracil nem kívánt alkotója a fiziológias DNS lánchnak és ezért a DNS-ben való megjelenése a sejt azonnali ellenreakcióját váltja ki. Az evolúció során az élőlényekben olyan enzimfehérjék konzerválódtak, amelyek indirekt vagy direkt módon uracil-mentesítik a DNS molekulát. Ezek egyik képviselője a dezoxiuridin-trifoszfát nukleotidhidroláz (dUTPáz) fehérje, amely a sejtek dezoxiribonukleotid készletében minimalizálja a dezoxiuridin-trifoszfát (dUTP) mennyiségét, így preventív módon megakadályozza az uracil esetleges beépülését a DNS molekulába. A biokémiai evolúció tökélye, hogy a dUTPáz-funkció az által, hogy uracil-mentesíti a dezoxiribonukleotid készletet, alapjaiban támogatja a timidin nukleotidok bioszintézisét is. Tehát az enzim a maga funkcionális dualitásával esszenciális helyet foglal el a dezoxipirimidin anyagcserében és így a DNS molekula integritásának védelmében. Ha a dUTPáz-prevenció ellenére az uracilnak mégis sikerül beépülnie a DNS-be vagy ott spontán, esetleg enzimatisz uton megjelennie, akkor a konzervált fehérjék egy másik

csoportja az uracil specifikus DNS glikozilázok (UNG, SMUG1, TDG, MBD4) lépnek fel hatékonyan az uracil bázissal szemben és könyörtelenül kihalítják a DNS láncból. A két védelmi rendszer azonban érzékeny egyensúlyt teremt, mivel a dUTPáz-funkció esetleges kiesése a DNS nagymértékű uracilosodását eredményezheti. A nagyszámú uracil jelenléte viszont a glikozilázok erélyes fellépését váltja ki, ami a sejt apoptózisát is okozhatja.

Bizonyos esetekben az uracil jelként is szolgálhat a DNS-ben. Jó bizonyíték erre az immunglobulinok izotípus váltásának molekuláris mechanizmusa. Továbbá az uracil helyspecifikus jelenléte hasznos mutációk forrása is lehet az immunglobulinok diverzitásának létrejöttében. Ez utóbbi esetben az uracil a molekuláris adaptáció egyik legérdekesebb megnyilvánulásához járul hozzá.

Az uracil-DNS metabolizmusban résztvevő említett enzimek egyértelmű és maradéktalan sejtmagi transzportja nélkülözhetetlen előfeltétele a fehérjefunkció adekvát érvényesítésének és ezen keresztül a sejt optimális működésének. A jelen munka keretében egyrészt a *Drosophila* uracil DNS degradáló faktor (UDE) és a dUTPáz fehérje putatív nukleáris lokalizációját meghatározó szekvenciák (NLS) molekuláris biológiai karakterizálását végeztem el. A két fehérje eltérő tulajdonságú nukleáris lokalizációt determináló peptid szakaszának jellemzése rávilágít az NLS szekvenciákban résztvevő lényeges aminosavak nélkülözhetetlen fontosságára. Az eltérő felépítésű NLS szakaszok funkcionális vizsgálata és karakterizálása mindinkább segíthet az egyre tökéletesebb konszenzus NLS szekvenciák megállapításában.

Az osztódásra elkötelezett sejtek intenzív timidilát bioszintézise nélkülözhetetlen fontosságú a megfelelő DNS-szintézishez. A dUTPáz enzim funkcióhiánya jelentős timidilát prekursorvesztést okozhat a sejtekben, amelynek következtében a dezoxipirimidin nukleotidok helyes aránya eltolódhat. Ez utóbbi viszont a DNS integritását veszélyeztetheti. Éppen ezért a timidilát metabolizmus a proliferatív megbetegedések elleni anti-tumor terápiák kedvelt célpontja. A jelen munkában sikerült létrehozni egy humán sejtvonalat, amelyben a dUTPáz gén repressziója stabilan biztosítható volt. A tartós timidilát prekursorhiány hátterében lehetőség nyílt a timidilát metabolizmusban érintett enzimek expressziós szintjének kvantitatív vizsgálatára, azaz a metabolikus út plasztikusságának tanulmányozására. A dUTPáz-funkció hatékony gátlása jelentősen érzékenyítheti az osztódó sejteket a timidilát metabolizmusra specifikusan ható kemoterapeutikummal szemben, így fékezheti az immortális sejtek proliferációját.

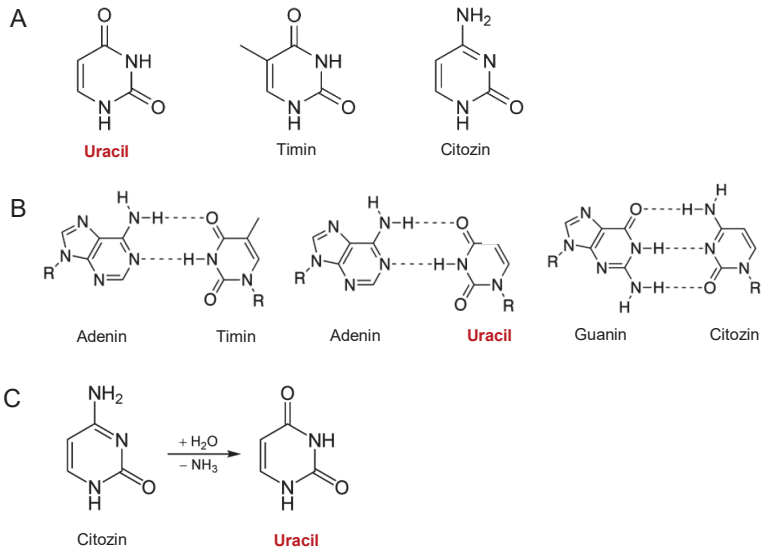
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2. 1. Az uracil, mint „hívatlan vendég” a DNS molekulában

A pirimidin bázisok közül az uracil nem tartozik a DNS molekulát felépítő bázisok közé. Azonban szerkezetét tekintve, mint timin-analóg adeninnel képezhet tökéletes bázispárt (2. 1./A,B ábra). A természetben az optimális fiziológiai viszonyok mellett, ha csak szórványosan is, de előfordul uracil bázis a DNS molekulában. A DNS-ben megjelenő uracilnak a jelen ismereteink szerint három fő forrása lehet.

Az első esetben úgy jelenhet meg uracil a dupla szálú DNS molekulában, hogy a purin guaninnal bázispárt képző citozin spontán módon egy hidrolitikus dezamináció szenved el (2. 1./C ábra) [3-4]. Az ily módon keletkező mutagén uracil a genetikai kód számára veszélyt rejt, ugyanis egy soron következő sejtciklus S-fázisában az uracil, mint timin-analóg az újonnan szintetizálódó DNS szál adenin bázisával alkothat bázispárt. Az említett bázisátalakulás naponta akár ötszáz különböző helyen is megtörténhet a humán DNS-ben [5]. Az esemény kitüntetett pontjai az egyes szálú DNS szakaszok, különösen a replikációs villák és a transzkripció buborékok. A létrejövő pont mutációt C > T tranzíciónak nevezzük [4-5]. Egy hasonló, de ritkább esetben, a génekifejeződés epigenetikus szabályozását jelentő CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) szekvencia-szigetek enzimatisz metilálásakor is megtörténhet a citozin spontán dezaminációja. A metiltranszferáz által katalizált reakció több lépéses, amelyben a citozin először egy dihidropirimidin köztitermékké alakul. Ha az enzimreakcióban nem kielégítő mennyiségben van jelen az aktivált SAM (S-adenozil-metionin) metil donor, az sikertelen enzimkatalízist eredményezhet, ami az említett intermedier spontán dezaminációját vonhatja maga után [6].

A DNS-ben megjelenő uracil második, potenciális forrása a DNS replikáció. A DNS szintézisekor az uracil és a timin nukleotidokra aszelektív DNS-dependens DNS polimeráz dTMP helyett dUMP komponenszt építhet be a polinukleotid láncba [4]. A komponensek intracelluláris koncentráció aránya szabja meg a nukleotid beépítési preferenciát. Napi átlagban minden tízezredik dTMP beépülést egy dUMP beépülés követ a humán genomban [7]. Az enzim által elkövetett hiba önmagában nem veszélyezteti a genetikai integritást, mivel egy soron következő S-fázisban az uracil timin-analóggént adeninnel mutat majd bázispárképzési hajlandóságot.



2. 1. ábra. A pirimidin bázisok szerkezeti képlete, bázispár képzése és a citozin oxidatív dezaminációja. (A) Természetes fiziológiás viszonyok mellett az uracil csak az RNS felépítésében, a timin (5-metil-uracil) csak a DNS felépítésében, míg a citozin mind az RNS, mind a DNS felépítésében részt vehet. (B) A timin, valamint az uracil, mint timin-analóg a purin adeninnel képezhet bázispárt két hidrogén híd kialakításával. A citozin bázis viszont a purin guaninnal alkothat bázispárt három hidrogén-híd segítségével. (C) A DNS-ben lévő citozin dezaminációja spontán [3-4] vagy enzimatiskus módon [6,14] mehet végbe. A reakciók végeredménye az uracil bázis lesz. Az így keletkező uracil javítás nélkül mutagén hatású a genetikai kód számára.

A sejtek a polimeráz helyes nukleotid preferenciájának megválasztása érdekében ún. preventív megoldást alkalmaznak: enzimatisukusan alacsony szinten tartják a dUTP/dTTP koncentráció arányt, ami humán sejtben ~0,08 értékű [8] (lásd még a 2. 3. 3. 1. fejezetet).

Mindkét uracil-forrás esetén a DNS-ben megjelenő uracil az uracil-DNS specifikus glikozilázok és az éberen működő javító mechanizmusok (BER: base excision repair és MMR: mismatch repair) számára nem maradhat észrevétlen és a hibás bázis korrigálása általában sikerrel megtörténik, elkerülve egy esetleges mutációt vagy DNS száltörést (lásd még a 2. 3. 3. 1. fejezetet) [9-13].

A harmadik uracil forrás egy enzim indukálta folyamat eredményének köszönhető. A B-limfocitákban antigén prezentációt követően, a specifikusan expresszáló AID (Activation-induced cytosine deaminase) enzim az immunglobulin (Ig) gének variábilis- és kapcsoló régióiban egy specifikus szekvencia kontextusban lévő citozint uracil bázissá

alakítja. Az említett helyeken létrejövő uracil a glikozilázok és a javító mechanizmusok közreműködésével akár hibásan is korrigálódhat. A keletkezett mutációk az Ig gének szomatikus hipermutációjának (SHM: somatic hyper mutation), valamint egy nagyon hasonló folyamatban az izotípus váltásának (CSR: class switch recombination) folyamatát teszik lehetővé (lásd még a 2. 2. 3. fejezetet). Az AID enzim közreműködésével létrehozott mutációk milliószor meghaladják a spontán módon létrejött mutációk számát. Végző soron, az immunglobulinokban létrehozott mutációk specifikusabb antigén felismerést és hatékony immunműködést eredményeznek emlős szervezetben [14-17].

Az előbbi példa jól szemlélteti, hogy a DNS molekulában felbukkanó uracil, mint hivatlan vendég, a javító mechanizmusok szakadatlan működésének ellenére, lényeges mutagenikus tényezője a genetikai sokféleség létrejöttének, és ezen keresztül az élőlények mind tökéletesebb alkalmazkodóképességének.

2. 2. Az uracil felismerése és eltávolítása a DNS molekulából

2. 2. 1. Az uracil-DNS glikozilázok

Abban az esetben, ha a replikációkor dUMP formában uracil épülne be a DNS molekulába, azt az uracil bázisra specifikus enzimek, az uracil-DNS glikozilázok távolítják el. A DNS-ben spontán módon keletkezett uracil bázisok okozta hibapárok bonyolult korrekciójában is az említett enzimek végzik az első katalitikus lépést. Az uracil-DNS glikozilázok az egyéb DNS glikozilázokkal egyetemben a DNS bázisait érő legkülönbözőbb károsodások korrigálásáért felelős BER javítórendszer tagjait képzik [18]. Működésüket tekintve monofunkciós enzimek, azaz csak a bázist vágják ki a lézióban érintett nukleotidból egy un. AP (apurin/apirimidin/abázikus) helyet hagyva a polinukleotid láncban [19]. Tehát a bifunkcionális glikozilázokkal (pl., hOGG1: human Oxoguanine DNA glycosylase 1) ellentétben nincs AP-liáz aktivitásuk [20-21]. A bázis leválasztását a nukleotid N-glikozidos kötésének felszakításával végzik [22]. A monofunkciós glikozilázok az enzimmkatalízis során egy aktivált vízmolekulát és az enzim aktív centrumában egy D aminosavat használnak fel az N-glikozidos kötés nukleofil támadása érdekében [23].

Az elsők között azonosított uracil specifikus DNS glikoziláz az *E. coli* UDG (Uracil-DNA Glycosylase) enzime, amely prototípus képviselője ezen (UDG) enzimmcsaládnak [24]. Az emlős sejtekben négy uracil specifikus DNS glikoziláz található: UNG1 (Uracil-DNA Glycosylase 1) és UNG2 (Uracil-DNA Glycosylase 2) [25-26], SMUG1 (Single-strand-

Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase 1) [27], TDG (T/U mismatch DNA Glycosylase) [28] és MBD4 (Methyl-Binding Domain 4 protein) [29-30] (2. 2. 1. táblázat).

2. 2. 1. táblázat. Baktérium, humán és ecetmuslica monofunkciós uracil-DNS glikozilázok néhány tulajdonsága. A táblázat a bakteriális, a humán és az ecetmuslica uracil-DNS glikozilázok ORF hosszát, celluláris lokalizációját, szubsztrát spektrumát, valamint a fehérjéket kódoló gének kromoszómális lokalizációját foglalja össze [23].

uracil-DNS glikoziláz	ORF hossz	celluláris lokalizáció	kromoszóma lokalizáció	szubsztrát specifitás
bUDG	229	bakt. citoplazma	gDNS	ssU>U:A>U:G>T:G
hUNG1	304	mitokondrium	12q24.1	ssU>U:G>U:A>5FU>>5hU, IA, A.
hUNG2	313	nukleusz	12q24.1	ssU>U:G>U:A>5FU>>5hU, IA, A.
hSMUG1	270	?	12q13.1-q14	ssU>U:A, U:G, 5hmU:G
dSMUG1 homológ	280	?	3R:12,976,309	?
bMUG	168	bakt. citoplazma	gDNS	U:G>εC:G>(G:T)
hTDG	410	nukleusz	12q24.1	U:G>εC:G>T:G
dTDG	1738	nukleusz	4:565,889	U:G>T:G
hMBD4	580	?	3q21	U/TPG:5-meCpG, Timin-glikól:G

b: baktérium (*E. coli*)
h: humán (*H. sapiens*)
d: muslica (*D. mel.*)
5hU: 5-hidroxiuracil
IA: izodialuronát
A: alloxán
εC: etenocitozin
5hmU: 5-hidroximetil-uridin

Emlős sejtekben az említett glikozilázok eltérő arányban vesznek részt a különböző bázisokkal (guanin vagy adenin) párt képző uracil eltávolításában. Ennek oka főleg az, hogy az enzimek egy adott hibapárhoz eltérő affinitással viszonyulnak. Szubsztrát spektrumuk is jelentősen különbözhet, ugyanis némelyikük az uracil mellett más bázisokat (pl., timint), valamint azok módosulatait (pl., timin-glikolt) is képes kivágni. Lényeges megjegyezni, hogy az eltérő evolúciós fejlettségi szinten lévő élőlények (baktériumok, gombák, rovarok, gerincesek) a felsorolt emlős glikozilázok homológját, azon belül ortológját tartalmazhatják (2. 2. 1. táblázat).

2. 2. 1. 1. Az UNG glikoziláz

Humán szervezetben az UNG1 és UNG2 fehérjék ugyanazon UNG génről íródnak át alternatív promóter használat és splicing segítségével [26]. Az UNG1 (mitokondriális izoforma) izoprotein expressziója konstitutív és a fehérje N-terminális régiójában megtalálható a mitokondriális determináltságért felelős szekvencia-szignál [31].

Ismereteink szerint, az UNG1 az egyedüli mitokondriális uracil-DNS glikoziláz [32]. Az UNG2 (nukleáris izoforma) izoprotein expressziója az előbbivel ellentétben szigorúan a sejtciklus S-fázisához kötött, és ennek értelmében fő feladata a replikációkor beépülő uracil bázis eltávolítása az U:A hibapárból [33]. *In vitro* vizsgálatok szerint, az UNG fehérjék mind az egyes szálú-, mind a kettős szálú DNS-ben előforduló uracilt képesek kivágni. Szubsztrát specifikitásuk inkább csak az uracil bázisra terjed ki – csak alacsony hatékonysággal vágnak ki módosult bázisokat – (2. 2. 1. táblázat) [34], ami a szubsztrátkötő zseb molekuláris kialakításával magyarázható. A szubsztrátkötő zseb bejáratát az Y147 aminosav oldallánc fizikailag beszűkíti, megakadályozva ezzel a timin bázis beférést a zsebbe. Az enzim aktív centrumában a D145, N204 és H268 aminosav oldalláncoknak van kitéüntetett szerepük az enzimkatalízis során (2. 2. 1. 2./B ábra) [35]. A fehérje a DNS mentén haladva monitorozza a bázisokat és uracil esetén a polinukleotid lánc síkjából kifordítva kivágja azt [36]. Kimutatták, hogy a replikációs villában a PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) és RPA (Replication protein A) fehérjékkel alkot fehérje komplexet, így báziskivágása feltehetően a replikáció folyamatával szimultán történik [37].

Humánban a B-limfociták UNG génmutációja hiper-IgM szindrómát okoz (lásd még a 2. 2. 3. fejezetet) [38]. Az Ung *-/-* genotípusú egér-modellben rávilágítottak, hogy a többi uracil DNS glikozilázhoz viszonyítva az UNG2 a legfontosabb poszt-replikatív (replikációt közvetlenül követő) eltávolítója az uracil bázisnak az U:A hibapárból [39]. Az Archeákat és néhány rovar rendet (átalakulással fejlődő rovarok, pl., *Drosophila*) leszámítva szinte konzervált fehérje az evolúció során [40].

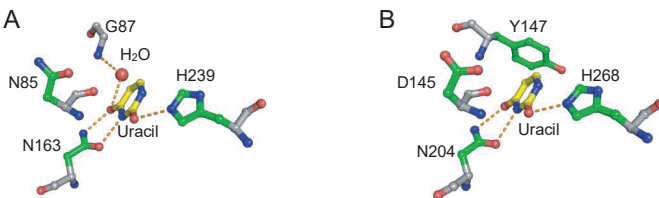
2. 2. 1. 2. A SMUG1 glikoziláz

A SMUG1 glikoziláz legfőképpen gerincesekben fordul elő, ezért korábban azt feltételezték, hogy eredete az UNG fehérjéhez képest jóval későbbre tehető az evolúciós időskálán. Azonban a közelmúlt szekvencia analízisei kiderítették, hogy számos rovargenomban [40-42] (így például a *D. mel.*-ben is) jelen van génjének szekvencia homológja, sőt baktériumban is találtak már szekvencia homológot [43]. Az enzim expressziója a sejtciklustól független és a fehérje a replikációs villában nem mutatható ki. Szubsztrát specifikását tekintve, hatékonyan köti és távolítja el az egyes szálú DNS-ben előforduló uracilt (2. 2. 1. táblázat) [34]. Az enzim ezen prominens aktivitása kapcsán

kapta elnevezését is. Ugyanakkor a dupla szálú DNS-ben előforduló uracilt is képes kihalászni, jóllehet ez utóbbit alacsonyabb hatékonysággal teszi, de ennek ellenére az UNG hiányában jelentősen komplementálhatja annak kieső funkcióját [34]. Többek között ezért tartják lehetségesnek az Ung $-/-$ genotípusú egér életképességét [39].

A SMUG1 elsősorban a citozin spontán dezaminációjával létrejött U:G hibapárból vágja ki az uracil báziskomponenst [34]. Szubsztrát spektruma az UNG-éhoz képest tágabb, ugyanis egyéb módosult bázist is képes kihalászni hibapárokból (pl., 5-hidroximetil-uridin:G) (2. 2. 1. táblázat). Ez utóbbi képessége valószínűleg a szubsztrátkötő zseb nyitottabb voltának köszönhető [43]. Az enzim szubsztrátkötő helyének és a katalitikus centrumának kialakítása hasonló az UNG fehérjénél leirtakhoz, annak ellenére, hogy a két fehérje közötti szekvencia homológia alacsony (2. 2. 1. 2. ábra). A humán UNG és a *Xenopus* SMUG1 szubsztrátkötésében és a katalízisben lényeges funkciójú aminosav oldalláncok (N85, G87, N163 és H239) tekintetében viszont nagyfokú hasonlóság van [43-44].

A SMUG1 az enzimkatalízist követően az AP-helyhez kötve marad, elfedve azt egy esetleges toxikus hatástól [34]. A fehérje fiziológias szerepe inkább a nem proliferáló sejtekben a nem replikatív kromatin védelmében, vagy az osztódó sejtek sejtciklusának S-fázison kívüli részeiben van [34]. A *D. mel.* esetében a SMUG1 gén homológja a CG5285 gén, amelynek a géntermékét *in vitro* és *in vivo* módon még nem vizsgálták, nem jellemezték.



2. 2. 1. 2. ábra. A SMUG1 és az UNG glikozilázok szubsztrátkötésének összehasonlítása. A szerkezeti pálcikamodell jól szemlélteti a *Xenopus* (A) SMUG1 (PDB: 1OES [43]) és a humán (B) UNG (PDB: 1SSP [43]) glikozilázok szubsztrátkötési hasonlóságát: a kötésben és a katalízisben (SMUG1 N85, G87; UNG2 D145, Y147) szereplő aminosav oldalláncok helyzete nagyon hasonló a két enzimnél [43]. Az UNG esetében az Y147 aminosav oldallánc térszűkítő szerepe lehet az egyik oka, ami miatt az enzim szubsztrátkötő zsebe nem képes a metil csoporttal rendelkező 5-hidroximetil-uridin bázis megkötésére, ellentétben a SMUG1-gyel [43]. (piros: oxigén, kék: nitrogén, sárga: uracil gyűrű szénatomjai, zöld: aminosav oldalláncok szénatomjai)

2. 2. 1. 3. A TDG glikoziláz

Az emlős uracil-DNS glikozilázok következő tagja a TDG glikoziláz [28, 45], amely az uracil és a timin bázisok kihatását végzi az U:G és/vagy T:G hibapárokból (2. 2. 1. táblázat) [46]. A T:G hibapár az 5-metilcitozin dezaminálódása révén keletkező timin révén alakulhat ki [46]. A TDG homológja az *E. coli*. MUG (Mismatch Uracil Glycosylase), amely preferenciálisan csak a G:U hibapárból távolítja el az uracilt, míg a T:G hibapár esetében csak nagy enzimkoncentráció esetén valósul meg szignifikáns enzimkatalízis (2. 2. 1. táblázat) [46]. Ismert irodalmi adat, hogy a hasadó élesztő (*S. pombe*) és a *Drosophila* TDG homológok is csak kevésbé vagy egyáltalán nem részesítik előnyben a T:G hibapárt, míg a humán TDG szinte azonos értékkel katalizálja a bázisexcíziót a T:G és U:G párok esetében is [45]. További szubsztrátokat tartalmazó bázispárok esetében tapasztaltak még enzimaktivitást: 5-hidroximetil-uridin:G, C:T, hipoxantin:G és 5FU:G (2. 2. 1. táblázat) [46-47]. A TDG/MUG enzimszalád tagjainak azonban közös tulajdonsága, hogy szubsztrát spektrumuk az uracil és a módosult uracil bázisok mellett általában a timin bázist is lefedi. A TDG/MUG enzimek és az UNG fehérje szubsztrátkötő helyének felépítését illető legradikálisabb különbség, hogy az UNG enzimmél leírt, a timin számára fizikai barriert jelentő Y aminosav helyett, a jelen esetben kis térkitöltésű aminosav oldallánc található, általában G aminosav [47-48].

Az emlős TDG fehérje expressziója sejtciklus szabályozott, közvetlenül az S-fázis megelőzően még az UNG2 megjelenése előtt lebomlik [49]. A TDG aktivitásának és szubsztrát szelektivitásának szabályozása poszt-transzlációs módosítások segítségével valósulhat meg. A fehérje az N-terminálisán acetilálódhat (CBP/p300 által), amely kovalens módosítás következményeként az enzim a T:G hibapárhoz való affinitása jelentősen csökken [50]. Továbbá, a fehérje a C-terminálisán SUMO(Small Ubiquitin-like Modifier)-ilálódhat, amely módosítás enzimműködést befolyásoló hatása megegyezik az acetilációéval [51]. A TDG a SMUG1-hez hasonlóan az enzimkatalízist követően az AP-helyhez kötve marad. Az enzim AP-helyről való disszociációja SUMO-ilációt követően valósul meg [51].

Az emlős TDG gén homológja *D. mel.*-ben a CG1981 (Thd1) gén, amelynek génterméke egy extra méretű C-terminális régióval rendelkezik. A muslica TDG glikoziláz szubsztrát spektruma hasonló az emlőiséhez, azonban preferenciálisan az U:G hibapáron mutat jelentős enzimaktivitást [45]. Mivel a *Drosophila* genomban nincs jelen az UNG gén homológja, ezért feltételezhető, hogy az enzimfunkció hiányát a TDG fehérje

komplementálja (leszámítva, hogy a SMUG1 homológ funkciójáról nincs adat), legalábbis ami az U:G hibapár hatékony javítását illeti.

2. 2. 1. 4. Az MBD4 glikoziláz

Az emlős MBD4 glikoziláz részben a TDG enzimhez hasonló szubsztrát specifitással rendelkezik (2. 2. 1. táblázat). Az enzim fő attribútuma, hogy egy metil-CpG kötő domént tartalmaz a fehérje N-terminálisán [52, 29]. Szubsztrát spektruma viszonylag széles: U:G, T:G, timin-glikol:G és 5FU:G hibapárok esetében mutat enzimaktivitást [53-54]. Az említett hibapárok felismerésére legfőképpen az 5-metil-CpG szekvencia környezetben képes. Tehát elsősorban ebben, a génexpresszió epigenetikus szabályozását jelentő szekvencia környezetben csökkenti a potenciális mutációk számát [29]. Az Mbd4 -/- genotípusú egérvonal esetében a C > T tranzíciók háromszori gyakoriságát figyelték meg a CpG szekvencia szigetekben [55]. Az emlős fehérje esetében leírták, hogy apoptózissal összefüggő fehérjékkel (pl., FADD: Fas-associated death domain protein) mutat fehérje-fehérje kölcsönhatást, amely interakción keresztül szerepe lehet a sejtek apoptotikus érzékenységének kialakításában [56].

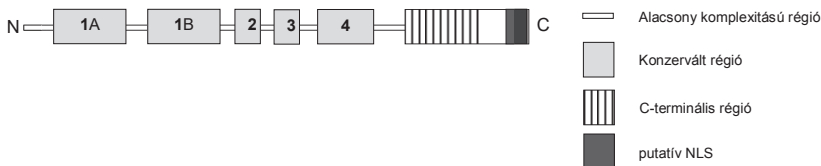
2. 2. 2. Az uracil DNS degradáló faktor (UDE)

A Vértessy laborban Dr. Békési Angéla által nemrégiben azonosított *D. mel.* uracil DNS degradáló faktor (UDE) az eddigi ismereteink szerint, az *ecetmuslica* ontogenezisében, a lárvális fejlődés harmadik szakaszában a bebábozódás előtt jelen van a sejtekben [57]. Az *in vitro* vizsgálatok szerint, a fehérje DNS-kötő affinitása révén a DNS molekulához köt és specifikusan felismeri a DNS-ben lévő uracilt [57]. Az eredmények alapján, a fehérje mind a fiziológiás, mind az uracil tartalmú DNS-hez köt, de csak az uracil tartalmú DNS molekula degradációját idézte elő [57]. Ez utóbbi megfigyelésből ered az enzim elnevezése is. Azonban új eredmények szerint, a fehérje RNS kötési affinitással is rendelkezik [58].

A fehérje *in vitro* detektált aktivitása alapján feltételezhető, hogy az UDE részt vehet az apoptotikus DNS-fragmentáció kezdeményezésében az állat metamorfózis során [57]. Fontos megjegyezni, hogy az *ecetmuslicában* nincs jelen a prominens uracil-DNS glikoziláz az UNG, valamint az ontogenezis ezen szakaszában a dUTPáz fehérje sem mutatható ki a sejtekben.

Ebből az következhet, hogy a sejtekben a DNS uracil tartalma magas lehet, ami az UDE fehérje esetleges katalízisét vonhatja maga után [57, 60-62]. A gyakran ismétlődő uracil bázisoknál bevágott/elvágtat DNS, mint egyfajta szignálként szolgálhat a DNS apoptotikus degradációját illetően.

A szekvencia vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az UDE fehérje öt konzervált motívumból épül fel [57, 59]. Az első két motívum (1A és 1B) helikális szerkezeti elemeket tartalmaz, valamint e két motívum nagyfokban homológ egymással. A limitált proteolitikus vizsgálatok szerint, a fehérje DNS kötése az említett két motívumot tartalmazó fehérjerészhez köthető [59]. Az utolsó motívumot egy kiterjedtebb flexibilis C-terminális régió követi, amely feltűnően gazdag erősen bázikus aminosavakban. A C-terminális legvégén található szekvencia-szakasz ($^{347}\text{PKRKKKR}^{353}$) egy korábbi szekvencia analízis szerint, feltehetően egy putatív nukleáris lokalizációs szekvencia (NLS) (2. 2. 2. ábra) [57].



2. 2. 2. ábra. Az uracil DNS degradáló faktort (UDE) felépítő fehérjerégiók. Az UDE fehérjét az alacsony komplexitású szekvencia szakaszok mellett öt konzerváltabb szekvencia motívum és egy flexibilis C-terminális régió építi fel. A C-terminális legvégén egy erősen bázikus putatív NLS szekvencia ($^{347}\text{PKRKKKR}^{353}$) található [57, 59].

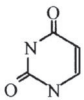
A fehérje további specifikuma, hogy csak néhány teljes átalakulással fejlődő rovar genomjában lelhető fel szekvencia homológja, azonban ezen homológok funkciója egyelőre nem azonosított [57]. Az UDE fehérjével végzett *in vitro* aktivitás vizsgálatok és a szekvencia-homológia tulajdonságok szerint, az enzim nem rokonítható az eddig ismert uracil-DNS glikozilázokkal, valamint nukleázokkal [57]. Így feltehetően egy új fehérjecsalád képviselőjéről lehet szó [57].

2. 2. 3. A bázis excíziós javítómechanizmus (BER)

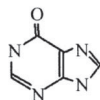
Mint ez már említésre került, a citozin és az 5-metilcitozin bázisok gyűrűn kívüli aminocsoportjának hidrolitikus dezaminációja uracil, valamint timin bázist eredményez. Hasonló hidrolitikus reakcióban az adenin hipoxantin, míg a guanin xantin irányába dezaminálódhat [10-11, 23]. Ezen hibák korrigálásáért a BER javító mechanizmus a kitüntetett [19, 22-23]. Azonban fontos megemlíteni, hogy a BER rendszer az uracil hibajavítása mellett számos oxidatív és egyéb endogén ágensek okozta báziskárosodások prominens javítója a sejtekben (2. 2. 3. 1. ábra) [23, 63]. Az oxidatív ágensek az oxidatív metabolikus folyamatok melléktermékeként vagy spontán módon gamma sugárzás hatására keletkezhetnek. Jellemzőjük, hogy a DNS bázisainak elektrofil szénatomjait veszik leginkább célba. A vízmolekula, valamint a spontán és a katalizált módon végbemenő reakciók során létrejövő reaktív oxigén gyökök (ROS: reactive oxxygen species) az endogén oxidatív stressz faktorok között a leggyakoribbak. A nukleofil vízmolekula a nukleotidok N-glikozidos kötésének hidrolízise révén naponta akár tízezer purin-bázisvesztést is okozhat a humán genomban [23]. A hidrolitikus reakcióból visszamaradó AP helyek erősen citotoxikusak és mutagén hatásúak, így azonnali hibajavítást igényelnek, megelőzve egy esetleges DNS száltörést [64]. A reaktív zsírsav gyökök és aldehidek a lipid-peroxidációs folyamatokban keletkeznek és a DNS számára rendkívül mutagén adduktokat képezhetnek, mind a purin, mind a pirimidin bázisokon [23]. A BER által leggyakrabban javított bázismódosulások a következők: uracil, hipoxantin, xantin, 3-metil-adenin, timin-glikol, 8-oxoguanin, 8-hidroxi-guanin, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyG) és 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyA), 1,N6-etenoadenin, 3,N4-etenocitozin (2. 2. 3. 1. ábra) [23].

A BER általi bázisjavítás számos fehérjét felhasználó konzekutív reakciósor, amelyben az egymást követő lépések szigorú sorrendje elengedhetetlen a pontos bázis-korrekciónak szempontjából. Az uracil bázishiba korrekciója során a javítási folyamat legalább öt lépésből áll (2. 2. 3. 2. ábra). Az első lépés az uracil bázis kihatása egy monofunkciós uracil-DNS glikoziláz által [23]. Az N-glikozidos kötés felhasadását követően a bázis helyén egy AP-hely keletkezik. A második lépésben egy AP- endonukleáz (pl., APE1, HAP1) az AP-hely 5'-ős irányában elvágja a cukor-foszfát láncot egyes szálú DNS törést eredményezve. A katalizist követően egy szabad 3'-OH és 5'-dezoxiribóz-5-foszfát (5'dRP) DNS végek keletkeznek [23].

Dezamináció okozta bázisok

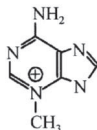


Uracil



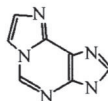
Hipoxantint

Alkiláció okozta bázis

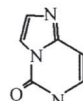


3-metiladenin

Lipid peroxidáció által létrejött bázisok

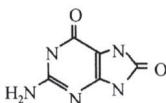


1,N6-etenoadenin

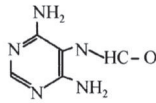


3,N4-etenocitozin

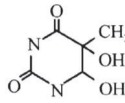
Reaktív oxidatív gyökök által létrejött bázismódosulások



8-oxoguanin



4,6-diamino-5-formamidopyrimidine

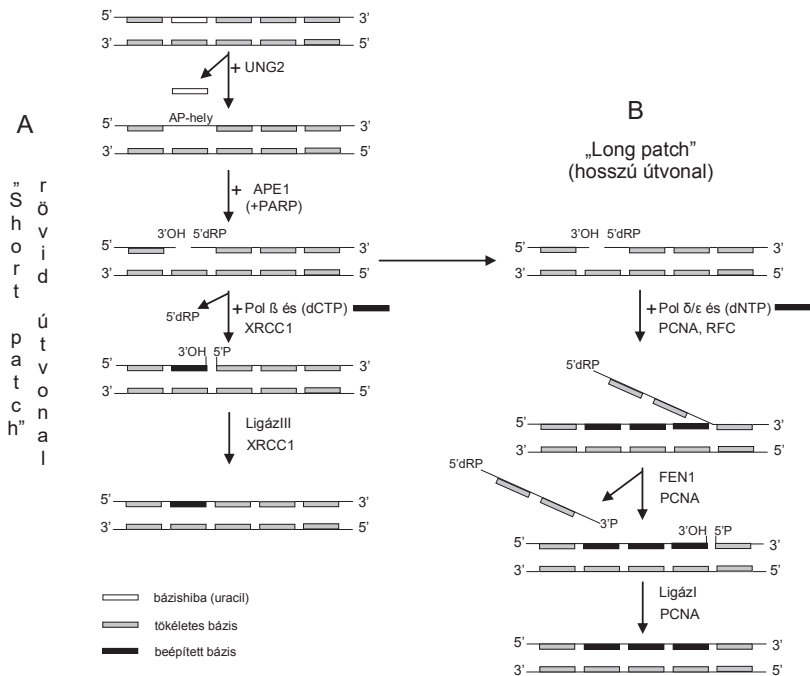


Timin-glikol

2. 2. 3. 1. ábra. A BER által javított leggyakoribb bázismódosulások szerkezeti képletei. A spontán, illetve a katalitikus folyamatokban keletkező endogén károsító ágensek gyakori bázismódosulásokat okozhatnak a DNS molekulában. A citozin hidrolitikus dezaminálódása uracilt, valamint az adenin hasonló reakcióban hipoxantint eredményezhet. Gyakori jelenség a purin bázisok alkilációja, a purin és pirimidin bázisok lipid peroxidációs termékeinek létrejötte, valamint a reaktív oxigén gyökök által létrehozott bázismódosulások [23].

Érdemes megjegyezni, hogy az uracil-hibajavítástól eltérően, ha bifunkciós glikoziláz például a HOGG1, vesz részt a 8-oxoguanin hibajavításban, akkor annak AP-liáz aktivitása a cukorfoszfát láncot egy β -eliminációs reakcióban az AP-hely 3'-ős irányában vágja be egy 3' telítetlen aldehid véget (3'dRP) eredményezve [20-23]. Mivel az említett vég a későbbi lépésben akadályt jelent a polimeráz működése számára, ezért azt az APE1 vagy más, exonukleáz aktivitással (is) rendelkező enzim lehasítja 3'OH csoportot hagyva a végén. Az egyes szállú DNS törés elleni védelemben és a javítórendszer stimulálásában a PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) fehérje jelentősége kitüntetett. Ezt követően először a folyamat két irányban folytatódhat: „short patch” azaz rövid útvonalon vagy „long patch”, azaz hosszú útvonalon (2. 2. 3. 2. ábra) [23].

A rövid útvonalban (2. 2. 3. 2./A ábra) a polimeráz- β (Pol β) közvetlenül interakcióba kerül az AP-endonukleázzal majd az 5'dRP-áz aktivitása révén eltávolítja a bázis nélküli 5'-dezoxiribóz-5-foszfátot, végül a szabad 3'-OH véghez egy komplementer nukleotidot ad [23].



2. 2. 3. 2. ábra. A BER működése uracil bázishiba korrekciójakor. Az uracil bázishiba korrekciója során az első lépés a bázis lehasítása egy monofunkciós uracil-DNS glikoziláz által (pl., UNG2), aminek következményeként a bázis helyén egy AP-hely keletkezik. A következő lépésben az AP-endonukleáz (pl., APE1) 5'-s irányában elvágja a cukor-foszfát láncot, ami egy szabad 3'-OH és egy 5'dRP DNS véget eredményez. Ezt a lépést követően a PARP fehérje jelenléte a DNS-t védő hatása és a javító rendszer stimulálása érdekében fontos lehet. A javítási folyamat emlősökben két eltérő irányban folytatódhat: (A) „short patch” azaz rövid útvonalon vagy (B) „long patch”, azaz hosszú útvonalon. (A) A rövid útvonalban a Pol β eltávolítja a bázis nélküli 5'dRP-t és a szabad 3'-OH véghez egy komplementer nukleotidot fűz, majd a folyamat végén a ligáz III az XRCC1 fehérjével alkotott komplexben kovalensen zárja a cukor-foszfát láncot. (B) A hosszú útvonal során a Pol δ/ε a PCNA és az RFC fehérjék jelenlétében az AP-hely szabad 3'-OH csoportjához egy nukleotid-oligomert elongál. A megszüntetizált oligomert a FEN-1 endonukleáz a PCNA fehérje jelenlétében levágja a DNS-ről. Utolsó lépésként a szintén PCNA stimulálta DNS ligáz I az oligomert és az eredeti DNS szálak között létrehozza a kovalens foszfodiészter kötést [23]. 5'dRP: 5'-dezoxiribóz-5-foszfát; PARP: (Poly (ADP-ribose) polymerase); Pol β: DNS polimeráz-β; XRCC1: x-ray repair cross-complementing group 1; Pol δ/ε: DNS polimeráz δ/ε; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; RFC: replication factor C; FEN-1: flap endonuclease I.

A következő lépésben a ligáz III az XRCC1 (X-ray Repair Cross-Complementing group 1) fehérjével alkotott komplexben kovalensen zárja a cukor-foszfát gerincet [23].

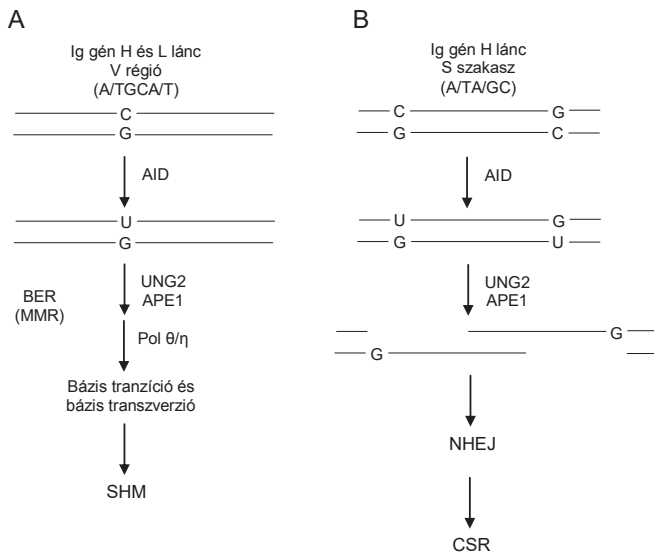
A hosszú útvonal (2. 2. 3. 2./B ábra) során 2-10 nukleotid egyidejű cseréje történik a lézióban érintett szekvencia szakaszon. Ez a javítási útvonal általában akkor következik be, ha az 5'dRP eltávolítása nem eredményes. Ilyenkor a Pol β , de inkább a Pol δ és ϵ az AP-hely szabad 3'-OH csoportjához 2-10 nukleotidból álló oligomert szintetizál a komplementaritásnak megfelelően. Az enzim az elongáció közben az 5'dRP-t tartalmazó eredeti szálrészt denaturálja, letolja az eredeti szálról. Az ismeretek szerint, a Pol β szintetizálja meg az oligomer első nukleotidját, míg a továbbiakat a Pol δ/ϵ , amelyek működése a PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) és a RFC (Replication Factor C) fehérjék jelenlétét igényli. Azonban a Pol β működése az említett fehérjéktől függetlenül is történhet [23]. Az ezt követő lépésben, a megszentizált oligomert a FEN-1 (Flap Endonuclease I) endonukleáz lehasítja a DNS-ről. A FEN-1 működéséhez szintén szükség van a PCNA fehérje jelenlétére. Utolsó lépésként a szintén PCNA stimulálta DNS ligáz I az oligomer és az eredeti DNS szálak között létrehozza a kovalens foszfordiészter kötést [23].

Mivel az UNG2 fehérjét az RPA és PCNA proteinekkal asszociálva kimutatták a replikációs villában [37], valamint a Pol β nincs jelen az említett replikációs képződményben, így feltételezhető, hogy a replikációkor beépülő uracilok - UNG2 általi - javítása a BER hosszú útvonalán történik [23].

A BER javítómechanizmusnak az MMR javítórendszer működése mellett kitüntetett szerepe van az aktivált B-limfociták affinitásérését jelentő SHM-ban, valamint az Ig molekulák eltérő effektor funkcióját biztosító izotípus váltás vagy más néven CSR folyamatának létrejöttében (2. 2. 3. 3. ábra) [65-66].

Az SHM esetében (2. 2. 3. 3./A ábra) az Ig gének (könnyű (L)- és nehézlánc (H) gének) V régiójában (V: variábilis régió; variable gene segment) egy konszenzusszerű szekvencia kontextusában (A/TGCA/T) az AID enzimkatalízise során, citozinból uracil bázis keletkezik [67]. A dezaminációval létrejött uracilt az UNG2 glikoziláz kivágja a DNS molekulából, majd a BER javítófolyamat megpróbálja korrigálni a bázishibát. Aktivált B-limfocitákban az alacsony hibaszázalékkal elongáló Pol β helyett az alacsony fidelitású Pol θ/η és Rev-1 működése a preferált, ami számos pont mutáció (C > N tranzíciók és transzverziók) létrejöttének valószínűségét okozza az érintett nukleotid esetében [67-68].

A CSR folyamatok (2. 2. 3. 3./B ábra) az Ig gén (H lánc) konstans (C) exonjait ($C_{\mu, \gamma, \alpha, \epsilon}$) megelőző S (switch) intronikus szekvenciák között egy régió-specifikus rekombináció történik. Az intronok $S_{\mu, \gamma, \alpha, \epsilon}$ szekvencia szakaszaiban egy palindrom konszenzus szekvencia (A/TA/GC) ismétlődik [67]. A szekvenciában az AID citozint dezaminál. Az uracil megjelenése a BER működését váltja ki, amelyben az UNG2 és az APE1 katalízise az érintett szekvenciában kettős DNS-száltörését idéz elő. Ez lehetővé teszi, hogy a cél C exon nem homológ szákiegészüléssel (NHEJ: Non-Homologous End-Joining) kapcsolódjon a nehézlánc variábilis régiójával (VDJ: V: Variable gene segment; J: Joining gene segment; D: Diversity gene segment) [65, 67-68].



2. 2. 3. 3. ábra. A BER szerepe az Ig gének SHM és CSR folyamatában. (Leegyszerűsített, sematikus folyamatábra) (A) Az Ig L és H láncait kódoló gének V régiójában a B-limfociták affinitásérése során szomatikus hipermutáció (SHM) történik [67-68]. Az említett régióban számos A/TGCA/T kontextusú szekvencia szakasz található, amelyekben az AID enzim citozint dezaminál. A létrejött uracilt, mint bázis hibát a BER (és az MMR – nincs feltüntetve) javítómechanizmus korrigálja. A korrekcióban résztvevő alacsony fidelitású Pol θ/η, Rev-1 működése számos pont mutáció (bázis transzció és bázis transzverzió) létrejöttét okozza az említett régióban. (B) Az izotípus váltás (CSR) folyamatok az Ig H láncát kódoló génben a C exonokat megelőző intronikus S szekvenciák között régió-specifikus rekombináció történik. Az S szekvenciákban palindrom A/TA/GC kontextusú szekvencia-ismétlődés fordul elő, amelyben az AID citozint dezaminál. Az uracil megjelenése a BER működését váltja ki, amely az S szekvencia régiókban kettős szálú DNS törését idéz elő. A folyamat lehetővé teszi, hogy a cél C exon egy nem homológ szákiegészüléssel (NHEJ) kapcsolódhasson a H lánc variábilis (VDJ) régiójával [67]. (V: variábilis régió, Variable gene segment; VDJ: V: Variable gene segment; J: Joining gene segment; D: Diversity gene segment; S: Switch region; C exon: konstans exon; NHEJ: Non-Homologous End-Joining)

A CSR esetében az uracil kivágását nagy százalékban az UNG2 végezheti, mivel az UNG deficiens malignus B-sejtek az un. hiper-IgM szindróma okozói [17, 38].

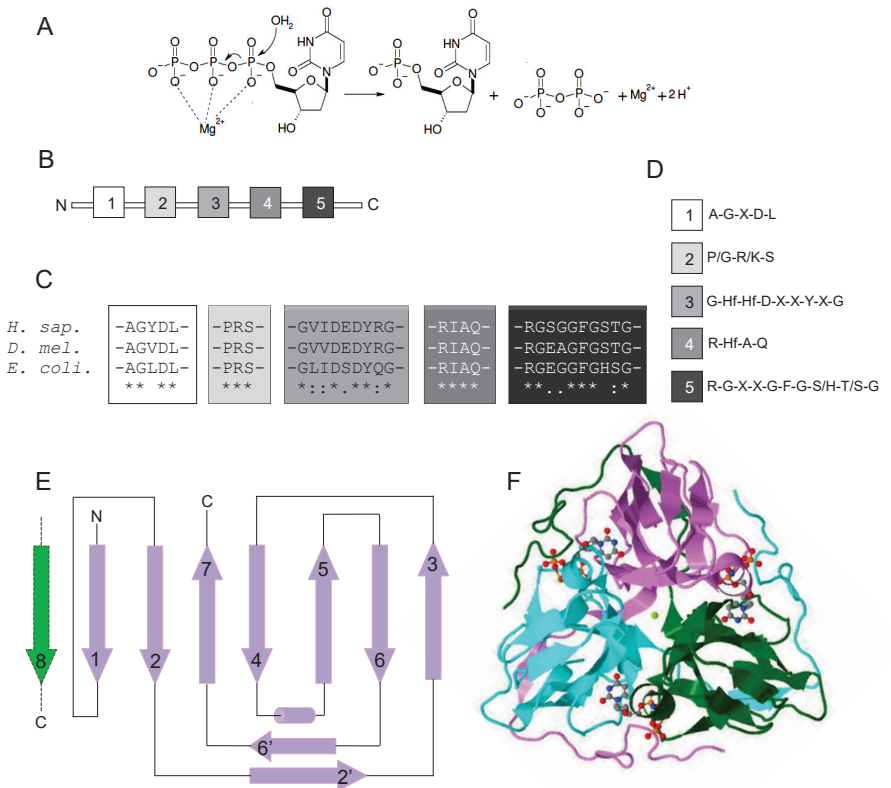
Az említett két immunsejt-specifikus folyamat példát szolgáltat arra a tényre, hogy az uracil bázis megjelenése a B sejtek Ig génjének meghatározott szekvenciájában nem egy nem kívánt mutagén hatást jelent, hanem a B sejt affinitásérését és izotípus váltását biztosító hasznos mutációk létrejöttének előfeltétele.

2. 3. A dUTPáz enzimfehérje jellemzése

A dezoxiuridin-trifoszfát nukleotidhidroláz (dUTPáz) által katalizált biokémiai reakció a dUTP nukleotid hidrolízise, amely enzimreakció során dUMP nukleotid és anorganikus pirofoszfát keletkezik, mint termékek [69]. Az enzimkatalízis általában Mg^{2+} ion kofaktort igényel és a reakció során keletkező végtermékek mellett két H^+ ion is felszabadul (2. 3./A ábra). Ez utóbbi teszi lehetővé az enzim katalitikus aktivitásának *in vitro* nyomon követését egy un. semleges közegű, sav-bázis indikátor alapú fotometriás mérési eljárás során [70]. A dUTPáz egy aktivált vízmolekulát használ fel a dUTP α helyzetű foszfátja elleni nukleofil reakcióban, amely reakció az enzimkatalízis során az α és β foszfátcsoportok közötti foszfoanhidrid kötés felbomlását eredményezi [69, 71-72].

A dUTPáz enzimeket szerkezetük alapján több csoportba sorolhatjuk. Legtöbbjük homooligomer felépítésű [69]. A baktériumok, az eukarióták és a retrovírusok homotrimer negyedleges szerkezetű enzimfehérjéket kódolnak. A herpesz vírus dUTPázok monomer fehérjék [73-74], de ezen túlmenően még ismeretesek homodimer (egyesejtű paraziták némelyike) negyedleges szerkezetű dUTPáz enzimek is [75]. A dUTPáz fehérjék polipeptidláncai – néhány kivételtől eltekintve – öt konzervált szekvencia motívumot tartalmaznak (2. 3./B ábra) [69]. Ezek a szekvencia szakaszok az evolúció során konzerválódtak a baktériumoktól egészen az emlősökig és egy konszenzus szekvenciával jellemezhetőek (2. 3./C,D ábra).

A homotrimer dUTPáz-ok három azonos polipeptidláncból (alegységből) épülnek fel és három, szimmetrikus formában elhelyezkedő aktív centrumot tartalmaznak. Mindegyik aktív centrum kialakításában mindhárom alegység részt vesz, tehát az enzim csak trimer formában működőképes. Az egyes alegységek feltekeredése (foldingja) a retrovírus dUTPáz-októl a humán dUTPáz-okig nagyon hasonló, tehát konzervált módon történik (2. 3./E,F ábra) [69].



2. 3. ábra. A dUTPáz által katalizált enzímreakció és a fehérje néhány fehérjeszerkezeti tulajdonsága. (A) A dUTPáz enzimkatalízise során a dUTP szubsztrátból dUMP és anorganikus pirofoszfát (PPi) termékek keletkeznek. A foszfoanhidrid kötés hidrolizálásához egy aktivált vízmolekulát használ fel az enzim. A maximális enzimkatalízis Mg^{2+} ion jelenlétét igényli. (B) A dUTPáz-ok elsődleges fehérjeszerkezetükben – néhány kivételtől eltekintve – öt konzervált szekvencia motívumot tartalmaznak, (C) amelyek a prokariótáktól egészen az emlősökig konzerváltak maradtak (* azonos aminosav; : erősen konzervált aminosav; . alacsonyán konzervált aminosav). (D) A konzervált motívumok aminosav sorrendje konszenzus szekvenciákkal jellemezhető (Hf: hidrofób aminosav; X: bármely aminosav). Mind az öt motívum részt vesz az enzim szubsztrátkötő zsebeinek és aktív centrumainak kialakításában. (E) A homotrimer dUTPáz-ok egyes fehérjeláncainak feltekeredése szintén konzervált. Egy polipeptidlánc egy nyolc β szál (lila nyilak), jellegzetes ún. lekváros-tekercs (jelly-roll) jellegű szekunder struktúrát hoz létre, kiegészítve azt egy antiparallel β szálrendeződéssel (2' és 6'), valamint egy extra α -hélix szerkezettel (lila henger). Az említett szerkezethez a 8. β -szálat a szomszédos alegység szolgáltatja (zöld nyíl). (F) A humán dUTPáz negyedleges szerkezetét megjelenítő szalagmodell (PDB: 3EHW) a dUTPáz: α,β -imido-dUTP: Mg^{2+} komplexét szemlélteti, amelyben a szimmetrikus helyzetű aktív centrumok jól megfigyelhetőek. Jól látható, hogy mindhárom alegység (cián, ibolya és zöld) részt vesz, mindhárom aktív hely kialakításában [76-77, 69].

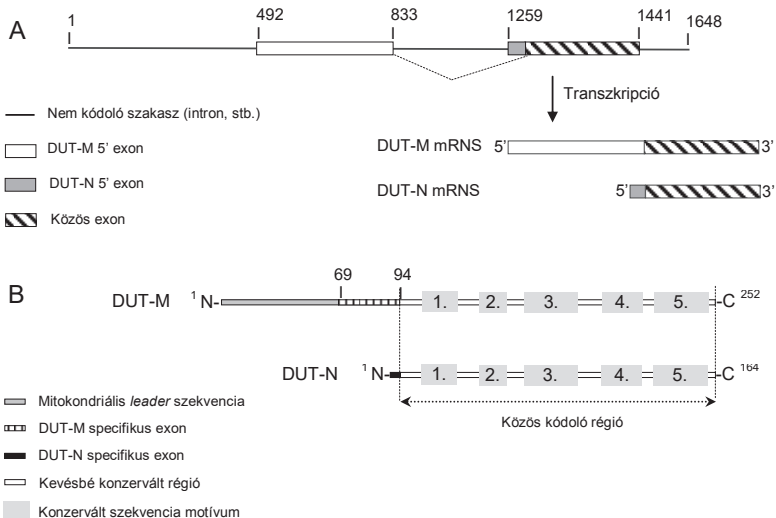
Az alegységek harmadlagos szerkezetének kialakulását megelőzően egy nyolc- plusz két β -szálás elrendeződés jön létre, amit egy α -hélix szerkezet egészít ki. A kialakult β -szálás elrendeződés a jellegzetes lekváros-tekercs (jelly roll) lánc-elrendeződésre emlékeztető szekunder struktúra [76, 69]. Az aktív centrumot illetően, az első alegység a 3. motívummal, a második alegység az 1-2. és 4. motívummal, míg a harmadik alegység az 5. motívummal (flexibilis C-terminális karon van) járul hozzá az aktív hely szerkezetének kialakításához [77, 69].

A dUTPáz szubsztrát specifikása szinte kizárólag a dUTP nukleotidra korlátozódik. Bázisfelismerése az aktív helyek szigorú molekuláris körülményeivel magyarázható [71, 77]. A szubsztrátkötő helyre bekötő dUTP uracil bázisa egy béta hajtűbe ékelődik és H-hidak segítségével rögzül. A bázis megfelelő pozicionálását a 3. motívum aminosav oldalláncai végzik, a kölcsönhatásban G, V, I és Y aminosavak fontosak. Míg az 5. motívum részéről egy F aminosav oldallánc képez hidrofób kölcsönhatást az uracil bázissal. Ez a báziskötés mind szerkezetileg, mind sztérikusan olyannyira kompatibilis, hogy egy kiterjedtebb méretű szubsztituens (pl., 5-metil csoport) jelenléte már gátolná a bázis bekötését. Azonban fontos megjegyezni, hogy az 5-FdUTP nukleotid-analógot szubsztrátjaként fogadja el a humán enzim [78]. Ezen ténynek az ismerete különösen fontos a dUTPáz enzim fluoropirimidinek metabolizmusában betöltött kiemelkedő szerepét illetően (lásd a 2. 4. fejezetet). Míg a nukleotid foszfátláncának rögzítésében a 2. és az 5. motívum S és R aminosav oldalláncai vesznek részt. Összefoglalva, a dUTPáz szubsztrátkötésében mind a bázis, mind a nukleotid dezoxiribóz tagja, valamint a foszfátlánc egyaránt fontos szerepet játszanak.

2. 3. 1. A humán dUTPáz

Humán genomban a dUTPáz-t kódoló DUT génről (lokalizáció: 15q21.1) alternatív promóter és 5' exon használat segítségével egy mitokondriális, hosszabb (DUT-M) és egy nukleáris, rövidebb (DUT-N) fehérje izoforma íródhat át (2. 3. 1./A ábra) [79]. Az izoproteinek csak az N-terminálisuk hosszában különböznek, míg az öt konzervált szekvencia motívumot lefedő fehérjerégió tekintetében teljesen identikusak. A mitokondriális izoforma naszcens polipeptidlánc ~90 aminosavval hosszabb a nukleáris izoforma natív fehérjeláncához képest [79].

A DUT-M N-terminálisa egy R aminosavakban gazdag, mitokondriális lokalizációért felelős vezető (leader) szekenciát (69 aminosav hosszú) tartalmaz, amely a mitokondriumba jutást követően lehasad [80]. A DUT-N N-terminálisa egy rövid (5 aminosavból álló) 5' exont tartalmaz, amely izoforma specifikus (2. 3. 1./B ábra) [79]. Az N-terminális további része egy NLS szignált ($^{12}\text{PSKRARP}^{18}$) is kódol, amely a nukleáris izoforma sejtmagi lokalizációját teszi lehetővé. *In vitro* kísérletek az NLS szekenciát megelőző S11 aminosav foszforilációját igazolták [81]. Mivel az S11 aminosav egy ciklin-függő kináz által felismerhető konszenzus szekenciában van, ezért a kovalens módosítás jelentőségét a sejtciklussal összefüggő poszt-transzlációs szabályozásnak vélték [82]. Azonban a foszforiláció következményes hatása ez ideig nem lett bizonyítva.



2. 3. 1. ábra. A humán DUT gén szerkezete és a dUTPáz izoformák felépítése. (A) A humán DUT gén szerkezetének sematikus ábrázolása: A humán genomban a DUT génről (15q21.1) alternatív promóter és 5' exon használat (szaggatott vonal jelzi) segítségével egy mitokondriális, hosszabb (DUT-M) és egy nukleáris, rövidebb (DUT-N) dUTPáz mRNA izoforma íródhat át [79]. (B) A dUTPáz izoproteinek naszcens polipeptidláncainak felépítése: A dUTPáz izoproteinek csak az N-terminálisuk hosszában különböznek egymástól, míg az öt konzervált motívumot tartalmazó fehérjeregiónak szekvenciája azonos. A DUT-M naszcens polipeptidláncának N-terminális végéről egy 69 aminosavból álló mitokondriális *leader* szekvencia enzimatikusan lehasad. A DUT-N N-terminálisa egy 5 aminosavból felépülő izoforma specifikus 5' exont tartalmaz [79-80].

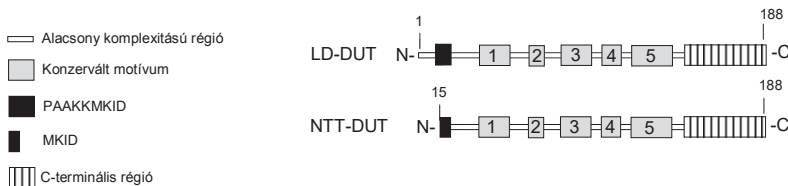
A DUT-N expressziója sejtciklus dependenciát mutat és főleg S-fázisához kötött, míg a DUT-M izoprotein kifejeződése konstitutívnak bizonyult [79]. Azonban nem proliferáló éretlen timocitákban a dUTPáz (feltehetően a nukleáris izoforma) magas szintjét mutatták ki [83]. Az említett sejtekben több olyan fehérje megjelenését is igazolták, amelyek expressziója a sejtciklus S-fázisára korlátozódik. A dUTPáz sejtciklustól független expresszióját az éretlen timociták fejlődésével hozták összefüggésbe, de a feltevést bizonyító eredményekről ez idáig nincs adat.

A DUT-N izoformát kódoló génszakaszt egy intronikus (a DUT-M izoforma szemszögéből intronikus szakasz) rész előzi meg, amely promóterként funkcionál (2. 3. 1./B ábra) [79]. A promóterben három Sp1 és egy E2F transzkripciós faktort kötő konszenzus szekvencia található, valamint az említett cisz-elemektől jóval távolabb, 5' irányba egy konszenzuszserű NFκB kötőhely meglétét is leírták. Az említett cisz szabályozó szekvenciák a nukleáris izoforma sejtciklus S-fázisához kapcsolt transzkripcióját szorgalmazzák. Érdekességként megemlítendő, hogy a humán c-Myc gén promóterében az említett cisz-szekvenciák szinte mind megtalálhatóak [79].

2. 3. 2. A *Drosophila melanogaster* dUTPáz

Ecetmuslicában a CG4584 gén kódolja a dUTPáz fehérjét [84]. Az enzimnek két izoformája ismert, amelyek a fehérjék N-terminális hosszában térnek el csupán egymástól (2. 3. 2. ábra). Mindkét izoprotein az említett génről íródik át sejtciklus függő módon. A hosszabb, 23 kDa molekulásúlyú izoforma (LD-DUT: long dUTPase isoform) nukleáris lokalizációjú. Az izoforma N-terminális régiója egy putatív NLS szignált (¹⁰PAAKMKID¹⁸) hordoz, ami a humán c-Myc fehérje NLS szegmentjével mutat nagyfokú szekvencia homológiát. A rövidebb, 21 kDa molekulatömegű izoformában (NTT-DUT: N-terminal truncated dUTPase isoform) hiányzik az első 14 aminosav és az eddigi ismeretek szerint inkább extranukleáris lokalizációt mutat [85]. Az öt konzervált motívumot lefedő szekvencia szakaszt követően, mindkét izoforma tartalmaz egy meglehetősen hosszú, A és P aminosavakban gazdag C-terminális régiót is (2. 3. 2. ábra) [84]. Az említett régió hiánya nem befolyásolja az enzim *in vitro* katalitikus aktivitását, így feltételezhető, hogy C-terminálisnak eddig még ismeretlen funkciója lehet [87]. Az enzim a humán dUTPáz-zal nagyfokú homológiát mutató, homotrimer szerkezetű fehérje.

A *D. mel.*-ben nem írtak le mitokondriális izoformát. Ismeretes, hogy dUTPáz enzimaktivitás nem tapasztalható az állat ontogenezisének lárvális szakaszában [60]. Érdeemes megemlíteni, hogy különböző szervekből nyert extrakton végzett immunhisztokémiai jelölések és immunoblot kísérletek mind két izoforma előfordulását vélték tapasztalni a citoplazmában, valamint a nukleáris kompartmentben [86]. Továbbá kimutatásra került, hogy embrionális állapotban a sejtmagok osztódásakor a rövid izoforma akkumulálódik a nukleuszban megfelelő térrészben [85].



2. 3. 2. ábra. Ecetmuslica dUTPáz izoformák. A *D. mel.*-ben a dUTPáz-nak két izoformája ismert: a hosszabb, 23 kDa molekulásúlyú izoforma (LD-DUT: long dUTPase isoform) és a rövidebb, 21 kDa molekulatömegű izoforma (NTT-DUT: N-terminal truncated dUTPase isoform) [85]. Mindkét izoprotein un. azon génről íródik át. Az LD-DUT izoforma N-terminálisa egy putatív NLS szignált (¹⁰PAAKMKKID¹⁵) hordoz, ami az izoforma nukleáris lokalizációját teszi lehetővé. Az NTT-DUT izoforma N-terminálisáról hiányzik az első 14 aminosav és a fehérje extranukleáris lokalizációt mutat. Az öt konzervált szekvencia motívumot lefedő fehérje szakaszt követően, mindkét izoprotein egy meglehetősen hosszú, A és P aminosavakban gazdag C-terminális régiót hordoz [84].

2. 3. 3. A dUTPáz kettős élettani szerepe

Élettani szempontból a dUTPáz kettős esszenciális szereppel bír a sejtekben [69, 88]. Egyrészt az enzim működése révén csökken a dezoxiuridilát metabolizmus során termelődő dUTP nukleotid mennyisége. Az alacsony intracelluláris dUTP koncentráció alacsony dUTP/dTTP arányt eredményez. Osztódó sejtek esetében az alacsony dUTP/dTTP arány megakadályozza, hogy a DNS szintézis alkalmakor a DNS polimeráz dTMP helyett dUMP nukleotidot építsen a DNS láncba. Tehát a dUTPáz eme preventív szerepe megakadályozza az uracil tartalmú DNS létrejöttét. Másodsorban, az enzim katalízise révén keletkező dUMP termék a *de novo* dTTP bioszintézis nélkülözhetetlen prekursor molekulája, vagyis az enzim alapvető szerepet tölt be a *de novo* timidilát metabolizmusban is [88-89].

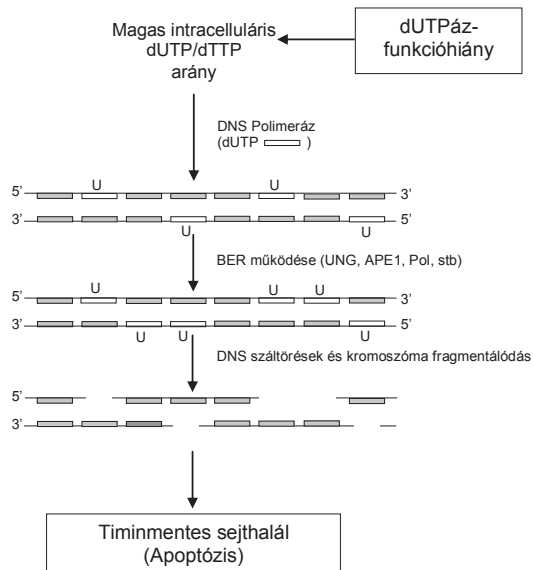
Az enzim kétfős funkciója fiziológiai szempontból valójában nem választható külön, mivel a timidilát metabolizmus (*de novo* szintetikus szakasza) aktív működése szükséges ahhoz, hogy a keletkező dUMP a deoxiuridilát szintézis során ne alakuljon vissza dUTP nukleotiddá [90].

2. 3. 3. 1. A dUTPáz szerepe az intracelluláris dUTP/dTTP arány szabályozásában

A baktériumok és az eukarióta sejtek fő védvonala a dUMP DNS-be való beépülésének megakadályozása érdekében az, hogy az intracelluláris dUTP koncentrációt tranzienst módon, a sejtciklus S-fázisában minimalizálják [88-89]. Amint ez már a 2. 1. fejezetben említésre került, a prokarióta és az eukarióta DNS-dependens DNS polimeráz nem szelektív az uracil és timin bázisokra (nem veszi észre az uracil bázis 5. pozíciójában lévő metil-hiányt), ezért a nukleotidok aktuális koncentrációjától függően alakul bázisválasztása (tehát valójában nem választ!). Magas dUTP/dTTP arány esetén a dUMP-t is beépíti szintetizálódó DNS molekulába. A beépült uracil annak ellenére, hogy a bázispárosodás szabályait tekintve, elméletileg nem alkot hibapárt és nem mutagén hatású, a javító rendszerek működése révén mégis véletlenszerű DNS károsodások forrása lehet [91], valamint a transzkripció apparátus optimális működését is zavarhatja [92]. A fent említett okok miatt a dUTPáz katalitikus szerepe elsődlegesen fontos az alacsony dUTP/dTTP arány kialakításában és ezen keresztül a timin tartalmú DNS molekula integritásának megőrzésében [93]. Az intracelluláris dUTP/dTTP arány számszerű értéke sejttypustól és a sejtek életciklusától függően akár nagyságrendekkel is eltérhet egymásétól ($0,1-10^{-5}$) [8, 94]. Intenzíven osztódó sejtekben ez az érték alacsonyabb (10^{-5}), míg a sejtciklus G_0 vagy G_1 fázisában lévő sejtek esetében az arány több nagyságrenddel magasabb lehet. Ez utóbbi különbség érthető is, mivel a dUTPáz expressziója (DUT-N, LD-DUT, NTT-DUT) a sejtciklus S-fázisához kötött.

A sejtek tehát fokozott figyelmet fordítanak az uracil DNS-be történő beépülésének elkerülésére: az esetlegesen mégis beépült uracilt a szintén S-fázisú UNG2 hatékonyan eltávolítja a DNS láncból. Azonban az UNG2 (és egyéb uracil-DNS glikozilázok) bázis kivágó szerepe akár a sejtek letalitását is okozhatja a dUTPáz alulműködése vagy hiánya esetén. Irodalmi adatok szerint, baktériumban (*E. coli.*) és élesztőben (*S. cer.*) a dUTPáz funkcióvesztését okozó mutációk a sejtek halálával vagy legalábbis azok erősen mutátor fenotípusával hozhatók összefüggésbe [95-96].

Ugyanakkor a dUTPáz és az UNG fehérjék együttes funkcióvesztése (*dut-*, *ung-*) nem letális kimenetelű baktériumsejtekben [94]. Ez utóbbi sejtek (*E. coli* CJ236 törzs) DNS-ében átlagban 5000 uracil/1 millió bázispár gyakorisággal fordul elő uracil, míg a vad típusú törzsben az uracil gyakorisága csak 1 uracil/1 millió bázispár [94]. Az az összefüggés, hogy a kettős mutáns (*dut-*, *ung-*) életképes a dUTPáz mutánsal (*dut-*) szemben, arra enged következtetni, hogy a sejtek halála elsősorban az uracil kivágó javítómechanizmus működésének tudható be és nem az uracil-DNS direkt következményeinek. Ugyanis a dUTPáz hiányakor megemelkedik az intracelluláris dUTP/dTTP arány, amely a DNS molekula nagymértékű uracil tartalmát fogja eredményezni (2. 3. 3. 1. ábra) [89, 98]. A BER rendszer folyamatosan eltávolítja a beépült uracilt, azonban a javító polimeráz változatlanul a nagy koncentrációban jelenlévő dUTP-t épít be a DNS molekulába.



2. 3. 3. 1. ábra. A magas intracelluláris dUTP/dTTP arány következménye a timinmentes sejtihalál. Ha a sejtekben nagymértékben megemelkedik a dUTP/dTTP arány (pl., dUTPáz funkcióhiány következtében), akkor a DNS polimeráz a sejtciklus S-fázisában dTTP helyett dUTP nukleotidot épít be a szintetizálódó DNS molekulába. A BER rendszer (UNG, APE1, Pol és további tagok, *short patch* és *long patch* útvonalak) folyamatosan eltávolítja a beépült uracilt. Azonban a javító polimeráz szintén dUTP nukleotidokat épít vissza. A javító folyamat egy hiába való ciklusba megy át, ami után DNS szál törések, majd kromoszóma fragmentáció következik be, amely végső soron a sejtek programozott sejtihalálát okozza. A folyamat neve timinmentes sejtihalál [89, 97-98].

A folyamat egy szuicid jellegű hiábavaló ciklusba megy át, amelynek eredményeként a DNS molekulában meghatványozódik a száltörések száma, kromoszóma fragmentáció következik be és a sejt programozott sejthalálban (apoptózis) elpusztul [89, 98]. A jelenséget timinmentes sejthalálnak is szokás nevezni. Timinmentes sejthalál a dUTPáz-vagy a timidilát metabolizmus további enzimeinek specifikus gátlása (pl., szubsztrát-analógok vagy RNSi alkalmazásával) révén is kiváltható (lásd a 2. 3. 4. fejezetet) [93, 97-99].

2. 3. 3. 2. A dUTPáz szerepe a *de novo* dTTP bioszintézisben

A pirimidin bázisú ribo- és dezoxiribonukleotidok bioszintézisét jelentő összetett biokémiai folyamat kiindulási lépése az aszpartát és a karbamil-foszfát kondenzációs reakciója [69, 90, 100-101]. A kondenzációt követően a karbamil-aszpartát belép egy konzekutív reakciósorba, amelynek utolsó lépésében az orotidilát dekarboxileződésével UMP ribonukleotid keletkezik (2. 3. 3. 2. 1. ábra). Az UMP az UTP, dUTP, CTP, dCTP és a dTTP nukleotidok bioszintézisének primer prekuzormolekulája. Emlős szervezetben, egy alternatív biokémiai útvonalon (nukleozid visszamentő útvonal: salvage pathway) az uridin, citidin és a dezoxitimidin nukleozidok foszforilációjával is keletkezhet UMP, CMP és dTMP nukleotid, értelemszerűen. A nukleotidok átalakulási reakciói során nukleotid kinázok (nukleozid monofoszfát- (NMK) és nukleozid difoszfát kinázok (NDPK/NDK)), nukleozid difoszfát- (NDR, pl., ribonukleotid reduktáz enzimkomplex: RR) és nukleozid trifoszfát reduktázok (NTR), nukleotid hidrolázok (pl., dUTPáz) és transzferázok (TYMS és CTP szintetáz: CTPS) vesznek részt (2. 3. 3. 2. 1. ábra). A nukleozid-foszfát kinázok a foszfátlánc hosszára, a reduktázok a nukleotid cukor komponensére, míg a bázisátalakulással járó konverziókat katalizáló szintázok és szintetázok a nukleotid egészére specifikusak. A legtöbb kinázreakció reverzibilis, míg a csoporttranszferrel járó reakciók, valamint a cukorredukciók irreverzibilis folyamatok. Továbbá a dUTPáz által katalizált hidrolízis is irreverzibilis.

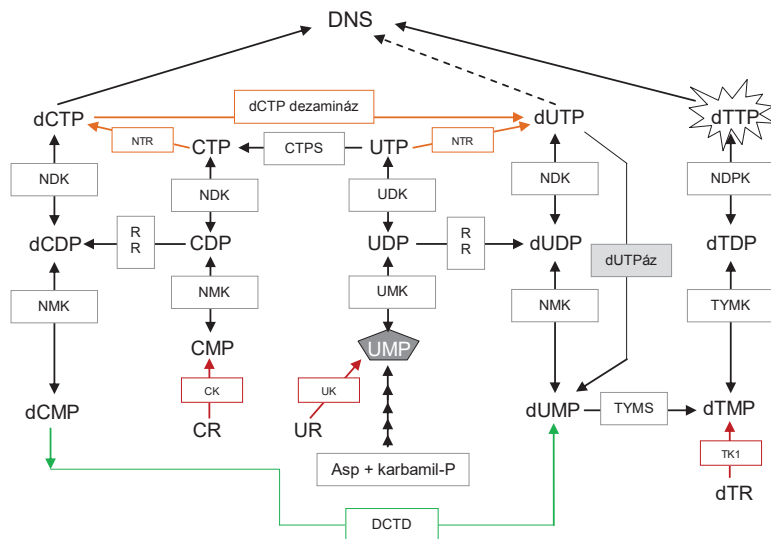
A dTTP *de novo* bioszintézisének esszenciális prekuzora a dUMP molekula [69, 90, 100-101]. A dUMP eukariótákban legfőképpen a dUTPáz reakció során dUTP-ből keletkezik, azonban kisebb mértékben a dCMP dezaminálódása révén is keletkezhet. A dUMP nukleotidok konverzióját dTMP nukleotidokká a TYMS enzimkomplex katalizálja.

A reakcióban a metilén-tetrahydrofolát (metilén-THF) szolgáltatja az S aminosavból származó metilén csoportot. A reakció szoros kapcsolatban van a folát oxido-redukciós ciklusával, mivel a THF a metilén csoport redukációjához szükséges ekvivalenseket is szolgáltatja. A reakcióban keletkező dihidrofolát (DHF) NADPH-függő redukcióját a dihidrofolát redukáz (DHFR) végzi. Mivel a TYMS általi metiltranszfer irreverzibilis és a dTTP szintézis alapját képezi, ezért a reakció a *de novo* timidilát szintézis sebesség meghatározó lépése. Tehát a TYMS enzimkomplex lehetővé teszi, hogy a dUTP általi elbontott dUTP nukleotidok bekerüljenek a dTTP szintetikus útbá és ne alakulhassanak vissza dUTP molekulává a dezoxitimidilát szintézis során. Ennek értelmében a két enzim együttes, optimális működése szükséges a keletkező dUTP nukleotidok dNTP készletből történő végleges elvezetéséhez [90]. A TYMS reakcióban keletkező dTMP-t egy NDK, nevezetesen a TYMK enzim dTDP-vé alakítja, amely egy további foszforilációs lépésben (NDPK/NDK katalízis során) dTTP nukleotiddá alakul (2. 3. 3. 2. 1. ábra). Meg kell említeni jelen esetben is, hogy emlősökben a dezoxitimidin visszamentő útvonalon keresztül, a TK1 kináz katalízise révén is keletkezhet dTMP nukleotid.

A dTTP azon kívül, hogy a DNS molekula egyik építőköve, a dATP molekula mellett a legfontosabb allosztérikus szabályozója a dezoxipirimidin- és részben a dezoxipurin nukleotid anyagcserének is [100-102]. Kiterjedt módon szabályozza egyes nukleotidok egymásba alakulási reakcióinak sebességét. Leglényegesebb szabályozási pontja az RR enzimkomplexen van. Eukariótákban, de legalábbis emlősökben biztosan csak az RR enzimkomplex teheti lehetővé a dezoxipirimidin és dezoxipurin nukleotidok keletkezését. Ezért működésének allosztérikus szabályozása egyértelműen kihat a sejt dNTP készletének alakulására. A dTTP koncentrációjától függően az RR enzimkomplexen beállítja távoli prekursorainak, a CDP és az UDP ribonukleotidoknak redukciós átalakulási sebességét. A dTTP magas koncentrációja negatív allosztérikus hatást gyakorol a dCMP > dUMP és a dTR > dTMP átalakulásokra, míg a GDP > dGDP átalakulást szorgalmazza (2. 3. 3. 2. 2. ábra).

A sejtciklus S-fázisában a megfelelő dATP/dTTP arány nélkülözhetetlen a kiegyensúlyozott dNTP készlet biztosításához, amely a hibátlan DNS replikáció előfeltétele [99, 103]. Ha a dTTP koncentrációja nem optimális, a dezoxinukleotidok helyes aránya eltolódik a dNTP készletben, ami a DNS szintézise- és javításakor a makromolekula károsodását eredményezheti [104]. Ezért a dTTP szintézisében résztvevő reakció utak hibátlan

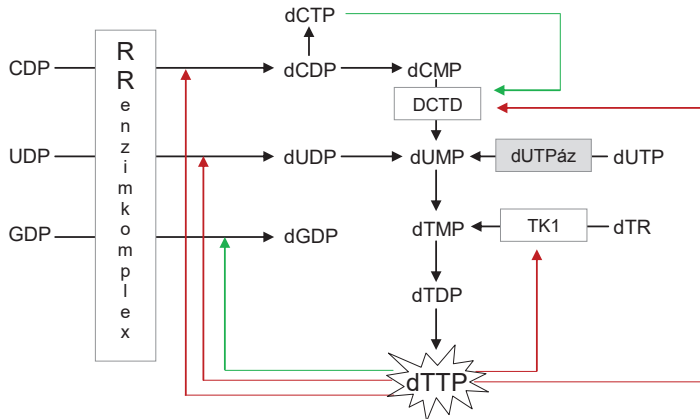
működése szükséges az optimális dTTP koncentráció kialakításához és ezen keresztül a sejt genetikai integritásának megőrzéséhez.



2. 3. 3. 2. 1. ábra. A dUTPáz szerepe a *de novo* dTTP bioszintézisben. A pirimidin ribo- és dezoxiribonukleotidok (UTP, dUTP, CTP, dCTP és dTTP) *de novo* bioszintézisének központi molekulája az UMP (szürke ötszög), amely aszpartát (Asp) és karbamil-foszfat (karbamil-P) kondenzációját követő hosszas enzimatis reakciósor végterméke. A nukleotidok egymásba alakulása során keletkező dUTP-t a dUTPáz (szürke háttér) elhidrolizálja és a keletkező dUMP molekulával, mint prekuzorral a dTTP *de novo* bioszintetikus utat táplálja. A dUMP molekulát a TYMS enzimkomplex egy irreverzibilis reakcióban dTMP nukleotiddá alakítja. A dUTPáz és a TYMS összehangolt működése a dTTP szintézis mellett, a dUTP nukleotidok végleges kivzetését is lehetővé teszi a dNTP készletből. Emlős szervezetben, egy alternatív biokémiai útvonalon (un. nukleozid visszamentő útvonal: salvage pathway) a dezoxitimidin direkt foszforilációjával (dTR) is történhet dTMP szintézis (piros nyíl). A reakciót katalizáló enzim a TK1. Hasonló reakció utakban az uridin (UR) és a citidin (CK) nukleozidok foszforilációjával UMP és CMP ribonukleotidok keletkezhetnek (piros nyilak). Bizonyos reakciók csak prokariótákban mennek végbe (narancssárga nyilak), egyes reakciók csak eukariótákban (zöld nyilak) mennek végbe, valamint a menekítő útvonalak (piros nyilak) az emlős sejtekben általában megtörténnek [90, 100-101]. UMK: uridin monofoszfat kináz; UDK: uridin difoszfat kináz; CTPS: CTP szintetáz; NTR: nukleozid trifoszfat reduktáz; NMK: nukleozid monofoszfat kináz; NDPK/NDK: nukleozid difoszfat kináz; RR: ribonukleotid reduktáz enzimkomplex; TYMS: timidilát szintáz; TYMK: timidilát kináz; CK: citidin kináz; UK: uridin kináz; TK1: timidin kináz; DCTD: dCMP dezamináz.

Összefoglalva: a dUTPáz egyrészt, mint dUTP nukleotid elimináló – így az alacsony dUTP/dTTP arány biztosítója –, másrészt elsődleges dTTP prekuzor termelő is, amely funkciójával az optimális dTTP koncentráció létrejöttének fontos résztvevője. Tehát

a dUTPáz katalitikus reakciójával két oldalról támogatja a megfelelő összetételű dNTP készlet kialakítását és ezen keresztül a genetikai kód érintetlenségét.



2. 3. 3. 2. 2. ábra. A dTTP allosztérikus szabályozó szerepe a dezoxipirimidin és dezoxipurin anyagcserében. A dTTP koncentrációjától függően pozitív (zöld nyíl) és negatív (piros nyíl) allosztérikus hatást gyakorol egyes nukleotidok átalakulási reakcióira, így a mindenkori koncentrációja egyértelműen kihat a sejt dNTP készletének összetételére [100-102]. A sejt osztódási fázisában a nem megfelelő dTTP koncentráció (dATP/dTTP arány felboruláson keresztül) kiegyensúlyozatlan dNTP készletet teremthet, ami DNS károsodáshoz vezethet a makromolekula szintézise és/vagy javításakor [99, 103-104]. A dUTPáz (szürke háttér) enzimreakció meghatározó (a DCTD és TK1 reakciók mellett) a *de novo* deoxitimidilát szintézisben és ezen keresztül az optimális dTTP koncentráció kialakításában. Rövidítéseket lásd az 2. 3. 3. 2. 1. ábraszövegben.

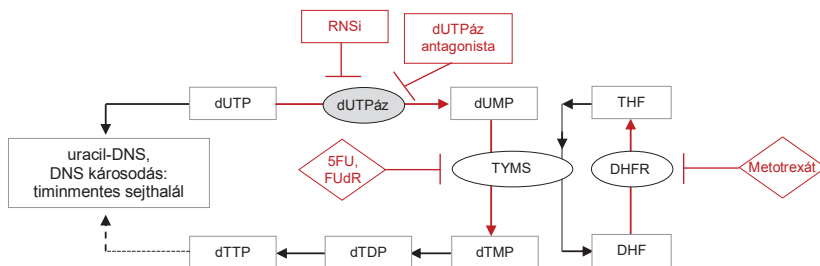
2. 4. A timidilát metabolizmus, mint kemoterápeutikumok célpontja

A gyors sejtproliferációval járó kórképek (tumrok, autoimmun betegségek) hatékony fékezői közé tartoznak a nukleotid anyagcsere erőlyes gátlószerei. A gátlószerek direkt vagy indirekt módon a nukleotid átalakulással járó enzimreakciókat veszik célba. A leggyakrabban alkalmazott vegyületek a folsav-, purin- és pirimidin antagonisták, valamint analógok. A gátlás hatásmechanizmusának az az alapja, hogy a gátlószereket az enzimek szubsztrátjukként fogadják el, miközben az alkalmazott vegyület reverzibilisen vagy irreverzibilisen megbénítja az anyagcsere utak blokkja a végtermékek kialakulásának hiányával (pl., dTTP, mint DNS alkotó) és a sejt teljes homeosztázisának összeomlásával majd halálával jár. Mivel a gátlószerek antiproliferatív hatása a sejtosztódás irányába elkötelezett sejteken érvényesül csak, ezért az adott

körképben szerepet nem játszó, egészséges sejtállományban is jelentős kárt tesznek (bélhám sejtek, immunsejtek, véréképző sejtek és ivarsejtek) [100].

A dTTP *de novo* bioszintézisének két leggyakrabban alkalmazott gátlószere a fluoropirimidinek közül az 5FU (valamint az FdUR) és a folát-analóg metotrexát (valamint az aminopterin) [98-99, 102]. Mivel mindkét vegyület a dezoxiuridilát-timidilát anyagcsere átmenet hatékony gátlója – jóllehet az 5FU RNS és DNS szinten is erősen toxikus – így hatásukra timinmentes állapot alakulhat ki a sejtekben, amelynek timinmentes sejthálál a következménye (2. 3. 3. 1. fejezet) [97]. A metotrexát, mint tetrahidrofolát (THF) analóg, egy folsav antagonistá hatású vegyület, ami a dihidrofolát redukáz (DHFR) kompetitív inhibitora. Az enzim gátlása lehetetlenné teszi a THF reszintézisét és ezzel megakadályozza a dUMP > dTMP átalakuláshoz nélkülözhetetlen metilén-THF létrejöttét (2. 4. 1. ábra) [99].

Az 5FU és az FdUR (az 5FU korai metabolitikus származéka) egyik aktív metabolitja az FdUMP. A TYMS metilén-THF jelenlétében szubsztrátjaként elfogadja az FdUMP nukleotid-analógot. A kialakuló enzim-szubsztrát komplex azonban kovalens módon rögzül és egy ún. ternér-komplex jön létre, amelyben a szubsztrát nem disszociál le az enzimről. A szuicid-enzim elveszíti katalitikus aktivitását és kivonódik az anyagcsere folyamatból [99-100].



2. 4. 1. ábra. A timinhiányos állapot kiváltásának lehetőségei. A dTTP *de novo* bioszintézis reakciólépéseinek specifikus gátlásával lecsökkenthető az intracelluláris dTTP koncentráció. A timinhiányos állapot a dUTP/dTTP arány emelkedésével és következményes timinmentes sejthálál jelenségével jár. A dezoxiuridilát-timidilát anyagcsere átmenet hatékony gátlószerei a metotrexát és az 5FU (és az FdUR) [99-100]. A metotrexát, mint folsav antagonistá hatású DHFR kompetitív inhibitora. Az enzim gátlása révén a DHF > THF átmenet nem tud végbemenni, ami közvetett módon megakadályozza a dUMP > dTMP átalakulást. A TYMS enzimkatalízis közvetlenül is gátlható az 5FU aktív metabolitjával, az FdUMP nukleotid-analóggal [99-100]. A hamis szubsztrát megkötését követően irreverzibilis enzim-szubsztrát komplex jön létre. Az ún. szuicid-enzim elveszíti aktivitását. A dUTPáz specifikus gátlása (RNSi [97] vagy antagonisták segítségével) önmagában vagy a fent említett szintetikus szerekkel kombinálva jelentősen felgyorsíthatja a dUTP/dTTP arány megemelkedését és így a timinmentes sejthálál folyamatát.

Az 5FU metabolizmus másik lehetősége, amikor a sejtbe lépést követően a timidin foszforiláz (TP) és a timidin kináz 1 (TK1) katalitikus hatására FdUMP aktív metabolitá alakul, amely a TYMS enzim irreverzibilis inhibitora [99-100]. Az FdUMP létrejöhet a ribonukleotid-dezoxiribonukleotid átalakulást katalizáló RR, valamint az UMK enzimek segítségével is. Az FdUMP az UMK és az UDK kinázok közreműködésével FdUDP majd FdUTP nukleotid-analóggá alakulhat. Az FdUTP beépülhet a DNS molekulába és azt károsíthatja [99, 106]. Irodalmi adatok szerint, a dUTPáz szubsztrátként tekint az FdUTP molekulára és elhidrolizálhatja azt, megelőzve így az 5FU okozta DNS károsodást [78]. A dUTPáz enzimkatalízis viszont az FdUMP termék koncentrációját emeli, ami a TYMS irreverzibilis gátlását fokozza. A DNS-be beépült 5FU-t néhány uracil-DNS glikoziláz kivághatja, azonban a parallel kialakuló timin hiány hátterében ez tovább rontja a DNS molekula fizikai állapotát (lásd a 2. 3. 3. 1. fejezetet). A dUTPáz specifikus gátlása (RNSi vagy antagonisták segítségével) önmagában vagy a fent említett szintetikus szerekkel kombinálva jelentősen felgyorsíthatja a dUTP/dTTP arány megemelkedését és így a timinmentes sejthalál folyamatát [97].

2. 5. Fehérjék nukleáris transzportját meghatározó szekvenciák

Eukarióta sejtekben a kompartmentalizáció létrejöttével elengedhetlenné vált a citoplazmában szintetizálódó nukleáris funkciójú fehérjék adekvát nukleáris transzportja [110]. A citoplazma és a sejtmag közötti szelektív átjárhatóságot a nukleáris pórus komplex (NPC) biztosítja. A nukleusz kettős membránjába (envelope) ágyazott, 45 nm hosszúságú, 8-40 nm átmérőjű NPC legalább harminc különböző proteiből (legfőképpen az F és G aminosavakban gazdag nukleoporin fehérjékből) felépülő bonyolult csatorna. Az NPC lehetővé teszi kisebb molekulák (ionok, nukleotidok, fehérjék <35 kDa) passzív diffúzióját, valamint nagyobb molekulák (fehérjék >35 kDa, transzport komplexek formában) aktív transzportját a nukleusz és a citoplazma között [111].

A nukleáris proteinek legtöbbje a fehérje elsődleges szerkezetében megjelenő specifikus szekvencia kontextus révén jelzik a nukleáris transzportrendszer számára funkcionális hovatartozásukat. Ezt a konszenzuszzerű aminosav-kiterjedést nukleáris lokalizációs szignálnak (NLS) nevezzük [112]. Az NLS szignál általában a fehérjék N-terminálisához közeleső fehérje régióban található, de előfordulhat a fehérje szekvencia bármely részén, leszámítva a karakterisztikus funkcionális motívumokat és doméneket.

Az NLS szignálok kiterjedésük szerint két nagy csoportra osztjuk [110, 112]. A monopartit NLS szignálok legfőbb jellegzetessége a szekvenciát felépítő erősen bázikus aminosavak (R és K) legalább négy tagszámú konsekutív sora. A bipartit típusú NLS szignálokon belül két rövidebb bázikus aminosav kiterjedést (2-4 tagszámú) egy 8-12 aminosavból álló peptid szakasz választ el egymástól. Az irodalmat követve, rendkívül sok és változatos felépítésű NLS szignált azonosították már, tehát egy szigorú, egyértelmű szekvencia-konzenzust nem sikerült megállapítani [113]. Sőt, az újonnan karakterizált szignálszekvenciák az aktuális konszenzusok állandó változó dinamikáját tartják fenn. A monopartit NLS-ek tulajdonságait leginkább jellemző prototípus szekvencia az SV40 vírus T-antigénjének NLS szignálja (126 PKKKRRV 132) [114], míg a bipartit NLS-ek prototípusa a *Xenopus* nukleoplazmin (155 KRPAATKKAGQAKKK 170 LDK) szegmense [115] (2. 5. táblázat).

2. 5. táblázat. Különböző típusú NLS szekvenciák csoportosítása. Az NLS szekvenciák monopartit, bipartit (tripartit – nincs feltüntetve [124]) vagy besorolhatatlan, azaz speciális típusúak lehetnek. A monopartit szekvenciákat klasszikus (pl., SV40 T-ag NLS) vagy nem-klasszikus (c-Myc- [117], Swi6p NLS [118]) NLS szekvenciákra oszthatjuk. A monopartit szekvenciák a konszenzus szekvenciához többé-kevésbé igazodnak, de legalább három R/K aminosavat tartalmaznak. A bipartit NLS szekvenciák két bázikus aminosav-klaszterét jellegzetesen egy mutáció rezisztens, 8-15 tagú peptid szakasz választja el egymástól [115-116]. A speciális besorolású NLS-ek egyik típusában a poláros aminosavakat neutrális, nem poláros aminosavak választják el egymástól, ennek ellenére funkcionális NLS szekvenciák [119].

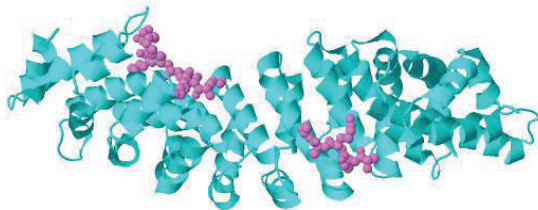
Fehérje	NLS szekvencia
<u>Monopartit</u>	
SV40 T-ag	PKKKRKV
H2B <i>S. cerevisiae</i>	GKKRSKV
v-Jun <i>H. sapiens</i>	SKSRKRKL
H2B <i>S. cerevisiae</i>	GKKRSKV
dUTPáz <i>H. sapiens</i>	PSKRARP
RanBP3 <i>H. sapiens</i>	PPVKRETS
c-Myc <i>H. sapiens</i>	PAAKRVKLD
c-Myc <i>X. laevis</i>	VSSKRAKLE
Swi6p <i>S. cerevisiae</i>	SPLKKLKID
BRCA1-NLS2 <i>H. sapiens</i>	PKKNNRLRRK
Konszenzus szekvencia	K(K/R)X(K/R)
<u>Bipartit</u>	
Nucleoplasmin <i>X. laevis</i>	KR-10aa-KKKKLDK
DNS helikáz Q1 <i>H. sapiens</i>	KK-15aa-KKKK
CBP80 <i>H. sapiens</i>	RRR-11aa-KRRK
Konszenzus szekvencia	(K/R)₂X₁₀₋₁₂(K/R)₃₋₄
<u>Speciális</u>	
Matα2 <i>S. cerevisiae</i>	VRILESWFAKNIENPYLDT

Az NLS-ek változatossága ellenére, szerkezeti és termodinamikai vizsgálatok segítségével a funkcionális NLS szignálok szekvencia-kontextusát illetően, számos fontos kritériumra derült fény. Az eredmények szerint, a monopartit típus esetén egy $K(K/R)X(K/R)$ konszenzus-szekvencia állapítható meg [120]. Eszerint, a szekvencia N-terminálisát kezdő K aminosav jelenléte kritikus fontosságú, valamint a második és a negyedik pozícióban K vagy R aminosav megléte szükséges. A harmadik pozíciójú aminosavat nem érinti restrikción, de itt általában neutrális aminosav fordul elő a leggyakrabban. Más források véleménye, hogy a kezdő K szerepe nem kritikus és így egy leegyszerűsített $(K/R)_{4-6}$ konszenzust állapít meg [121, 123]. Azonban szemlélve az NLS-ek széles repertoárját, érdemes megjegyezni, hogy a legtöbb NLS bázikus magja K aminosavval indul. A bipartit típusú NLS szignálok esetében a következő szekvencia-konszenzus az elfogadott: $(K/R)_2X_{10-12}(K/R)_{3-4}$ [120-121]. Vagyis a K vagy R aminosavakból álló bázikus klasztereket egy indifferens aminosav összetételű peptid szakasz köti össze, amelyben létrehozott mutációk nem befolyásolják az NLS funkciót. Újabb eredmények alapján, tripartit NLS-ek is léteznek, amelyekben három bázikus klasztert két különböző peptid szakasz fűz egy funkcionális NLS szegmensé [124]. Továbbá olyan nukleáris importot determináló szekvenciákat is azonosítottak, amelyekben bázikus dipeptidok diszpergáltan helyezkednek el egy hidrofób aminosav-kontextusban [119, 121]. Jellemző még az NLS szignálok legtöbbször, hogy a bázikus aminosavak sorát egy neutrális P aminosav előzi meg, amely ismert szekunder szerkezetű, így az NLS peptid szakasz relaxációját teheti lehetővé [123]. Szintén ismert jelenség – jóllehet ritkább – amikor az NLS szekvenciában neutrális, apoláros (G, I, L) és savas (D/E) karakterű aminosavak jelenléte meghatározó a funkció szempontjából [117-118, 123].

Néhány példát illetően, a *D. mel.* UDE fehérje esetében egy igen klasszikus jellegű putatív NLS szekvencia található a fehérje C-terminálisának legvégén (2. 2. 2. fejezet). Míg ugyanezen faj dUTPáz enzime esetében egy igen szokatlan aminosav összetételű putatív NLS található a fehérje N-terminálisán (2. 3. 2. fejezet). Ez utóbbi szekvencia a humán RanBP3 [122] és a humán, valamint a *Xenopus* c-Myc fehérjék NLS szegmensével mutat nagyfokú szekvencia homológiát [117] (2. 5. táblázat).

Az NLS szekvenciával rendelkező fehérjék az NPC-én keresztül aktív transzporttal jutnak a nukleoplazmába [110, 116, 120, 125]. Az irányított transzlokációhoz szolubiliss karyopherin molekulákra (nukleáris transzport receptorok) van szükség.

A β -karyopherin fehérjék családjába tartozó karyopherin molekulákat az import irányának megfelelően – jelen esetben – importinoknak (α - és β -importin) nevezzük. A β -importin fehérje közvetlenül vagy az α -importin adaptor molekulán keresztül a szállítandó fehérje NLS szegmensével fehérje-fehérje kölcsönhatást tud kialakítani. Azonban a β -importin a klasszikus típusú NLS-ekhez csak az α -importin segítségével tud kapcsolódni. A szerkezet-biokémiai ismeretek szerint, az α -importin fehérje N-terminális flexibilis régiója egy ún. IBB (importin- β binding) domént hordoz, míg a C-terminális fehérjerégiója tartalmazza az NLS-kötő domént. Ez utóbbi egy ívelt fehérje domén, amely tíz ARM (Armadillo) motívumot tartalmaz. Minden egyes ARM motívumot három α -helikális szekunder struktúra épít fel. Az ARM motívum-ismétlődések egy nyújtott konkáv fehérjefelszint hoznak létre, amelyben egy kis és egy nagy NLS-kötő zseb formálódik. Mindkét kötőzseb kialakításában konzervált W, N és negatívan töltött aminosavak vesznek részt. A nagyobb kötőzseb a monopartit típusú, klasszikus szekvenciájú NLS-ekkel, valamint a bipartit típus kiterjedtebb bázikus részével képes kölcsön hatni. Míg a kisebb kötőzseb a bipartit NLS-ek első, rövidebb bázikus klaszterét köti. Az NLS szegmensek egy kifeszített konformációban illeszkednek a zsebekbe az importin polipeptidláncával antiparallel lánclefutással. Az illeszkedő NLS peptid első pozíciójú K aminosav oldallánc befekszik egy W aminosav oldallánc hidrofób indol gyűrűje közé és elektrosztatikus kölcsönhatásba lép negatív karakterű konzervált aminosavakkal. A fehérje N-terminálisa hordoz még egy ún. autoinhibitor domént is, amely egy KRR bázikus tripeptidet tartalmaz. Az említett tripeptid egy NLS szekvencia motívumot mimikál, amellyel az α -importin NLS-szubsztrát hiányában intramolekuláris kölcsönhatást létesít (2. 5. ábra) [110, 116, 120, 125].



2. 5. ábra. Élesztő (*S. cerevisiae*) α -importin és SV40 T-ag NLS komplexe. A szerkezeti szalagmodell az élesztő α -importin (cián) az SV40 T-ag NLS peptiddel (ibolya) alkotott komplexét szemlélteti. Az α -importin (a fehérje szekvencia 88-530 szakasza látható) ARM motívumait felépítő α -hélixek egy nagyobb (N-terminális felőli – baloldali felőli) és egy kisebb NLS kötő zsebet (C-terminális felőli - jobboldali felőli) alakítanak ki a fehérje domén konkáv felszínén. Mindkét kötőzsebben egy független NLS szegmens kötése figyelhető meg. (PDB: 1BK6 [125]).

A nukleáris fehérjetranszport folyamatának első lépése, hogy a citoplazmában az α -importin az éppen szintetizálódó nukleáris fehérje NLS szekvenciáját felismeri és a szekvencián keresztül hozzáköt a fehérjéhez. Majd a kialakult heterodimert a β -importin ismeri fel és létrejön a nukleáris transzlokációra alkalmas trimer komplex. A heterotrimer ezután az NPC-én dokkol, majd átjut a nukleopóruson keresztül a nukleoplazmába [110, 116, 120, 126]. A nukleáris transzport egy aktív, energiaigényes folyamat [120]. A folyamathoz szükséges energiát GTP biztosítja a Ran GTPáz cikluson keresztül. Amint beér a trimerikus komplex a sejtmagba, a β -importin Ran-GTP-t köt, amely kölcsönhatás konformáció változást indukál a fehérjében és disszociál a heterodimerikus fehérje komplexről. A β -importin hiánya csökkenti az α -importin affinitását az NLS peptid-szegmenshez. A komplex végleges disszociációját nukleáris fehérjék (Nup50, Np60), az α -importin autoinhibitoros doménjének intramolekuláris kötése, valamint az α -importin export receptor (CAS/RanGTP) megjelenése segíti [110, 116, 120].

Fontos megjegyezni, hogy számos, NLS szignállal bíró nukleáris fehérje celluláris lokalizációja poszt-transzlációs kovalens módosítás útján szabályozható. A szabályozás leggyakrabban a fehérje NLS szekvenciájában lévő aminosavak (főleg S aminosav) foszforilációjával érhető el (NF κ B, p53, v-Jun) [116]. Érdekességként érdemes megjegyezni, hogy számos fehérje tartalmaz egy L aminosavakban gazdag, hidrofób karakterű nukleáris export szignált (NES), ami a fehérje nukleuszból való kijutását segíti elő [116]. Az AID fehérje az irodalom szerint egy NLS szekvenciát (nem-klasszikus monopartit) tartalmaz a fehérje N-terminálisán, míg a fehérje C-terminálisán egy NES szignált is hordoz. A szignálszekvenciák összehangolt poszt-transzlációs módosítása szerepet játszhat a fehérje celluláris lokalizációjában [127].

3. CÉLKITŰZÉSEK

A Genom metabolizmus és javítás kutatócsoporthoz történő csatlakozásomkor két nagyobb lélegzetvételű **kutatási témába** kapcsolódhattam be, mint PhD hallgató. Az egymással összefüggő kutatási tervek ötvözete eredményezte végleges doktori témátam.

1.) A doktori munkám első részét az uracil-DNS metabolizmusban érintett **D. mel. UDE és dUTPáz fehérjék szubcelluláris lokalizációjával** foglalkozó kutatási téma jelentette. Dr. Békési Angéla és Dr. Muha Villő munkatársaim korábban már számos eredményes összefüggésre fényt derítettek a muslica dUTPáz izoformáinak celluláris viselkedése kapcsán [85, 86].

- Munkatervem keretében elsődleges célkitűzésem volt **négy D. mel. fehérje, az UDE, a dUTPáz, a TDG és a SMUG1 homológ enzimfehérjék szubcelluláris lokalizációjáért felelős fehérjeszekvenciák in silico szekvencia analízissel történő meghatározása.**
- Az NLS predikció eredményét követően, szándékomban állt a vad típusú **UDE és dUTPáz fehérjék celluláris lokalizációjának experimentális vizsgálata** rovar, valamint humán sejtekben.
- További tervem volt az UDE és dUTPáz fehérjék **prediktált, putatív NLS szekvenciáinak részletes jellemzése**, karakterizálása, az NLS funkció kialakításához nélkülözhetetlen fontosságú aminosavak, peptid-szakaszok experimentális azonosítása.
- Az experimentális kísérleteket az enzimfehérjék **fluoreszcens** fehérjékkel létrehozott **riporter-konstrukcióival** szándékoztam végrehajtani elsőként Sf9 rovar, későbbiekben HeLa humán sejtekben.

2/a) A doktori munkám második részét képezte a humán dezoxiuridin és timidilát metabolizmus fontos résztvevőinek, a **humán dUTPáz és a TYMK enzimfehérjéknek RNS interferenciás géncsendesítése**, valamint a géncsendesítés következményeinek tanulmányozása. A humán dUTPáz RNSi-ás csendesítésére irányuló kísérletsorozatban a kezdeti mérföldköveket Dr. Kovári Júlia munkatársam teremtette meg. A csoporthoz történő csatlakozásomkor kapcsolódtam be a kutatási témába. Dr. Kovári Júlia a

csoporttól való távozását követően az RNSi-ás kísérletsorozatot egyedül folytattam és fejeztem be.

- Elsődleges célkitűzésünk volt a humán **DUT gén** és későbbiekben a **TYMK gén** expressziójának **hatékony csendesítése** egy regulálható, vektor-alapú RNS interferencia rendszer segítségével.
- Továbbá olyan **stabil humán HeLa sejtvonalat** kívántunk **létrehozni**, amelyek lehetőséget biztosítanak az említett génrepressziók következményeként fellépő **molekuláris és sejtfiziológiai változások** körültekintőbb **vizsgálatára**.
- Szándékomban állt a **de novo timidilát-metabolizmusban (DCTD, TYMS és TYMK)** és a **menekítő útvonalban (TK1)** lényegi szerepet betöltő **enzimek génexpressziós mintázatának kvantitatív PCR alapú vizsgálata**. Ez utóbbi vizsgálat egy jelentős dUMP prekursorvesztés hátterében a timidilát szintézis plaszticitására adna értékes információt.
- További terveként szerepelt a géncsökkentett stabil sejtvonalak esetében, a timidilát-metabolizmust célba vevő **fluoropirimidin (5FU és FUDR)** természetű citotoxikus **szerekkel szembeni toleranciaválaszok tanulmányozása**.

2/b) A timidilát metabolizmus vizsgálata kapcsán, további tervem volt az **UDE** fehérje esetében egy olyan **transzgenikus humán sejtvonallétrehozása**, amelyben a fehérje konstitutív expressziója és sejtmagi lokalizációja stabilan biztosított. A kívánt sejtvonallétrehozását egy HIV-alapú **lentivirális** rendszer segítségével kívántam megtenni. A sikeres **géntraszfert** követően, a fluoreszcens riporter fehérjével címkézett transzprotein lehetőséget nyújt egy homogén, transzgenikus sejt kultúra létrehozására. A **homogén sejtvonallétrehozás**, mint modell rendszer, az enzim uracil-DNS degradáló enzimfunkcióját kihasználva, az immortalizált sejtek - a timidilát metabolizmust bénító citotoxikus szerekkel szembeni - **apoptotikus viselkedésének tanulmányozására** adna lehetőséget a későbbiekben. A sejtvonallétrehozásában Dr. Német Katalin, az OVSZ Kísérleti Génterápiás csoportjának vezetője biztosította a szakmai segítséget.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4. 1. Anyagok

A doktori munka kísérleti része nagy tisztaságú, molekuláris biológiai és sejtbiológiai preparatív munkára alkalmas anyagok (vegyszerek, reagensek, oligonukleotidok, enzimek, stb.) felhasználásával történt. A módszerleírásoknál a felhasznált anyagok megnevezését követő zárójelben, a gyártó- vagy forgalmazó cég nevét vagy internetes elérhetőségét feltüntettem.

4. 1. 1. Plazmidok, vektorok

Az alább felsorolt alap-vektorokat használtuk fel a különböző vektor-konstrukciók elkészítéséhez. Zárójelben az adott vektorhoz tartozó antibiotikum rezisztencia (^R), valamint a célgén (vizsgálni kívánt géntermék kódoló-, cDNS szekvenciája az expressziós kazettában) transzkripcióját biztosító promóter (_p) van feltüntetve. A dolgozat egészét tekintve a fehérjék rövidített nevét nyomtatott nagybetűvel (pl., eGFP, TYMK, stb.), míg DNS vektor-konstrukciókban a gének rövidített nevét kis dőltbetűvel (pl., *pRM-yfp*, *stb.*) jelölöm, eltekintve evolúciós származásuktól és minden egyéb egyezményes nomenklatúra rendszertől.

- *pRM-yfp* (Ampicilin^R; Methallotionein_p) - rovar sejt specifikus expressziós vektor [128] [A vektor eYFP – későbbiekben csak YFP – expressziós kazettát tartalmaz]
- *pIZ* (Zeocin^R; OpIE2_p) - rovar sejt specifikus expressziós vektor (Invitrogen)
- *pDsRed-Monomer-N1* (Kanamycin^R; G418^R; CMV_p) – emlős/humán sejt specifikus vektor (BD Bioscience, Clontech). [A vektor pDsRed-Monomer-N1 cDNS-t tartalmaz az expressziós kazettában]
- *pCDNA4/TO* (Ampicilin^R, Zeocin^R; CMV-TetO2^[2]_p) - emlős/humán sejt specifikus, Tetraciklin indukálható expressziós vektor (Invitrogen)
- *pSew-egfp* (Ampicilin^R; SFFV_p) - emlős/humán sejt specifikus, lentivirális vektor (Dr. Német Katalin, Kísérletes Génterápiás Labor, OVSZ). [A vektor eGFP cDNS-t tartalmaz az expressziós kazettában]
- *p.Superior.puro* (Ampicilin^R; Puromycin^R; H1-TetO2_p) - emlős/humán sejt specifikus, Tetraciklin indukálható RNSi vektor (Oligoengine).

- *pEntr-H1-TO* (Kanamycin^R; Zeocin^R; H1-TetO2^{[2]_p) - emlős/humán sejt specifikus, Tetraciklin indukálható RNSi vektor (Invitrogen).}

4. 1. 2. Alkalmazott baktérium törzsek

- *E. coli* XL1-Blue *recA1, endA1, gyrA96, th-1i, hsdR17, supE44, relA1, lac*
(F' *proAB, lacI^q ZΔM15, Tn10* (tet^r))
- *E. coli* TOP10 F- *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74*
(F' *proAB, lacI^q ZΔM15, Tn10* (tet^r)) *recA1 araD139*
Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) *endA1 nupG*

4. 1. 3. Rovar- és humán sejtvonalak

- Sf9, rovar bélhám sejtvonala (*Spodoptera frugiperda*) (ELTE Biokémia Tsz.)
- HeLa, immortális cervicális adenocarcinoma sejtvonala (*Homo sapiens*) (OVSZ)
- T-REx™-HeLa, immortális cervicális adenocarcinoma sejtvonala (*Homo sapiens*), stabilan expresszálja a Tet Represszor (Tet-R) fehérjét (Invitrogen)
- HEK293, immortális embrionális vesesejt-293 (*Homo sapiens*) (Dr. Német Katalin, Kísérletes Génterápiás Labor, OVSZ)
- HEK-293T, immortális, HEK293 alapú, pakoló sejtvonala (*Homo sapiens*) (Dr. Német Katalin, Kísérletes Génterápiás Labor, OVSZ)

4. 2. Módszerek

4. 2. 1. Baktérium törzsek-, rovar és humán sejtvonalak fenntartása és növesztése

4. 2. 1. 1. Baktérium törzsek fenntartása és növesztése

Az alap- és a pozitív klónokból származó *E. coli* törzseket szilárd LB (Luria-Bertani Medium) [1% (w/v) tripton, 0,5% (w/v) élesztő kivonat, 10% (w/v) NaCl (w/v), 1% agar (w/v), pH 7.2] lemezen 4 °C-on tároltuk, valamint fagyasztó oldatban [10% glicerin (v/v)] - 80 °C-on archiváltuk. A baktériumok molekuláris biológiai preparatív célú felhasználást megelőző növesztése, szilárd és folyékony LB médiumban (a szelekciót biztosító, megfelelő antibiotikummal kiegészítve) a kísérleti szempontoknak megfelelő módon (lemezen vagy rázott kultúrában – 200 rpm) és ideig (általában 24-48 h) 37 °C-on történt. A különböző törzsek növesztésénél felhasznált antibiotikumok (és alkalmazási végkoncentrációjuk) a következők voltak: Tetraciklin (Tet) (12,5 µg/ml), Chloramphenicol (34 µg/ml), Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (25 µg/ml), Zeocin (25 µg/ml).

4. 2. 1. 2. Rovar sejtvonala fenntartása és növesztése

Az Sf9 rovar sejtvonala egy *in vitro* körülmények között fenntartható, heterológ fehérje expresszióra alkalmas adherens sejtvonala. A sejt kultúrát 26 °C-os inkubátorban, SFM (serum free medium) tápoldatban növesztetem, amelyet 10% FBS (fetal bovine serum), 1 mM L-glutamin, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin komponensekkel egészítettem ki. A sejt kultúra passzálási gyakorisága optimális denzitás (300 ezer sejt/ml) és kísérleti szempontok igénye szerint történt.

Jóllehet az Sf9 rovar sejtvonala érintett kísérleteinkben *D. mel.* fehérjét vizsgálunk, az Sf9 sejtvonala mégis azért esett a választásunk, mert a kereskedelmi forgalomban lévő *in vitro* *D. mel.* sejtvonalaikhoz képest számos, a kísérleti rendszerünkhöz pozitívabban igazodó tulajdonsággal rendelkezik. Mindenekelőtt, a kedvező morfológiai tulajdonságainak köszönhetően a sejt extranukleáris-, szubcelluláris- és nukleáris régiói mikroszkópiával könnyen megfigyelhetők és egymástól határozottan elkülöníthetők. További pozitívuma a sejtvonala, hogy gyors az osztódási rátája, valamint a sejtek lipofekcióval történő transzfekciója kedvező hatékonyságú.

4. 2. 1. 3. Humán sejtvonalak fenntartása és növesztése

A HeLa, T-REx™-HeLa és a HEK293 adherens sejtvonalakokat D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) tápoldatban növesztettem, amelyet 10% FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin komponensekkel egészítettem ki. A T-REx™-HeLa sejtvonala esetében a tápoldathoz 5 µg/ml blastidicin további adása volt szükséges. Az alap sejt kultúrákat és a belőlük származtatott tranziensen (HeLa) és stabilan (T-REx™-HeLa) transzfektált sejt vonalakat, valamint a lentivirális transzdukcióval előállított sejt vonalakat (HEK293) 37 °C-on telített vízgőzt és 5% CO₂ tartalmú levegőt biztosító inkubátorban tartottam fenn. A stabil T-REx™-HeLa (shRNS-stabil) sejt vonalak fenntartása további meghatározott antibiotikumok és azok meghatározott koncentrációja mellett történt (lásd később). A sejt kultúrák passzálási gyakorisága optimális denzitás (200-500 ezer sejt/ml) és kísérleti szempontok igénye szerint történt. A passzálás folyamatok, valamint a sejtek molekuláris biológiai preparatív felhasználása (nukleinsav-, fehérje- és nukleotid izolálás) előtt, a tápoldat eltávolítását követően a sejteket két egymást követő alkalommal fölös térfogatban PBS (phosphate buffered saline)-puffer [0,8% (w/v) NaCl, 0,02% (w/v) KCl, 0,144% (w/v) Na₂HPO₄, 0,024% (w/v) KH₂PO₄, pH 7,4] oldattal mostam a tápfolyadék-maradványok eltávolítása érdekében. Ezt követően tripszin (Sigma-Aldrich) segítségével a sejteket enzimatikusan leválasztottam a tenyésztőedény aljáról. Passzálákor a sejteket kevés mennyiségű tápoldatban kíméletesen szuszpendáltam, majd denzitástól függően tenyésztő edényekbe osztottam. Preparatív célok előtt a sejt szuszpenziót három egymást követő alkalommal PBS-pufferrel mostam majd a lecentrifugált sejt csapadékot használtam fel.

A T-REx™-HeLa sejt vonal komerciális állapotában stabilan tartalmazta a pcDNA6/TR vektor-konstrukciót, amely a Tet-R konstitutív expresszióját biztosította a sejtekben. A stabil sejt vonal megtartása érdekében, az említett vektor blastidicin rezisztencia gént hordozott. A TetR-t termelő sejt vonal lehetővé tette számunkra az ún. plazmid alapú, RNS interferenciás rendszerek (pSuperior- és a BLOCK-iT™ H1 RNAi Entry) tetraciklin-függő szabályozható alkalmazását.

4. 2. 2. Általános molekuláris biológiai módszerek

4. 2. 2. 1. Kompetens *E. coli* sejtek előállítása és transzformálása

Az *E. coli* XL1-Blue, TOP10 baktériumok DNS-plazmid transzformálásra alkalmas, CaCl₂ alapú, kémiai kompetens sejté váló alakítása, valamint a sejtek hő-sokk transzformálása a már korábban leírtak szerint történt [129].

4. 2. 2. 2. DNS plazmid izolálás baktérium sejtéből

Baktériumsejtekből történő kis- és nagy volumenű DNS-plazmid izolálás a QIAGEN Plasmid Mini és Midi Kit felhasználásával történt, pontosan követve a gyártó által közölt protokollt (www.qiagen.com).

4. 2. 2. 3. DNS elválasztása agaróz gélelektroforézissel

A különböző molekulásúlyú DNS molekulák (plazmidok, PCR termékek, fragmentek) molekula tömeg szerinti szétválasztását 2%-os agaróz gélen horizontális gélelektroforézissel végeztem TAE (0.04 M Tris-base, 1,14% (v/v) Acetát, 1 mM EDTA, pH 8.0) puffer jelenlétében.

4. 2. 2. 4. DNS izolálása és tisztítása

Cirkuláris (restrikcós endonukleázzal nem emésztett) és lineáris (restrikcós endonukleázzal emésztett) plazmidok, vektorok, valamint lineáris PCR termékek, fragmentek (inszertek) agaróz gélből és restrikcós emésztési elegyből való tisztítására a QIAquick Gel Extraction Kit-et használtam fel, követve a gyártó által közölt használati útmutatót (www.qiagen.com).

4. 2. 2. 5. DNS restrikcós emésztése. Ligálási reakció

A DNS plazmidok, PCR termékek és DNS fragmentek restrikcós emésztési reakciókörülményeit, valamint a ligálási reakció körülményeit a 4. 2. 2. 5. táblázat foglalja össze.

4. 2. 2. 5. táblázat. Restriktációs emésztési és ligálási reakciókörülmények. A táblázat első része a DNS plazmidok, PCR termékek és fragmentek restriktációs emésztési reakciókörülményeit foglalja össze. Az emésztési reakciók az általam használt restriktációs endonukleázok esetében (Nhe I, Not I, Hind III, Xba I, Bam H I, Bgl II) 37 °C-on a DNS koncentrációjától függően 2-24 óra időintervallumban történtek. A táblázat második fele a ligálási reakciókörülményeket foglalja össze. A ligálási reakciók minden esetben szobahőmérsékleten 30-90 perc időintervallumban történtek, amelyeket a ligáz 65 °C-on történő hőinaktiválása (20 perc) követett.

Reakció			
restriktációs emésztés		ligálás	
komponensek	végkoncentráció	komponensek	végkoncentráció
10 x Restriktációs puffer *	1 x	10 x T4 Ligáz puffer **	1 x
DNS	0,02-0,1 µg/µl	plazmid DNS	0,2-1 µg/V _{25µl}
Restriktációs endonukleáz	0,4-1 unit/µl	fragment DNS	0,6-3 µg/V _{25µl}
100 x BSA	1 x	T4 Ligáz	1 unit/V _{25µl}

*A fent említett restriktációs endonukleázok preferált reakció pufferreit és azok összetételét lásd: (www.neb.com; www.fermentas.com); **T4 Ligáz puffer 1 mM ATP-t tartalmaz; további összetétele: (www.neb.com)

4. 2. 2. 6. DNS amplifikálás polimeráz lánreakcióval (PCR)

A különböző fluoesczens riporter-fehérjékkel (YFP, DsRed-N1, eGFP) fuzionált *D. mel.* UDE és dUTPáz rekombináns fehérjék létrehozásának érdekében a gének cDNS-ét PCR alapú amplifikációval állítottam elő, majd a cDNS-eket vagy a fúziós géneket rovar- és humán sejt specifikus vektor-konstrukciókba (*pRM-...*, *pIZ-...*, *pDsRed-N1-...*, *pcDNA4/TO-...*, *pSew-...*) klónoztam. A génszakaszok PCR reakcióval történő felszaporításához gén-specifikus 5'-ős (forward) és 3'-ős (reverse) DNS primereket terveztem, amelyek meghatározott, az irányított molekuláris klónozást lehetővé tevő restriktációs endonukleáz felismerő szekvenciákat tartalmaztak. A primerek tervezéséhez a DNA STAR/Primer Select szoftvert (DNAStar, Madison, WI, USA; www.dnastar.com) használtam fel. Az 5'-ős primerek legtöbbjénél a start kodonnál (ATG) egy módosított Kozak-szekvenciát használtam fel (...-5'-accaccATGgcg-3'-...), amely a fúziós fehérjék hatékony transzlációját segítette rovar- és humán sejtekben egyaránt. A PCR reakciókban felhasznált primerek szekvenciáját és az endonukleáz hasító helyeket a 4. 2. 2. 6. 1. táblázat foglalja össze. A PCR reakciókat az Applied Biosystems PCR-gépen (Applied Biosystems), Phusion HF polimeráz (Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, Finnzymes) felhasználásával végeztem, amely egy magas hűségű (high fidelity), alacsony hibaszázalékkal polimerizáló enzim. A PCR reakcióprogramok megtervezése a primerek olvadási hőmérsékletének, szekvencia hosszának-, bázis összetételének-, valamint az ampikonok hosszának figyelembevételével történtek. Az általam használt PCR reakciók reakciókörülményeinek összefoglalását az 4. 2. 2. 6. 2. táblázat tartalmazza.

4. 2. 2. 6. 1. táblázat. PCR reakciókban felhasznált primerek összefoglalása. A táblázat a *D. mel.* UDE és dUTPáz fehérjék rovar- vagy humán/emlős specifikus DNS-konstrukcióinak előállításához felhasznált PCR primerek szekvenciáját, valamint a klónozáshál alkalmazott restriktiók helyeket (aláhúzott szekvencia) foglalja össze. A primerek szintézisét az Eurofins MWG GmbH cég végezte.

PCR primerek			
felhasználás	elnevezés	szekvencia (5'-3')	restriktiók felismerő hely
kontroll	yfp-For	ctagc <u>aa</u> gcttaccaccatggtgagcaagggcgaggag	Hind III
	yfp-Rev	gctctgctct <u>ctaga</u> ctcgagtcacgcttgtacagctcgtccatgc	Xba I
UDE primerek	ude-For	ctagc <u>ctag</u> catgccgtcgagttggagacggctac	Nhe I
	ude-Rev	gtttag <u>cg</u> gccgctgctcctccctcttcttcttcc	Not I
	udeΔ ³⁴⁶⁻³⁵⁵ -Rev	gtttag <u>cg</u> gccgcatcctcgccatcggaatcctg	Not I
	udeΔ ³¹⁶⁻³⁵⁵ -Rev	gtttag <u>cg</u> gccgctcgagatggccagcttctcgatgtaactgc	Not I
	ude-yfp-For	aactt <u>aa</u> gcttaccaccatggcgctcgagttggagacggctacgc	Hind III
	NLS-mut ^{2A} -For	gataagcccaaaagggcggcgaagagggaggag	
	NLS-mut ^{2A} -Rev	ctcctccctcttgcgcgcccttctgggcttctc	
	NLS-mut ^{4A} -Rev	ttttt <u>cg</u> gccgctgctcctccgcgcgcgcgccttttg	Not I
	ude_d1-319-For	ctagc <u>aa</u> gcttaccaccatggcgcccgaaaagcgaagcaggag	Hind III
	ude320-326-YFP-Rev	cggcattggacgagctgtacaaggcaccgaaaagcgaagcaggag aggcgtgat <u>cttag</u> acagagc	Xba I
	ude346-353-YFP-Rev	cggcattggacgagctgtacaagaagcccaaaaggaagaagaaga gggaggagggcgcgctgat <u>cttag</u> acagagc	Xba I
	ude346-349-YFP-Rev	cggcattggacgagctgtacaaggcaaaagcccaaaaggaagcgg cgtgat <u>cttag</u> acagagc	Xba I
	Ds-ude-For	aactt <u>aa</u> gcttaccaccatggcgctcgagttggagacggctacgc	Hind III
	Ds-ude-Rev	gaccgctggatccgggctcctcctcttcttcttcc	Bam H I
Ds-udeΔ ³⁴⁶⁻³⁵⁵ -Rev	cgaccgggtgatcccgatcctcgccatcggaatcctgctg	Bam H I	
Ds-udeΔ ³¹⁶⁻³⁵⁵ -Rev	gaccgctggatccgggcccagcttctcgatgtaactgc	Bam H I	
Sew-ude-For	tatcggcgatccgccaccatggcgctcgagttggagacggc	Bam H I	
dUTPáz primerek	ld-For	ctagc <u>ctag</u> catgccatcaaccgatttcgc	Nhe I
	ld*-For	aactt <u>aa</u> gcttaccaccatggcatcaaccgatttcgccacattc	Hind III
	ld-Rev	gtttat <u>cg</u> gccgcgtagcaacaggagccggagc	Not I
	ntt-For	aactt <u>aa</u> gcttaccaccatggaagatcgacacgtgcg	Hind III
	NLS ^{WT} -For	ctagc <u>aa</u> gcttaccaccatggcgccagctgccaagaagatgaagatc gacatggtgagcaagggcgaggagctg	Hind III
	NLSΔ ¹⁰⁻¹² -For	ctagc <u>aa</u> gcttaccaccatggcgaagaagatgaagatcgacatggtg agcaagggcgaggagctg	Hind III
	NLSΔ ¹⁰⁻¹³ -For	ctagc <u>aa</u> gcttaccaccatggcgaagaagatgaagatcgacatggtgagc aagggcgaggagctg	Hind III
	NLS ^{WT} -For'	ctagc <u>aa</u> gcttaccaccatggcgccagctgccaagaagatgaagat ggtgagcaagggcgaggagctg	Hind III
	NLSΔ ¹⁰⁻¹² -For'	ctagc <u>aa</u> gcttaccaccatggcgaagaagatgaagatggtgagcaa ggcgaggagctg	Hind III
	NLSΔ ¹⁰⁻¹³ -For'	ctagc <u>aa</u> gcttaccaccatggcgaagaagatgaagatggtgagcaaggg cgaggagctg	Hind III
	ld-dut'-For	aactt <u>aa</u> gcttaccaccatggcatcaaccgatttcgccacattc	Hind III
ld-dut'-Rev	gtat <u>ctag</u> actcgagttacttgactccggtggaaccgaaatc	Xba I	

4. 2. 2. 6. 2. táblázat. PCR reakciók tulajdonságainak összefoglalása. A táblázat a PCR reakciók reakciókomponenseit, azok végkoncentrációit-, valamint a PCR reakcióprogram lépéseit és az egyes lépésekhez tartozó paramétereket (hőmérséklet, időtartam) foglalja össze.

		PCR reakció				
		program				
reakció komponensek	végkoncentráció	reakció-lépés	hőmérséklet (°C)	időtartam	ciklus szám	
5 x HF puffer *	1 x	I.	98	30s	1	
dNTP mix	200 µM	II.	98	15 s		
5' (forward) primer	0,5 µM	III.	55-65	30 s		
3' (reverse) primer	0,5 µM	IV.	72	35-55 s		
DNS templát	0,01 µg/µl	V.	72	10 perc	1	
Phusion HF polimeráz	0,02 u/µl	VI.	4	végtelen	1	

*Az 5 x HF (High Fidelity) reakció puffer 7.5 mM MgCl₂-ot tartalmaz, további összetétele: (www.finnzymes.com)

4. 2. 3. *Drosophila* fehérjék celluláris lokalizációs vizsgálatának módszertana

4. 2. 3. 1. Az UDE és a dUTPáz fehérjék Sf9 sejtben belüli lokalizációjának vizsgálatával összefüggő módszerek leírása

4. 2. 3. 1. 1. Riporter-konstrukciók előállítás molekuláris klónozással

Az UDE és a dUTPáz fehérje teljes hosszúságú, valamint redukált (trunkált) kódoló régióinak YFP fluoreszcens fehérjével történő rekombinálása (C- vagy N-terminális felől) révén olyan fluoreszcens fúziós fehérjéket (kimérákat) állítottam elő, amelyek sejtben belüli kifejeződése, sejt kompartment szerinti eloszlása, szubcelluláris lokalizációja, fluoreszcens mikroszkópia segítségével könnyen és egyértelműen tanulmányozhatóak voltak. Az Sf9 rovar sejt vonalban tanulmányozott riporter-konstrukciók DNS szintű előállításához a *pRM-yfp*-, valamint a *pIZ* vektorokat használtam fel. A konstrukciók létrehozásának első lépéseként mindkét fehérje esetében a teljes hosszúságú kódoló szakaszt (*ude^{WT}*, *ld-dut^{WT}*), valamint az UDE fehérje esetében két redukált kódoló szakaszt (*ude³⁴⁶⁻³⁵⁵*, *ude³¹⁶⁻³⁵⁵*) a *pRM-yfp* vektorba klónoztam oly módon, hogy az inszertált szakaszok C-terminálisának kódoló szekvenciája azonos leolvasási keretbe került a fluoreszcens YFP fehérje N-terminálisának kódoló szekvenciájával. A folyamat eredményeként előállított fúziós géneket (*ude^{WT}-yfp*, *ld-dut^{WT}-yfp*, valamint *ude³⁴⁶⁻³⁵⁵-yfp*, *ude³¹⁶⁻³⁵⁵-yfp*) egy szintén rovar sejt specifikus vektorba, a *pIZ* plazmidba helyeztem át. Az elsőként elkészült *pRM*- és *pIZ*-vektor-konstrukciók további, különböző hosszúságú és mutációkat tartalmazó fúziós gének (az UDE esetében: *ude^{Δ1-319}-yfp*, *ude^{Δ1-319(350AAAAA353)}-yfp*, *yfp-ude-NLS1*, *yfp-ude-NLS2*, *yfp-ude-NLS2^{Δ350-353}*); a dUTPáz esetében: *ntt-dut^{WT}-yfp*, *dut-NLS-yfp*, *dut-NLSΔ¹⁰⁻¹²-yfp*, *dut-NLSΔ¹⁰⁻¹³-yfp*, *dut-NLSΔ¹⁷⁻¹⁸-yfp*, *dut-*

NLS $\Delta^{10-12,17-18}$ -yfp, dut-NLS $\Delta^{10-13,17-18}$ -yfp) előállításához szolgáltak PCR templátként. A molekuláris klónozást a fent leírt protokollok alapján végeztem (lásd 4. 2. 2. fejezet). A különböző hosszúságú és szekvenciájú fúziós géneket hordozó pIZ-vektor-konstrukciók már alkalmasak voltak Sf9 rovar sejtbe történő transzfeckcióra és abban kifejeződésük tanulmányozására. A 4. 2. 3. 1. 1. táblázat részletesen összefoglalja az elkészített DNS-konstrukciókat, valamint a fúziós gének PCR alapú előállításakor felhasznált PCR primer párokat és templátokat.

4. 2. 3. 1. 1. táblázat. Az UDE és a dUTPáz fehérje -rovar sejt specifikus- riporter vektor-konstrukcióinak összefoglalása. A táblázat felsorolja az UDE és a dUTPáz fehérje -rovar sejt specifikus- riporter DNS-konstrukcióinak elkészítéséhez felhasznált PCR primer párokat és templátokat. A primerek szekvenciáját lásd a 4. 2. 2. 6. 1. táblázatban. Az alkalmazott PCR reakciókörülményeket a 4. 2. 2. 6. 2. táblázat foglalja össze. A konstrukciók kifejeződését, lokalizációját, tranzien transzfeckciót követően Sf9 sejtvonalon tanulmányoztam.

riporter vektor-konstrukciók		primer név		templát a PCR
típus	einevezés	5'-ös (forward)	3'-ös (reverse)	reakcióban
kontr.	<i>pIZ-yfp</i>	yfp-For	yfp-Rev	<i>pRM-yfp</i>
	<i>pRM-ude^{WT}-yfp</i>	ude-F	ude-Rev	<i>pET19b-ude</i>
	<i>pRM-ude$\Delta^{346-355}$-yfp</i>	ude-F	ude $\Delta^{346-355}$ -Rev	<i>pET19b-ude</i>
	<i>pRM-ude$\Delta^{316-355}$-yfp</i>	ude-F	ude $\Delta^{316-355}$ -Rev	<i>pET19b-ude</i>
	<i>pIZ-ude^{WT}-yfp</i>	ude-yfp-For	yfp-Rev	<i>pRM-ude^{WT}-yfp</i>
	<i>pIZ-ude$\Delta^{346-355}$-yfp</i>	ude-yfp-For	yfp-Rev	<i>pRM-ude$\Delta^{346-355}$-yfp</i>
	<i>pIZ-ude$\Delta^{316-355}$-yfp</i>	ude-yfp-For	yfp-Rev	<i>pRM-ude$\Delta^{316-355}$-yfp</i>
	<i>pIZ-ude^{350AA351}-yfp</i>	NLS-mut ^{2A} -For	NLS-mut ^{2A} -Rev	<i>pIZ-ude^{WT}-yfp</i>
	<i>pIZ-ude^{350AAA351}-yfp</i>	ude-yfp-For	NLS-mut ^{2A} -Rev	<i>pIZ-ude^{350AA351}-yfp</i>
	<i>pIZ-udeΔ^{1-319}-yfp</i>	ude_d1-319-For	yfp-Rev	<i>pIZ-ude^{WT}-yfp</i>
	<i>pIZ-ude$\Delta^{1-319(350AAA353)}$-yfp</i>	ude_d1-319-For	yfp-Rev	<i>pIZ-ude^{350AAA351}-yfp</i>
	<i>pIZ-yfp-ude-NLS1</i>	yfp-For	ude320-326-yfp-Rev	<i>pIZ-yfp</i>
	<i>pIZ-yfp-ude-NLS2</i>	yfp-For	ude346-353-yfp-Rev	<i>pIZ-yfp</i>
	<i>pIZ-yfp-ude-NLS2$\Delta^{350-353}$</i>	yfp-For	ude346-349-yfp-Rev	<i>pIZ-yfp</i>
ude-konstrukciók	<i>pRM-ld-dut^{WT}-yfp</i>	ld-For	ld-Rev	<i>pET22b-LDdut^{WT}</i>
	<i>pIZ-ld-dut^{WT}-yfp</i>	ld*-For	yfp-Rev	<i>pRM-ld-dut^{WT}-yfp</i>
	<i>pIZ-ntt-dut^{WT}-yfp</i>	ntt-For	yfp-Rev	<i>pIZ-ld-dut^{WT}-yfp</i>
	<i>pIZ-dut-NLS-yfp</i>	NLS ^{WT} -For	yfp-Rev	<i>pIZ-yfp</i>
	<i>pIZ-dut-NLSΔ^{10-12}-yfp</i>	NLS Δ^{10-12} -For	yfp-Rev	<i>pIZ-yfp</i>
	<i>pIZ-dut-NLSΔ^{10-13}-yfp</i>	NLS Δ^{10-13} -For	yfp-Rev	<i>pIZ-yfp</i>
	<i>pIZ-dut-NLSΔ^{17-18}-yfp</i>	NLS ^{WT} -For'	yfp-Rev	<i>pIZ-yfp</i>
	<i>pIZ-dut-NLS$\Delta^{10-12,17-18}$-yfp</i>	NLS Δ^{10-12} -For'	yfp-Rev	<i>pIZ-yfp</i>
	<i>pIZ-dut-NLS$\Delta^{10-13,17-18}$-yfp</i>	NLS Δ^{10-13} -For'	yfp-Rev	<i>pIZ-yfp</i>
	<i>pIZ-dut-NLS$\Delta^{10-13,17-18}$-yfp</i>	NLS Δ^{10-13} -For'	yfp-Rev	<i>pIZ-yfp</i>

4. 2. 3. 1. 2. Helyspecifikus mutagenézis az UDE fehérjeszekvenciában

Az UDE fehérjeszekvenciájában a K350A és K351A mutációk létrehozására a QuikChange®Site-Directed Mutagenesis Kit-et (www.stratagene.com) használtam fel. A műveletet a gyártó által közölt protokoll pontos betartásával végeztem. A *pIZ-ude^{350AA351}-yfp* konstrukció elkészítéséhez használt primer és templát választást a 4. 2. 2. 6. 1. táblázat tartalmazza. A K350A, K351A, K352A és R353A mutációkat hordozó konstrukció (*pIZ-ude^{350AAAA351}-yfp*) esetében a K352A és R353A radikális aminosavcserék bevitelére már hagyományos PCR reakciót alkalmaztam, amelyben templátként a *pIZ-ude^{350AA351}-yfp* plazmid szerepelt (4. 2. 3. 1. 1. táblázat).

4. 2. 3. 1. 3. Sf9 sejtek tranziens transzfekciója

Az Sf9 sejteket megfelelő denzitásban (200-500 ezer sejt/ml) 24-férőhelyes tenyésztő tálcában mobilizálható üveglemezre növesztettem. A sejteket letapadásukat követő negyedik órában Lipofectamine™2000 reagens és az adott DNS vektor komplexével (transzfekciós médiumban) transzfektáltam, figyelmesen követve a gyártó útmutatását (www.invitrogen.com).

4. 2. 3. 1. 4. Sf9 sejtek fixálása és DAPI festése

Az Sf9 sejtek transzfekcióját követő napon eltávolítottam a transzfekciós médiumot és a kultúrát két alkalommal PBS-pufferrel mostam (1 perc), majd 3% paraformaldehid-PBS-puffer segítségével 15 percen keresztül üveglemezre rögzíttem a sejteket (fixálás). A fixálást követően az oldatot eltávolítottam és ismételt PBS-pufferrel mostam a sejteket. Ezt követően permeabilizáló oldattal (0.1% Triton X-100-PBS-puffer) a sejtmembránt átjárhatóvá tettem (5 perc) majd 1 mg/ml DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) oldattal a sejtek magját megfestettem (5 perc). Ismételt PBS-puffer- és egyszeri H₂O mosást követően az üveglemezeket mérsékelten megszárazítottam, majd a FluoroSave™ reagens (Calbiochem) segítségével tárgylemezre rögzíttem.

4. 2. 3. 1. 5. Fluoreszcens mikroszkópia

Az Sf9 (valamint a humán) sejteken végzett fehérje lokalizációs vizsgálatok esetében a mikroszkópiás felvételeket a Leica DMLS epifluoreszcens mikroszkóppal

készítettem. A tárgylemezeken lévő preparátumokat 60 szoros nagyításban olaj immerziós objektívvel tanulmányoztam. A minták vizualizálásához a FITC, YFP és eGFP esetében 485 nm hullámhosszúságú excitációs és 530 nm hullámhosszúságú emissziós fényt, DsRed esetében 543 nm hullámhosszúságú excitációs és 560 nm hullámhosszúságú emissziós fényt, míg a DAPI esetében 355 nm hullámhosszúságú excitációs és 450 nm hullámhosszúságú emissziós fényt használtam.

4. 2. 3. 1. 6. Nukleinsav- és fehérjeszekvenciák *in silico* analízise

A nukleinsav- és fehérjeszekvenciák analíziséhez, összehasonlításához az ExPaSy (Expert Protein Analysis System) proteomikai szerver internetes oldalán (<http://www.expasy.ch/>) elérhető programokat alkalmaztam. Szekvencia homológia kereséshez a BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) keresőprogramot használtam.

A tanulmányozott fehérjék putatív NLS szekvenciáinak predikciója céljából a PSORTII programot (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>) alkalmaztam [130]. A program az irodalomban már azonosított és experimentálisan igazolt potenciális, főleg szubcelluláris lokalizációt meghatározó szekvencia mintázatok (többek között NLS szekvenciák) alapján homológia-keresését végezi az analizálandó fehérje aminosav sorrendjén, majd végezetül predikciót készít. Az NLS analízist követően un. pat4 (négy bázikus aminosavból - főleg R/K - álló szekvencia mintázat) és pat7 (legalább három R/K és n-számú H bázikus aminosavakból és egy hidrofób, szekvencia kezdő P aminosavból álló szekvencia mintázat) szekvencia mintázatokat kapunk. A pat7 mintázatok aminosav összetétele az R és K bázikus, valamint a kezdő hidrofób P aminosavakat leszámítva változatos lehet (G, A, Q, E aminosavak fordulhatnak elő). A szekvencia analízishez a vizsgált fehérjék teljes hosszúságú kódoló szekvenciáját (ORF) használtam fel. A szekvenciákat az UniProt (www.uniprot.org) adatbázis szolgáltatta.

4. 2. 3. 2. Az UDE és a dUTPáz fehérjék HeLa sejten belüli lokalizációjának vizsgálatával összefüggő módszerek leírása

4. 2. 3. 2. 1. UDE-riporter-konstrukciók előállítás molekuláris klónozással

Az UDE fehérje humán sejtben (HeLa) történő lokalizációját a "rovar-rendszerhez" hasonlóan fluoreszcens riporter-konstrukciók segítségével vizsgáltam. A DNS-konstrukciókat PCR alapú molekuláris klónozással hoztam létre. Az UDE fehérje különböző hosszúságú kódoló régióit (ude^{WT} , $ude\Delta^{346-355}$, $ude\Delta^{316-355}$) a *pDsRed-N1* vektorba klónoztam, oly módon, hogy az inszertált szakaszok C-terminálisát kódoló szekvencia azonos leolvasási keretbe került a fluoreszcens DsRed-N1 fehérje N-terminálisának kódoló szekvenciájával. A molekuláris klónozást a fent leírt protokollok alapján végeztem (lásd 4. 2. 2. fejezet). A riporter vektor-konstrukciók elkészítéséhez használt PCR primereket (primer szekvenciát lásd a 4. 2. 2. 6. 1. táblázatban), templatokat, valamint a kész konstrukciókat a 4. 2. 3. 2. 1. táblázat foglalja össze.

4. 2. 3. 2. 1. táblázat. Az UDE fehérje - emlős specifikus - riporter-konstrukcióinak összefoglalása. A táblázat az - emlős specifikus - DNS-konstrukciókat, valamint az elkészítésükhöz felhasznált PCR primer párokat és a templatot foglalja össze. A primerek szekvenciáját és a klónozáshoz felhasznált restriktions endonukleázokat lásd a 4. 2. 2. 6. 1. táblázatban. Az alkalmazott PCR reakciókörülményeket a 4. 2. 2. 6. 2. táblázat foglalja össze. A konstrukciók kifejeződését, celluláris-, szubcelluláris lokalizációját HeLa sejtvonalban tanulmányoztam.

Riporter vektor-konstrukciók	primer név		templát a PCR reakcióban
	5'-ős (forward)	3'-ős (reverse)	
<i>pDsRed-N1-ude^{WT}</i>	Ds-ude-For	Ds-ude-Rev	<i>pET19b-ude</i>
<i>pDsRed-N1-ude^{Δ346-355}</i>	Ds-ude-For	Ds-ude ^{Δ346-355} -Rev	<i>pET19b-ude</i>
<i>pDsRed-N1-ude^{Δ316-355}</i>	Ds-ude-For	Ds-ude ^{Δ316-355} -Rev	<i>pET19b-ude</i>

4. 2. 3. 2. 2. dUTPáz-expressziós-konstrukció előállítás molekuláris klónozással

A dUTPáz C-terminális deletált kódoló régiójának ($Id-dut'\Delta^{159-188}$) humán sejtekben (HeLa) történő expressziójának és az ezt követő celluláris lokalizációjának tanulmányozása érdekében az említett kódoló cDNS-t az emlős specifikus pcDNA4/TO expressziós vektorba klónoztam. A molekuláris klónozást a fent leírt protokollok alapján végeztem (lásd 4. 2. 2. fejezet). Az expressziós DNS-konstrukció elkészítéséhez használt PCR primer párt (primer szekvenciát lásd a 4. 2. 2. 6. 1. táblázatban), templatot, valamint a kész konstrukciót a 4. 2. 3. 2. 2. táblázat foglalja össze.

4. 2. 3. 2. 2. táblázat. dUTPáz expressziós vektor-konstrukció. A táblázat a dUTPáz fehérje (ld-dut' $\Delta^{159-188}$) emlős specifikus expressziós konstrukcióját, valamint az elkészítéséhez használt PCR primer párt és templátot foglalja össze. A primerek szekvenciáját és a klónozáshoz felhasznált restrikciós endonukleázokat lásd a 4. 2. 2. 6. 1. táblázatban. Az alkalmazott PCR reakciókörülményeket a 4. 2. 2. 6. 2. táblázat foglalja össze. A konstrukciók kifejeződését, szubcelluláris lokalizációját HeLa sejtvonalban tranziens transzfekcióit követően immuncitokémia segítségével tanulmányoztuk.

Expressziós vektor-konstrukció	primer név		templát a PCR reakcióban
	5'-ős (forward)	3'-ős (reverse)	
<i>pcDNA4/TO-ld-dut'$\Delta^{159-188}$</i>	ld-dut'-For	ld-dut'-Rev	<i>pET22b-LDdut'WT</i>

4. 2. 3. 2. 3. Humán sejtek tranziens transzfekciója

Exponenciális fázisban növvő HeLa sejteket megfelelő denzitásban (200 ezer sejt/ml) 24-férőhelyes tenyésztő tálcában mobilizálható üveglemezre növesztettem. A sejteket letapadásukat követő 24. órában Lipofectamine™2000 reagens és az adott DNS vektor komplexével transzfektáltam. A transzfekciót a reagenst gyártó útmutatásai szerint végeztem (www.invitrogen.com). A következő DNS vektor-konstrukciókat használtam fel egyedi tranziens transzfekciós eseményekben: *pDsRed-N1-ude WT* , *pDsRed-N1-ude $\Delta^{346-355}$* , *pDsRed-N1-ude $\Delta^{316-355}$* , *pcDNA4/TO-ld-dut' $\Delta^{159-188}$* .

4. 2. 3. 2. 4. Humán sejtek fixálása és DAPI festése

A transzfekciót követő napon a HeLa (és HEK293) sejteket a fent (4. 2. 3. 1. 4. fejezet) leírtak szerint fixáltam és DAPI-val festettem.

4. 2. 3. 2. 5. Humán sejtek immuncitokémiás és fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálata

HeLa sejtekben az LD-DUT' $\Delta^{159-188}$ fehérje expresszióját és szubcelluláris lokalizációját immuncitokémia segítségével tanulmányoztam. A tranziens transzfekcióit követően a sejteket a már leírt módon fixáltam és permeabilizáltam (lásd 4. 2. 3. 2. 4. fejezet). Majd a sejteket 1% BSA-PBS (bovine serum albumin-PBS) blokkoló pufferben 30 percig inkubáltam. PBS-pufferrel történő mosást követően a sejteket poliklonális nyúl antiszérummal 60 percig inkubáltam (hígítási arány: 1:8000). Háromszori PBS-pufferrel történő mosást követően a sejteket FITC (fluorescein isothiocyanate)-kötött anti-nyúl IgG (Sigma-Aldrich) másodlagos ellenanyaggal (hígítási arány: 1:5000) egy órán át reagáltattam. Ismételt PBS-pufferrel történő mosást követően a sejtminták DNS-ét DAPI festékkel jelöltem (lásd 4. 2. 3. 1. 4. fejezet). Végezetül metszeteket készítettem, majd a

preparátumok tanulmányozásához fluoreszcens mikroszkópiát alkalmaztam. (A mikroszkópiás detektálást és a látóter rögzítést a 4. 2. 3. 1. 5. fejezetben leírt módon végeztem.)

4. 2. 3. 2. 6. Humán sejtek konfokális mikroszkópiás vizsgálata

Az UDE riporter-konstrukciók (lásd 4. 2. 3. 2. 1. és 4. 2. 4. 4. fejezetek) expresszióját és a géntermékek lokalizációját HeLa sejtekben konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (Olympus FV500-IX) segítségével, Dr. Homolya László (Sejtbológia Laboratórium, OVSZ) szívélyes közreműködésével tanulmányoztam. A preparátumokat egy 60 szoros nagyítású Olympus PLAPO olaj immerziós objektívvel (Olympus Europa GmbH, Hamburg, Germany) tanulmányoztuk. A mintákat eGFP esetében 488 nm hullámhosszúságú-, DsRed esetében 543 nm hullámhosszúságú lézerfényvel gerjesztettük, míg a felvételeket eGFP esetében 505-540 nm hullámhosszúságú-, DsRed esetében 560-600 nm hullámhosszúságú emissziós tartományban rögzítettük. A DAPI megjelenítésére UV fényt (355 nm) alkalmaztunk a felvételeket 450 nm-en rögzítettük.

4. 2. 4. Transzgenikus humán sejtek létrehozásával összefüggő metodikák leírása

4. 2. 4. 1. Lentivirális vektor-konstrukció előállítása molekuláris klónozással

Az UDE fehérje humán sejtekben esetlegesen kiváltott fiziológiás hatásának tanulmányozása érdekében lentivirális transzdukcióval transzgenikus sejtvonalatok állítottunk elő. A transzgenikus sejtvonalak létrehozásához szükséges *pSew-egfp* HIV (Human Immunodeficiency Virus) -alapú lentivirális vektort Dr. Német Katalin jóvoltából kaptuk, valamint a lentivirionok előállítása és a HEK293 sejtek vírusfertőzése Dr. Német Katalin Kísérletes Génterápiás csoportjában Dr. Bátkainé Mónika asszisztens segítségével történt. A kísérlet sorozat első lépéseként az UDE^{WT} cDNS szekvenciáját tartalmazó vektorkonstrukciót készítettem el molekuláris klónozással. Az UDE fehérje teljes hosszúságú kódoló szekvenciáját oly módon inszertáltam a *pSew-egfp* vektorba, hogy az eGFP fluoreszcens fehérje N-terminálisát kódoló szekvencia szakasszal azonos leolvasási keretbe került. A lentivirális DNS-konstrukció elkészítéséhez használt PCR primer párt (primer szekvenciát lásd a 4. 2. 2. 6. 1. táblázatban), templátot, valamint a kész

konstrukciót a 4. 2. 4. 1. *táblázat* foglalja össze. A molekuláris klónozást a már korábban leírt protokollok alapján végeztem (lásd 4. 2. 2. fejezet).

4. 2. 4. 1. táblázat. A lentivirális DNS-konstrukció előállítás. A táblázat az UDE lentivirális DNS-konstrukciót, valamint az elkészítéséhez használt PCR primer párt és a templátot szemlélteti. A primerek szekvenciáját és a klónozáshoz felhasznált restrikciós endonukleázokat lásd a 4. 2. 2. 6. 1. *táblázat*ban. Az alkalmazott PCR reakciókörülményeket a 4. 2. 2. 6. 2. *táblázat* foglalja össze. A jelen vektor-konstrukciót, valamint negatív kontroll párját (*pSew-egfp*) használtuk fel a megfelelő genomú lentivirionok elkészítéséhez (lásd 4. 2. 4. 2. fejezet)

Lentivirális vektor-konstrukció	primer név		templát a PCR reakcióban
	5'-ős (forward)	3'-ős (reverse)	
<i>pSew-ude^{WT}-egfp</i>	Sew-ude-For	Ds-ude-Rev	<i>pET19b-ude</i>

4. 2. 4. 2. Lentivirionok termelése

Humán HEK293 sejtek (célsejtek) fertőzésére alkalmas lentivirionokat termeltünk HEK-293T sejtben (4. 2. 4. 2. ábra). Az említett sejt vonal egy ún. pakoló sejt vonal, amely a virulens lentivirionok összeszerelődéséhez szükséges vírusfehérjék termelését biztosította. A pakoló sejteket 5×10^6 denzitásban növesztettük a transzfekecióig. A virionok létrejöttéhez négy különböző DNS vektorra volt szükség (mivel a *pSew* vektor egy harmadik generációs lentivírus vektor), amelyek mindegyikét szimultán, kalcium-foszfat alapú transzfekecióval a pakolósejtekbe juttattunk. A transzfekeciót a már korábban leírtak szerint hajtottuk végre [129]. Három vektor (plazmid-1, plazmid-2, plazmid-3), mint ún. segédvektorok a virionok burok- és szerkezeti fehérjéit, továbbá reverz transzkriptáz, proteáz és integráz enzimeket kódoltak. Míg a negyedik vektor az LTR (long terminal repeat) határoló szekvenciák által közrefogva kódolta a potenciális vírus genomot (célgént), amely a kívánt fehérje - esetünkben az UDE^{WT}-eGFP és eGFP - génbevitelét tette lehetővé. Tehát a célgén bevitelét két különböző DNS-konstrukció segítségével hajtottunk végre (a *pSew-egfp*, mint kontroll vektor, valamint *pSew-ude^{WT}-egfp*, mint fúziós célgén tartalmazó vektor). Az említett vektorok transzfekecióját követő napon a tápoldatot lecseréltük és 72 órán keresztül tovább inkubáltuk a sejteket. Az inkubáció alatt a pakolósejtekben megindult a plazmidok kódoló régióinak átírása, majd a transzkriptek translációja és végül a virionok összeszerelődése.

A komplett virionok exocitózissal a médiumba kerültek. Az inkubáció elteltével a vírus tartalmú médiumot 0,45 μm pórusméretű szűrővel (Millipore) átszűrtük. Az átszűrt médium, mint vírusoldat már a célsejtek vírusfertőzésére volt alkalmas. A vírusoldatot felhasználásig – 80 °C-on tároltuk.

A vírustermelés eredményeként, két eltérő genomú virion populációt állítottunk elő, ezek a következők: $v_{g}UDE^{WT}$ -eGFP és $v_{g}eGFP$.

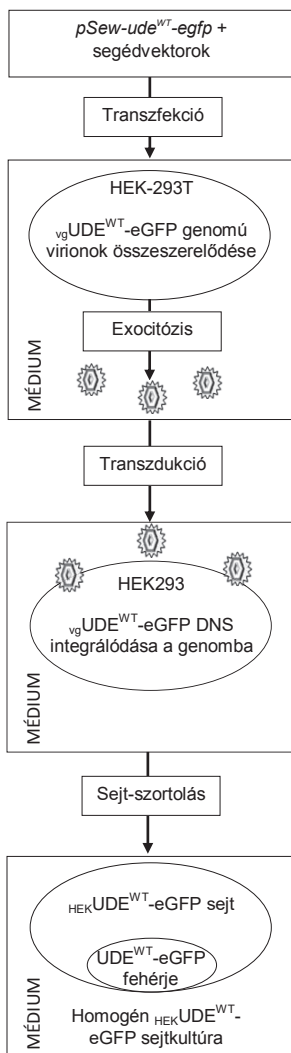
4. 2. 4. 3. HEK293 sejtek vírusfertőzése

Exponenciális fázisban növekvő HEK293 sejteket (célsejtek) megfelelő denzitásban (5×10^4 / férőhely) 24-férőhelyes tenyésztő edénybe helyeztünk. A sejtek letapadását követő napon a vírusoldatokat tízszeresére hígítottuk és $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ polybrane (Sigma-Alrich) jelenlétében 0, 5, 10, 50, 100, 500 μl vírus térfogatokkal fertőztük a sejtenyészeteket (4. 2. 4. 2. ábra). A fertőzött kultúrákat 72 órán keresztül a megszokott módon tovább növesztettük. Fertőzést követően a virionok bejutnak a célsejtekbe és a reverz transzkripciót követően a vírusgenom az LTR szekvenciák és az integráz enzim segítségével random módon (általában nem kitüntetett pozícióknál) integrálódik a genomba. A molekuláris géntranszferre használt retrovirális vektorok nem tartalmazzák a provírus aktiválódását, kivágódását és multiplikációját biztosító géneket, így a létrehozott transzgenikus sejtvonalak biztonságosan felhasználhatók molekuláris genetikai és sejtbiológiai vizsgálatokra [163]. Hetvenkét óra elteltével a sejteket feltripszinezttük, a kultúra egyharmadát fixáltuk majd a célgének expresszióját áramlási citometria segítségével detektáltuk (lásd 4. 2. 4. 4. fejezet).

A vírusfertőzési folyamat végeredményeként, a két különböző genomú virion populációnak, valamint a növekvő vírusoldat térfogatoknak megfelelő számú transzgenikus HEK293 sejtvonalat állítottunk elő, ezek a következők: $_{HEK}eGFP/0$, /5, /10, /50, /100, /500, valamint $_{HEK}UDE^{WT}$ -eGFP/0, /5, /10, /50, /100, /500.

4. 2. 4. 4. Áramlási citometria és vírustiter meghatározása

A célsejtek fertőzését követően a vírustiterek meghatározására kerültek. A meghatározáshoz a különböző vírusoldat-térfogattal fertőzött HEK293 sejteket tripszinnel leválasztottuk és 3% paraformaldehidben fixáltuk.



4. 2. 4. 2. ábra. A $HEK293T$ $HEK293T$ -eGFP transzgenikus sejt vonal létrehozásának mechanizmusa. A $HEK293T$ -eGFP transzgenikus sejt vonal létrehozásának első lépése a $pSew-ude^{WT}-egfp$ lentivirális DNS-konstrukció elkészítése molekuláris klónozással. Majd ezt követi az $vgUDE^{WT}-eGFP$ genomú lentivirionok megtermeltetése HEK-293T pakolósejtekkel.

Tehát a célgént tartalmazó lentivirális vektort és a segédvektorokat (plazmid-1, -2, -3) szimultán transzfekeció útján juttatjuk a HEK-293T pakolósejtekbe. Az említett sejtek a virionok összeszerelődését biztosítják. A segédvektorok a virionok burok-, szerkezeti- és egyéb fontos fehérjéit (integráz, reverz transzkriptáz, proteáz) kódolják, míg a lentivirális vektor célgént tartalmazó része a vírus genomot biztosítja és így lehetővé teszi az egyirányú géntranszferet a HEK293 célsejtekbe. Az összeszerelődött és transzdukcióra alkalmas $vgUDE^{WT}-eGFP$ genomú virionok exocitózissal jutnak ki a pakolósejtből és osztódó sejtek irányában erőteljesen virulensek. A HEK293 célsejtek vírusfertőzését, valamint transzdukcióját követően a vírus genom irreverzibilisen integrálódik a humán genomba és ott konstitutívan expresszál. A fluoreszcens $UDE^{WT}-eGFP$ proteint expresszáló $HEK293T$ -eGFP sejtek áramlási citometria segítségével vizsgálhatók, valamint dúsíthatók, vagyis eGFP pozitívitás alapján koncentrálnak sejt-szortolással. Az így létrehozott homogén $HEK293T$ -eGFP transzgenikus sejt kultúrák már hatékonyan felhasználhatók sejtbiológiai vizsgálatokban.

Mivel a lentivirális vektorgyártók által az eredeti vírus genom molekuláris módszerekkel négy különböző vektorban lett elhelyezve (harmadik generációs lentivirus vektorok esetében), valamint a patogénitáért felelős néhány gén eltávolításra került, így a célsejtek genomjába integrálódott vírus-DNS, mint provírus (ami valójában nem más, mint a promotérral ellátott célgén) kivágódásra és replikációra képtelen. Ezért, a jelen típusú virális transzdukcióval előállított transzgenikus $HEK293T$ -eGFP sejt vonalnak biztonsággal használható molekuláris sejtbiológiai vizsgálatokra [163].

A sejteket centrifugálást követően 500 μ l PBS-pufferben felfuszpendáltuk, majd a minták eGFP pozitívitasát és intenzitását áramlási citométerrel (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA) detektáltuk. A vírus titer meghatározásának alapját az adta, hogy a fertőzésre használt vírusoldat térfogata egyenes arányban van a

sejtgenomba integrálódott ép vírusgenom kópia számával, valamint a sikeresen transzlálódó eGFP riporter és UDE^{WT}-eGFP fúziós protein mennyiségével, vagyis a fluoreszcencia intenzitással. A virulenciát a következő módon számolhatjuk ki: sejtszám/felhasznált vírus mennyisége x pozitív sejtek %-a /100 = víruserősség TU/ml (transzdukciós unit/ml) [129].

A fertőzéssel létrehozott sejtvonalakat fenntartottuk, felszaporítottuk, majd 240 óra elteltével a minták jelintenzitását ismét megmértük. A kísérleti elgondolásainknak megfelelő jelintenzitású sejtvonalakat (_{HEK}eGFP/5 és _{HEK}UDE^{WT}-eGFP/500) felszaporítottuk majd a sejteket eGFP pozitívitas alapján több alkalommal szétválogattuk (sejt-szortolással, lásd 4. 2. 4. 2. ábra) a FACSAria (Becton Dickinson, San Jose, CA) készüléken. Az így létrejött homogén sejtkultúrák koncentráltan tartalmazták az _{HEK}eGFP/5 és _{HEK}UDE^{WT}-eGFP/500 pozitív sejteket.

4. 2. 4. 5. Transzgenikus sejtvonalak vizsgálata konfokális mikroszkópia segítségével

A _{HEK}eGFP/5 és _{HEK}UDE^{WT}-eGFP/500 transzgenikus sejtvonalak sejt-szortolással előállított homogén populációját az eGFP fluoreszcens fehérje gerjesztésével konfokális mikroszkópia segítségével a 4. 2. 3. 2. 6. fejezetben leírtak szerint tanulmányoztuk.

4. 2. 5. A humán dUTPáz és timidilát kináz RNS interferenciás csendesítésével összefüggő módszerek leírása

4. 2. 5. 1. RNS interferencia vektor-konstrukciók előállítása

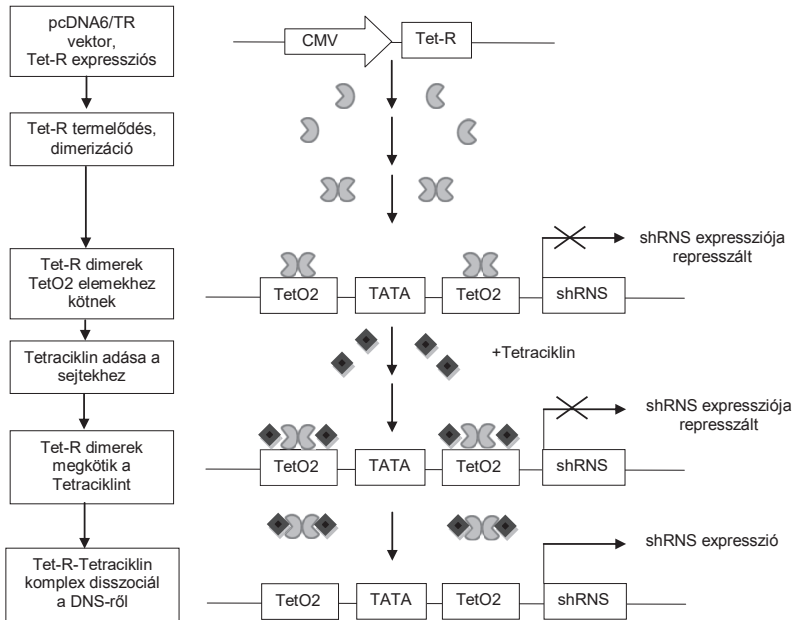
A humán dUTPáz gén nukleáris és mitokondriális izoformáinak (DUT-N, DUT-M) RNS interferenciával (RNSi) történő csendesítésére a vektor alapú pSuperior indukálható RNSi rendszert- (www.oligoengine.com), míg a TYMK gén csendesítésére szintén, egy vektor alapú RNSi indukálható rendszert a BLOCK-iT™ H1 RNAi Entry rendszert (www.invitrogen.com) alkalmaztuk. A vektor alapú indukálható RNSi előnye, hogy a vektor biztosította antibiotikum rezisztencia kihasználásával stabil sejtvonalak hozhatók létre, továbbá a vektorba beépített indukálható elemek segítségével az RNSi jelensége induktor-függő módon szabályozható olyan sejtekben, ahol a transzaktivátor (vagy transzrepresszor) konstitutív expressziója biztosított.

A rendszer további előnye, hogy a vektorról termelődő shRNS-ek (short hairpin RNS) stabil állapotban jutnak el termelődésük helyéről (nukleusz) a citoplazmába, ahol az RNSi hatás érvényesül.

A *pSuperior.puro* (*pSup.p*) és a *pEntr-H1-TO* (*pEntr*) vektorok emlős H1 promótere un. TetO2 (Tet-operátor-2 szekvencia) kötőhelyet tartalmaz, lehetővé téve a tetraciklin (esetünkben induktor) általi szabályozhatóságot Tet-represszort (esetünkben transzmodulátor) konstitutív módon termelő sejtekben (esetünkben a T-REx™-HeLa). Az általunk használt rendszer regulálhatóságának lényege, eltérően a hagyományos Tet-rendszerektől [131-134], hogy tetraciklin hiányában a TetO2 kötőhelyek telítettek, vagyis a H1 promóter ezen szakaszához Tet-R dimerek - valójában itt, mint tényleges represszorok – kötnek, fizikai akadályt képezve a promóterről meginduló transzkripció apparátusnak. Tetraciklin adására a dimerek megkötik az antibiotikumot. Ennek hatására DNS kötési affinitásuk megszűnik, disszociálnak a DNS-ről és így a H1 promóter szabaddá válik a transzkripció számára. Tehát az RNSi rendszer bekapcsolt állapotba kerül és megkezdődik a shRNS-ek átírása az RNSi-ás expressziós kazettáról [134-135] (4. 2. 5. 1. ábra).

Kísérleti rendszerünkben az RNSi támadáspontjait jelentő célszekvenciák kiválasztása részben megelőző tanulmányokon alapult [97, 136-137]. A DUT gén esetében kettő, míg a TYMK gén esetében egy célszekvenciát adoptáltunk irodalmi forrásokból. A további célszekvenciák meghatározását és az elméleti oligonukleotid tervezést az alapvető szabályszerűségek figyelembevételével végeztük (http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html). A potenciális célszekvenciák esetleges homológjainak nemlétéről a BLAST program használatával győződünk meg. Így elkerültük az esetleges aspecifikus interferenciahatást (off-targetek megjelenését).

A kiválasztott célszekvenciákat, és pozícióikat a csendesítendő gén kódoló régiójában, valamint az elkészített RNSi vektor-konstrukciókat a 4. 2. 5. 1. táblázat foglalja össze. A konstrukciók elkészítéséhez hibridizált, vagyis kettős szálú szintetizált oligonukleotidokat használtunk fel, amelyek mindegyike tartalmazta a neki megfelelő célszekvenciát értelmes (sense; 5'-3') irányban, ezt követően a kilenc nukleotidból álló hurok(loop)-szekvenciát (5'-TTCAAGAGA-3'), amelyet a célszekvencia ellenértelmű (antisense; 3'-5') olvasata követett.



4. 2. 5. 1. ábra. A tetraciklin regulálható RNSi rendszer működési elve. T-Rex™-HeLa sejtekben a pcDNA6/TR expressziós vektor CMV (citomegalovírus) promotere a Tet represszor (Tet-R) konstitutív expresszióját biztosítja. A sejtekbe transzfektált indukálható RNSi vektor-konstrukció (jelen példaként a *pEntr-H1-TO* vektor szerepel) - amelynek expressziós kazettája a kívánt gén csendesítéséért felül oligonukleotidot tartalmazza - tetraciklin hiányában represszált állapotban van. A termelőző Tet-R fehérjék homodimereket képeznek és nagy affinitással kötődnek a H1 promóter TATA-régióját közrefogó TetO2 DNS szekvencia szakaszokhoz, fizikai gátat képezve az expressziós kazettán meginduló transzkripció folyamatnak. A sejtek tetraciklin kezelését követően a Tet-R homodimerek megkötik a tetraciklint, elveszítik DNS-kötő affinitásukat és ledisszociálnak a H1 promóter TetO2 kötőhelyeiről. A folyamat az RNSi rendszer bekapcsolását eredményezi. A represszió alól felszabadult expressziós kazettáról megindul a shRNS-ek átírása majd megkezdődik az RNSi hatás [134-135].

Az egyes szálú oligonukleotidok hibridizálását ún. hibridizálási reakcióban végeztük (www.oliogoengine.com; www.invitrogen.com). A *pEntr* vektor esetében a duplaszálú oligonukleotidok inszertálásának megkönnyítése érdekében az ún. felső (top) oligonukleotid szál 5'-ős végére -, valamint az ún. alsó (bottom) oligonukleotid szál 5'-ős végére kiegészítő szekvenciákat (5'-CACC-3', 5'-AAAA-3'; értelemszerűen) terveztünk, mivel ezen szekvenciák komplementerét tartalmazták a gyártó által linearizált *pEntr* vektor szabadvégek. A *pSup.p* vektor esetében a duplaszálú oligonukleotidok beillesztése érdekében a felső oligonukleotid szál 5'-ős végére egy inkomplett Bgl II szekvenciát (5'-GATCTCC-3') -, míg az alsó oligonukleotid szál 5'-ős végére egy inkomplett Hind III (5'-AGCTTAAAAA-3') restrikciós endonukleáz felismerő szekvenciát (*dólt betűvel* jelölve)

tervezünk, a vektorgyártó utasítása szerint. Az inszertálás érdekében a *pSup.p* vektort az említett restriktációs endonukleázokkal linearizáltuk. Majd, mindkét konstrukció esetében a vektor-, inszert DNS szabad végeket egy ligálási reakcióban kovalensen zártuk.

Összefoglalva: a humán DUT gén RNSi-val történő csendesítéséhez négy különböző támadási pozícióban ható, négy különböző vektor-konstrukciót (*pSup.p-200*, *pSup.p-230*, *pSup.p-350*, *pSup.p-413*) -, míg a TYMK gén esetében egy pozícióban gátló (*pEntr-509*) vektor-konstrukciót hoztunk létre. A továbbiakban egy negatív kontrollként használt vektor-konstrukciót (*pEntr-sc*) is készítettünk, amely egy randomizált (scrambled) DUT célszekvenciát tartalmaz, a humán genomban fellelhető potenciális homológ szekvencia nélkül (4. 2. 5. 1. táblázat).

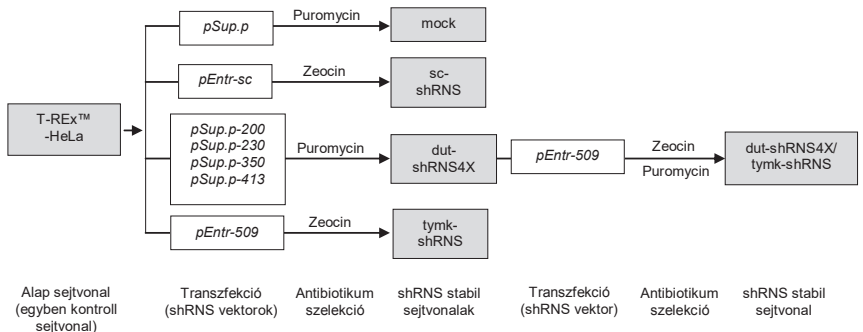
4. 2. 5. 1. táblázat. Az RNSi kísérletekben alkalmazott shRNS-vektor-konstrukciók összefoglalása. A DUT és TYMK gének csendesítésére felhasznált konstrukciókat és az shRNS oligók támadáspontjait jelentő célszekvenciákat foglalja össze a táblázat. A DUT gén csendesítéséhez négy-, a TYMK gén csendesítéséhez egy vektor-konstrukciót hoztunk létre. Kontroll konstrukcióként a *pEntr-sc* (és a *pSup.p* – nincs feltüntetve) vektort alkalmaztuk.

shRNS-vektor-konstrukciók			
cél gén	elnevezés	cél szekvencia	
		pozíció a cDNSe-n (5'-3')	szekvencia (sense, 5'-3')
kontroll	<i>pEntr-sc</i>	-	gaacctgggtgcaacgtata
	<i>pSup.p-200</i>	200-219	taccacctatggagaaagc
	<i>pSup.p-230</i>	230-249	cggacattcagatagcgct
DUT	<i>pSup.p-350</i>	350-369	aatgttggtgtgtgactgt
	<i>pSup.p-413</i>	413-432	ttgcacagctcaatttcgca
TYMK	<i>pEntr-509</i>	509-527	agacacgactttgaactgg

4. 2. 5. 2. Stabilan transzfektált sejtvonalak előállítás

Az exponenciális fázisban növényő sejteket a transzfekciót megelőzően 5×10^4 sejt/férőhely denzitásban 24-férőhelyes tenyésztő tálcára helyeztük. A letapadást követő 24. órában a tápoldatot transzfekciós médiumra (médium + DNS-Lipofectamin™2000 komplex) cseréltük le. A DNS-Lipofectamin™2000 komplexek kialakítására 4 µg DNS-t (RNSi vektor-konstrukciók) és 10 µl Lipofectamin™2000 reagenst használtunk fel minden egyes egyedi transzfekciós eseményben. A folyamat kivitelezését a reagenst gyártó/forgalmazó leírása szerint hajtottuk végre (www.invitrogen.com). A dUTPáz csendesített sejtvonal létrehozásához a *pSup.p-200*, *-230*, *-350*, *-413* vektor-konstrukciók 1:1:1:1 arányú keverékét használtuk fel egy transzfekciós eseményre, azaz vektor-konstrukcióként 1 µg DNS-t. A TYMK csendesített sejtvonal kialakításához a *pEntr-509*

vektor-konstrukciót önmagában alkalmaztuk. A kontroll sejtvonalak előállítására érdekében az üres *pSup.p* alapvektort és a *pEntr-sc* vektor-konstrukciót szintén önmagukban, egyedi transzfekeiós eseményekben használtuk fel. A transzfekeiót követő 24. órában a transzfekeiós médiumot lecseréltük normál-táplódatra és a kultúrákat a szokványos módon növesztettük tovább. Majd 24 óra elteltével a médiumot ismét lecseréltük és kiegészítettük az adott rezisztenciagénnek megfelelő antibiotikummal. A különböző antibiotikumok optimális, szelekcióra alkalmas koncentrációját előzetesen a sejtvonala antibiotikum tolerancia-küszöbéhez igazítottuk a sejtvonala forgalmazó javaslatai szerint.



4. 2. 5. 2. ábra. Az shRNS-stabil sejtvonala létrehozásának folyamata. A T-REx™-HeLa sejtvonala a feltüntetett vektor-konstrukciókkal transzfekeiáltuk. A mock és az sc-shRNS kontroll sejtvonala-, valamint a tymk-shRNS sejtvonala létrehozásának céljából a feltüntetett vektor-konstrukciókat (*pSup.p*, *pEntr-sc*, *pEntr-509*) egyedi transzfekeiós eseményekben használtuk fel. A dUTPáz géncsendesítésére egy transzfekeiós eseményben négy különböző vektor-konstrukciót (*pSup.p-200*, *-230*, *-350*, *-413*) alkalmaztunk. A megfelelő antibiotikummal k szelektált shRNS-stabil sejtvonala közül a dut-shRNS4X sejteket további transzfekeiós (*pEntr-509*) és antibiotikum szelekciós folyamatoknak vetettük alá, amelynek eredményeként létrehoztuk a dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonala. Az említett sejtvonala a dUTPáz és TYMK gének együttes csendesítésének fiziológiai hatása vizsgálható.

A mintegy 3-5 hétig tartó szelekciós folyamat négy különböző un. shRNS-stabil sejtvonala eredményezett (4. 2. 5. 2. ábra). A mock kontroll sejtvonala 0,8 µg/ml puromycin-, a sc-shRNS kontroll sejtvonala 150 µg/ml zeocin-, a dUTPáz csendesített dut-shRNA4X sejtvonala 0,9 µg/ml puromycin- és a TYMK csendesített tymk-shRNA sejtvonala 150 µg/ml zeocin antibiotikum jelenlétében sikerült k szelektálnunk. Majd a későbbiekben, felhasználva a dut-shRNA4X stabil sejtvonala és a *pEntr-509* vektor-konstrukciót, egy újabb transzfekeiós folyamatot követően a dut-shRNA4X/tymk-shRNA sejtvonala sikerült k szelektáltuk 150 µg/ml zeocin és a már meglévő 0,9 µg/ml puromycin jelenlétében. Ez utóbbi shRNS-stabil sejtvonala a DUT és TYMK gének szimultán csendesítése valószínű meg (4. 2. 5. 2. ábra).

4. 2. 5. 3. RNS izolálás és reverz transzkripció

A totál RNS kivonáshoz az exponenciális fázisú sejteket 5×10^5 - 1×10^6 denzitásban növesztettem. Az RNS izolálást az RNeasy® Plus Mini Kit segítségével végeztem a gyártó útmutatása szerint (www.qiagen.com). A DNS-mentes, totál RNS minták minőségi és mennyiségi ellenőrzését (A_{260nm}/A_{280nm} hányados 1.9-2.0 értéket tekintettem optimálisnak) a ND-1000 UV-Vis Spektrofotométer (Thermo Scientific) segítségével végeztem el. Egy μg totál RNS-t használtam fel egy reverz transzkripció reakcióban ($V_{\text{vég}} = 50 \mu\text{l}$), amely a következő komponensekből állt: 1 unit M-MuLV reverz transzkriptáz, 25 ng oligo T_{18} primer, 0.5 unit RiboLock RNáz Inhibitor, 1 mM dNTP mix és reakció puffer (összetételét lásd: www.fermentas.com). Az RNS és az oligo T_{18} komponensből álló mixet 65°C -on 5 percig hő-kezeltem majd az elegyet azonnal jégen lehűtöttem és kiegészítettem a reakció további komponenseinek mixével (enzim, inhibitor, dNTP, puffer). A reakció elegyet 5 percig szobahőn inkubáltam, majd a cDNS átírást 37°C -on egy órán keresztül végeztem. A reakciót követően az enzimet 75°C -on 10 percig hőinaktiváltam. A reakció elegyek azonos térfogatát használtam fel minden minta esetében a kvantitatív PCR vizsgálatok során.

4. 2. 5. 4. Kvantitatív PCR (Q-PCR)

Az RNSi-val csendesített gének (DUT és TYMK), valamint további gének (TK1, DCTD és TYMS) esetében a relatív génexpressziós arányok kvantitálásához Q-PCR rendszert alkalmaztam. A vizsgálathoz szükséges primer párokat a DNA STAR/Primer Select szoftver segítségével terveztem meg, különös figyelmet fordítva a Q-PCR primer tervezési szabályokra (www.ambion.com). A Q-PCR reakciókat az Mx3005P-QPCR rendszeren (Stratagene, Agilent Technologies)-, HPLC tisztított primerek- (Eurofins MWG GmbH), EvaGreen jelölőfesték- és ImmoMix reakciómix (Bioline) felhasználásával kiviteleztem. A 4. 2. 5. 4. táblázat részletesen összefoglalja a Q-PCR vizsgálatok során felhasznált primer szekvenciákat.

A Q-PCR reakcióhatékonysága minden primer pár (következésképp minden ampikon) esetében optimalizálásra került. A kontroll sejtekből származó cDNS templátból hígítási, vagyis standard sorozatot készítettem, majd a minták mindegyikéből azonos térfogategységet használtam fel, mint templátot az egyedi Q-PCR reakciókban.

4. 2. 5. 4. táblázat. Kvantitatív PCR primerek összefoglalása. A táblázat az shRNS-stabil sejtvonalak DUT, TK1, DCTD, TYMK és TYMS gének relatív expressziós arányainak kvantitatív PCR alapú meghatározásához tervezett primer párokat és azok szekvenciáját foglalja össze. A GAPDH, mint belső kontroll gén (háztartási gén) szerepelt a Q-PCR kvantitálási vizsgálatokban.

vizsgált gén	Kvantitatív PCR primer párok	
	szekvencia	
	5'-ős (forward) 5'- 3'	3'-ős (reverse) 5'- 3'
GAPDH	gcgggggctctccagaacatcatc	gacgcctgcttcaccaccttcttg
DUT	tggaagagtggctccacgggt	ccgttcgcaaatgagctgtgc
TK1	tccgtcgtccagattgctcag	ctgccctcgtcgatgcctatg
DCTD	tcgaccgatgtgaaaggctgtag	caggagcctcgcagcagttg
TYMK	tccaccagctcatgaaagacacg	tgggcagcctgggtcacttc
TYMS	ggcagatccaacacatcctccg	caaaacacccttcagaacacacg

A Q-PCR reakcióhatékonysága minden primer pár esetében optimalizálásra került. A kontroll sejtekből származó cDNS templátból hígítási, vagyis standard sorozatot készítettem, majd a minták mindegyikből azonos térfogategységet használtam fel, mint templátot az egyedi Q-PCR reakciókban. Minden vizsgálni kívánt gén (target-gén) esetében az amplikonra nézve kalibrációs görbét készítettem. A kalibrációs egyenest úgy kaptam, hogy két parallel reakciósor eredményeként kapott Ct (threshold cycles: áttörési ciklusszámok) értékek átlagát a térfogat egységek (koncentrációk) logaritmusának függvényében ábrázoltam. Az illetett kalibrációs egyenesből kiszámolható volt az egyenes meredeksége, amely értéket az $E=10^{-1/\text{meredekség}}$ összefüggésben felhasználva, meghatároztam a Q-PCR reakcióhatékonyságot (E, amplifikációs hatékonyság). A minták standardizálása érdekében a GAPDH gént, mint endogén referencia gént használtam fel. A GAPDH egy konstitutív háztartási gén (referencia-gén), amelynek az expressziós értéke egyenesen aránylik a felhasznált sejtmennyiséggel vagy a reakciókban felhasznált templát térfogatával. Azonos templát esetében a mért génexpressziókat a GAPDH génexpresszióhoz viszonyítottam (normalizáltam). A csendesített sejtvonalakban mért normalizált génexpressziós változásokat a nem transzfektált alap sejtvonala, azaz a kalibrátor sejtvonala normalizált génexpressziós értékeihez, mint kalibrátor értékekhez viszonyítottam. A kalibrátorban mért expresszió szinteket 1 (100%) értékben határoztam meg. A relatív génexpressziós arányokat komparatív Ct-metodika ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) alapján állapítottam meg (1. és 2. egyenlet) [138].

$$\text{Relatív génexpresszió} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad 1.$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = [(Ct_{\text{target-gén}} - Ct_{\text{ref. gén}})_{\text{shRNS sejt.v.}} - (Ct_{\text{target-gén}} - Ct_{\text{ref. gén}})_{\text{kontroll sejt.v.}}] \quad 2.$$

Az 1. egyenlet teljes formáját a 2. egyenlet szemlélteti, amiben a $Ct_{\text{target-gén}}$ = a target-génre vonatkozó Ct érték; $Ct_{\text{ref. gén}}$ = referencia génre vonatkozó Ct érték; shRNS sejt.v. = RNSi-val csendesített shRNS-stabil sejtvonala; kontroll sejt.v. = kontroll, kalibrátor sejtvonala.

Az 1. egyenlet csak abban esetben használható relatív génexpressziós arány meghatározásához, ha a Q-PCR amplifikációs hatékonysága eléri a 100%-os értéket a target-gén és a referencia-gén esetében is. A pontatlanság elkerülése érdekében ezért a 2. egyenlet helyett a 3. egyenletet használtam a relatív arányok meghatározásához. A 3. egyenlet figyelembe veszi az egyes amplikonok esetében elért Q-PCR reakcióhatékonyságot is [139].

$$\text{Relatív expresszió} = \frac{(E_{\text{target gén}})^{\Delta Ct (\text{kontroll sejt.v.} - \text{shRNS sejt.v.})}}{(E_{\text{ref. gén}})^{\Delta Ct (\text{kontroll sejt.v.} - \text{shRNS sejt.v.})}} \quad 3.$$

Az egyes target-gének esetében a kiszámolt relatív expressziós arány egy n-szeres különbséget jelent a kalibrátornál megállapított értékhez képest.

A Q-PCR reakció a következő lépésekből állt: első denaturálási lépés 95 °C - 10 perc, majd 95 °C - 30 mp, 60 °C - 30 mp, 75 °C - 30 mp (az utóbbi három lépés, mint egy ciklus 40-szer ismétlődött). A kvantitatív kísérletsorozat minden gén esetében paralel biológiai preparátumon és triplikált reakciókban volt elvégezve. Az adatok gyűjtése és kvantitatív analízise az MxPro QPCR (Stratagene, Agilent Technologies) és OriginPro 7.5 (www.OriginLab.com) szoftverek segítségével történt. Szignifikáns génexpressziós változásokat a csendesített- és a sc-shRNS sejtvonala értékei között állapítottam meg. Szignifikáns összefüggéseket az un. kétfarkú student-t teszt segítségével határoztam meg. Szignifikáns különbségnek a $p < 0,05$ értéktartományt állapítottam meg.

4. 2. 5. 5. dUTPáz anti-szérum előállítása

A komerciális humán dUTPáz ellenanyagokkal szerzett negatív tapasztalatok révén, anti- dUTPáz szérum előállítása történt az ELTE Immunológiai Tanszékén Prof. Dr. Erdei Anna vezetésével. Az anti-szérum előállításának menete a már korábban leírtak szerint történt [140-141].

4. 2. 5. 6. Fehérjék immunoblot analízise

Totál fehérje izoláláshoz az exponenciális fázisú sejteket $1-3 \times 10^6$ denzitásban növesztettem, majd a sejteket tripszinezését követően PBS-pufferrel mostam. A lecentrifugált sejtszuszpenziót jéghideg lízis-pufferben [50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 1 mM DTT (ditiotritol)] 10 perces inkubációs idő alatt feltártam. A lizátumot 15 percig 4°C -on 12.000 rpm fordulattal centrifugáltam. A felülúszó (totál fehérje extraktum) koncentrációját BSA kalibrációs egyenes és Bradford-reagens (Bio-Rad Protein Assay reagent (Bio-Rad)) segítségével a gyártó által leírt protokoll szerint határoztam meg. A fehérjeminták 25 μg mennyiségét 15%-os SDS-poliakrilamid gélen, vertikális elektroforézissel molekulatömeg szerint szeparáltam, majd a fehérjéket fél-száraz (semi-dry) blottoló készülék (BioRad) és transzfer-puffer (25 mM Tris base, 0.2 M glycine, 20% (v/v) metanol) segítségével PVDF membránra (Immobilon-P, Millipore) vittem át. A membránt a 35 kDa-os pozíció mentén vízszintes irányban két részre vágtam. A membránokon lévő proteinmentes, szabad helyeket TBS blokkoló-pufferrel (TBS, 0,05% Tween-20, 5% sovány tejpor, pH 8,0) 60 perc időtartam alatt lefedtem.

Az eredeti membrán 35-kDa feletti része egér anti- α -tubulin monoklonális ellenanyaggal- (Sigma-Aldrich, hígítási arány: 1:5.000), míg a membrán alsó része anti-dUTPáz egér szérummal (hígítási arány: 1:50.000) került inkubálásra 60 percen keresztül TBS blokkoló-pufferben. Az immunreakciókat követően a membránokat TBS-Tween pufferrel (TBS, 0,05 % Tween-20, pH 8,0) háromszor tíz percig mostam. Majd a membránokat torma peroxidáz (HRP: horseradish peroxidase) konjugált másodlagos antitestekkel reagáltattam 60 percen keresztül TBS blokkoló-pufferben. Az α -tubulin esetében anti-egér IgG-HRP (Sigma-Aldrich, hígítási arány: 1:5.000), míg a dUTPáz esetében anti-nyúl IgG-HRP (Amersham Pharmacia Biotech, hígítási arány: 1:5.000) szekunder antitesteket alkalmaztam. A másodlagos immunreakciót követően a membránokat háromszor 10 percig TBS-Tween pufferrel mostam. A membránokon létrejött ún. immunreaktív komplexeket kemilumineszcencia segítségével (ECL-reagent I-II.: enhanced chemiluminescence reagent I-II.; Amersham Pharmacia Biotech) röntgen filmen megjelenítettem.

4. 2. 5. 7. Sejtvonalak citotoxicitási vizsgálata

Az shRNS-stabil sejtvonalak életképességét és drogokkal szembeni érzékenységét az AlamarBlue™ Cell Viability Assay Kit (Biotium, Inc.) felhasználásával vizsgáltam. Exponenciális fázisban növekvő sejteket a tripszines felszedést követően azonos sejtszámban (2000 sejt/lyuk) 96-lyukú tenyésztő tálcán a kísérleti körülményeknek megfelelően helyeztem el. A sejtek 5FU és FUDR dóziszfüggő érzékenységének vizsgálata céljából, huszonnégy órával a letapadást követően a tápfolyadékot növekvő koncentrációjú 5FU és FUDR tartalmú médiumra cseréltem le. A koncentráció gradiens az 5FU drog esetében 0-250 μM , míg az FUDR drog esetében 0-500 μM közötti tartományban változott fix koncentráció pontok részvételével. Az RNSi bekapcsolása érdekében 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetraciklinnel egészítettem ki a médiumot. A drogkezelés időtartama 72 óra volt. A sejtek 5FU, FUDR és VP-16 érzékenységének időfüggését is tanulmányoztam. Ebben az esetben meghatározott koncentrációjú drogokkal (30 μM 5FU, 30 μM FUDR, 30 μM VP-16) különböző inkubációs időintervallumokig (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) kezeltem a sejteket tetraciklin jelenlétében. A megfelelő inkubációs időtartamok lejártával a médiumot AlamarBlue reagenssel egészítettem ki (10% (v/v)) és 4 órán át inkubáltam a sejteket. A kifejlődő fluoreszcencia intenzitást 530 nm excitációs és 590 nm emissziós hullámhosszon a WallacVictor-2 plate reader (PerkinElmer) készüléken detektáltam.

A stabil sejtvonalak 5FU és FUDR drogokra adott koncentráció-függéseinek alapján az 50%-os növekedési gátláshoz szükséges koncentrációkat-, vagyis IC_{50} (μM) értékeket határoztam meg az adott drogokra vonatkozóan minden sejtvonal esetében. A sejtek százalékos életképességét a koncentráció gradiens logaritmusának függvényében ábrázoltam, majd nem-lineáris egyenes illesztéssel az Origin Lab 7.5 szoftver segítségével számoltam ki az IC_{50} (μM) értékeket. Minden drog esetében a mérések triplikátumban történtek és az átlagértékeket használtam fel a számításokhoz. A drogokat frissen, felhasználás előtt készítettem, majd a komplett médiumhoz kevertem. Az 5FU és a VP-16 koncentrátumok DMSO, míg az FUDR koncentrátum steril víz hozzáadásával készült. A DMSO koncentrációja <0.001% volt a tápoldatban, ami a sejtek normális fiziológiai működését nem zavarta. A teljes kísérletsorozatot többször megismételtem.

4. 2. 5. 8. Sejtek dTTP és dUTP készletének meghatározása

A shRNS-stabil sejtvonalak dNTP készletének tanulmányozása céljából exponenciális fázisú (1×10^6 denzitásban) sejt kultúrákat $1 \mu\text{g/ml}$ tetraciklin jelenlétében 72 órán át növesztettem, majd a sejteket előkészítettem a dNTP extraháláshoz. A mosott sejtcspadékokat $0,5 \text{ ml}$ jéghideg 60%-os metanolban 2 órán keresztül $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on extraháltam, majd 15-20 percig 13.000 rpm -en centrifugáltam. A felülúszót, amely a szolúbilis dNTP frakciót tartalmazta, vákuum-szárító (Eppendorf) segítségével $45 \text{ }^\circ\text{C}$ -on 40 perc alatt beszárítottam. A beszárított frakciót $50\text{-}100 \mu\text{l}$ nukleáz-mentes, steril tridesztillált vízben visszaoldottam és a felhasználásig $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltam.

A szabad dTTP koncentráció meghatározásához az irodalomban már jól ismert és gyakran alkalmazott enzimátikus eljárást alkalmaztam [142]. 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 pontos koncentráció értékek meghatározásához a dTTP nukleotid esetében kalibrációt végeztem. A kalibrációhoz egy koncentráció gradientet ($0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 15 \text{ pmol}/50 \mu\text{l}$) vettem fel, amely tartományba az extraktumban lévő kérdéses nukleotid koncentrációja illeszkedik.

A polimerizációs reakcióelegy ($50 \mu\text{l}$) a következő komponensekből állt: *Klenow* puffer (az összetételét lásd www.fermentas.com), $0,5$ unit exonukleáz-negatív *Klenow*-fragment (Fermentas), $0,25 \mu\text{M}$ dTTP/dUTP specifikus templát (5-TTATTATTATTATTAGCGGTGGAGCGG-3) és primer (5-CCGCCTCCACCGCC-3), $8 \mu\text{l}$ dNTP-extraktum, $2,5 \mu\text{M}$ [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] dATP ($1,5 \text{ Ci}/\text{mmol}$) (American Radiolabeled Chemicals, Inc.). A reakciókat $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on 45 percig inkubáltam, majd minden reakcióból $20 \mu\text{l}$ -t DE81 filter papírra (Sigma-Aldrich) csepegtettem és szobahőn teljesen beszárítottam. A be nem épült radioaktív nukleotidok minél hatékonyabb eltávolítása érdekében a filter papírokat 5%-os Na_2PO_4 oldattal- (3×10 percig), desztillált vízzel- (1×3 percig) és 96%-os etanollal (1×30 szekundumig) mostam. Az alapos mosást követően a filter papírokat ismételen beszárítottam, majd a minták radioaktivitását *Wallac* szcintillátor (PerkinElmer) segítségével meghatároztam.

A dUTP koncentráció meghatározását, szintén egy már korábban evolált módszer szerint hajtottam végre [97]. A módszer lényege, hogy adott sejtvonalból származó dNTP-extraktum azonos térfogathányadában jelenlévő dUTP nukleotidot *in vitro* rekombináns dUTPáz segítségével elbontjuk (előemésztés dUTPáz-zal), illetve a paralel mintában nem bontjuk el. Majd a két minta dTTP koncentrációját a fentiekben leírt módon meghatározzuk és a minták közötti $\Delta[dTTP]$ ($\Delta[dTTP] = [dTTP]_{nem\ kezelt} - [dTTP]_{dUTPáz\ kezelt} = [dUTP]$) értéket kiszámolva megkapjuk az érintett sejtekben jelen lévő dUTP koncentrációt. Az előemésztési reakció kivitelezésekor a beszárított dNTP-extraktumot emésztési pufferben (30 mM Tris-HCL, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) oldottam vissza, majd az elegyet 40 ng rekombináns dUTPáz-zal egészítettem ki és 37 °C-on 45 percig inkubáltam. A reakció végén az enzimet 60%-os metanollal precipitáltam, majd centrifugálást követően a felülúszót ismét beszárítottam és vízben visszaoldottam. A minták dTTP koncentráció meghatározását a fentiekben leírt módon végeztem. Minden reakciót hármas paralelben végeztem és a teljes kísérlet sorozatot megismételtem.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

5. 1. Uracil-DNS metabolizmusban résztvevő *Drosophila* fehérjék intracelluláris lokalizációjának vizsgálata*

5. 1. 1. Az UDE, a dUTPáz, a TDG és a SMUG1-homológ fehérjék *in silico* NLS predikciója PSORTII programmal

Az uracil-DNS metabolizmusban résztvevő UDE, dUTPáz, TDG és SMUG1-homológ fehérjék NLS predikciója céljából *in silico* szekvencia-analízisét végeztem a PSORTII program segítségével (5. 1. 1. 1. táblázat).

5. 1. 1. 1. táblázat. A *D. mel.* UDE, dUTPáz, TDG és SMUG1-homológ fehérjék *in silico* NLS-predikciója PSORTII programmal. A program által listázott prediktált NLS szekvencia-szakaszok kezdő pozícióját a zárójelben lévő számok jelzik.

<i>D. mel.</i> fehérje	UniProt azonosító (UniProtKB/TrEMBL)	ORF hossz	prediktált, putatív NLS szekvencia
UDE	Q961C	355 aa	KPKR (346) PKRK (347) KRKK (348) RKKK (349) KKKR (350) PEKRKQE (320) PKRKKKR (347)
dUTPáz	Q9V311	188 aa	PAAKMK (10) PKKR (711) RKKK (716) RKKH (760) KKKR (1088) RPKK (1093) PKKK (1141) KKKR (1142) RPPK (1147) PNNRKRQ (114) PMPKKRG (709) PKKRGRK (711) PKERKKH (757) PLEKKKR (1085) PKKIKGQ (1094) PKKKRGR (1141) PKKLPKA (1148)
TDG	Q9V4D8	1738 aa	
SMUG1-homológ	Q9VEM1	280 aa	-

* Az eredmények alapján született közleményt lásd: 8. *Közlemények* fejezet, a dolgozat témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények 1. cikk

A fehérjék szekvencia analízise során az UDE fehérje esetében két putatív pat7-típusú NLS szekvencia szakaszt (NLS1: ³²⁰PEKRRQE³²⁶ és NLS2: ³⁴⁷PKRKKKR³⁵³E), a dUTPáz esetében egy pat7-típusú NLS szekvenciát (¹⁰PAAKMK¹⁶ID), míg a TDG esetében feltűnő számú, eltérő hosszúságú és aminosav összetételű putatív NLS szakaszt sikerült azonosítani. A SMUG1-homológ fehérje esetében a program nem prediktált putatív NLS szekvencia szakaszt (5. 1. 1. 1. táblázat).

A dUTPáz esetében prediktált NLS szakasz a humán c-Myc fehérje NLS régiójával mutat nagyfokú szekvencia rokonságot. A TDG esetében prediktált NLS szakaszok közül a ⁷¹¹PKKRGRKKK⁷¹⁹ aminosav-kiterjedés feltűnő szekvencia homológiát mutat az SV40 T-ag NLS szekvenciájával, valamint az UDE fehérjénél talált NLS2 szekvenciával (5. 1. 1. 2. táblázat; lásd még a 2. 4. táblázatot). Mivel az SV40 T-ag NLS-e egy rendkívül potens nukleáris importot meghatározó szekvencia [114], ezért feltételezhető volt, hogy a TDG és az UDE esetében az említett aminosav-kiterjedések potenciális magi transzportot determináló mintázatok lehetnek. A TDG esetében az említett szekvencia szubcelluláris megjelenését kísérletesen (*in vitro* sejtkultúrában) nem tanulmányoztam.

5. 1. 1. 2. táblázat. A *D. mel.* UDE, dUTPáz és TDG fehérjék prediktált NLS szekvenciáinak összehasonlítása különböző eredetű fehérjék NLS szekvenciájával. A prediktált UDE NLS2 és a TDG (711)NLS szekvencia nagyfokú szekvencia homológiát mutat az SV40 T-ag, valamint a humán v-Jun, a humán dUTPáz és az élesztő H2B NLS szekvenciákkal. Míg a prediktált *D. mel.* dUTPáz NLS-e a humán c-Myc fehérje NLS szakaszával mutat nagyfokú szekvencia hasonlóságot. Továbbá, a dUTPáz NLS-e és a *Xenopus laevis* c-Myc NLS szekvenciája között, az előzőhöz képest kisebb mértékű, de jelentős szekvencia rokonság figyelhető meg.

Fehérje	NLS szekvencia
SV40 T-ag	PKKKRKV
UDE NLS2 <i>D. mel.</i>	PKRKKKR
UDE NLS1 <i>D. mel.</i>	PEKRRQE
TDG (711)NLS <i>D. mel.</i>	PKKRGRKKK
v-Jun <i>H. sapiens</i>	SKSRKRKL
dUTPáz <i>H. sapiens</i>	PSKRARP
H2B <i>S. cerevisiae</i>	GKKRSKV
c-Myc <i>H. sapiens</i>	PAAKRVKLD
dUTPáz <i>D. mel.</i>	PAAKMKID
c-Myc <i>X. laevis</i>	VSSKRAKLE
RanBP3 <i>H. sapiens</i>	PPVKRERTS

A SMUG1-homológ fehérje aminosav sorrendjében az eddig ismert NLS szekvenciákhoz homológ szekvencia szakaszt nem talált a PSORTII program. Ez utóbbi nem azt jelenti, hogy a fehérje szekvenciájában nem lehetnek potenciális, sejtmagi

lokalizációt determináló, azonban a tudomány számára még ismeretlen szakaszok. Megjegyzendő, hogy a fehérje molekulatömege (31 kDa) elméletileg még éppen lehetővé teszi a fehérje szabad penetrációját a nukleáris pórus komplexen keresztül a sejtmagba [111]. Ugyanakkor nincs kizárva annak a valószínűsége sem, hogy egy nukleáris fehérjével képzett komplexben juthat be az említett kompartmentbe. A SMUG1-homológ fehérje celluláris viselkedésének tanulmányozása nem volt célkitűzésünk, ezért azt experimentálisan nem vizsgáltam.

5. 1. 2. Az UDE fehérje celluláris lokalizációjának vizsgálata rovar és humán sejtben

5. 1. 2. 1. Az UDE^{WT} fehérje vizsgálata Sf9 sejtben

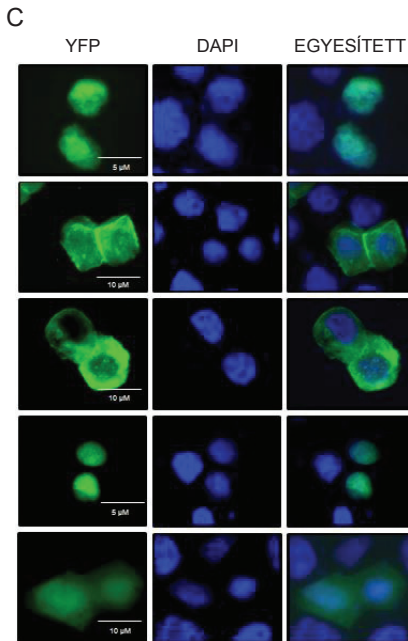
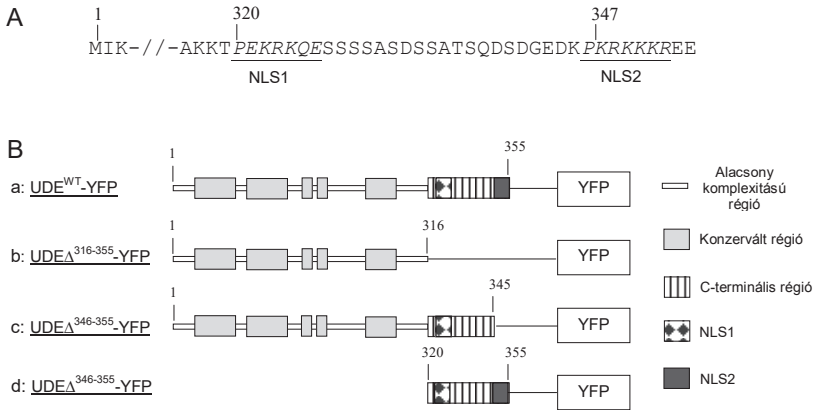
A teljes hosszúságú UDE (UDE^{WT}) fehérje adekvát nukleáris transzportja majd az ezt követő sejtmagi lokalizációja esszenciális fontosságú a fehérje uracil-DNS degradáló funkciójának ellátásához [57, 59]. Az *in silico* szekvencia analízis eredményét tekintve, két eltérő szekvenciájú, de részben hasonló aminosav összetételű putatív NLS szekvenciát tartalmaz az UDE fehérje. Mindkét prediktált szekvencia a fehérje C-terminális régiójában helyezkedik el. A két NLS-t egy 20 aminosavból álló szekvencia szakasz választja el egymástól, amelyben feltűnően magas arányban (20/9) fordul elő S aminosav. A fehérje C-terminálisának kezdeti szakaszánál elhelyezkedő első putatív NLS szekvencia (NLS1) a ³²⁰PEKRKQE³²⁶, amely pozitív és negatív karakterű aminosavakat egyaránt tartalmaz. Míg a fehérje C-terminálisának végső szakaszában található második feltételezett NLS (NLS2) szekvencia a ³⁴⁷PKRKKKR³⁵³E, amely feltűnően sok egymást követő, pozitív karakterű aminosavat tartalmaz (5. 1. 2. 1./A ábra). A két NLS régió szekvencia-kontextus béli közös vonása, hogy mindkét szakasz a neutrális P aminosavval kezdődik és az erősen savas karakterű E aminosavval zárul. A két prediktált szekvencia között található összekötő szakasz jelenléte felveti az NLS-ek közötti funkcionális összefüggés lehetőségét, vagyis egy bipartit NLS meglétét, jóllehet az irodalmi adatok által közölt bipartit NLS-ek linker régiója 8-15 aminosav kiterjedésű csupán [115]. Továbbá az NLS2 és az SV40 T-ag NLS-e közötti magas fokú szekvencia homológia az NLS2 szekvencia monopartit NLS voltát sejteti (5. 1. 2. táblázat). Azonban érdemes alaposabban szemügyre venni a *X. laevis* nukleoplazmin bipartit NLS-ének a linkert követő erősen bázikus szakaszát (KKKKLKD) (lásd még a 2. 4. táblázatot is).

Látható, hogy ez a szekvencia az NLS-konszenzus alapján önmagában is potenciális nukleáris importot determináló aminosav-kiterjedés lehet [115]. Jóllehet az említett bázikus aminosav-kiterjedést egy neutrális P aminosav közvetlenül nem előzi meg, de ugyanakkor a humán v-Jun, az élesztő H2B, valamint a *X. laevis* c-Myc fehérjék NLS szekvenciájában sem találjuk meg a kezdő P aminosavat, ennek ellenére erős bázikus karakterük révén funkcióképes monopartit NLS-ként viselkednek. Továbbá a tripartit és speciális NLS-ek funkcióképességét sem érdemes figyelmen kívül hagyni (5. 1. 1. 2. táblázat és lásd még a 2. 5. fejezetet is).

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk vajon az azonosított két NLS szakasz az UDE fehérje tényleges nukleáris transzlokációját determináló hatással rendelkezik-e – azaz potenciális sejtmagi lokalizációt okozó NLS szekvenciákról van-e szó –, az UDE^{WT} kódoló szekvenciát a YFP fehérje N-terminálisához konjugáltam, létrehozva egy fúziós fluorezcens fehérjét, amelynek szubcelluláris lokalizációját tranziens transzfekciót követően, fixált Sf9 rovarsejtekben fluorezcens mikroszkópia segítségével tanulmányoztam (5. 1. 2. 1./B ábra). A vizsgálati rendszerben kontroll fehérjeként a YFP fehérjét használtam, amely nem rendelkezik NLS szekvenciával, azonban molekulatömege (~27 kDa) révén passzív diffúzióval átjut a nukleáris póruson és ezáltal a citoplazma mellett a nukleuszban is egyaránt előfordul. Tehát a YFP szelektív magi transzportja csak potenciális NLS szekvenciát tartalmazó fehérjével történő fúzióban valósulhat meg.

A fluorezcens mikroszkópiás felvételek az UDE^{WT}-YFP riporter-konstrukció kompartment-szelektív transzportjáról, következésképpen kizárólagos sejtmagi lokalizációjáról tanúskodtak. A kontrollként használt YFP fehérje önmagában - a fent leírt okok következtében - mind citoplazmás, mind nukleáris lokalizáltságot mutatott, azaz eloszlása diffúz volt a citoplazma és a nukleusz egészét tekintve. (5. 1. 2. 1./C/a,e ábra)

Összegezve a tapasztaltakat, az UDE^{WT} fehérje sejt belüli lokalizációja az *in silico* predikció eredményétől vártan, szelektív és kizárólagos nukleáris preferenciát mutatott Sf9 sejtekben, amely lokalizáció nagy valószínűséggel a prediktált NLS1 és NLS2 szekvenciák aktív közreműködésének eredményeként valósulhatott meg. A jelen megfigyelés alátámasztja mindazon feltevéseket, amelyek szerint a fehérje funkcionális aktivitása a sejt nukleáris kompartmentjéhez köthető.



5. 1. 2. 1. ábra. Az UDE fehérje szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata Sf9 sejten I. (A) *In silico* szekvencia analízis segítségével két putatív NLS szekvenciát (NLS1 és NLS2) sikerült azonosítani az UDE fehérje C-terminális régiójában. A két szekvenciát egy 20 aminosavból álló szakasz köti össze, amelyben feltűnő arányban fordul elő S aminosav. (B) Az UDE fehérje különböző hosszúságú kódoló régiójának celluláris- és szubcelluláris lokalizációja YFP-riporter rendszer segítségével tanulmányoztam. A riporter-konstrukcióban az UDE fehérje különböző hosszúságú kódoló régiója a YFP fehérje N-terminálisához rekombináltam. A vizsgálatban használt riporter-konstrukciók a következők voltak: UDE^{WT}-YFP, UDE^{Δ316-355}-YFP, UDE^{Δ346-355}-YFP, UDE^{Δ1-319}-YFP). (C) A riporter-konstrukciók celluláris- és szubcelluláris lokalizációját Sf9 rovar sejtekben, fixált sejtpreparátumon fluoreszcens mikroszkópia segítségével tanulmányoztam. Az eredmény a következő volt: *a*, UDE^{WT}-YFP kizárólagos sejtmagi lokalizációjú; *b*, UDE^{Δ316-355}-YFP extra- nukleáris lokalizációjú; *c*, UDE^{Δ346-355}-YFP extra- nukleáris lokalizációjú; *d*, UDE^{Δ1-319}-YFP kizárólagos sejtmagi lokalizációjú; *e*, YFP diffúz eloszlású a citoplazma és a nukleusz egészét tekintve.

5. 1. 2. 2. Az UDE C-terminálásának vizsgálata deléciók mutagenézissel Sf9 sejtben

Fontosnak tartottam megvizsgálni, hogy vajon a prediktált NLS szekvenciák felelősek-e az előző fejezetben vizsgált UDE^{WT}-YFP riporter-konstrukció kizárólagos sejtmagi importjéért és az ezt követő nukleáris lokalizációjáért, a fehérje C-terminálásának sejtmagi transzportot determináló hatását YFP riporter-rendszerben tanulmányoztam. Elsőként különböző kiterjedésű, az NLS szekvenciákat alternálva érintő deléciókat hoztam létre a fehérje C-terminálisa mentén. Továbbá az önálló C-terminális fehérje fragment hatását is vizsgáltam. Az első, UDE $\Delta^{316-355}$ -YFP riporter-konstrukcióban a fehérje majdnem teljes C-terminálisa delécióra került beleértve mindkét putatív NLS szekvencia szakaszt. A második, UDE $\Delta^{346-355}$ -YFP riporter-konstrukció esetében a fehérje C-terminálásának utolsó tíz aminosavat tartalmazó része került delécióra beleértve a prediktált NLS2 szekvenciát is. A harmadik, UDE Δ^{1-319} -YFP riporter-konstrukció csak a fehérje C-terminálását tartalmazta (5. 1. 2. 1./B ábra). A riporter konstrukciók celluláris lokalizációját, transziens transzfekeiót követően, fixált Sf9 sejteken fluoreszcens mikroszkópia segítségével tanulmányoztam.

Az eredményeket tekintve, mindkét C-terminális deléció esetében a fehérje kizárólagos nukleáris lokalizációja teljes mértékben megszűnt (5. 1. 2. 1./C/b,c ábra). Az UDE $\Delta^{316-355}$ -YFP riporter-konstrukció extranukleáris lokalizációja bizonyítéka lehet az NLS1 vagy NLS2 vagy akár mindkét NLS szekvencia valós, nukleáris lokalizációt determináló hatásának. Azonban az UDE $\Delta^{346-355}$ -YFP riporter-konstrukció extranukleáris lokalizációja bizonyítéka annak, hogy a C-terminális utolsó tíz aminosavat tartalmazó szakasza, beleértve az NLS2 szekvenciát esszenciálisan fontos az UDE fehérje kizárólagos sejtmagi transzportjéért és lokalizációjáért. Továbbá az előbb említett megfigyelés azt a tényt is igazolja, miszerint az NLS1 szekvencia önmagában nem képes a riporter-konstrukciót a magba irányítani és a fúziós fehérje molekulatömegénél fogva kizáródik a nukleuszból. Jóllehet ezen észrevételek nem zárják ki annak a valószínűségét, hogy a két NLS között valamilyen mértékű funkcionális összefüggés lehetséges, akár egyfajta szinergizmus formájában, akár egyfajta szokatlan szerkezetű bipartit kapcsolat formájában [115-116, 119, 124]. A harmadik esetben az UDE Δ^{1-319} -YFP konstrukció rendkívül erős, egyértelmű kizárólagos magi lokalizációt mutatott, bizonyítva a C-terminális egyértelmű szerepét az UDE fehérje sejtmagi lokalizációját illetően.

Összefoglalásként elmondható, hogy a hat erősen bázikus- és egy neutrális aminosavból felépülő NLS2, ³⁴⁷PKRKKKR³⁵³E szekvencia jelenléte az UDE C-terminálásának

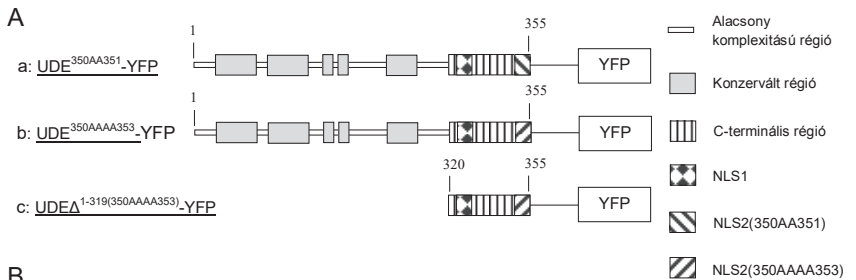
szekvenciájában nélkülözhetetlen fontosságú a fehérje exkluzív sejtmagi lokalizációját illetően.

5. 1. 2. 3. Az UDE NLS2 szekvenciájának karakterizálása irányított mutagenézissel Sf9 sejtben

Az UDE fehérje NLS2 szekvenciájában a kritikus fontosságú aminosavak azonosítása és az NLS2 szekvencia hatáserősségének tanulmányozása céljából, irányított mutagenézis segítségével aminosav cseréket hajtottam végre az említett szekvenciában. Az NLS szekvencia-vizsgálatoknál használt aminosav csere lényege, hogy kitüntetett helyen lévő, kémiai tulajdonság szempontjából lényeges aminosavakat irányított mutagenézissel kicserélünk, az említett tulajdonságot nem képviselő aminosavakra. Ez a gyakorlatban leggyakrabban a bázikus K és R aminosavak A aminosavra történő cseréjét jelenti. Mivel az NLS-ek importinokkal való kölcsönhatásában a pozitív töltéseket képviselő bázikus aminosavak jelenléte elengedhetetlen, ezért az NLS szekvenciában lévő R és K aminosavak fontossága egyértelműen igazolható, ha helyükre neutrális, töltéssel nem rendelkező A aminosavakat vezetünk be [121]. Továbbá relatíve kis molekulatömegű (≤ 30 kDa) fehérjék esetében a nukleáris importot determináló szekvencia szakasz erőssége (NLS-potenciálja) határozza meg a fehérje intracelluláris megjelenési mintázatát. Abban az esetben, ha a vizsgált fehérje egy konszenzuszserű, potens nukleáris importot determináló szekvenciát hordoz, az említett fehérje általában maradéktalanul akkumulálódik a nukleuszban. Ha a putatív NLS szekvencia kevésbé konszenzuszserű vagy aminosav cserék révén gyengített, akkor részlegesen vagy teljesen elégtelen lehet a protein magba történő irányításához és annak nukleáris feldúsításához.

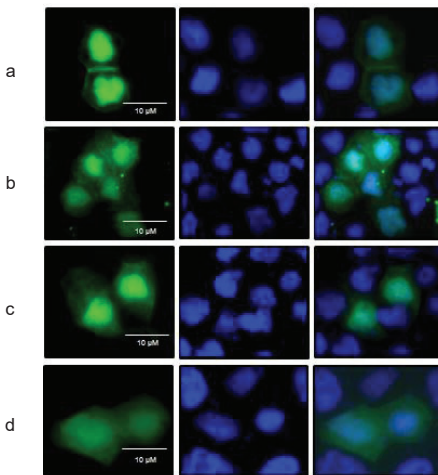
A korábbiakban tanulmányozott UDE^{WT}-YFP konstrukció szekvenciájába elsőként egy K350A/K351A kettős aminosav cserét-, majd további két K352A/R353A aminosav cserét vittem be irányított mutagenézissel. Továbbá a már szintén tanulmányozott UDE Δ^{1-319} -YFP konstrukció esetében egyszerre vittem be az előbb említett négy aminosavcserét (5. 1. 2. 3./A ábra). Az irányított mutagenézissel létrehozott UDE^{350AA351}-YFP és UDE^{350AAA353}-YFP, valamint az UDE $\Delta^{1-319(350AAA353)}$ -YFP riporter-konstrukciók intracelluláris lokalizációját tranziens transzfekciót követően, fixált Sf9 sejtekben tanulmányoztam. A vizsgálatokban a YFP fehérjét használtam kontroll fehérjeként.

A fluoreszcens mikroszkópiás eredmények szerint, a K350A/K351A kettős mutáció kismértékben megzavarta a kiindulási konstrukció exkluzív nukleáris lokalizációját, vagyis a fúziós fehérje szubcelluláris transzportja még mindig sejtmagi dominanciát mutatott enyhe citoplazmás beszűrődés mellett (5. 1. 2. 3./B/a ábra). Tehát annak ellenére, hogy a prediktált NLS2 szekvenciában (³⁴⁷PKRKKK³⁵³E) a K350A/K351A mutációk megtörték a bázikus aminosavak konszekutív sorrendjét, az eredményezett ³⁴⁷PKRAAKR³⁵³E szekvencia még mindig potenciális NLS funkciót betöltő determinánsnak bizonyult a vizsgált riporter-konstrukció esetében.



B

	YFP	DAPI	EGYESÍTETT
--	-----	------	------------



5. 1. 2. 3. ábra. Az UDE fehérje szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata Sf9 sejten II. (A)

Az UDE fehérje NLS2 szekvenciájában a nukleáris lokalizációtért felelős aminosavak azonosítása érdekében, irányított mutagenézissel egy K350A/K351A kettős aminosav cserét-, majd további két K352A/R353A aminosav cserét hajtottam végre. Az irányított mutagenézissel létrehozott riporter-konstrukciók a következők: $\text{UDE}^{350\text{AA}351}\text{-YFP}$, $\text{UDE}^{350\text{AAA}353}\text{-YFP}$, valamint $\text{UDE}\Delta^{1-319}(350\text{AAA}353)\text{-YFP}$. (B) A riporter-konstrukciók intracelluláris lokalizációját transziens transzfekcióval követően, fixált Sf9 sejtekben tanulmányoztam. Az eredmény a következő volt: a, $\text{UDE}^{350\text{AA}351}\text{-YFP}$ konstrukció domináns sejtmagi lokalizációjú enyhe citoplazmás beszűrődés mellett; b és c, $\text{UDE}^{350\text{AAA}353}\text{-YFP}$ és $\text{UDE}\Delta^{1-319}(350\text{AAA}353)\text{-YFP}$ részleges sejtmagi lokalizáció erőteljes citoplazmás megjelenés kíséretében; d, YFP diffúz eloszlása a sejten.

A K350A/K351A/K352A/R353A négyes mutációt tartalmazó $\text{UDE}^{350\text{AAA}353}\text{-YFP}$ konstrukció szubcelluláris lokalizációjának mintázata az előző konstrukcióhoz képest jelentősebb citoplazmás feldúsulást mutatott részleges magi lokalizáció kíséretében. (5.

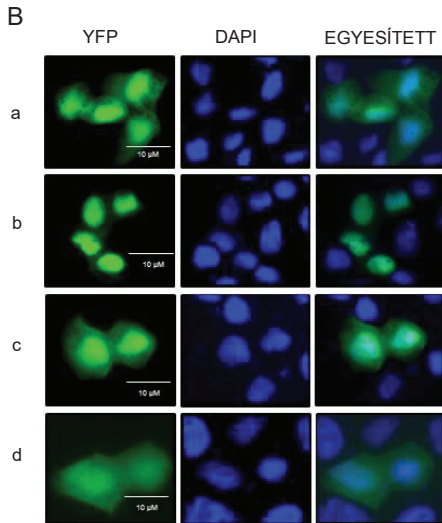
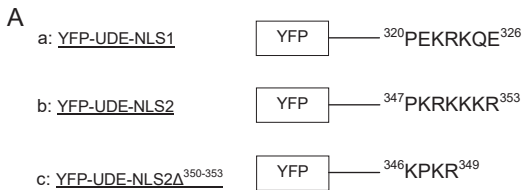
1. 2. 3./B/b ábra). Vagyis a négyes mutáció által létrehozott ³⁴⁷PKRAAAA³⁵³E szekvencia már nem volt alkalmas a fúziós fehérje kizárólagos nukleáris transzportjához. Ez utóbbi megfigyelés azt mutatja, hogy az NLS2 szekvenciában az erősen bázikus ³⁵⁰KKKR³⁵³ aminosav-kiterjedés jelenléte szükséges az UDE fehérje szelektív, kizárólagos magi transzlokációjához [120-123]. Továbbá az UDE $\Delta^{1-319(350\text{AAAA}353)}$ -YFP riporter konstrukció intracelluláris eloszlását tanulmányozva az UDE^{350AAAA353}-YFP konstrukció sejten belüli eloszlásával szinte majdnem megegyező eredmény volt tapasztalható (5. 1. 2. 3./B/c ábra).

Az elsőként vizsgált két riporter-konstrukció molekulatömege (~67 kDa) passzív nukleáris-penetrációt nem tesz lehetővé a fúziós fehérjék számára, tehát az UDE^{350AAAA353}-YFP konstrukció, ha részlegesen is, de csak is aktív, NLS-mediált transzporttal juthatott be a sejtmagba. A tapasztalt részleges magi lokalizációnak több magyarázható oka is lehet. Elsőként említendő, hogy az UDE^{WT} szekvencia *in silico* vizsgálata egy ³⁴⁶KPKR³⁴⁹ pat4 típusú putatív NLS szekvenciát is prediktált (5. 1. 1. 1. táblázat). Jóllehet ezen szekvencia a kezdő K aminosavat leszámítva az NLS2 szekvencia része, valamint a P aminosav szokatlan pozíciójával egy megtört bázikus kontextust alkot. Az eredmények szerint, mégis részlegesen potenciális NLS funkcióval bírhat. Másodsorban az NLS1 szekvencia erősítő hatása sem zárható ki egyértelműen. Erősítő hatást jelenthet egy viszonylag rövidebb szekvencia szakaszon belül előforduló erősen bázikus karakterű aminosavak alkotta dupletek vagy tripletek jelenléte [110, 112, 116]. Az alábbi vizsgálatok választ szolgáltattak az említett feltevésekre.

5. 1. 2. 4. Az UDE NLS1 és NLS2 szekvenciáinak vizsgálata Sf9 sejtben

A prediktált NLS szekvenciák nukleáris-import determináló hatását önálló, független szekvenciákként is vizsgáltam. Az NLS1, NLS2 és az NLS2 $\Delta^{350-353}$ szekvenciákat YFP riporter C-terminálisához konjugáltam, majd a fúziós fehérjék intracelluláris helyzetét tranziens transzfekciót követően, fixált Sf9 sejtpreparátumon, fluoreszcens mikroszkóp segítségével tanulmányoztam (5. 1. 2. 4./A ábra). A vizsgált YFP-UDE-NLS1, YFP-UDE-NLS2 és YFP-UDE-NLS2 $\Delta^{350-353}$ riporter-konstrukciók molekulatömege abban az értéktartományban van (~30 kDa), amely molekulaméret NLS hiányában még lehetővé teszi a fehérjék passzív diffúzióval történő sejtmagba lépését, tehát az itt megfigyelhető magi lokalizáció az NLS-funkció erősségének függvénye [116].

A fluoreszcens mikroszkópiás eredmények arról tanúsokdtak (5. 1. 2. 4./B ábra), hogy a YFP-NLS1 riporter-konstrukció inkább diffúzabb intracelluláris eloszlást mutatott, enyhe sejtmagi feldúsulással. A fúziós fehérje jelentős citoplazmás megjelenése egyértelmű bizonyítéka, hogy a ³²⁰PEKRRKQE³²⁶ szekvencia önmagában nem képes a YFP szelektív, kizárólagos sejtmagi transzlokációját előidézni, tehát ezen szekvencia esetben nem beszélhetünk egy potenciális monopartit NLS szekvenciáról, mint ez már korábban is sejthető volt (5. 1. 2. 2. fejezet). Az előző konstrukcióval ellentétben, a YFP-NLS2 szinte kizárólagos sejtmagi lokalizációt mutatott bizonyítva a ³⁴⁷PKRKKKR³⁵³E szekvencia valós, nukleáris transzlokációt meghatározó képességét.



5. 1. 2. 4. ábra. Az UDE fehérje szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata Sf9 sejtben III. (A) A prediktált NLS1 és NLS2 szekvenciák nukleáris lokalizációt determináló hatását önálló, független szekvenciaként is tanulmányoztam. Az NLS1, NLS2 és az NLS2Δ³⁵⁰⁻³⁵³ szekvenciákat a YFP riporter fehérje C-terminálisához rekombináltam. Az elkészített konstrukciók a következők voltak: YFP-UDE-NLS1, YFP-UDE-NLS2 és YFP-UDE-NLS2Δ³⁵⁰⁻³⁵³. (B) A fúziós fehérjék intracelluláris helyzetét, transziens transzfekciót követően, fixált Sf9 sejtpreparátumon, fluoreszcens mikroszkóp segítségével detektáltam. Az eredmények a következők voltak: a, a YFP-UDE-NLS1 diffúzabb, sejtmagi és citoplazmás megjelenésű; b, a YFP-UDE-NLS2 domináns, egyértelmű sejtmagi lokalizációjú; c, a YFP-UDE-NLS2Δ³⁵⁰⁻³⁵³ citoplazmás és enyhe sejtmagi feldúsulású; d, a YFP, mint kontroll fehérje diffúz megjelenésű a sejtben.

A két NLS iménti szeparált vizsgálata szerint, az NLS1 és NLS2 szekvenciák között nem áll fenn bipartit NLS szekvenciáknál megszokott funkcionális kapcsolat, mivel az NLS2 monopartit NLS szekvenciaként is funkcióképesnek bizonyult.

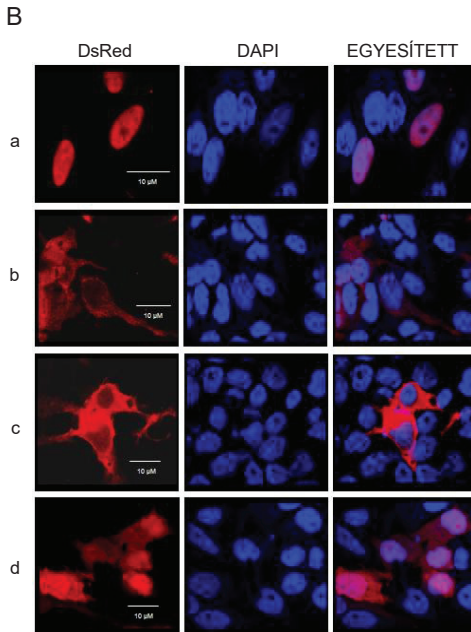
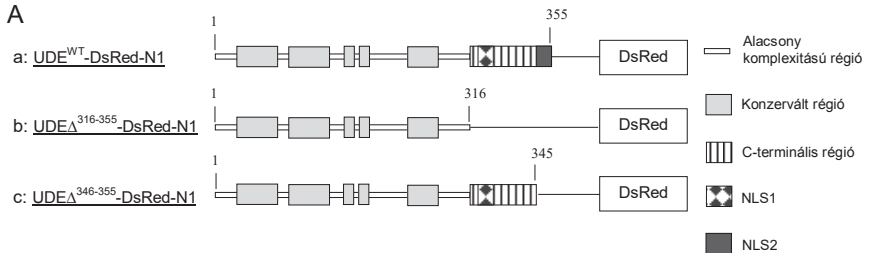
Végezetül azon kérdés megválaszolása érdekében, miszerint az NLS1 szekvenciának az NLS2 szekvenciát érintő erősítő hatása van, a YFP-UDE-NLS2Δ³⁵⁰⁻³⁵³ konstrukció sejten belüli eloszlását is tanulmányoztam. Az eredmények szerint, az említett riporter-konstrukció mind a citoplazmában, mind a nukleáris kompartmentben lokalizálódott. A nukleáris kompartmentben a fúziós fehérje enyhe feldúsulása volt érzékelhető a kontrollhoz (YFP) képest (5. 1. 2. 4./B/C,d ábra). Összevetve a megfigyeléseket az UDEΔ¹⁻³¹⁹-YFP, UDE^(350AAA353)-YFP és az UDEΔ^{1-319(350AAA353)}-YFP konstrukciók sejten belüli eloszlásánál tapasztaltakkal, látható, hogy ez előbbi három konstrukció valamelyest kifejezettebb nukleáris feldúsulást mutatott a YFP-UDE-NLS2Δ³⁵⁰⁻³⁵³ konstrukcióhoz képest (5. 1. 2. 1./C/d vö. 5. 1. 2. 3./B/b,c ábrák). Figyelembe véve, hogy az előbbi konstrukció molekulatömegénél (~28 kDa) fogva passzív diffúzióval is bejuthat a sejtmagba, míg az UDE^(350AAA353)-YFP konstrukció (>65 kDa) csak aktív nukleáris transzporttal léphet be az említett kompartmentbe, a nagyobb molekulatömegű fúziós fehérje esetében mégis jelentősebb nukleáris akkumulációt figyelhetünk meg. Tehát az NLS1 szekvencia jelenlétekor a vizsgált konstrukciók sejtmagi feldúsulása, még ha enyhén is, de kifejezettebb volt. Összegezve: a prediktált NLS1 szekvencia enyhe erősítő hatást gyakorol az NLS2 szekvencia nukleáris importot meghatározó funkciójára.

5. 1. 2. 5. Az UDE fehérje HeLa sejten belüli lokalizációjának vizsgálata

A *D. mel.* UDE fehérje humán sejten (HeLa) belüli lokalizációs vizsgálatára két lényeges szempont miatt került sor. Elsőként tudni szeretettük volna, hogy vajon az előbbi fejezetben azonosított és karakterizált NLS2 szekvencia fejlettebb organizmus sejtjeiben is potenciális NLS-ként funkcionál-e, azaz képes-e a humán importinokkal hasonló mértékben kölcsön hatni, ami valószínűsíthető volt. Másodsorban, a humán sejtekben kifejezett UDE fehérje a sejtek fiziológias folyamataira gyakorolt hatását – elsősorban uracil-DNS degradáló hatást – állt szándékunkban a későbbiekben megvizsgálni. Az előbbi megfigyelés lehetősége csak a fehérje nukleáris lokalizációja esetén történhet meg, mivel a fehérje az uracil DNS degradáló funkcióját a nukleuszban látja el.

Az UDE fehérje HeLa sejtvonalon történő lokalizációját szintén fluoreszcens riporter-konstrukciók segítségével vizsgáltam meg. A fehérje három különböző hosszúságú kódoló régióját (UDE^{WT}, UDEΔ³⁴⁶⁻³⁵⁵, UDEΔ³¹⁶⁻³⁵⁵) a DsRed-N1 fluoreszcens riporter N-terminálisához konjugáltam, majd az egyedi fúziós fehérjék intracelluláris

eloszlását, transziens transzfekeiót követően, fixált HeLa sejtpreparátumon, konfokális mikroszkóp segítségével tanulmányoztuk (5. 1. 2. 5./A ábra). A vizsgálati rendszerben a DsRed-N1 (~24 kDa) fehérjét használtam kontroll fehérjeként, amelynek sejtben belüli eloszlása a YFP fehérjénél már említett molekulatömeg béli okok miatt diffúz.



5. 1. 2. 5. ábra. Az UDE fehérje humán sejtben belüli lokalizációjának vizsgálata. (A) Az UDE fehérje HeLa sejtben történő lokalizációját DsRed-N1 fluoreszcens riporter-rendszerben tanulmányoztam. Az UDE fehérje három különböző hosszúságú kódoló szekvenciáját (UDE^{WT}, UDE Δ ³⁴⁶⁻³⁵⁵, UDE Δ ³¹⁶⁻³⁵⁵) a DsRed-N1 fluoreszcens riporter N-terminálisához konjugáltam. Az elkészített konstrukciók a következők voltak: UDE^{WT}-DsRed-N1, UDE Δ ³⁴⁶⁻³⁵⁵-DsRed-N1, UDE Δ ³¹⁶⁻³⁵⁵-DsRed-N1. (B) Az egyedi fúziós fehérjék intracelluláris eloszlása, transziens transzfekeiót követően, fixált HeLa sejtpreparátumon, konfokális mikroszkóp segítségével került detektálásra. Az eredmény a következő volt: a, az UDE^{WT}-DsRed-N1 exkluzív nukleáris lokalizációjú; b, az UDE Δ ³⁴⁶⁻³⁵⁵-DsRed-N1 extranukleáris lokalizációjú; c, az UDE Δ ³¹⁶⁻³⁵⁵-DsRed-N1 szintén extranukleáris lokalizációjú; d, míg a DsRed-N1 diffúz, egyaránt citoplazmás és nukleáris lokalizációjú volt a sejtben.

A konfokális mikroszkópiás eredmények szerint, az UDE^{WT}-DsRed-N1 riporter-konstrukció, amely a teljes hosszúságú UDE fehérjeszekvenciát tartalmazta HeLa sejtben kizárólag a nukleuszban lokalizálódott. Ezzel szemben az UDE fehérje C-terminálisán különböző hosszúságú deléciókat tartalmazó UDE Δ ³⁴⁶⁻³⁵⁵-DsRed-N1 és UDE Δ ³¹⁶⁻³⁵⁵-DsRed-N1

riporter-konstrukciók kizáródtak a sejtmagból és extranukleárisan halmozódtak fel. A kontroll fehérjeként használt DsRed-N1 intracelluláris lokalizációja a citoplazma és a nukleusz egészét érintően diffúz volt (5. 1. 2. 5./B/a,b,c,d ábra).

Összegezve az eredményeket, az Sf9 rovar-sejttrendszerrel tapasztaltakkal megegyezően az UDE fehérje NLS2³⁴⁷PKRKKKR³⁵³E szekvenciája humán sejtben is potenciális nukleáris determinánsként funkcionált, valamint hiányában nem jött létre a vizsgált fúziós fehérjék sejtmagi lokalizációja. Az NLS1³²⁰PEKRKQE³²⁶ szekvencia sem rovar, sem humán rendszerben nem bizonyult potenciális NLS szerepet betöltő szekvencia szakasznak (5. 1. 2. 5. táblázat).

5. 1. 2. 5. táblázat. A rovar és humán sejtekben tanulmányozott UDE-riporter-konstrukciók celluláris lokalizációjának összefoglalása. A táblázat felső része a rovar specifikus-, míg a táblázat alsó része az emlős specifikus riporter-konstrukciók elnevezését, valamint a konstrukciók által hordozott NLS szekvenciákat, továbbá a konstrukciók sejten belüli lokalizációját szemlélteti. A '+' jel az adott konstrukció egyértelmű megjelenését jelöli a feltüntetett kompartmentben. Míg a '-' jel az adott konstrukció egyértelmű hiányát jelöli a feltüntetett kompartmentben.

Riporter-konstrukció			sejten belüli lokalizáció	
típus	elnevezés	tartalmazott NLS szekvencia	citoplazma	sejtmag
rovar specifikus konstrukciók	UDE ^{WT} -YFP	320PEKRKQE ³²⁶ , 347PKRKKKR ³⁵³ E	-	+
	UDE Δ ³¹⁶⁻³⁵⁵ -YFP	-	+	-
	UDE Δ ³⁴⁶⁻³⁵⁵ -YFP	320PEKRKQE ³²⁶	+	-
	UDE Δ ¹⁻³¹⁹ -YFP	320PEKRKQE ³²⁶ , 347PKRKKKR ³⁵³ E	-	+
	UDE ^{350AA351} -YFP	320PEKRKQE ³²⁶ , 347PKRAAKR ³⁵³ E	+	+
	UDE ^{350AAAA353} -YFP	320PEKRKQE ³²⁶ , 347PKRAAAA ³⁵³ E	+	+
	UDE Δ ^{1-319(350AAAA353)} -YFP	320PEKRKQE ³²⁶ , 347PKRAAAA ³⁵³ E	+	+
	YFP-UDE-NLS1	PEKRKQE	+	+
	YFP-UDE-NLS2	PKRKKKR	-	+
YFP-UDE-NLS Δ ³⁵⁰⁻³⁵³	KPKR	+	+	
emlős specifikus konstrukciók	UDE ^{WT} -DsRed-N1	320PEKRKQE ³²⁶ , 347PKRKKKR ³⁵³ E	-	+
	UDE Δ ³⁴⁶⁻³⁵⁵ -DsRed-N1	320PEKRKQE ³²⁶	+	-
	UDE Δ ³¹⁶⁻³⁵⁵ -DsRed-N1	-	+	-

Ebben a fejezetben szükséges megemlíteni, hogy az UDE fehérje humán sejtekben esetlegesen okozott fiziológiás hatásának tanulmányozása céljából a tranziensen transzfektált sejtek közül az UDE^{WT}-DsRed-N1 és a kontroll DsRed-N1 riporter-konstrukciót tartalmazókat G418 antibiotikum jelenlétében rezisztens sejt kultúrákká növesztettem. A rezisztens kultúrák fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálata szerint, az

UDE^{WT}-DsRed-N1 konstrukció a kontroll konstrukcióval ellentétben már nem fejeződött ki az érintett sejtvonalonban.

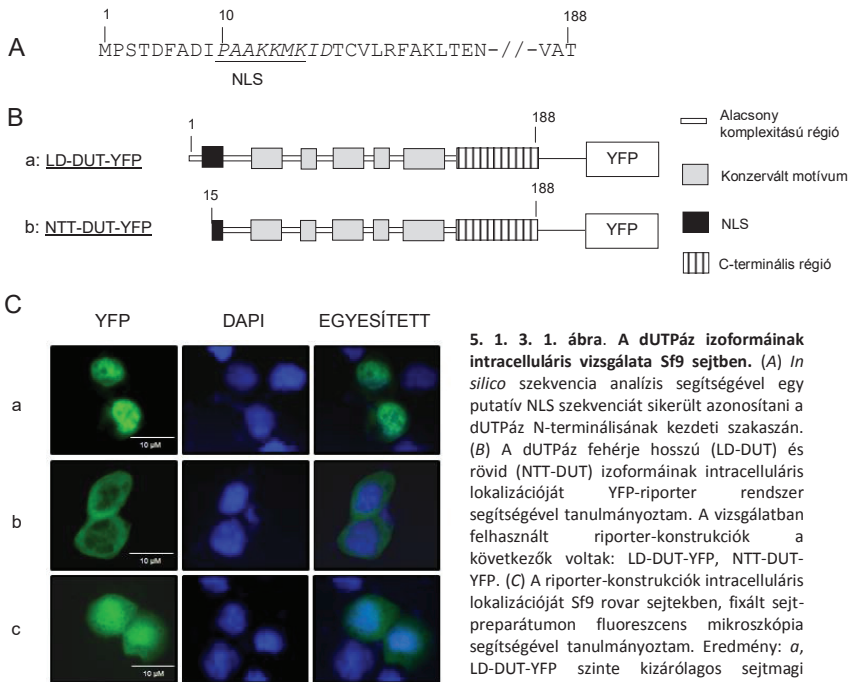
5. 1. 3. A *Drosophila* dUTPáz NLS szekvenciájának jellemzése rovar és humán sejtben

5. 1. 3. 1. A dUTPáz izoformáinak vizsgálata Sf9 sejtben

A dUTPáz hosszú és rövid izoformájának (LD- DUT, NTT-DUT) sejtben belüli lokalizációja korábbi tanulmányokban – Dr. Muha Villó által - már kimutatásra került [85-86], azonban a fehérje szekvenciájának PSORTII programmal történő *in silico* NLS predikciója, valamint a prediktált NLS szekvencia molekuláris karakterizálására ez alkalommal került sor elsőként.

A PSORTII programmal végrehajtott *in silico* predikció során (5. 1. 1. 1. táblázat) egy szokatlan, a hagyományos NLS szekvenciáktól (SV40 T-ag homológ szekvenciák) több tekintetben is eltérő – azonban a humán és *Xenopus* c-Myc fehérje NLS szekvenciájával magas fokú szekvencia homológiát mutató – aminosav összetételű putatív NLS szekvenciát sikerült azonosítani a dUTPáz N-terminális szakaszán (5. 1. 3. 1. ábra/A) [117]. A prediktált ¹⁰PAAKKMK¹⁶ID szekvencia egy neutrális P aminosavval kezdődik, amely megegyezik a legtöbb klasszikus NLS szekvencia kezdetével. Azonban a P aminosavat követő AA neutrális aminosav-duplet és az ezt követő, neutrális aminosavval megtört bázikus pat4 KKKM kiterjedés egy igen szokatlan szekvencia-kontextust eredményez. Az említett NLS további jellegzetessége, hogy egy neutrális I és egy bázikus D aminosavakból álló duplettel zárul. A dUTPáz hosszú izoformája maradéktalanul tartalmazza a prediktált NLS szekvenciát, míg a rövid izoforma az NLS szekvencia első öt aminosavát nem tartalmazza, tehát a fehérje a hosszú izoformánál megállapított ¹⁵M pozíciójú aminosavval kezdődik.

A dUTPáz hosszú és rövid izoformáinak Sf9 sejtben belüli lokalizációját fluoreszcens riporter-konstrukciók segítségével vizsgáltam. A dUTPáz említett kódoló szakaszait a YFP riporter N-terminálisához rekombináltam, majd a riporter-konstrukciók intracelluláris eloszlását tranziens transzfekciót követően, fixált Sf9 sejtpreparátumon, fluoreszcens mikroszkóp segítségével tanulmányoztam (5. 1. 3. 1. ábra/B).



5. 1. 3. 1. ábra. A dUTPáz izoformáinak intracelluláris vizsgálata Sf9 sejtben. (A) *In silico* szekvencia analízis segítségével egy putatív NLS szekvenciát sikerült azonosítani a dUTPáz N-terminálisának kezdeti szakaszán. (B) A dUTPáz fehérje hosszú (LD-DUT) és rövid (NTT-DUT) izoformáinak intracelluláris lokalizációját YFP-riporter rendszer segítségével tanulmányoztam. A vizsgálatban felhasznált riporter-konstrukciók a következők voltak: LD-DUT-YFP, NTT-DUT-YFP. (C) A riporter-konstrukciók intracelluláris lokalizációját Sf9 rovar sejtben, fixált sejt-preparátumon fluoreszcens mikroszkópia segítségével tanulmányoztam. Eredmény: a, LD-DUT-YFP szinte kizárólagos sejtmagi lokalizációjú; b, NTT-DUT-YFP extranukleáris lokalizációjú; c, YFP diffúz lokalizációjú a sejtben.

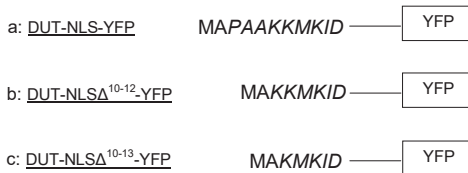
A mikroszkópiás eredmények szerint, az LD-DUT-YFP konstrukció szinte kizárólagos sejtmagi lokalizációt mutatott, míg az NTT-DUT-YFP konstrukció teljesen kizáródott a sejtmagból és a citoplazmában maradt vissza. A kontroll fehérjeként használt YFP diffúz eloszlású volt a sejtben (5. 1. 3. 1./C ábra). Ezen megfigyelések megegyeznek a korábbi tanulmányokban tapasztalt fehérje lokalizációkkal (Schneider 2 sejtben) [85].

Összefoglalva: a dUTPáz N-terminálisának első 14 aminosavát (1 MPSTDFADIPAAK 14) illető szekvencia különbség jelentősen megváltoztatja a dUTPáz izoformák szubcelluláris eloszlását. Következésképpen az említett N-terminális szakasz és a benne lévő prediktált 10 PAAKMK 16 ID szekvencia maradéktalan jelenléte nélkülözhetetlen fontosságúnak bizonyult az LD-DUT izoforma nukleáris lokalizációjához Sf9 sejtben.

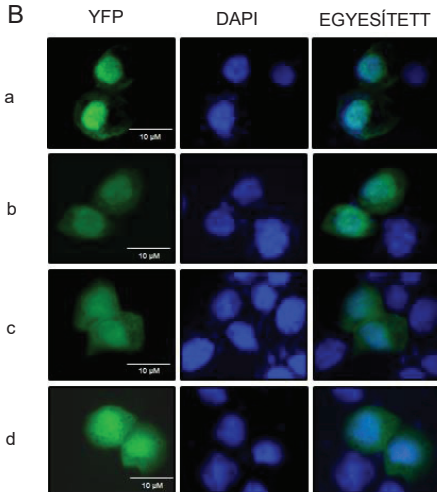
5. 1. 3. 2. A dUTPáz NLS szekvenciájának karakterizálása Sf9 sejtben

Az előző fejezetben kapott eredmények nem egyértelműen bizonyították a prediktált NLS szekvencia közvetlen felelősségét a tapasztalt lokalizációkat illetően, mivel a magból kizáródó rövidebb izoforma esetében nem csak az érintett NLS egy része, hanem egy 14 aminosavat tartalmazó peptid szakasz hiányzott az N-terminális szekvenciából. Ezért a prediktált NLS szekvencia nukleáris-import determináló hatását önálló, független szekvenciaként is tanulmányoztam. Elsőként a 10 PAAKKMK 16 ID szekvenciát-, majd az említett szekvencia különböző deléciót tartalmazó variánsait (DUT-NLS Δ^{10-12} , DUT-NLS Δ^{10-13} , DUT-NLS Δ^{17-18} , DUT-NLS $\Delta^{10-12, 17-18}$, DUT-NLS $\Delta^{10-13, 17-18}$) YFP riporter N-terminálisához rekombináltam. A fúziós fehérjék intracelluláris lokalizációját transziens transzfekciót követően, fixált Sf9 sejtpreparátumon, fluoreszcens mikroszkóp segítségével tanulmányoztam (5. 1. 3. 2. 1. és 5. 1. 3. 2. 2. ábrák).

A



B



5. 1. 3. 2. 1. ábra. A dUTPáz NLS szekvenciájának karakterizálása Sf9 sejtben I. (A) A prediktált NLS szekvencia nukleáris lokalizációt meghatározó hatását, önálló, a fehérjétől független szekvenciaként is vizsgáltam. Az NLS szekvencia (DUT-NLS) és deléciós változatainak (DUT-NLS Δ^{10-12} , DUT-NLS Δ^{10-13}) celluláris megjelenését YFP riporter rendszer segítségével tanulmányoztam. Az említett szekvenciákat a YFP fehérje N-terminálisához rekombináltam. (B) A fúziós fehérjék intracelluláris helyzetét, transziens transzfekciót követően, fixált Sf9 sejtpreparátumon, fluoreszcens mikroszkóp segítségével detektáltam. Az eredmények a következők voltak: *a*, a DUT-NLS szinte kizárólagos sejtmagi lokalizációjú; *b*, a DUT-NLS Δ^{10-12} domináns sejtmagi lokalizáció jelentékenyebb citoplazmás beszűrődéssel; *c*, a DUT-NLS Δ^{10-13} diffúzabb, sejtmagi és citoplazmás megjelenés egyaránt; *d*, a YFP, mint kontroll fehérje diffúz megjelenésű a sejtben.

Az eredményeket tekintve, a $^{10}\text{PAAKKM}^{16}\text{ID}$ szekvenciát tartalmazó DUT-NLS-YFP riporter-konstrukció – ellentétben a kontroll fehérjével – szinte kizárólagos sejtmagi meghatározottságú volt, ami megegyezik az előző fejezetben vizsgált LD-DUT-YFP konstrukciónál tapasztalattal (5. 1. 3. 2. 1./B/a/d ábra). Tehát a prediktált NLS a dUTPáztól független szekvenciaként is egy potenciális nukleáris importot determináló szekvenciaként viselkedett, jóllehet az *in silico* prediktált NLS nem tartalmazta a jelen esetben megvizsgált szekvencia utolsó két $^{17}\text{ID}^{18}$ aminosav dupletjét. Azonban a humán c-Myc fehérje NLS-ével mutatott szekvencia homológia alapján (5. 1. 1. 2. táblázat) lényegesnek tartottuk az említett duplet a szekvenciában való részvételét is.

A további vizsgálatokban az NLS szekvencia nukleáris importot determináló hatásáért felelős aminosavak azonosítására került sor. A lényeges aminosavak meghatározása érdekében elsőként a DUT-NLS Δ^{10-12} , DUT-NLS Δ^{10-13} deléciós mutánsok intracelluláris helyzetét tanulmányoztam. A DUT-NLS Δ^{10-12} -YFP riporter-konstrukció esetében a $^{10}\text{PAA}^{12}$ pozíciójú tripeptid került delécióra, míg a DUT-NLS Δ^{10-13} -YFP riporter-konstrukció esetében az $^{10}\text{PAAK}^{13}$ tetrapeptid került eltávolításra.

A mikroszkópos felvételeket szemlélve a $^{10}\text{PAA}^{12}$ tripeptid hiánya megzavarta az első konstrukció kizárólagos nukleáris akkumulációját, mivel a fúziós protein a citoplazmát is mérsékelten infiltrálta. Azonban az említett konstrukció esetében még mindig a nukleáris dominancia volt meghatározó (5. 1. 3. 2. 1./B/b ábra). Vagyis az NLS szekvencia $^{13}\text{KKM}^{16}\text{ID}$ szakasza még elégségesnek tűnt egy szelektív nukleáris akkumulációhoz. Meg kell említeni, hogy a PAA tripeptid önmagában egy nem kifejezetten NLS-jellegű szekvencia-kontextusban nem rendelkezik nukleáris importot determináló hatással, legalábbis irodalmi adatok nem bizonyítják ezt. Hanem sokkal inkább egy NLS szekvencia kezdő pozíciójában, megelőzve a bázikus aminosav kiterjedéseket, lazítja a polipeptidlánc érintett másodlagos szerkezeti elemeit, lehetőséget biztosítva a bázikus aminosavak importinokkal történő kölcsönhatásának [117-118, 123]. A kezdő neutrális P aminosav, mint szekunder szerkezettörő szinte velejárója a klasszikus NLS szekvenciáknak, azonban a P és a bázikus pat4 szakasz közé ékelődött neutrális AA dipeptid előfordulása jóval ritkább jelenség (5. 1. 1. 2. táblázat) [117].

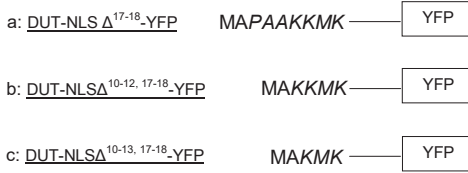
A DUT-NLS Δ^{10-13} -YFP konstrukció esetében a $^{10}\text{PAAK}^{13}$ tetrapeptid hiányában már jóval jelentősebb citoplazmás feldúsulás volt tapasztalható (5. 1. 3. 2. 1./B/c ábra). Tehát egy bázikus aminosav további eltávolítása már jelentősen befolyásolta a korábban tapasztalt nukleáris-import preferenciáját.

Vagyis a konstrukció ¹⁴KMK¹⁶ID szakasza már nem elégséges egy aktív nukleáris transzport kiváltásához. Az előbbi konstrukciók sejten belüli eloszlását illetően, a citoplazma irányába egyfajta gradiens szerű megjelenés figyelhető meg a deléciók számának növekedésével arányosan. Egyértelműen látszik, hogy a ¹⁰PAA¹² neutrális tripeptid enyhe nukleáris importot csökkentő hatásával szemben, a bázikus ¹³K aminosav eltávolítása már jelentősen limitálta a nukleáris lokalizáció létrejöttét, bizonyítva ezzel a bázikus aminosavak kitüntetett fontosságát a vizsgált szekvencia kontextusban [120-123].

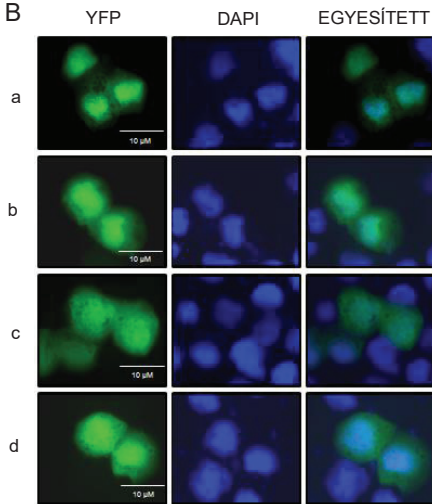
Mint az korábban már említésre került, az *in silico* prediktált NLS nem tartalmazta az általunk vizsgált szekvencia utolsó ¹⁷ID¹⁸ aminosav dupletjét. Ezért lényegesnek tartottuk az említett dipeptid esetleges jelentőségének tanulmányozását is [117-118, 123]. Tanulmányozni kívántam, hogy vajon az említett duplet hiánya milyen mértékben befolyásolja a vizsgált szekvencia NLS funkcióját, a fentiekben tanulmányozott riporter-konstrukciók ¹⁷ID¹⁸ dupletet nem tartalmazó, deléciók változatait is elkészítettem, majd azok intracelluláris lokalizációját a fentiekben leírt módon megvizsgáltam (5. 1. 3. 2. 2. ábra). Az első, DUT-NLSΔ¹⁷⁻¹⁸-YFP riporter-konstrukció intracelluláris lokalizációja – ellentétben a kontroll fehérjével – sejtmagi dominanciáról tanúskodott, azonban jelentősebb citoplazmás beszűrődés is tapasztalható volt összehasonlítva az ¹⁷ID¹⁸ dipeptidet is tartalmazó DUT-NLS-YFP fúziós fehérje szelektív nukleáris megjelenésével (5. 1. 3. 2. 2./B/a ábra vö. 5. 1. 3. 2. 1./B/a ábra). A második, DUT-NLSΔ^{10-12,17-18}-YFP riporter-konstrukció esetében az előzőhöz képest fokozódik a citoplazmás megjelenés és ezzel fordított arányban csökken a nukleáris szelektivitás mértéke (5. 1. 3. 2. 2./B/b ábra). A harmadik, DUT-NLSΔ^{10-13,17-18}-YFP riporter-konstrukció intracelluláris megjelenése már egyáltalán nem szelektív a nukleáris kompartmentre és celluláris lokalizációja szinte egyenértékű a kontrollként használt YFP fehérje sejten belüli diffúz eloszlásával (5. 1. 3. 2. 1./B/c/d ábra).

Összegezve a deléciók vizsgálatok eredményeit, elmondható, hogy a ¹⁰PAA¹², ¹⁰PAK¹³ és az ¹⁷ID¹⁸ peptid-szakaszok jelenléte meghatározóan fontos az NLS szekvencia szelektív, nukleáris importot determináló hatásának kialakításában. Az utolsóként vizsgált – azonban a PSORTII program által az NLS szekvenciában nem prediktált – ¹⁷ID¹⁸ dipeptid hiánya tovább fokozza az NLS szekvencia N-terminálisában lévő deléciók magi transzportot gyengítő hatását (5. 1. 3. 2. táblázat).

A



B



5. 1. 3. 2. 2. ábra. A dUTPáz NLS szekvenciájának karakterizálása Sf9 sejtben

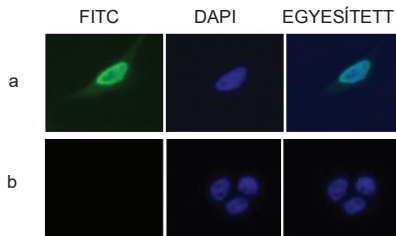
II. (A) A prediktált NLS szekvencia nukleáris lokalizációt meghatározó hatása az $^{17}D^{18}$ dipeptid hiányában is vizsgáltra került. Az $^{17}D^{18}$ dipeptidet nem tartalmazó NLS szekvencia szakaszt (DUT-NLS Δ^{17-18}) és annak deléciós változatait (DUT-NLS $\Delta^{10-12,17-18}$, DUT-NLS $\Delta^{10-13,17-18}$) YFP riporter-rendszer segítségével tanulmányoztam. Az említett szekvenciákat a YFP fehérje N-terminálisához rekombináltam. (B) A riporter-konstrukciók intracelluláris helyzetét, transziens transzekciót követően, fixált Sf9 sejtpreparátumon, fluoreszcens mikroszkóp segítségével detektáltam. Az eredmények a következők voltak: *a*, a DUT-NLS Δ^{17-18} esetében sejtmagi lokalizáció dominál, jelentékenyebb citoplazmás beszűrődés mellett; *b*, a DUT-NLS $\Delta^{10-12,17-18}$ az előző konstrukcióhoz képest erőteljesebben citoplazmás megjelenésű; *c* és *d*, a DUT-NLS $\Delta^{10-13,17-18}$ és a YFP diffúz, sejtmagi és citoplazmás megjelenésű egyaránt.

5. 1. 3. 2. táblázat. A rovar sejtben tanulmányozott dUTPáz-riporter-konstrukciók intracelluláris lokalizációjának összefoglalása. A táblázat a rovar specifikus riporter-konstrukciók elnevezését, valamint a konstrukciók által hordozott NLS szekvenciákat/szakaszokat, továbbá a konstrukciók sejten belüli lokalizációját szemlélteti. A '+' jel az adott konstrukció egyértelmű megjelenését jelöli a feltüntetett sejt kompartmentben. Míg a '-' jel az adott konstrukció egyértelmű hiányát jelöli a feltüntetett sejt kompartmentben.

Riporter-konstrukció	tartalmazott NLS szekvencia	sejten belüli lokalizáció	
		citoplazma	sejtmag
LD-DUT-YFP	$^{10}PAAKKMK^{16}$ ID	-	+
NTT-DUT-YFP	$^{15}MK^{16}$ ID	+	-
DUT-NLS-YFP	$^{10}PAAKKMK^{16}$ ID	-	+
DUT-NLS Δ^{10-12} -YFP	$^{13}KKMK^{16}$ ID	+	+
DUT-NLS Δ^{10-13} -YFP	$^{14}KMK^{16}$ ID	+	+
DUT-NLS Δ^{17-18} -YFP	$^{10}PAAKKMK^{16}$	+	+
DUT-NLS $\Delta^{10-12,17-18}$ -YFP	$^{13}KKMK^{16}$	+	+
DUT-NLS $\Delta^{10-13,17-18}$ -YFP	$^{14}KMK^{16}$	+	+

5. 1. 3. 3. A dUTPáz celluláris lokalizációjának vizsgálata HeLa sejtekben

Tanulmányozni kívántam, hogy vajon a szokatlan aminosav összetételű és szekvenciájú dUTPáz NLS humán sejtekben is potenciális NLS-ként viselkedik-e, azaz képes-e a humán c-Myc fehérje NLS szekvenciájához hasonlóan humán importinokkal kölcsön hatni. A dUTPáz fehérje (LD-DUT $\Delta^{159-188}$) intracelluláris eloszlását, transziens transzfekeiót követően, fixált HeLa sejtpreparátumon, FITC-alapú immuncitokémia és fluoreszcens mikroszkóp segítségével tanulmányoztam.



5. 1. 3. 3. 1. ábra. A *D. mel.* dUTPáz intracelluláris lokalizációjának vizsgálata humán sejtekben. Az LD-DUT $\Delta^{159-188}$ fehérje intracelluláris eloszlását, transziens transzfekeiót követően, fixált HeLa sejtpreparátumon, FITC-alapú immuncitokémia és fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltam. Az eredmény a következő volt: *a*, az LD-DUT $\Delta^{159-188}$ fehérje kizárólagos nukleáris lokalizációjú volt HeLa sejtekben; *b*, nem transzfekeiótált negatív kontrol.

Az immuncitokémia eredményét tekintve, a *D. mel.* dUTPáz humán sejtekben is preferenciálisan a sejtmagban lokalizálódott (5. 1. 3. 3. 1./a ábra). Ezen megfigyelés alapján feltételezhető, hogy a humán és a *Drosophila* importin- α fehérjék ARM doménjeiben az NLS szekvenciával kölcsönható aminosavak nagy valószínűséggel identikusak vagy legalábbis kémiai tulajdonságukat tekintve nagyon hasonlóak lehetnek (konzerváltak). Szerkezet-biókémiai adatok szerint, az élesztő (*S. cerevisiae*) importin- α és a humán c-Myc fehérje NLS peptidjének (320 PAAKRVKLD 328) komplexét már korábban tanulmányozták [143]. A kristályszerkezet alapján készült három dimenziós molekulamodellben egyértelműen meghatározhatók az importin- α fehérjeszekvenciájában azok az aminosavak, amelyek az említett NLS szekvenciával nagy valószínűséggel kölcsön hatnak (4 Å távolságon belül elhelyezkedő importin- α aminosav oldalláncok) ((PDB ID 1EE4_A és 1EE4_B) [143]) (5. 1. 3. 3. 2. ábra).

Ha *in silico* összehasonlítjuk a *D. mel.* importin- α (UniProt ID: O76521), a humán importin- α (UniProt ID: P52294) és az élesztő importin- α (UniProt ID: Q02821) fehérje szekvenciákat, akkor jól látható, hogy a fehérjék ARM doménjeit lefedő szekvencia régiók nagymértékű szekvencia hasonlóságról és azonosságról tanúskodnak (5. 1. 3. 3. 2. ábra).

szekvencia azonosság figyelhető meg a 10 ARM domént tartalmazó szekvenciák összehasonlításakor. Továbbá az élesztő importin- α és a humán c-Myc NLS komplexében azonosított kontaktáló aminosavak is identikusak a *D. mel.* és a humán importin- α fehérjékben lévőkkel (5. 1. 3. 3. 2. ábra). A dUTPáz NLS peptid és az élesztő importin- α komplexéről - Dr. Vértessy G. Beáta által - készített szerkezeti modellben jól megfigyelhető az NLS illeszkedése az importin- α kötőzsebébe, valamint a fehérje-fehérje kölcsönhatásban résztvevő aminosav oldalláncok és azok helyzete*. Zársként elmondható, hogy az importin- α ARM doménjeinek nagyfokú konzerváltsága révén igen távoli evolúciós lépcsőfokon álló fajok esetében is funkcióképes NLS szekvenciaként viselkedik a *D. mel.* dUTPáz PAAKKMKID szekvenciája.

* A szerkezeti modellt tartalmazó közlemény: 8. *Közlemények* fejezet, a dolgozat témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények: 1. közlemény

5. 2. Az UDE fehérjét stabilan expresszáló transzgenikus humán sejtek előállítása

5. 2. 1. A HEK UDE^{WT}-eGFP és HEK eGFP transzgenikus sejtvonalak előállítása lentivirális géntranszferrel

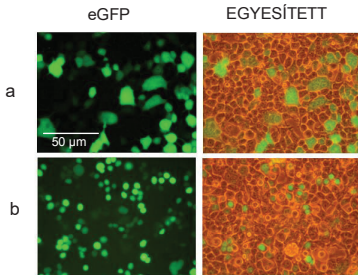
Mint ez már a 2. 3. 3. *fejezetben* is említésre került, a timidilát bioszintetikus útvonal specifikus gátlása révén jelentősen növelhető a DNS-be beépülő uracil mennyisége, amely következményeként exponenciálisan megemelkedik a DNS-ben enzimatikusan előídezett száltörések száma. A jelenség, mint apoptotikus szignál a DNS fragmentálódását, majd végső soron a sejt halálát okozza.

Ezen természetes folyamat hátterében egy olyan kísérleti rendszer kidolgozása volt a célunk, amelyben immortalizált sejtek (pl., transzformált sejtek) apoptotikus érzékenységét szándékoztuk megemelni és ily módon a sejtek apoptotikus halálát felgyorsítani. A Vértessy laborban nemrégiben azonosított UDE fehérje az *in vitro* vizsgálatok szerint, az uracil tartalmú DNS molekulán fejt ki katalitikus aktivitását, vagyis degradálja az uracil-DNS-t [57, 59]. Munkahipotézisünk lényege az volt, hogy az UDE fehérje uracil-DNS degradáló enzimfunkcióját kihasználva, a fehérjét, mint enzimátikus effektor alkalmaznánk az érintett sejtek apoptotikus érzékenyítésére. Az UDE fehérje humán sejtben történő heterológ expressziójával az uracil tartalmú DNS-ben létrejött száltörések száma hatványozottan megnövelhető, így az apoptotikus jel és az ezt követő DNS fragmentáció létrejötte időben jelentősen lerövidülne. A folyamatok

végeredményeként az immortalizált sejtek halála felgyorsítható lenne. Az UDE fehérje katalitikus hatása elsősorban a fluoropirimidinek (FUdR) és a metotrexát kemoterápiás szerek citotoxicitását hatványozhatná meg indirekt módon.

A modellrendszer létrehozására irányuló első experimentális megközelítésben az UDE fehérjét HeLa sejtvonalban tranziens módon fejeztettük ki. A kísérlet egyrészt alkalmat adott a DS-Red-N1 fluoreszcens fehérjével címkézett UDE humán sejtben történő lokalizációjának tanulmányozására (5. 1. 2. 5. fejezet). Mivel az enzimtől várt uracil-DNS degradáló funkció a nukleuszhoz kötött, így lényeges volt, hogy a *D. mel.* enzim humán sejtben is nukleáris lokalizáltságú legyen. Másrészt, lehetőséget kínált egy stabil kultúra létrehozásához is. A *pDsRed-N1-ude^{WT}* és a *pDsRed-N1* riporter-konstrukciókkal tranziensen transzfektált HeLa sejtek a fehérje konstrukciókat a transzfekeiót követő 48. órában sikeresen kifejezték. Az említett sejteket antibiotikum szelekció segítségével genecicin rezisztens sejt kultúrákká növesztettem. A rezisztens kultúrák fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálata meglepő eredményről árulkodott. Ugyanis az UDE^{WT}-DsRed-N1 fehérje-konstrukció a kontroll DsRed-N1 fehérjével ellentétben már nem fejeződött ki az érintett kultúrában. Ez utóbbi jelenségnek számos oka lehet: expressziós kazetta kivágódása a rezisztencia gén fennmaradása mellett, a sejtek számára kedvezőtlen hatású fluoreszcens fúziós protein eliminálása, degradációja.

A tapasztalatok követően, az UDE fehérjét lentivirális expressziós rendszer segítségével fejeztettük ki HEK293 humán sejt vonalban, amely egy jóval stabilabb, transzgenikus sejt kultúrát eredményezhet a vizsgálatainkhoz. A kísérleti rendszerünkben egy HIV-alapú lentivirális vektort (*pSew*) alkalmaztunk. A virális DNS-konstrukciókat (*pSew-ude^{WT}-egfp*, *pSew-egfp*), valamint a HEK-293T pakolósejteket felhasználva két eltérő genomú virion populációt ($v_{g}UDE^{WT}$ -eGFP és $v_{g}eGFP$) hoztunk létre. A pakolósejteket a hagyományos transzfekeiósi metódust követően fluoreszcens mikroszkópiával megvizsgáltuk. A mikroszkópiás képek alapján, látható volt, hogy a leendő transzgenek transzkripciója és translációja megindult a sejtekben, amely a lentivirális konstrukció működőképességét és használhatóságát igazolta. A felvételeken azonnal szembe tűnik, hogy az UDE^{WT}-eGFP fehérje konstrukciók a pakolósejtek nukleuszában lokalizálódnak, míg az eGFP konstrukciók homogéne oszlik el a sejtben (5. 2. 1. ábra).

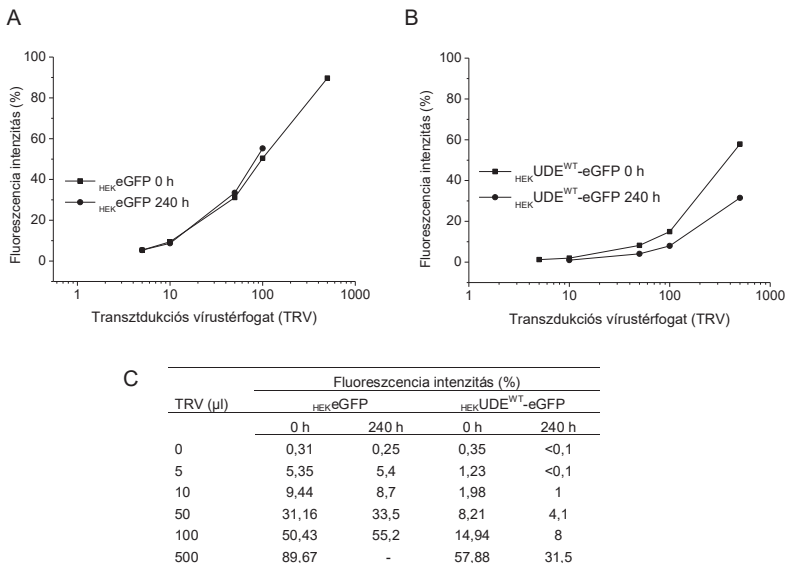


5. 2. 1. ábra. Lentivirionok termelése HEK-293T pakolósejtekben. A (a) $v_{\text{g}}\text{eGFP}$ és (b) $v_{\text{g}}\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ genomú vírus partikulumok létrehozásának érdekében a lentivirális vektor-konstrukciókat ($p\text{Sew-ude}^{\text{WT}}\text{-egfp}$, $p\text{Sew-egfp}$) kalcium-foszfát alapú transzekcióval HEK-293T pakolósejtekbe juttattuk. A transzekció követően a vírustermelő sejteket fluoreszcens mikroszkópiával megvizsgáltuk. A sejtekben a vírus partikulumok összeszerelődése mellett a működőképessé leendő transzgenek átíródtak. Az eGFP transzprotein (a) diffúzán lokalizált a sejtekben, míg az $\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ transzfahérje (b) a sejtek nukleuszában lokalizálódott kizárólagosan.

A pakolósejtek által termelt vírusoldatok begyűjtését követően meggyőződünk arról, hogy történt-e sikeres virulens vírustermelés, tehát képződtek-e olyan $v_{\text{g}}\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ és $v_{\text{g}}\text{eGFP}$ genomú virion populációk, amelyek képesek megfertőzni a célsejteket és a sikeres géntranszfert végrehajtani. Ennek érdekében, növekvő térfogatú (0, 5, 10, 50, 100, 500 μl) vírus-oldatot felhasználva HEK293 célsejteket fertőztünk meg. A fertőzött sejt kultúrákat a vírusgenom és a transzdukcióra felhasznált vírustérfogat szerint neveztük el ($_{\text{HEK}}\text{eGFP}/0, /5, /10, /50, /100, /500$, valamint $_{\text{HEK}}\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}/0, /5, /10, /50, /100, /500$). A fertőzést, valamint a transzdukciót követő ötödik napon, a kultúrák fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával meghatároztuk. Majd a fluoreszcencia intenzitási adatokat felhasználva meghatároztam a termeltetett vírusoldatok víruserősségét (vírustiterét). A kiszámolt vírustiter az $v_{\text{g}}\text{eGFP}$ virion populáció esetében 3314 TU/ml, míg az $v_{\text{g}}\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ virion populáció esetén 873 TU/ml értéknek adódott. Az adatokból jól látható, hogy az $v_{\text{g}}\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ vírus populáció víruserőssége szinte a negyede a kontrollként használt $v_{\text{g}}\text{eGFP}$ vírus populáció titeréhez képest. A tapasztalt jelentős értékkülönbség elsődleges magyarázata az lehet, hogy az UDE cDNS-e több mint 1 kbp-ral megnöveli a vírusgenom méretét, és jelen esetben a nagyobb méretű DNS a vírusgenom kialakításakor negatív előnyt élvezhet. Jóllehet a retrovírus genom létrehozásakor a beépülő DNS méretét érintő restrikció általában, inkább az alsó bázispár méretlimithez kötött. Másrésztől, előfordulhat, hogy már a pakolósejtekben is kifejeződő transzprotein esetleges nem kívánt fiziológiai hatást gyakorolhat a sejt folyamatokra, és ezen keresztül kedvezőtlenül befolyásolhatja a virionok összeszerelését. Ilyen esetben kevésbé lesz hatékony a vírustermelés.

5. 2. 2. Homogén $_{\text{HEK}}\text{eGFP}$ és $_{\text{HEK}}\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ sejt kultúrák előállítása

A sejt kultúrák homogenizálása érdekében a vírustiter megállapítását (0 h) követő tizedik napon (240 h) ismét meghatároztuk a $_{\text{HEK}}\text{eGFP}$ és $_{\text{HEK}}\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ fertőzött sejt kultúrák – már sejt vonalak – fluoreszcencia intenzitását áramlási citometria segítségével. A $_{\text{HEK}}\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ sejt vonalak fluoreszcencia intenzitása a nulla időpontban (0 h) mérthöz képest megközelítőleg a felére csökkent. A kontrollként használt $_{\text{HEK}}\text{eGFP}$ sejt vonalak viszont számtartónak bizonyultak a fluoreszcencia intenzitási értékek tekintetében (5. 2. 2. ábra). A jelen megfigyelés több kérdést vet fel.



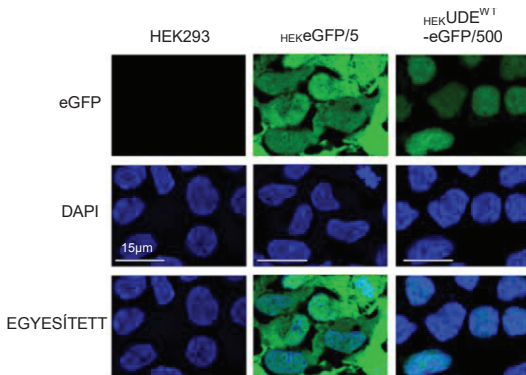
5. 2. 2. 1. ábra. A $_{\text{HEK}}\text{eGFP}$ és $_{\text{HEK}}\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ sejt vonalak fluoreszcencia intenzitásának meghatározása áramlási citometriával. A vírustiter megállapításához a fertőzést követő ötödik napon (0 h) a (A,C) $_{\text{HEK}}\text{eGFP}$ és (B,C) $_{\text{HEK}}\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ sejt vonalak fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával meghatároztuk. A vírustiter értékek: $_{\text{HEK}}\text{eGFP}$ virion populáció esetében 3314 TU/ml; $_{\text{HEK}}\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ virion populáció esetén 873 TU/ml. Ezt követően a tizedik napon (240 h) ismét meghatároztuk a (A,C) $_{\text{HEK}}\text{eGFP}$ és (B,C) $_{\text{HEK}}\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ fertőzött sejt vonalak fluoreszcencia intenzitását áramlási citometria segítségével. Az adatok szerint, a $_{\text{HEK}}\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ sejt vonalak fluoreszcencia intenzitása a nulla időpontban (0 h) mért értékekhez képest szinte a felére csökkent. A $_{\text{HEK}}\text{eGFP}$ sejt vonalak viszont számtartónak bizonyultak a fluoreszcencia intenzitási értékekkel illetően.

Mivel természetes jelenség, hogy a transzdukciót követően a vírus genomok teljes integrációjáig virális DNS veszteség lehetséges a sejtekben, ezért felmerült a gondolat, hogy ez okozhatott fluoreszcencia intenzitásbeli csökkenést a $_{\text{HEK}}\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ sejt kultúrákban.

Ezen jelenség azonban a fertőzést követően röviddel lezárul. Tehát esetünkben ez utóbbi valószínűsége minimális, valamint a kontroll kultúrák esetében nem tapasztaltunk intenzitásvesztést egyáltalán. További oki tényező lehet az, hogy transzdukciót követően egy sejt-kultúra nem tekinthető homogén sejt-kultúrának, mivel a kultúra nem minden sejtje esetében történt sikeres fertőzés, valamint transzdukció. Tehát előfordulhat, hogy alacsony fertőzési hatékonyság és/vagy vírustiter esetén az inert sejtek néhány generációs ciklust követően, létszám felettivé válnak a transzdukált társaikkal szemben, ami azok számbéli felhígulásával és a sejtvonal következményes fluoreszcencia intenzitás-csökkenéssel járhat. Ez előbbi jelenség azonban csak elég alacsony fertőzési hatékonyság esetén fordulhat elő. A $v_g\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ vírus populáció esetében ez nem állhat érvényben, mivel a kontroll vonalaknál ($\text{HEK-eGFP}/5/10/50$) mért alacsony intenzitás értékek 240 órát követően is számtartóak maradtak. Végezetül felmerül annak a ténynek is a valószínűsége, hogy a transzproteinek jelenléte nem kedvezően befolyásolta a sejtek életfunkcióit, így a sejtek eliminálhatták, degradálhatták az $v_g\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ fehérje konstrukciót. Az is elképzelhető, hogy a transzproteinek negatívan befolyásolta a sejtek osztódási potenciálját és ezért az inert sejtek túlnövési effektusa került érvényre. Ennek ellenére, hogy a tapasztalt jelenség valószínű oki hátterére csak feltevéseink vannak és a megfigyeléseket inkább empirikusnak tekintjük, a jelenség némileg egybevág a HeLa tranzienst kultúrájánál tapasztaltakkal, ahol az $\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-DsRed-N1}$ expressziója teljesen eltűnt az antibiotikum rezisztens sejt-kultúrából.

A tapasztaltakkal ellentétben, kiválasztottuk a $\text{HEK-eGFP}/5$ és $\text{HEK-UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}/500$ sejtvonalakat a kultúrák homogenizálása céljából. A sejtvonalakat több alkalommal is homogenizáltuk (sejt-szortolással) eGFP pozitivitás alapján. A többszörösen homogenizált $\text{HEK-UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}/500$ sejtvonal már tartósabban tartalmazta a transzproteint és a fluoreszcencia intenzitás tekintetében értéktartónak bizonyult. A sejtvonalakban a transzproteinek intracelluláris helyzetét konfokális mikroszkóppal ellenőriztük (5. 2. 2. ábra). A felvételek az $\text{UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}$ konstrukció $\text{HEK-UDE}^{\text{WT}}\text{-eGFP}/500$ sejtekben kizárólagos nukleáris lokalizációját, míg az eGFP konstrukció $\text{HEK-eGFP}/5$ sejtekben diffúz eloszlását igazolták.

Összefoglalásként elmondható, hogy ezen homogén sejt-kultúrák, mint modell rendszerek már alkalmasnak bizonyulnak a célul kitűzött vizsgálat jövőbeni elvégzéséhez.



5. 2. 2. 2. ábra. A HEK^{eGFP} és HEK^{UDE^{WT}-eGFP} sejtvonalak vizsgálata konfokális mikroszkópiával. A HEK^{eGFP/5} és HEK^{UDE^{WT}-eGFP/500} sejtvonalakat többszörösen homogenizáltuk sejt-szortolással. A sejtvonalakban a transzproteinek intracelluláris helyzetét konfokális mikroszkóppal ellenőriztük. A felvételek alapján, az UDE^{WT}-eGFP konstrukció HEK^{UDE^{WT}-eGFP/500} sejtekben kizárólagos magi lokalizációt, míg az eGFP konstrukció HEK^{eGFP/5} sejtekben diffúz lokalizációt mutatott. A vizsgálatban felhasznált nem transzdukált HEK293 sejtek eGFP fluoreszcenciával nem rendelkeztek.

A sejtvonalakat meghatározott kemoterápiás szerekkel (FUDR és/vagy metotrexát) kezelve azok DNS-ének uracil tartalmát jelentősen megnövelhetjük és az UDE fehérje uracil-DNS-degradáló katalitikus aktivitását kiaknázva a sejtek apoptotikus érzékenységét többszörösére növelhetjük. Végző soron az UDE transzproteint kifejező sejtek apoptotikus halála, időben nagyságrendekkel felgyorsulhat a kontroll sejtekéhez képest.

5. 3. A humán DUT és TYMK gének RNS interferenciás csendesítése és a géncsökkentés következményeinek tanulmányozása*

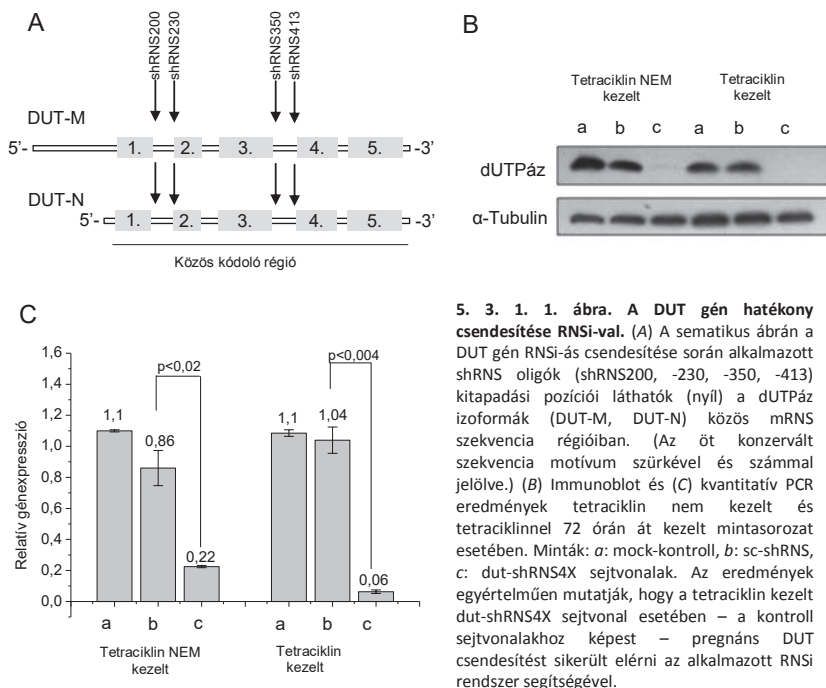
5. 3. 1. A DUT gén csendesítése és következményeinek vizsgálata

5. 3. 1. 1. A DUT gén hatékony csendesítése

Korábbi tanulmányok szerint, a DUT gén tranzienst siRNS-alapú csendesítése csak részleges génrepressziós hatékonyságot eredményezett, valamint az eredmények nem voltak kvantitatívak [97, 136]. Tervezett kísérleti rendszerünkben a hatékony géncsökkentés elérésének érdekében négy különböző szekvencia szakasz ellen irányított, tetraciklin regulálható shRNS vektor-konstrukciót hoztunk létre. Mivel a humán dUTPáz-nak két izoformája létezik (DUT-N és DUT-M) ezért a célszekvenciák meghatározása a nukleáris- és a mitokondriális izoformát is kódoló, közös mRNS szekvencia-szakaszon belülről korlátozódott (5. 3. 1. 1./A ábra). Így az RNSi alkalmazásakor mindkét izoforma párhuzamos csendesítése történik a sejtben.

* Az eredmények alapján született közleményt lásd: 8. *Közlemények* fejezet, a dolgozat témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények 2. közlemény

Az RNSi repressziós hatékonyságának megállapítása érdekében 72 órás tetraciklin expozíciót követően, immunoblot detekciót végeztem a DUT csendesített dut-shRNS4X és a kontroll (mock és sc-shRNS) sejtvonalakból nyert összprotein minták, valamint specifikus antitestek felhasználásával. Tetraciklinel nem kezelt mintasorozatot is alkalmaztam a kísérletben. Az immunoblot eredménye szerint, a tetraciklin kezelést követően a dut-shRNS4X sejtvonalban a dUTPáz fehérje mennyiség a rendszer detektálhatósági küszöbszintje alá csökkent a kontroll sejtvonalakhoz képest. Összehasonlítva az iménti észrevételt a tetraciklin kezeletlen mintasorozathal tapasztalattal, jól érzékelhető, hogy ez esetben is jelentősen csökkent a dUTPáz fehérje mennyisége a dut-shRNS4X sejtvonalban a kontroll sejtvonalakéhoz képest (5. 3. 1. 1./B ábra). Ez utóbbi jelenség a tetraciklin általi regulálhatóság alacsony határfokát sejteti.



A tapasztalt immunoblot eredményeket követően, kvantitatív PCR analízis segítségével számszerűsítettem a DUT mRNS szintet az érintett sejtvonalakban. A mérések szerint, a tetraciklin kezelt dut-shRNS4X stabil sejtvonalban a DUT gén mRNS

szintje 0.06 ± 0.01 ($6\% \pm 1\%$) értékre csökkent a kalibrátor 1 (100%) értékéhez viszonyítva, ami egy igen jelentős és szignifikáns ($p < 0,004$) 17-szeres relatív expresszió szint csökkenésnek felel meg. A tetraciklin kezeletlen mintasorozat esetében is jelentős, 0.22 ± 0.01 ($22\% \pm 1\%$) értékű DUT mRNS szint csökkenés volt tapasztalható, amely egy szignifikáns ($p < 0,02$) 4,5-szeres relatív expresszió szint csökkenést jelent. A kontroll (mock és sc-shRNS) sejtvonalak esetében a kalibrátor értékéhez közeli expresszió szintek voltak mérhetőek (5. 3. 1. 1./C ábra).

Összegezve az eredményeket, elmondható, hogy az alkalmazott RNSi rendszer segítségével jelentős mértékben (94%) sikerült represszálni a DUT génexpressziót – a kontroll sejtvonalakhoz mérten –, amelynek következménye egy már nem detektálható mennyiségű dUTPáz fehérje szint a dut-shRNS4X sejtvonalban. Vagyis a létrehozott dut-shRNS4X stabil sejtvonal, mint modell rendszer alkalmas a dUTPáz timidilát metabolizmusban betöltött szerepének bővebb tanulmányozására.

Az eredmények alapján, az alkalmazott pSup.p RNSi rendszer tetraciklin általi regulációja csak kis mértékben (<20%) valósult meg a T-REx™-HeLa sejtvonal esetében. Ennek egyik feltételezett oka lehet, hogy a vektor H1 promóterébe beépített TetO2 kötőhely Tet-R-telített állapotában sem képes gátat szabni a promóter aktivációnak és tetraciklin hiányában is aktív marad az shRNS-expressziós kazetta. Másik magyarázat, miszerint a sejtvonal Tet-R termelése nem kielégítő, azaz kevesebb a jelenlévő szabad Tet-R, mint a TetO2 kötőhelyek száma, ami szintén az shRNS-expressziós kazetta folyamatos aktivitását eredményezi.

5. 3. 1. 2. A DUT géncsendesítés hatása a timidilát metabolizmusban esszenciális enzimek génexpressziójára.

Korábbi tanulmányokban már említésre került a feltevés, miszerint a dUTPáz és a TYMS enzimek közötti funkcionális kölcsönhatás szerepet játszhat a sejtek 5FU és az FUDR drogokkal szemben adott válaszában kialakításában [145-146]. Feltételeztük, hogy a DUT géncsendesítés következtében fellépett dUTPáz funkcióhiány génexpressziós változásokat indukálhat a TYMS, vagy a timidilát metabolizmus egyéb enzimeinek tekintetében. Kiindulva a gondolatból, miszerint a dUTPáz hiány jelentős dUMP szintcsökkenéshez vezet, feltételeztük, hogy a dTMP prekursorok pótlása elsősorban vagy a DCTD-TYMS *de novo* útvonal felől, vagy az alternatív (menekítő) útvonal felől, a TK1 enzim katalízise

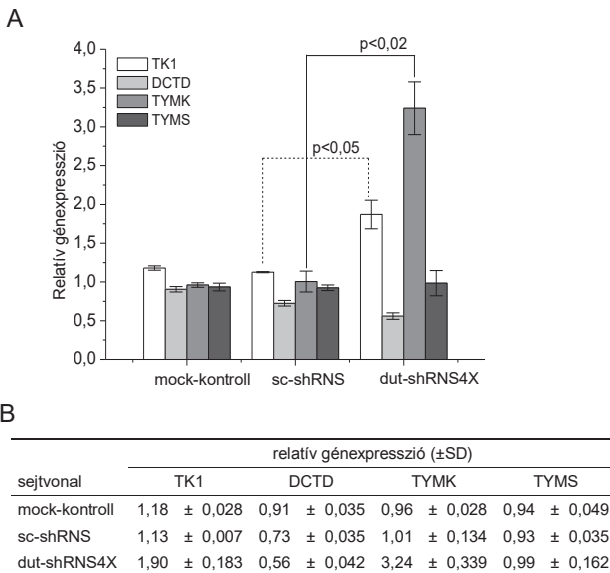
révén valósul meg. Ez utóbbi esetben a TK1 enzim a dezoxitimidilát foszforilálásával, a TYMS enzimkomplexet megkerülve dTMP nukleotidokat juttathat a szintetikus kaszkádba, amely a sejt számára egy elégséges dTTP produkciót tehet lehetővé. A másik irányú dTMP prekursor pótlás a DCTD enzim katalízisének eredménye lehet, amely a dezoxicitidilát katabolizmus során keletkező dCMP nukleotidok dUMP-vé való átalakításával szubsztrátot szolgáltathat a TYMS enzimkomplexnek, regenerálva ezzel a teljes *de novo* dTTP szintetikus kört. További lehetőségként, a TYMS esetleges fokozott expressziója kompenzálhatja a csökkent dUMP > dTMP átalakulást, míg a TYMK enzim hatékonyabb működtetése fenntarthatja az elégséges dTTP termelést alacsonyabb dTMP koncentráció mellett is akár. Tehát a DUT csendesítés a TYMS expressziója mellett további génexpressziós változásokkal járhat a szintetikus kaszkád működésének regenerálása érdekében. A feltevések megválaszolása érdekében, kiválasztottuk az említett négy, esszenciális szerepet betöltő enzimet (tehát a TYMS, valamint a TK1, DCTD és TYMK enzimeket), amelyek génexpressziós mintázatát kvantitatív PCR segítségével megvizsgáltam a dut-shRNS4X sejtvonalban.

A feltételezett génexpressziós változások vizsgálata érdekében a dut-shRNS4X sejtvonalat, valamint a kontroll (mock, sc-shRNS és kalibrátor) sejtvonalakat 72 óráig tetraciklinnel kezeltem, majd a sejtekből nyert RNS-t felhasználva cDNS templát-alapú kvantitatív PCR-t végeztem a vizsgálatban kérdéses génekre specifikus primer párok segítségével.

Az mRNS szint kvantitálási eredmények a TK1 és a TYMK gének egyértelmű és szignifikáns relatív expresszió változását támasztották alá a DUT represszált dut-shRNS4X sejtvonalban a kontroll (mock és sc-shRNS) sejtvonalakhoz képest (5. 3. 1. 2. ábra). A TK1 gén esetében egy 2-szeres ($p < 0,05$), míg a TYMK gén esetében egy 3,2-szeres ($p < 0,02$) relatív expresszió növekedés figyelhető meg a kalibrátor 1 értékéhez viszonyítva. A DCTD gén mRNS szintjében azonban érzékelhető mennyiségű 2-szeres relatív expresszió csökkenés volt kimutatható, ami a várthoz képest elsősorban kissé meglepetésszerű. Figyelemre méltó, hogy az elsősorban várt TYMS gén szignifikáns relatív génexpresszió változása nem volt tapasztalható.

Az eredményeket összefoglalva, jól érzékelhető, hogy a T-REX™-HeLa sejtvonal nem a *de novo* szintetikus út regenerálásával válaszolt a 94%-os dUTPáz funkcióhiányra, hanem az alternatív (menekítő) útvonal kulcsenzimének, a TK1 enzim fokozottabb génexpressziójával próbálhatta helyreállítani a dTTP szintetikus utat. Továbbá a TYMK

expressziójának jelentős mértékű megemelésével fokozhatta a TK1 direkt katalízise során a szintetikus útra belépő dTTP prekursorok további foszforilációs átalakulását, biztosítva ezzel a DNS szintézis számára szükséges mennyiségű dTTP produkciót. A TK1 enzim expressziója normális esetben elég alacsony és a sejtciklus osztódási fázisához kötött, ennek ellenére egy igen effektív kináz [147].



5. 3. 1. 2. ábra. A DUT géncsendesítés hatása a TK1, TYMK és DCTD enzimek relatív géneexpressziójára a dut-shRNS4X sejtvonalban. Kvantitatív PCR eredmények. A DUT csendesített dut-shRNS4X sejtvonalban bekövetkezett géneexpressziós változások kimutatása érdekében az említett sejtvonalat, valamint a kontroll (mock, sc-shRNS és kalibrátor) sejtvonalakat 72 óráig tetraciklinnel kezelttem, majd a sejtekből nyert RNS-t felhasználva cDNS templát-alapú kvantitatív PCR-t végeztem a TK1, DCTD, TYMK és TYMS génekre specifikus primer párok használatával. A grafikon (A), valamint a táblázat (B) értékei a TK1 és a TYMK gének szignifikáns relatív expresszió emelkedését mutatják a dut-shRNS4X sejtvonalban a kontroll sejtvonalakhoz képest. A TK1 gén esetében egy ~2-szeres, míg a TYMK gén esetében egy ~3,2-szörös relatív expresszió emelkedés figyelhető meg. A DCTD gén mRNS szintjében egy ~2-szeres relatív expresszió szintcsökkenés látható. A TYMS gén esetében szignifikáns relatív géneexpresszió változást nem sikerült kimutatni.

Jóllehet minden egyes deoxitimidilát molekula direkt foszforilációja egy ATP molekulával csökkenti a sejt energiatöltöttségét, de talán a jelen esetben ez energetikailag mégis kedvezőbb lehet, mint a dUMP hiánypótlása és/vagy a nagyon energiaigényes metiltranszfert katalizáló TYMS enzimkomplex túlermelése, ill. túlműködtetése [100-101]. A DCTD esetében tapasztalt relatív expresszió szint csökkenés sem a dUMP termelés

helyreállításának gondolatát veti fel. A DCTD enzimről köztudott, hogy a fehérje enzimaktivitása allosztérikusan szabályozott, magas dCTP szint fokozza az aktivitását, míg a magas dTTP szint csökkenti az aktivitását [100, 148]. Azonban az előbbieket génextpresszió szabályozására vonatkozó hatásáról nincs irodalmi adat.

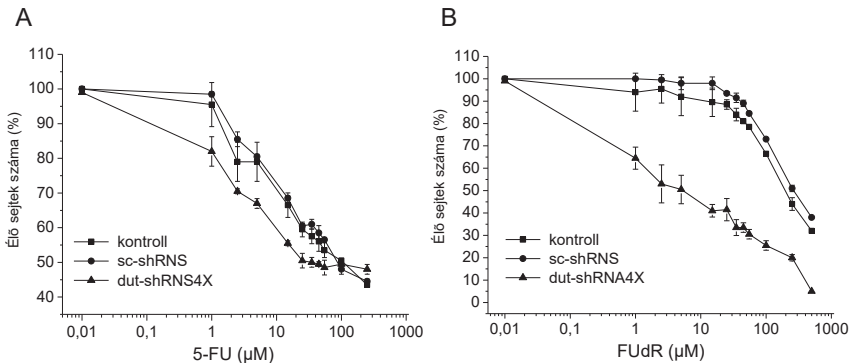
5. 3. 1. 3. A DUT géncsendesítés hatása a sejtek 5FU és FUDr drogokkal szembeni érzékenységre

Irodalmi adatok szerint, a dUTPáz expresszió szintje igen eltérő lehet különböző eredetű tumor sejtek esetében. Számos tanulmány a sejtek dUTPáz expresszió szintje és a fluoropirimidinekkel (FUDr, 5FU) szemben mutatott tolerancia értékek között összefüggést vélt felfedezni [145, 149-150]. Egy vizsgálat alapján a dUTPáz siRNS-sel történt tranziens csendesítése fokozott szenzitivitást kölcsönzött a sejteknek az FUDr droggal szemben [97]. A vizsgálat azonban az FUDr hatását az 5FU hatásának kontextusában nem tanulmányozta. A parallel vizsgálatnak az említett komponensek metabolikus érintettségét illetően van relevanciája, mivel a komponensek eltérő arányban képesek belépni a DNS-, valamint az RNS szintetikus utakba és így beépülve az említett makromolekulákba azok degradációját, majd végső soron a sejt halálát okozzák.

A DUT csendesített dut-shRNS4X sejtvonalt, valamint a kontroll (nem transzfektált kontroll és sc-shRNS) sejtvonalt 5FU és FUDr dózisfüggő érzékenységeinek vizsgálatára céljából a sejteket növekvő koncentrációjú 5FU és FUDr drogokkal kezeltet tetra ciklin jelenlétében 72 óráig. A tapasztalt sejtválaszok szerint a hatékony DUT csendesítés jelentősen csökkentette a sejtek fluoropirimidinekkel szemben mutatott toleranciáját, azaz pregnáns különbség volt tapasztalható a mért IC₅₀ koncentráció értékekben a csendesített és a kontroll sejtek esetében. A dut-shRNS4X sejtvonalt ~6-szor bizonyult érzékenyebbnek az 5FU droggal szemben, míg 40-szer mutatott fokozottabb szenzitivitást az FUDr komponensre nézve a kontroll sejthez képest (5. 3. 1. 3. 1. ábra).

A dut-shRNS4X sejtvonalt 5FU, FUDr és VP-16 érzékenységeinek időfüggését egyedi kezeléseknél, meghatározott drog koncentráció, valamint tetra ciklin jelenlétében, különböző időintervallumokban (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) tanulmányoztam. A VP-16 egy citotoxikus szer, amely a timidilát metabolizmust nem érintve, mint topoizomeráz gátló avatkozik be a sejtek normális fiziológiai működésébe és végső soron sejthalált okoz [151]. Használata az 5FU és az FUDr hatásának specifikusságát hivatott igazolni a DUT

csendesített sejtvonalban. Az 5FU és az FdR drogokkal szemben mutatott időfüggések a koncentrációfüggéshez hasonló mértékű érzékenységről számoltak be a dut-shRNS4X és a kontroll sejtek esetében. A VP-16 komponenssel szemben azonban nem mutatható ki eltérő érzékenység a vizsgált sejtvonalak esetében (5. 3. 1. 3. 2. ábra).



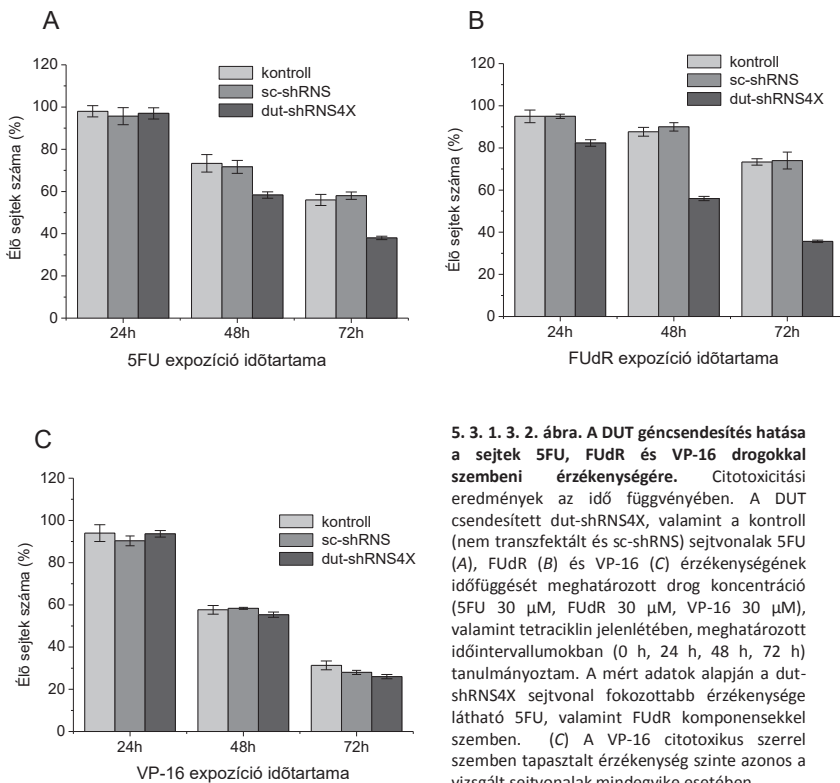
C

Sejtvonal	Kezelés	
	5FU, IC ₅₀ (µM)	FdR, IC ₅₀ (µM)
nem transzfektált kontroll	21.04 ± 5.2	200.5 ± 3.5
sc-shRNS	21.55 ± 10.3	254.4 ± 1.2
dut-shRNS4X	3.62 ± 1.3	5.0 ± 3.5

5. 3. 1. 3. 1. ábra. A DUT géncsendesítés hatása a sejtek 5FU és FdR drogokkal szembeni érzékenységére. Citotoxicitási eredmények drogonkoncentráció függvényében. A DUT csendesített dut-shRNS4X, valamint a kontroll (nem transzfektált és sc-shRNS) sejtvonalak 5FU (A) és FdR (B) dóziszfüggő érzékenységét szemléltetik a grafikonok. A sejteket növekvő koncentrációjú 5FU (0-250 µM) és FdR (0-500 µM) drogokkal kezeltem tetraciklin jelenlétében 72 óráig. (C) A tapasztalt sejtvonalak szerint, a hatékony DUT csendesítés jelentősen fokozta a sejtek fluoropirimidinnel szemben mutatott érzékenységét, vagyis nagyságrendi különbség volt tapasztalható a mért IC₅₀ koncentrációértékekben a csendesített és a kontroll sejteket összehasonlítva. A citotoxicitási vizsgálat szerint, a dut-shRNS4X sejtvonal ~6-szor bizonyult érzékenyebbnek az 5FU droggal szemben, míg 40-szer mutatott fokozottabb szenzitivitást az FdR komponenssel szemben a kontroll sejthez képest.

Értelmezve az eredményeket, elmondható, hogy a 94%-os hatásfokú DUT csendesítés jelentősen megemelte a dut-shRNS4X sejtvonal érzékenységét a timidilát metabolizmusra specifikusan ható fluoropirimidinnel szemben. Emellett pregnáns különbség volt érzékelhető az 5FU és FdR komponensek dut-shRNS4X sejtvonalra kifejtett citotoxikus hatását illetően. A két drog hatásának parallel vizsgálata egy 6%-os

dUTPáz (mRNS) szint jelenlétében érzékenyen rámutatott a két komponens metabolikus érintettségének eltérő arányaira.



Az 5FU esetében tapasztalt ~6-szoros szenzitivitás mutatja, hogy a kontroll sejtekhez képest a dUTPáz funkciókiesés nem potenciórozta dramatikusan az 5FU timidilát metabolizmusra specifikusan kifejtett hatását és ezen keresztül a citotoxicitást. Az FUDR közel 40-szeres érzékenyítő hatása, a drog a timidilát metabolizmuson keresztül kifejtett hatásának dominanciáját igazolja. A tapasztalt sejtválások biokémiai oka magyarázatot szolgáltathat a vizsgált komponensek különböző mértékű timidilát metabolizmusbeli involváltságra. Az első és nem elhanyagolandó biokémiai különbség az, hogy az 5FU komponensnek a sejtbelépést követően két katalitikus eseményt kell elszennvednie, amíg aktív, a dTTP *de novo* bioszintézisét befolyásolni képes FdUMP intermedierré alakul.

Továbbá az 5FU a DNS szintézist gátolni képes aktív nukleotid analóggá csak egy energia igényes konzekutív reakciósor eredményeként válhat. Tehát az 5FU belépve a sejtbe, feltehetően az RNS szintetikus út irányába metabolizálódik aktív, RNS degradáló FUTP nukleotid analóggá és ezen keresztül teszi lehetetlenné a sejt normális homeosztatisuk működését. Az 5FU ez utóbbi valószínűsíthető tevékenységét viszonylag alacsony koncentráció tartományában (1-10 μM) igen kifejezetten, exponenciális léptékben teszi, mind a csendesített, mind a kontroll sejtek esetében (5. 3. 1. 3. 1./A ábra). Az előbbivel ellentétben, az FdUR, belépve a sejtbe a TK1 enzim katalízisét követően azonnal aktív FdUMP intermedierré alakul, amely a TYMS enzimet gátolva dTTP szintetikus blokkot eredményez. Valamint az FdUMP további foszforilációs lépéseket követően beépülhet a DNS-be és annak degradációját okozhatja. Az adatok jól mutatják, hogy az alacsony koncentráció tartományban (1-10 μM) csak a DUT csendesített sejtekre fejt ki exponenciális léptékű citotoxikus hatást, míg a kontroll sejtekre nem, tehát a dUTPáz hiány jelentősen potenciórozta az FdUR hatását (5. 3. 1. 3. 1./B ábra).

A dUTPáz szerepe az érzékelt citotoxicitásban többértelmű lehet. Az első gondolat szerint a dUTPáz hiány és a TYMS enzim gátlása hatványozottan bénítja a *de novo* dTTP szintetikus kört, ezzel timinmentes állapotot előidézve a sejtben. Azonban korábbi tanulmányok kimutatták, hogy humán sejtextraktum jelenlétében a dUTPáz szubsztrátként kezeli az FdUTP nukleotid-analógot és elhidrolizálja azt [78]. Dr. Takács Enikő és Dr. Tóth Judit által végzett aktivitás vizsgálatok is bebizonyították, hogy a dUTPáz szubsztrájként elfogadja az FdUTP-t és a dUTP-hez hasonlóan elhidrolizálja azt*. Amennyiben ez a biokémiai reakció *in vivo* is ténylegesen végbemegy, akkor a dUTPáz hiány sejtjeinek esetében a dUTPáz-nak eme preventív funkciókiesése elősegíti az FdUTP nukleotid analóg DNS-be való beépülését és annak degradációján keresztül fokozza a sejtek citotoxicitását. Az előbbi feltételezések helytállóságát részben alátámasztja a már korábban említésre került megfigyelés is, miszerint a megnövekedett dUTPáz expresszió és a fluoropirimidinekre adott tolerancia között egyenes arányosság áll fenn [149]. A fokozott dUTPáz expresszió mellett, hogy megnövekedett szubsztrát szinttel látja el a fluoropirimidinek által jelentősen bénított dUMP > dTMP katalitikus átalakulást és így kompetitíve meggátolja a *de novo* szintetikus út teljes blokkját, egyben megakadályozza az FdUTP DNS-be való beépülését is. Az előbbi összefüggés azonban további kérdést vet fel, ugyanis a dUTPáz enzimreakció FdUMP végterméke tovább fokozhatja a TYMS enzimkomplex gátlását és ezen keresztül a *de novo* bioszintetikus út blokkját.

Az előbbi ellentmondás ellenére, a tapasztalatok szerint a sejtek fluoropirimidin kezelésekor a dUTPáz enzimkatalízis ellentétes irányú fiziológiai hatásainak eredője mégis csak az enzim DNS preventív és a *de novo* szintetikus útban ellátott pozitív szerepének dominanciáját igazolja. Esetünkben a dut-shRNS4X sejtvonal fokozott FUDR érzékenysége is a dUTPáz esszenciális, a sejt homeosztatikusságát megőrző szerepét támasztja alá.

Végezetül a VP-16 topoizomeráz gátló alkalmazása, mint kontroll kísérlet jól mutatja, hogy a fluoropirimidinek – még ha eltérő arányban is – a dUTPáz által érintett biokémiai útvonalon fejtik ki hatásukat (5. 3. 1. 3. 2./C ábra).

5. 3. 1. 4. A DUT géncsökkentett sejtvonal dTTP és dUTP készletének vizsgálata

A dTTP mindenkor optimális koncentrációjának fenntartása nélkülözhetetlen a DNS integritásának megőrzése szempontjából [104, 152-153].

Fontosnak tartottam tudni, vajon a 94%-os hatásfokú DUT géncsökkentés milyen mértékben befolyásolta a sejtek dNTP készletének összetételét. Ezért a dut-shRNS4X és kontroll (nem transzfektált és sc-shRNS) sejtvonalakat 72 órán keresztül tetraciklinnel kezeltem, majd a sejteken dNTP extrakciót végeztem. A dNTP extraktumban a szabad dTTP és dUTP nukleotidok koncentrációjának meghatározása érdekében egy radioaktívan jelzett nukleotidot felhasználó enzimátikus módszert alkalmaztam.

5. 3. 1. 4. táblázat. A DUT géncsökkentett dut-shRNS4X sejtvonal dTTP és dUTP készletének meghatározása. A DUT csökkentett dut-shRNS4X, valamint a kontroll (nem transzfektált és sc-shRNS) sejteket tetraciklin jelenlétében 72 óráig növesztettem, majd a sejteken dNTP extrakciót végeztem. A dNTP extraktumban a szabad dTTP és dUTP nukleotidok koncentrációjának meghatározása érdekében egy enzimátikus módszert alkalmaztam. A DUT csökkentett dut-shRNS4X sejtvonalban a dUTP koncentrációja közel kétszerese a kontroll sejtvonalban mérthez képest. A szabad dTTP koncentráció a csökkentett sejtvonalban kevesebb, mint másfélszeresére emelkedett a kontroll sejtvonalban mérthez képest.

Sejtvonal	dNTP koncentráció (pmol (±SD) / 5 x 10 ⁵ sejt)	
	dTTP	dUTP
kontroll (nem transzfektált)	22.0 ± 3.4	4.71 ± 2.9
sc-shRNS	25.1 ± 2.7	5.91 ± 1.7
dut-shRNS4X	32.5 ± 4.8	8.98 ± 4.8

A kapott koncentrációértékekből jól érzékelhető, hogy a dut-shRNS4X sejtvonalban mért dUTP koncentráció közel kétszeresére a kontrollban mérthez képest (5.

3. 1. 4. táblázat). A szabad dTTP koncentráció esetén szintén eltérés tapasztalható. A csendesített sejtvonalban kevesebb, mint másfélszeresére emelkedett az említett nukleotid mennyisége. Összegezve a kapott értékeket, belátható, hogy az esetünkben elért ~94%-os dUTPáz funkcióhiány nem befolyásolta dramatikusan a T-REx™-HeLa sejtvonal dTTP/dUTP arányát a kontrolhoz képest.

A vizsgálatból származó dUTP koncentrációértékek eltérnek a "várthoz" képest, azonban az irodalomban fellelhető eredményekhez mind koncentrációtartományban, mind pedig dTTP/dUMP nukleotid arányban meglehetősen idomulnak. Ugyanis egy korábbi tanulmány szerint, a DUT gén RNSi-ás csendesítése nem okozott eltérést humán tumor sejtek dTTP/dUTP arányában, amely jelenséget a fennmaradó dUTPáz enzimkatalízisnek tulajdonítottak [97]. Szintén humán sejteken végzett dUTPáz csendesítési eredmény szerint eltérést találtak a sejtek dTTP/dUTP arányában, azonban az itt számszerűsített nukleotid koncentrációk értéktartománya az egyéb irodalmi értékektől több nagyságrendben is eltértek, így hitelességük kérdéses [136].

Mivel a dUTPáz központi helyet foglal el a *de novo* dTTP produkcióban, így az enzimfunkció hiánya megváltoztathatja a sejtek dTTP és ezen keresztül a többi nukleotid koncentrációját is. Azonban a menekítő útvonal TK1 enzime prekursorokat juttathat a szintetikus kaszkádba és így fennmaradhat az optimális dTTP szintézis, valamint a sejt megfelelő homeosztázisa.

Feltételezhetően a dut-shRNS4X esetében is a fennmaradt dUTPáz funkció (kb. 6-7% enzimaktivitás volt tapasztalható a dut-shRNS4X sejtvonalban Zagyva Imre munkatársam mérései szerint – adatok itt nem láthatóak) kismértékben részt vehetett a dNTP készlet dUTP nukleotidoktól való megtisztításában. Ugyanakkor a dTTP koncentrációértékek alátámasztják az előző fejezetben leírt feltevést, miszerint a dut-shRNS4X sejtvonal megnövekedett TK1 és TYMK enzim expressziók hozzájárulhattak dTTP produkció rekonstitutív helyreállításában.

5. 3. 2. A TYMK gén csendesítése és következményei

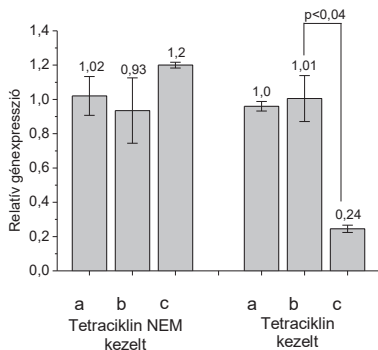
5. 3. 2. 1. A TYMK gén csendesítése

A DUT gén csendesítése során tapasztalt TYMK génexpresszió emelkedés felvetette a gondolatot, miszerint az említett fehérje a TK1 enzim mellett kitüntetett

szereppel bírhat a timidilát metabolizmus rekonstituálásában dUTPáz funkcióihiány esetén.

Fontosnak tartottam tudni, hogy vajon a T-REx™-HeLa sejtvonalban a TYMK gén RNSi-ás csendesítése milyen mértékben befolyásolja a timidilát metabolizmusban érintett enzimek génexpressziós mintázatát, továbbá azt, hogy a géncsökkentés a DUT csendesítéshez hasonlóan érzékenyíti-e a sejteket fluoropirimidin kezeléssel szemben. A TYMK mRNS ellen irányított RNSi kivitelezéséhez egy korábbi tanulmányban már sikeresen alkalmazott célszekvenciát adoptáltunk [137].

A TYMK géncsökkentés hatékonyságának megállapítása érdekében 72 órás tetraciklin expozíciót követően, kvantitatív PCR vizsgálatot végeztem a TYMK csendesített tymk-shRNS stabil sejtvonalból- és a kontroll (mock, sc-shRNS és kalibrátor) sejtvonalakból származó cDNS minták felhasználásával. Valamint tetraciklinel nem kezelt mintasorozatot is alkalmaztam a kísérletben. A mért adatok szerint, tetraciklin kezelést követően, a tymk-shRNS sejtvonalban a TYMK gén mRNS szintje 0.24 ± 0.02 ($24\% \pm 2\%$) értékre csökkent a kalibrátor 1 (100%) értékéhez viszonyítva, ami egy ~4-szeres szignifikáns ($p < 0,04$) relatív expresszió szint csökkenésnek felel meg. A tetraciklin nem kezelt tymk-shRNS minta esetében nem volt kimutatható szignifikáns mRNS szintváltozás a kontrollokhöz képest (5. 3. 2. 1. ábra).



5. 3. 2. 1. ábra A TYMK géncsökkentése RNS interferenciával. Kvantitatív PCR eredmények. A grafikon a TYMK géncsökkentés hatékonyságát meghatározó kvantitatív PCR eredményeket demonstrálja tetraciklin nem kezelt és tetraciklinel 72 órán át kezelt mintasorozat esetében. Minták: *a*: mock-kontroll, *b*: sc-shRNS, *c*: tymk-shRNS sejtvonal. Az eredmények szerint, a tetraciklin kezelt tymk-shRNS sejtvonal esetében – a kalibrátorhoz képest – jelentős, ~4-szeres relatív expresszió szintcsökkenést, azaz 76%-os hatásfokú TYMK géncsökkentést sikerült elérni az alkalmazott RNSi rendszer segítségével. A tetraciklin nem kezelt tymk-shRNS sejtvonal esetében nem volt kimutatható szignifikáns relatív génextpresszió szintkülönbség a kontrollokhöz képest.

Az eredményeket szemlélve látható, hogy az alkalmazott BLOCK-iT™ H1 RNAi Entry RNSi rendszer T-REx™-HeLa sejtvonalban hatékonyan kikapcsolt állapotban tartható tetraciklin hiányában, ellentétben a DUT géncsökkentésénél használt pSp.p RNSi

rendszerrel. A jelenség hátterében feltehetően a vektorok H1 promóterében lévő TetO₂ kötőhelyek száma a meghatározó. A jelen rendszer esetében a promóterben egymást követő két TetO₂ cisz-reguláló elem található, ellentétben a pSup.p rendszerrel, amelyben csak egy említett elem van (lásd 4. 2. 5. 1. fejezet).

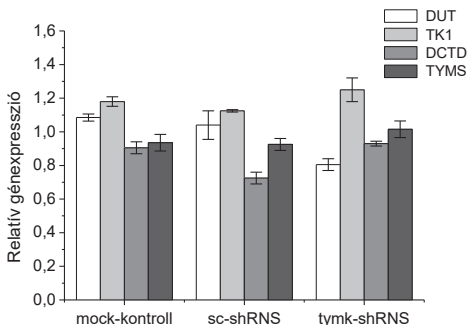
Ugyanakkor az RNSi repressziós hatékonysága elmarad a DUT géncsendesítésnél tapasztalható képest. Ennek oki hátterében többek között az alkalmazott shRNS szekvencia csendesítő hatékonysága, valamint a kétszeresen biztosított vektor shRNS-expressziós kazettájának bekapcsolási nehézsége állhat. Továbbá a TYMK mRNS esetben csak egy célszekvencia ellen irányított shRNS oligonukleotidot alkalmaztunk. Ez utóbbi tényező azonban az irodalomban is vitatott kérdésként szerepel az RNSi hatékonyságát illetően [131-135].

5. 3. 2. 2. A TYMK géncsendesítés hatása a timidilát metabolizmusban esszenciális enzimek génexpressziójára

A tymk-shRNS sejtvonalaiban tapasztalt szignifikáns 76%-os hatásfokú TYMK géncsendesítés esetleges molekuláris következményeinek kimutatása érdekében a DUT, TK1, DCTD, és TYMS gének expressziós mintázatát kvantitatív PCR segítségével megvizsgáltam az említett sejtvonalaiban. A tymk-shRNS és a kontroll (mock, sc-shRNS és kalibrátor) sejtvonalaikat 72 óráig tetraciklinel kezeltem, majd az említett génekre specifikus primer párok segítségével kvantitatív PCR analízist végeztem. A vizsgált gének mRNS szintjét reprezentáló adatok szerint, a 76%-os TYMK géncsendesítés nem okozott szignifikáns relatív génexpresszió változást a tymk-shRNS sejtvonalaiban a kontroll vonalakhoz képest (5. 3. 2. 2. ábra).

A TYMK enzim szerepe esszenciális a dTTP szintézis során, ennek ellenére nem sikerült kimutatni változást a timidilát metabolizmusban érintett és vizsgált gének expressziós mintázatában. Egy tanulmány beszámolt az élesztő TYMK homológ (NDK: cdc8) gén deléciójáról, amelynek hatása letális következményű volt a sejtek számára [154]. Ugyanakkor humán colon karcinóma sejtekkel végzett kísérletek szerint, a TYMK gén hatékony lentivirális RNSi-ás csendesítése direkt módon nem volt fatális kimenetelű a sejtek számára [137]. Feltételezhetően a TYMK egy effektív kináz, így nagy az átviteli száma, valamint más NMK enzimek komplementáló szerepe is valószínűsíthető a háttérben.

A



B

sejtvonal	relatív génexpresszió (±SD)			
	DUT	TK1	DCTD	TYMS
tymk-shRNS	0,80 ± 0,035	1,25 ± 0,070	0,93 ± 0,014	1,01 ± 0,049

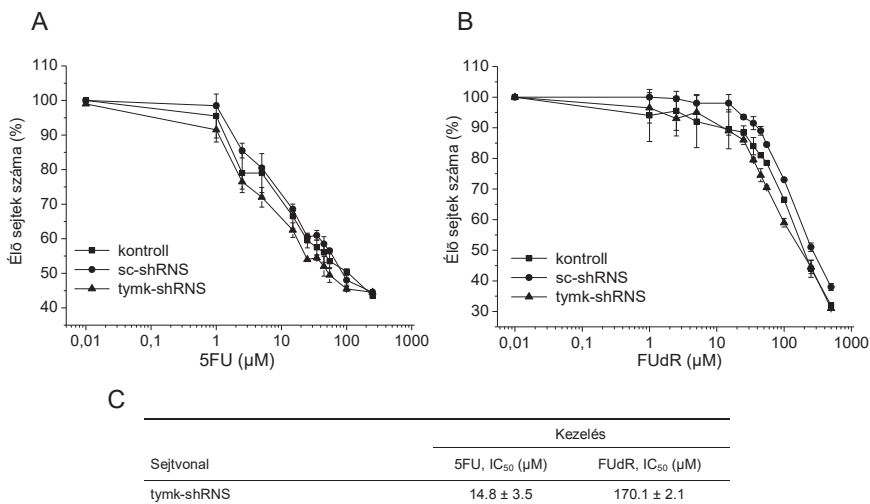
5. 3. 2. 2. ábra. A tymk-shRNS sejtvonal génexpressziós profiljának vizsgálata kvantitatív PCR-rel. A TYMK géncsenedesített, tymk-shRNS sejtvonalat, valamint a kontroll (mock, sc-shRNS és kalibrátor) sejtvonalakat 72 óráig tetraciklinnel kezeltem, majd a sejtekből nyert RNS-t felhasználva, cDNS templát-alapú kvantitatív PCR-t végeztem, a DUT, TK1, DCTD és TYMS génekre specifikus primer párok felhasználásával. A grafikon (A), valamint a táblázat (B) adatait szemlélve, látható, hogy a TYMK gén RNSi-val történő 76%-os hatásfokú csenedesítése nem okozott szignifikáns relatív génexpresszió változást a vizsgált gének esetében. A kontroll sejtvonalak relatív génexpresszió értékei az 5. 3. 1. 2./B ábrában láthatóak.

5. 3. 2. 3. A TYMK géncsenedesítés hatása a sejtek 5FU és FUDr drogokkal szembeni érzékenységre

Egy korábbi tanulmány szerint, a TYMK gén lentivirális shRNS interferenciás csenedesítése humán colon karcinóma sejtekben (HCT-116) fokozta a sejtek doxorubicin érzékenységét a kontroll sejtekhez képest [137]. A tanulmány azonban a fluoropirimidinek kontextusában nem vizsgálta az említett TYMK csenedesített sejtvonalat. Feltételeztük, hogy a tymk-shRNS sejtvonal esetében mért 76%-os TYMK génexpresszió hatással lehet a sejtek fluoropirimidin érzékenységére, ezért a sejtvonalat 5FU és FUDr citotoxicitási vizsgálatnak vettem alá.

A TYMK csenedesített, tymk-shRNS, valamint a kontroll (nem transzfektált és sc-shRNS) sejtvonalak 5FU és FUDr dózisfüggő érzékenységének vizsgálata céljából, a sejteket növekvő koncentrációjú 5FU és FUDr drogokkal kezeltem tetraciklin jelenlétében

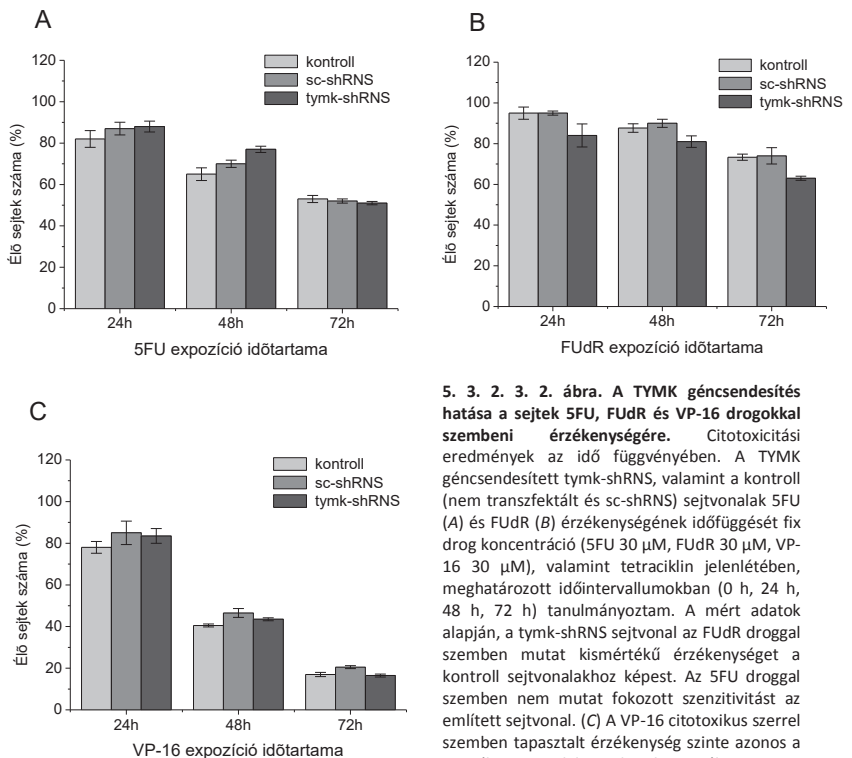
72 órán keresztül. A tapasztalt sejtválaszok szerint, a 76%-os TYMK csendesítés az 5FU komponenssel szemben nem, míg az FudR ágenssel szemben enyhén csökkentette a sejtek toleranciáját. Tehát kismértékű különbség volt tapasztalható a mért FudR IC₅₀ koncentráció értékekben a csendesített és a kontroll sejtvonal között (5. 3. 2. 3. 1. ábra). Azonban a jelen esetben mért IC₅₀ koncentráció értékülönbségek szinte elenyésző mértékűek a dut-shRNS4X sejtvonal esetében tapasztaltakhoz képest (5. 3. 1. 3. 1. ábra).



5. 3. 2. 3. 1. ábra. A TYMK géncsökkentés hatása a sejtek 5FU és FudR drogokkal szembeni érzékenységére. Citotoxicitási eredmények droggkoncentráció függvényében. A TYMK géncsökkentett tymk-shRNS sejtvonal, valamint a kontroll (nem transzfektált és sc-shRNS) sejtvonalak 5FU (A) és FudR (B) dóziszfüggő érzékenységét szemléltetik a grafikonok. A sejteket növekvő koncentrációjú 5FU (0-250 μM) és FudR (0-500 μM) drogokkal kezeltem tetraciklin jelenlétében 72 órán keresztül. (C) A számszerűsített sejtválaszok szerint, a 76%-os TYMK géncsökkentés csak kis mértékben csökkentette a tymk-shRNS sejtek FudR komponenssel szemben mutatott toleranciáját a kontroll (nem transzfektált kontroll IC₅₀: 200.5 ± 3.5; sc-shRNS IC₅₀: 254.4 ± 1.2) sejtvonalakhoz képest. Míg, az 5FU droggal szemben nem bizonyultak érzékenyebbek a tymk-shRNS sejtek a kontroll (nem transzfektált kontroll IC₅₀: 21.04 ± 5.2; sc-shRNS IC₅₀: 21.55 ± 10.3) sejtvonalakhoz képest. Tehát valós szignifikáns különbség nem volt tapasztalható a mért 5FU IC₅₀ koncentráció értékekben a csendesített és a nem transzfektált kontroll sejtvonal között.

A tymk-shRNS sejtvonal 5FU, FudR és VP-16 drogokkal szembeni érzékenységének időfüggését egyedi kezeléseikben, diszkrét drog koncentráció, valamint tetraciklin jelenlétében különböző hosszúságú időszakokban (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) tanulmányoztam. Az 5FU és az FudR ágensekkel szemben mutatott időfüggések a koncentrációfüggéshez hasonló válaszokról számoltak be a tymk-shRNS és a kontroll

sejtvonalak esetében. A VP-16 komponenssel szemben azonban nem mutatható ki eltérő érzékenység a vizsgált sejtvonalak esetében (5. 3. 2. 3. 2. ábra). Ez utóbbi hatásmechanismusa részben megegyezik a doxorubicinéval, azaz mindkét komponens topoizomeráz enzimeket gátol, ennek ellenére a VP-16 kezelést követően nem lehetett fokozott érzékenységet kimutatni a tymk-shRNS sejtvonal esetében összehasonlítva a fent említett colon karcinóma sejtekkel. Az említett tanulmányban alkalmazott lentivirális RNSi – annak ellenére, hogy az adatok nem voltak kvantitatívák – feltételezhetően messze meghaladta az általunk elért RNSi hatékonyságot. Másrészt, számos irodalmi adat szerint az immortalizált vagy transzformált sejtvonalak kemoterápiás szerekre adott toleranciája, valamint rezisztenciája nagymértékben függ a sejtvonalakban felhalmozott repair-gén mutációk számától [155-157].



5. 3. 2. 3. 2. ábra. A TYMK géncsendesítés hatása a sejtek 5FU, FUDr és VP-16 drogokkal szembeni érzékenységére. Citotoxicitási eredmények az idő függvényében. A TYMK géncsendesített tymk-shRNS, valamint a kontroll (nem transzfektált és sc-shRNS) sejtvonalak 5FU (A) és FUDr (B) érzékenységének időfüggését fix drog koncentráció (5FU 30 μ M, FUDr 30 μ M, VP-16 30 μ M), valamint tetraciklin jelenlétében, meghatározott időintervallumokban (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) tanulmányoztam. A mért adatok alapján, a tymk-shRNS sejtvonal az FUDr droggal szemben mutat kismértékű érzékenységet a kontroll sejtvonalakhoz képest. Az 5FU droggal szemben nem mutat fokozott szenzitivitást az említett sejtvonal. (C) A VP-16 citotoxikus szerrel szemben tapasztalt érzékenység szinte azonos a vizsgált sejtvonalak mindegyike esetében.

Összefoglalva: a TYMK gén szignifikáns mértékű RNSi-ás csendesítése nem okozott szignifikáns génexpressziós profilváltozást és számottevően nem fokozta a T-REx™-HeLa sejtvonal érzékenységét fluoropirimidinek, valamint a VP-16 topoizomeráz gátló ágenssel szemben. Feltehetően a TYMK gén megmaradt mRNS szintje (24%) még biztosíthatta azt az enzimmennyiséget, amely elégséges mértékben részt vehetett a timidilát metabolizmusban és ezen keresztül a sejtek normális fiziológiás folyamatainak fenntartásában.

5. 3. 3. A DUT és TYMK gének szimultán géncsendesítése és következményeinek vizsgálata

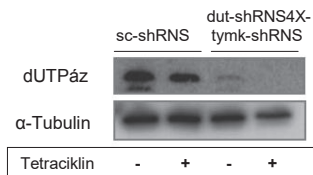
5. 3. 3. 1. A DUT és TYMK gének szimultán csendesítése

A kettős enzimmcsendesítés hatásának vizsgálata informatív lehet a timidilát metabolizmus plaszticitását (génexpressziós profil megváltozása a timidilát metabolizmus enzimeinek tekintetében), valamint a T-REx™-HeLa sejtvonal által preferált fluoropirimidin metabolikus utakat illetően. Mivel a sejtbe bekerült fluoropirimidinek részben a deoxitimidilát útvonalon keresztül anabolizálódnak, így valószínűsíthető, hogy a dut-shRNS4X sejtvonalban a megemelkedett TK1 és TYMK génexpressziók is összefüggésben állhatnak a sejtvonal FUDR ágenssel szemben tanúsított fokozott tolerancia csökkenésével.

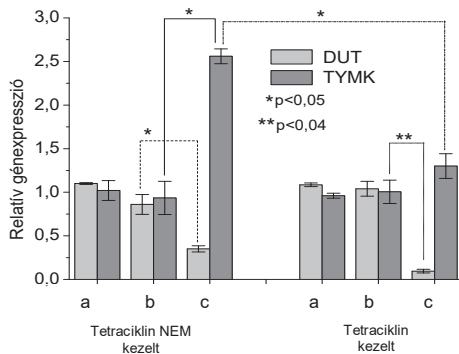
A kettős géncsendesített dut-shRNS4X/tymk-shRNS stabil sejtvonal létrehozásához a DUT és TYMK gének csendesítésénél alkalmazott shRNS vektor-konstrukciókat használtam fel.

A dUTPáz és a kontroll fehérje mennyiségének kimutatása érdekében 72 órás tetraciklin inkubációt követően, immunoblot detekciót végeztem a szimultán csendesített (dut-shRNS4X/tymk-shRNS) és a kontroll sejtvonalból származó fehérjeminták, valamint specifikus fehérje ellenanyagok felhasználásával. Az immunoblot eredménye szerint, a dUTPáz fehérjeszint jelentősen lecsökkent a tetraciklinnel nem kezelt-, valamint detektálási küszöbszint alá csökkent a tetraciklinnel kezelt dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtminták esetében a kontroll mintához (sc-shRNS) képest (5. 3. 3. 1./A ábra).

A



B



C

Tetraciklin kezelés	sejtvonal	relatív génexpresszió (\pm SD)	
		DUT	TYMK
-	sc-shRNS	0,35 \pm 0,035	2,56 \pm 0,084
+	sc-shRNS	0,09 \pm 0,023	1,3 \pm 0,141

5. 3. 3. 1. ábra. A DUT és TYMK gének szimultán géncsökkentése. (A) Immunoblot eredmények. A DUT és TYMK szimultán géncsökkentett, dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonalat, valamint a sc-shRNS kontroll sejtvonalat 72 óráig tetraciklinnel kezeltem, majd a sejtekből nyert összpoteint, valamint dUTPáz és α -Tubulin specifikus ellenanyagok felhasználásával immunoblot detekciót végeztem. A kísérletben tetraciklin kezeletlen mintasort is alkalmaztam. A dUTPáz fehérje mennyisége a tetraciklin kezeletlen dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtmintában jelentősen csökkent, míg a tetraciklinnel kezelt minta esetében detektálhatatlan mennyiségű volt. (B,C) Kvantitatív PCR eredmények. A mock (a), sc-shRNS (b) és a dut-shRNS4X/tymk-shRNS (c) sejtvonalakat 72 óráig tetraciklinnel kezeltem, majd a sejtekből nyert RNS-t felhasználva, cDNS templáton, DUT és TYMK génekre specifikus primer párokat alkalmazva kvantitatív PCR analízist végeztem. A kísérletben tetraciklin kezeletlen mintasort is alkalmaztam. A tetraciklin kezeletlen minták esetében a DUT gén csenkesítése 65%-os hatásfokú volt, míg a tetraciklinnel kezelt minták esetében elérte a 91%-os hatásfokot. Míg a TYMK gén csenkesítése csak a tetraciklin kezelést követően jutott érvényre, minek következtében 256%-ról 130%-ra csökkent a gén relatív expresszió szintje.

A szimultán géncsökkentés hatásfokának meghatározása érdekében, 72 órás tetraciklin expozíciót követően, DUT és TYMK gén specifikus primer párok felhasználásával kvantitatív PCR analízist végeztem a dut-shRNS4X/tymk-shRNS és a kontroll (mock, sc-shRNS és kalibrátor) sejtvonalakból származó cDNS mintákon. A kísérletekben tetraciklinnel nem kezelt mintasorozatot is alkalmaztam. Az mRNS szintet meghatározó kvantitatív mérések szerint, tetraciklin hiányában, a dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonalban a DUT gén mRNS szintje 0.35 ± 0.03 (35% \pm 3%) értékre csökkent a kalibrátor 1 (100%)-szeres értékéhez viszonyítva, ami egy ~ 3 -szoros, szignifikáns ($p < 0,05$) relatív génexpresszió szintcsökkenésnek felel meg.

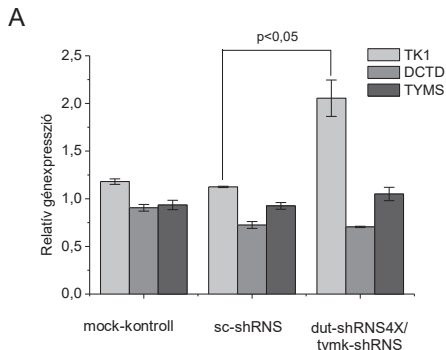
Ugyanezen sejtvonalban a TYMK gén relatív expresszió szintje 2.56 ± 0.08 ($256\% \pm 8\%$)-szoros értékű volt a kalibrátor értékéhez képest. A tetraciklin kezelés hatására a dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonalban a DUT gén repressziója tovább fokozódott, elérve a 0.09 ± 0.02 ($9\% \pm 2\%$) értékű mRNS szintet, ami egy ~ 11 -szeres szignifikáns ($p < 0,04$) relatív génexpresszió szint csökkenést jelent. Ugyanezen sejtmintában a TYMK gén mRNS szintje jelentősen lecsökkent 1.3 ± 0.14 ($130\% \pm 14\%$) értékre, ami egy ~ 2 -szeres, szignifikáns ($p < 0,05$) relatív génexpresszió esésnek felel meg a tetraciklinnel nem kezelt mintánál tapasztalt expresszió szinthez képest (5. 3. 3. 1. /B,C ábra).

Összefoglalva: a dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonalban, tetraciklin expozíciót követően, sikerült egy 91%-os DUT csendesítést elérni, valamint a 35%-os DUT represszió következményeként 256%-ra megemelkedett TYMK génexpressziót sikerült kvázi fiziológiás, 130%-os értékre visszazorítani.

5. 3. 3. 2. A DUT és TYMK gének szimultán csendesítésének hatása a timidilát metabolizmusban esszenciális enzimek génexpressziójára

A dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonal esetében mért szignifikáns értékű DUT és TYMK mRNS szintek esetleges molekuláris következményeinek kimutatása érdekében a TK1, DCTD és TYMS gének expressziós profilját kvantitatív PCR segítségével vizsgáltam meg. A dut-shRNS4X/tymk-shRNS és a kontroll (mock, sc-shRNS és kalibrátor) sejtvonalakat 72 óráig tetraciklinnel kezeltem, majd az említett génekre specifikus primer párok használatával kvantitatív PCR analízist végeztem (5. 3. 3. 2. ábra).

A vizsgált gének mRNS szintjét prezentáló adatok szerint, a hatékony DUT géncsendesítés és a kvázi fiziológiás értékre visszazorított TYMK génexpresszió a TK1 enzim relatív génexpressziójában okozott $2,05 \pm 0,19$ ($205\% \pm 19\%$) értékű, szignifikáns ($p < 0,05$) szintnövekedést a kalibrátor 1 (100%) értékéhez képest, míg a DCTD és TYMS gének relatív génexpressziója a kalibrátor értékéhez közeleső tartományban maradt. (5. 3. 3. 2. ábra).



B

sejtvonal	relatív géneexpresszió (±SD)		
	TK1	DCTD	TYMS
dut-shRNS4X/tymk-shRNS	2,05 ± 0,190	0,7 ± 0,007	1,05 ± 0,070

5. 3. 3. 2. ábra. A dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonal TK1, DCTD és TYMS géneexpressziós profiljának vizsgálata. Kvantitatív PCR eredmények. A szimultán gécnsendesített dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonalban az esetlegesen bekövetkezett géneexpressziós változások kimutatása érdekében kvantitatív PCR analízist végeztem az említett sejtvonal és a kontroll (mock, sc-shRNS és kalibrátor) sejtvonalakból származó cDNS minták, valamint a TK1, DCTD és TYMS génekre specifikus primer párok segítségével. A sejteket 72 óráig tetraciklinnel kezeltem. Az eredmények (A) a TK1 gén relatív expressziójának szignifikáns emelkedését mutatja a kontroll sejtvonalhoz képest. Tehát, (B) a TK1 gén esetében egy ~2-szeres, relatív géneexpresszió emelkedés figyelhető meg a kalibrátor értékéhez viszonyítva. A DCTD és a TYMS gének esetében szignifikáns relatív géneexpresszió változása nem történt a szimultán csendesített sejtvonalban. A kontroll sejtvonalak relatív géneexpresszió értékei az 5. 3. 1. 2./B ábrában láthatóak.

5. 3. 3. 3. A DUT és TYMK gének szimultán csendesítésének hatása a sejtek 5FU és FUDR droggal szembeni érzékenységére.

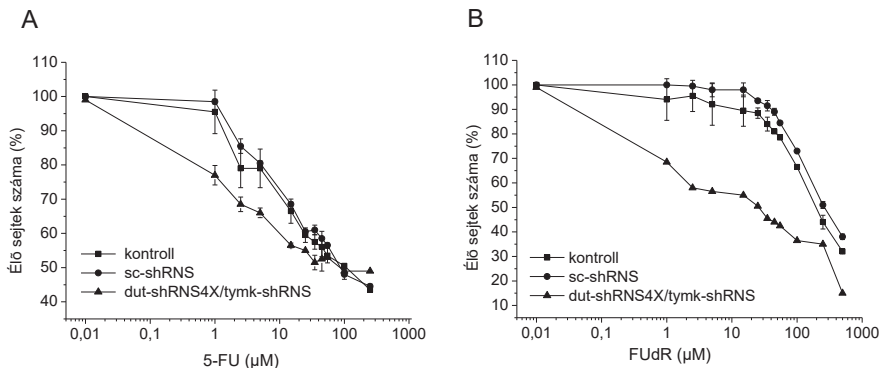
Felmerült a gondolat, miszerint a dUTPáz csendesítés okozta *de novo* timidilát szintetikus út kezdeti szakaszának jelentős funkcionális beszűkülése mellett, a megnövekedett TYMK és TK1 enzim expresszió is hozzájárulhatott a dut-shRNS4X sejtek FUDR droggal szemben tanúsított fokozott szenzitivitásához. Irodalmi források szerint, a TK1 és TYMK enzimek szubsztrátként kezelnek egyes nukleotid analógokat, így részt vehetnek azok sejten belüli biokémiai átalakításában [158-161]. A dut-shRNS4X sejtvonal esetében az említett kinázok expresszió növekedése amellet, hogy részben kompenzálhatta a *de novo* dTTP szintetikus út 94%-os dUTPáz-funkcióvesztését, részben azonban fokozhatta az FUDR >> FdUTP átalakulást is. Az ily módon keletkezett nagyobb koncentrációjú FdUTP, mint aktív metabolit a dUTPáz preventív funkciójának hiányában, nukleotid analóggént beépülhetett a DNS-be és annak fokozott károsodását válthatta ki.

A fenti összefüggéseket figyelembe véve, szerettük volna tudni, vajon a DUT csendesítés következményeként kialakult fokozott TYMK expresszió visszaszorításával növeljük vagy csökkentjük a DUT csendesített sejtvonal 5FU és FUDR szerrel szembeni érzékenységét.

A DUT és TYMK szimultán csendesített dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonal, valamint a kontroll (nem transzfektált és sc-shRNS) sejtvonalak 5FU és FUDR dózisfüggő toleranciájának meghatározása céljából a sejteket növekvő koncentrációjú 5FU és FUDR komponensekkel kezeltet tetraciklin jelenlétében 72 órán keresztül. A kiszámolt IC_{50} koncentrációértékek szerint, a kettős géncsökkentés csökkentette a sejtek fluoropirimidinekkel szembeni toleranciáját a kontrollhoz képest. A dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonal $\sim 2,2$ -ször bizonyult érzékenyebbnek az 5FU komponenssel szemben, míg 8-szor volt szenzitívebb az FUDR drogra a kontroll sejtvonalhoz képest (5. 3. 3. 1./A,B,C ábra). Figyelemre méltó, hogy a jelen esetben számolt IC_{50} koncentrációértékek a dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonal rezisztensebb voltát igazolták az 5FU és FUDR drogokkal szemben egyaránt, összehasonlítva a dut-shRNS4X sejtvonalnál tapasztalt drogérzékenységgel (5. 3. 3. 2. 1./D ábra).

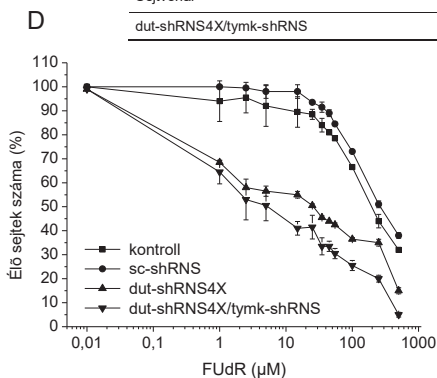
A dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonal, valamint a kontroll sejtvonalak FUDR és VP-16 érzékenységének időfüggését diszkrét drog koncentráció, valamint tetraciklin jelenlétében meghatározott időintervallumokban (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) tanulmányoztam. Az FUDR drogokkal szemben mutatott időfüggések a koncentrációfüggéshez hasonló szenzitivitásról számoltak be a dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonal esetében (5. 3. 3. 2./A ábra). A VP-16 komponenssel szemben enyhe, de nem szignifikáns eltérés látható, ami a sejtvonal kissé elnyújtottabb osztódási ciklusát jelentheti, ami empirikusan is észrevehető volt a kultúra fenntartásakor (5. 3. 3. 2./B ábra). Ha az idő függvényében összehasonlítjuk a dut-shRNS4X/tymk-shRNS és a dut-shRNS4X sejtvonalak FUDR droggal szembeni érzékenységét, jól látható, hogy a szimultán géncsökkentett sejtvonal kevésbé bizonyult szenzitívnek az említett droggal szemben (5. 3. 3. 3. 2./C ábra).

Az eredmények tükrében megállapítható, hogy a dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonalban tapasztalt génexpressziós profil hátterében a sejtek kevésbé voltak szenzitívek az alkalmazott fluoropirimidinre, mint a DUT represszált dut-shRNS4X sejtvonal. A két sejtvonal közti leglényegesebb molekuláris különbség a sejtekben mért eltérő értékű TYMK génexpresszió.



C

Sejtvonal	Kezelés	
	5FU, IC ₅₀ (μM)	FUDr, IC ₅₀ (μM)
dut-shRNS4X/tymk-shRNS	9.59 ± 4.4	25.18 ± 0.77

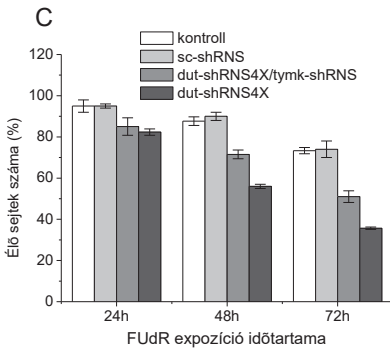
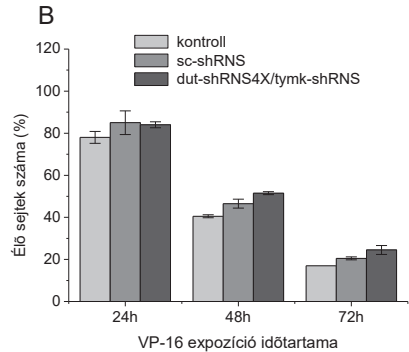
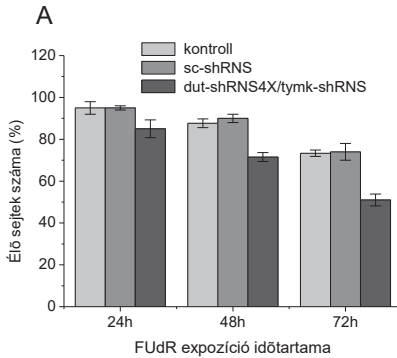


5. 3. 3. 1. ábra. A DUT és TYMK gének szimultán csendesítésének hatása a sejtek 5FU és FUDr droggal szembeni érzékenységére. Citotoxicitási eredmények droggkoncentráció függvényében. Az ábrán (A,B,C) a szimultán géncsendesített dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonal, valamint a kontroll (nem transzfektált és sc-shRNS) sejtvonalak 5FU (A) és FUDr (B) dóziszfüggő érzékenysége látható. A sejteket növekvő koncentrációjú 5FU (0-250 μM) és FUDr (0-500 μM) droggal kezelttem tetraciklin jelenlétében 72 órán keresztül. (C) A szimultán géncsendesítés jelentős mértékben csökkentette a sejtek FUDr komponenssel

szembeni toleranciáját a kontroll (nem transzfektált kontroll IC₅₀: 200.5 ± 3.5; sc-shRNS IC₅₀: 254.4 ± 1.2) sejtvonalakhoz képest. Míg az 5FU droggal szemben jóval kevésbé bizonyultak érzékenyebbek a dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtek a kontroll (nem transzfektált kontroll IC₅₀: 21.04 ± 5.2; sc-shRNS IC₅₀: 21.55 ± 10.3) sejtekhez képest. (D) A grafikon és az IC₅₀ koncentrációértékek alapján, látható, hogy a dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonal rezisztensebb az 5FU és FUDr droggal szemben, összehasonlítva a dut-shRNS4X sejtvonalnál mért értékekkel (5FU IC₅₀: 3.62 ± 1.3; FUDr IC₅₀: 5.0 ± 3.5).

Ezért feltehetően a dut-shRNS4X sejtvonal FUDr iránti magasabb érzékenységének háttérben a fluoropirimidinek metabolizmusára gyakorolt fokozott TYMK katalitikus hatás is szerepet játszhat. Valamint közös lényegi tulajdonsága a két sejtvonalnak, hogy a sejtekben a TK1 enzim expresszió szintje szignifikánsan megemelkedett. A TK1 enzimmatalízis nélkülözhetetlen a fluoropirimidinek biológiai aktiválását illetően, ugyanis a

sejtbe bekerült 5FU és FUDR molekulák csak nukleotid formában képesek belépni a timidilát és/vagy az uridilát és deoxiuridilát anabolikus utakba, amelyek végtermékeként inkorporálódhatnak a nukleinsavakba.



5. 3. 3. 3. 2. ábra. A DUT és TYMK gének szimultán csendesítésének hatása a sejtek FUDR és VP-16 drogokkal szembeni érzékenységére. Citotoxicitási eredmények az idő függvényében. A szimultán gécnsendesített dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonal, valamint a kontroll (nem transzfektált és sc-shRNS) sejtvonalak FUDR (A) és VP-16 (B) érzékenységének időfüggését fix droggkoncentráció (FUDR 30 μ M, VP-16 30 μ M), valamint tetracklin jelenlétében, meghatározott időintervallumokban (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) tanulmányoztam. (A) A mért adatok alapján, a dut-shRNS4X/tymk-shRNS sejtvonal az FUDR droggal szemben mutat fokozottabb érzékenységet a kontroll sejtvonalakhoz képest. (B) A VP-16 citotoxikus szerrel szemben tapasztalt érzékenység szinte azonos a vizsgált sejtvonalak mindegyike esetében. (C) Összehasonlítva a dut-shRNS4X/tymk-shRNS és a dut-shRNS4X sejtvonalak FUDR érzékenységét, látható, hogy a szimultán gécnsendesített sejtvonal rezisztensebbnek bizonyult.

A TK1 és a TYMK enzimek jelen esetben feltételezett metabolikus relevanciáját támaszthatja alá az a megfigyelés is, miszerint számos immortalizált sejtvonal esetében összefüggést találtak a timidin foszforiláz (TP) expressziós szintje és a fluoropirimidinekkel szembeni rezisztencia között [162]. Vagyis a malignusan transzformált sejtekben, sejtvonalakban a timidilát metabolizmusban érintett enzimek génexpressziós szintje

nagymértékben meghatározhatja a kemoterápiás szerként alkalmazott fluoropirimidinek citotoxikus hatékonyságát.

Összefoglalásként elmondható, hogy a dut-shRNS4X sejtvonal esetében a megnövekedett TK1 enzim expresszió egyrészt fokozhatja az említett drogok biológiai aktiválását (leginkább az FUdR származékét) és ezen keresztül a TYMS enzim irreverzibilis gátlását, jelentősen beszűkítve a *de novo* timidilát szintetikus út sebesség meghatározó lépését. Másrésztől nagyobb FdUMP szubsztrát koncentrációt biztosít a szintén megemelkedett expressziójú TYMK enzim számára, amely a fluoropirimidinek nukleinsavakba történő beépülését szorgalmazza.

A fent megfogalmazott összefüggések fényében megállapítható, hogy a dUTPáz csendesítés mindamellet, hogy a dTTP produkció számára jelentős dUMP szint csökkenést okoz, TK1 és TYMK génexpressziós profilváltozást indukál, amelyek hatása több eltérő metabolikus ponton béníthatja meg a fluoropirimidinekkel kezelt sejtek fiziológiai folyamatainak működését.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Szekvencia analízis segítségével a *D. mel.* TDG, UDE és a dUTPáz fehérjék elsődleges szerkezetében monopartit, putatív NLS-eket sikerült azonosítani. A predikció szerint, az UDE fehérje C-terminálisa két eltérő karakterű putatív NLS szekvenciát hordoz. Az UDE C-terminálisát érintő kiterjedt deléciós vizsgálatok csak az SV40 Tag homológ NLS szekvencia szinte egyedüli felelősségét igazolták az UDE fehérje szelektív és kizárólagos nukleáris preferenciájáért. A dUTPáz hosszú izoformájának N-terminálisán egy nem-klasszikus, a humán c-Myc fehérje NLS szekvenciájával homológiát mutató, putatív NLS-t sikerült azonosítani. A szekvencia karakterizálása a szekvenciában lévő neutrális aminosavak meghatározó fontosságát, valamint a központi bázikus tetrapeptid kritikusságát igazolták a szekvencia nukleáris importot determináló funkcióját illetően. Az UDE és dUTPáz fehérjék eltérő karakterű NLS szekvenciáját összehasonlítva, megállapítható, hogy az NLS szekvenciák funkcióképessége, mutációs-toleranciája elsődlegesen a bázikus karakterű aminosav-kiterjedések hosszától függ. Mindamellet az NLS szekvencia kezdő- és záró neutrális aminosavainak jelenléte is meghatározó jelentőséggel bír a maximális NLS funkció kialakítása tekintetében.

A humán dUTPáz- és TYMK gének hatékony géncsendesítését sikerült elérni RNSi segítségével. A dUTPáz-csendesített sejtvonal génexpressziós profilja szerint, a sejtvonal nem a *de novo* dTTP bioszintetikus út helyreállításával válaszolt a dUTPáz funkcióhiányra, hanem a menekítő útvonal TK1 és TYMK enzimek génexpressziós szintjének megemelésével próbálta rekonstituálni a dTTP szintetikus utat. A sejtvonallal végzett citotoxicitási vizsgálatok a fluoropirimidin származékok, a timidilát szintetikus utat illető, eltérő arányú metabolikus érintettségét sejtetik. A dUTPáz és a TYMK gének szimultán géncsendesítése a sejtek TK1 expressziójának szintnövekedését váltotta ki, valamint a sejtek fluoropirimidinekkel szembeni fokozottabb rezisztenciáját okozta a dUTPáz csendesített sejtvonalhoz viszonyítva. Megállapítható, hogy a dUTPáz funkcióvesztés a TK1 és TYMK gének expressziójában szignifikáns profilváltozást indukál, amelynek biokémiai hatása eltérő metabolikus pontokon negatívan befolyásolhatja a fluoropirimidinekkel kezelt sejtek optimális homeosztatisz mőködését.

A lentivirális géntranszfer segítségével létrehozott UDE transzgenikus humán sejtvonal a timinmentes sejthalál mechanizmusának tanulmányozására adhat kísérletes modellrendszert a jövőben.

7. SUMMARY

In the present PhD study, four different *Drosophila* enzymes (the uracil-DNA degrading factor (UDE), the dUTPase and two uracil DNA glycosylases, the TDG, and the SMUG1 homologue) involved in metabolism of uracil-substituted DNA were analyzed by *in silico* method for identifying putative NLS signals in their primary protein structure. According to the prediction, the flexible C-terminal region of UDE possesses classical NLS1 and NLS2 segments, whereas dUTPase has a non-classical monopartite NLS segment consisting of non-polar and basic residues in a row. Extensive deletion and point mutation studies revealed that the monopartite classical NLS2 segment on its own is sufficient for exclusive nuclear localization of the UDE. Molecular characterization studies performed on the dUTPase NLS sequence showed that the existence of non polar and basic residues is essential for the nuclear localization of dUTPase. Comparison of the different types of NLS sequences allows the conclusion that the nuclear targeting potential depends on the high proportion of basic residues and the presence of non-polar residues flanked to a basic core of NLS stretches.

The proper maintenance of thymidylate biosynthesis has a crucial role in preserving DNA integrity in cells. In this PhD study an efficient RNAi-based silencing system was established to downregulate dUTPase and thymidylate kinase (TYMK) gene expressions. Furthermore, we generated stable shRNA HeLa cell lines in which the molecular and cellular responses of gene silencing could be successfully investigated. Silencing of dUTPase on its own induced specific expression level increments for TYMK and thymidine kinase 1 (TK1). Phenotypic investigations revealed increased but distinct sensitization of dUTPase silenced cells to different kind of fluoropyrimidines (5FU and FdUR). These results show that the different fluoropyrimidine prodrugs might prefer distinct biochemical pathways in the cell. Downregulation of TYMK gene on its own did not alter the expression patterns of genes examined, while the simultaneous silencing of dUTPase and TYMK genes induced elevated expression level of TK1 gene and caused less sensitivity for cells towards fluoropyrimidines compared to dUTPase silencing by itself. Both TYMK and TK1 are considered to be enzymes involved in phosphorylation of diverse prodrugs of fluoropyrimidines. Efficient silencing of DUT gene combined with agents demolishing the thymidylate metabolism could accelerate thymineless cell death of malignant tumor cells.

8. KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények:

1. Merényi G, Kónya E and Vértessy BG
Drosophila proteins involved in metabolism of uracil-DNA possess different types of nuclear localization signals. FEBS J 277(2010) 2142-56
2. Gábor Merényi, Júlia Kovári, Judit Tóth, Enikő Takács, Imre Zagyva, Anna Erdei and Beáta G. Vértessy. *Cellular response to efficient dUTPase RNAi silencing in stable HeLa cell lines perturbs expression levels of genes involved in thymidylate metabolism.* „Folyóirat: Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Elfogadva közlésre: 2011. Április 13.”
3. Kovari J., Barabas, O., Merenyi, G., Zagyva, I., Vértessy, B. G.
dUTPase mRNA silencing triggers apoptosis in cancer cells
31st FEBS Congress, Molecules in Health & Disease, Isztambul, Törökország, 2006. június 24-29., poszterelőadás
4. Merényi Gábor
Timinmentes sejthalál vizsgálata humán transzformált sejtvonalakban
MTA Enzimológiai Intézet, Budapest
PhD előadások 2007. 12. 06.
5. Merényi Gábor
Humán dUTPáz csendesítése RNS interferenciával
MTA Enzimológiai Intézet, Budapest
PhD előadások 2009. 04. 16.

Egyéb kapcsolódó közlemény:

1. Zoltán Bozóky, Gergely Róna, Éva Klement, Katalin F. Medzihradzsky, Gábor Merényi, Beáta G. Vértessy, Peter Friedrich. *Calpain-catalyzed proteolysis of human dUTPase specifically removes the nuclear localization signal peptide.* „Folyóirat: PloS One, Elfogadva közlésre: 2011. Március.”

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Gilbert, Walter "The RNA World". *Nature* 319(1986) 618.
2. Pyle, A.M. Ribozymes: a distinct class of metalloenzymes. *Science* 261(1993) 709-714
3. T.Lindahl, Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature* 362(1993) 709–715.
4. Friedberg, EC.; Walker, GC.; Siede, W.; Wood, RD.; Schultz, RA.; Ellenberger, T. *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington, D.C.: ASM Press; (2006).
5. S.P. Jackson, J. Bartek, The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature* 461(2009) 1071-1078.
6. J.C. Shen, et al., High frequency mutagenesis by a DNA methyltransferase, *Cell* 71(1992) 1073–1080.
7. D.W. Mosbaugh, S.E. Bennett, Uracil-excision DNA repair, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 48(1994) 315–370.
8. T.W. Traut, Physiological concentrations of purines and pyrimidines, *Mol. Cell. Biochem.* 140(1994) 1–22.
9. Krokan HE, Drablos F, Slupphaug G. Uracil in DNA--occurrence, consequences and repair. *Oncogene* 21(2002) 8935–48.
10. Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, et al. Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett* 476(2000) 73–7.
11. Barnes DE, Lindahl T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 38(2004) 445–76.
12. Snowden,A., Kow,Y.W. and Van Houten,B. Damage repertoire of the Escherichia coli UvrABC nuclease complex includes abasic sites, base-damage analogues and lesions containing adjacent 5' or 3' nicks. *Biochemistry* 29(1990) 7251–7259.
13. Torres-Ramos,C.A., Johnson,R.E., Prakash,L. and Prakash,S. Evidence for the involvement of nucleotide excision repair in the removal of abasic sites in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 20(2000) 3522–3528.
14. Muramatsu M., Sankaranand V.S., Anant S., et al., Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells, *J. Biol. Chem.* 274(1999) 18470–18476.
15. Arakawa H, Hauschild J, Buerstedde JM. Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science* 295(2002) 1301–1306.
16. Rada C, Williams GT, Nilsen H, Barnes DE, Lindahl T, Neuberger MS. Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol* 12(2002) 1748–1755.
17. Revy P, Muto T, Levy Y, et al., Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102(2000) 565–575.
18. Krokan H.E., Standal R., Slupphaug G., DNA glycosylases in the base excision repair of DNA, *Biochem J* 325 (Pt 1) (1997) 1-16.
19. Dianov,G. and Lindahl,T. Reconstitution of the DNA-base excision-repair pathway. *Curr. Biol.*, 4(1994) 1069–1076.

20. Dodson, M.L., M.L. Michaels, and R.S. Lloyd, Unified catalytic mechanism for DNA glycosylases. *J Biol Chem.*, 269(52)(1994) 32709-12.
21. Radicella, J.P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M.S. and Boiteux, S. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94(1997) 8010-8015.
22. Mol, C.D., Parikh, S.S., Putnam, C.D., Lo, T.P and Tainer, J.A. DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 28(1999) 101-128.
23. Nilsen H., Krokan H.E., Base excision repair in a network of defence and tolerance, *Carcinogenesis* 22(2001) 987-998.
24. Lindahl, T., An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(9)(1974) 3649-53.
25. Olsen, L.C., Aasland, R., Wittwer, C.U., Krokan, H.E. and Helland, D.E. Molecular cloning of human uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme. *EMBO J.*, 8 (1989) 3121-3125.
26. Nilsen, H., Otterlei, M., Haug, T., Solum, K., Nagelhus, T.A., Skorpen, F. and Krokan, H.E. Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene. *Nucleic Acids Res.*, 25(1997) 750-755.
27. Haushalter, K.A., Stukenberg, P.T., Kirschner, M.W. and Verdine, G.L. Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors. *Curr. Biol.*, 9(1999) 174-185.
28. Neddermann, P., Gallinari, P., et al., Cloning and expression of human G/T mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.*, 271(1996) 12767-74.
29. Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H.-H., Jiricny, J. and Bird, A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*, 401(1999), 301-304.
30. Petronzelli, F., Riccio, A., et al., Biphasic kinetics of the human DNA repair protein MED1 (MBD4), a mismatch-specific DNA N-glycosylase. *J. Biol. Chem.*, 275(42)(2000) 32422-9.
31. Otterlei, M., et al., Nuclear and mitochondrial splice forms of human uracil-DNA glycosylase contain a complex nuclear localisation signal and a strong classical mitochondrial localisation signal, respectively. *Nucleic Acids Res*, 26(20)(1998) 4611-7.
32. L. Hagen, J. Pena-Diaz, B. Kavli, M. Otterlei, G. Slupphaug, H.E. Krokan, Genomic uracil and human disease, *Exp. Cell Res.* 312(2006) 2666-2672.
33. Haug T, Skorpen F, Aas PA, Malm V, Skjelbred C, Krokan HE. Regulation of expression of nuclear and mitochondrial forms of human uracil-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res.* 26(1998) 1449-1457.
34. Kavli, B., et al., hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U:A matches, U:G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup. *J Biol Chem*, 277(42)2002 39926-36.
35. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, Kavli B, Alseth I, Krokan HE, Tainer JA. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell.* 80(1995) 869-878.
36. Slupphaug G, Mol CD, Kavli B, Arvai AS, Krokan HE, Tainer JA. A nucleotide-flipping mechanism from the structure of human uracil-DNA glycosylase bound to DNA. *Nature.* 384(1996) 87-92.

37. Otterlei, M., Warbrick, E., et al., Post-replication base excision repair in replication foci. *EMBO J.*, 18(1999) 3834–3844.
38. Kavli B, Andersen S, Otterlei M, Liabakk NB, Imai K, Fischer A, Durandy A, Krokan HE, Slupphaug G. B cells from hyper-IgM patients carrying UNG mutations lack ability to remove uracil from ssDNA and have elevated genomic uracil. *J. Exp. Med.* 201(2005) 2011–2021.
39. Nilsen, H., Rosewell, I., et al., Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication. *Mol. Cell* (2000) 1059–1065.
40. Aravind, L. and E.V. Koonin, The alpha/beta fold uracil DNA glycosylases: a common origin with diverse fates. *Genome Biol.* 1(4)2000. RESEARCH0007
41. Nilsen H, Haushalter KA, Robins P, Barnes DE, Verdine GL, Lindahl T. Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase. *EMBO J.* (20)2001 4278–4286
42. M. Matsubara, T. Tanaka, H. Terato, H. Ide, Action mechanism of human SMUG1 uracil-DNA glycosylase, *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* (2005) 295–296.
43. Pettersen HS, Sundheim O, Gilljam KM, Slupphaug G, Krokan HE, Kavli B. Uracil-DNA glycosylases SMUG1 and UNG2 coordinate the initial steps of base excision repair by distinct mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 35(12)2007 3879–92.
44. Wibley JE, Waters TR, Haushalter K, Verdine GL, Pearl LH. Structure and specificity of the vertebrate anti-mutator uracil-DNA glycosylase SMUG1. *Mol. Cell.* 11 (2003) 1647–1659.
45. U. Hardeland, et al., The versatile thymine DNA-glycosylase: a comparative characterization of the human, *Drosophila* and fission yeast orthologs, *Nucleic Acids Res* 31(2003) 2261–2271.
46. T. Visnes, B. Doseth, et al., Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 364 (2009) 563–568.
47. Barrett, T. E., et al., Crystal structure of a G:T/U mismatch-specific DNA glycosylase: mismatch recognition by complementary-strand interactions. *Cell* 92(1998) 117–129.
48. Barrett TE, Schärer OD, Savva R, Brown T, Jiricny J, Verdine GL, Pearl LH. Crystal structure of a thwarted mismatch glycosylase DNA repair complex. *EMBO J.* (23)1999 6599–609.
49. U. Hardeland, et al., Cell cycle regulation as a mechanism for functional separation of the apparently redundant uracil DNA glycosylases TDG and UNG2, *Nucleic Acids Res* 35(2007) 3859–3867.
50. Tini, M., Benecke, et al., Association of CBP/p300 acetylase and thymine DNA glycosylase links DNA repair and transcription. *Molec. Cell* 9(2002) 265–277.
51. Baba, D., Maita, N., Jee, J.-G., et al., Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature* 435(2005) 979–982.
52. Hendrich, B., Bird, A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Molec. Cell. Biol.* 18(1998) 6538–6547,
53. J.H. Yoon, et al., Human thymine DNA glycosylase (TDG) and methyl-CpG-binding protein 4 (MBD4) excise thymine glycol (Tg) from a Tg:G mismatch, *Nucleic Acids Res* 31(2003) 5399–5404.
54. F. Petronzelli, A. Riccio, G.D. et al., Investigation of the substrate spectrum of the human mismatch-specific DNA N-glycosylase MED1 (MBD4): fundamental role of the catalytic domain, *J Cell Physiol* 185(2000) 473–480.
55. Millar, C. B., Guy, J., Sansom, O. J., et al., Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science* 297(2002) 403–405.

56. R.A. Sreaton, S. Kiessling, O.J. Sansom, et al., Fas-associated death domain protein interacts with methyl-CpG binding domain protein 4: a potential link between genome surveillance and apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 5211-5216.
57. Bekesi A, Pukancsik M, Muha V, et al., A novel fruitfly protein under developmental control degrades uracil-DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 355(2007) 643-648.
58. Bekesi A, Pukancsik M, Haasz P, Association of RNA with the uracil-DNA-degrading factor has major conformational effects and is potentially involved in protein folding. *FEBS J.* 278(2)2011 295-315.
59. Pukancsik M, Bekesi A, Klement E, et al., Physiological truncation and domain organization of a novel uracil-DNA-degrading factor. *FEBS J.* (2010)
60. Nation, M.D., et al., Control of *Drosophila* deoxyuridine triphosphatase. Existence of a developmentally expressed protein inhibitor. *Biochem. J.*, 259(1989) 593-596.
61. Dudley, B., Hammond, A. and Deutsch, W.A. The presence of uracil-DNA glycosylase in insects is dependent on developmental complexity. *J. Biol. Chem.*, 267(1992) 11964-11967.
62. Deutsch, W.A. Why do pupating insects lack an activity for the repair of uracil-containing DNA? One explanation involves apoptosis. *Insect Mol. Biol.*, 4(1995) 1-5.
63. Lu AL, Li X, Gu Y, et al. Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. *Cell Biochem Biophys* (35)2001 141-70.
64. Li L, Connor EE, Berger SH, Wyatt MD. Determination of apoptosis, uracil incorporation, DNA strand breaks, and sister chromatid exchanges under conditions of thymidylate deprivation in a model of BER deficiency. *Biochem Pharmacol* (70)2005 1458-68
65. Bransteitter R, Sneedden JL, Allen S, Pham P, Goodman MF., First AID (activation-induced cytidine deaminase) is needed to produce high affinity isotype-switched antibodies., *J Biol Chem.* 281(25)(2006) 16833-6.
66. Gauld SB, Dal Porto JM, Cambier JC. B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. *Science* 296 (2002) 1641-1642.
67. Maul RW, Gearhart PJ. AID and somatic hypermutation. *Adv Immunol.* 105(2010) 159-91.
68. Maul RW, Saribasak H, Martomo SA, et al., Uracil residues dependent on the deaminase AID in immunoglobulin gene variable and switch regions. *Nat Immunol.* 1(2011) 70-6.
69. Vertessy BG & Toth J Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res* 42(2009) 97-106.
70. Vertessy, B.G., et al., Identification of tyrosine as a functional residue in the active site of *Escherichia coli* dUTPase. *Biochim Biophys Acta*, 1205(1)(1994) 146-50.
71. Larsson, G., et al., Crystal structure of the *Escherichia coli* dUTPase in complex with a substrate analogue (dUDP). *Nat Struct Biol*, 3(6)(1996) 532-8.
72. Barabas, O., et al., Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase. *J Biol Chem*, 2004. 279(41): p. 42907-15.
73. McGeehan JE, Depledge NW, McGeoch DJ., Evolution of the dUTPase gene of mammalian and avian herpesviruses. *Curr Protein Pept Sci.* (4)(2001) 325-33.

74. McGeoch DJ., Protein sequence comparisons show that the 'pseudoproteases' encoded by poxviruses and certain retroviruses belong to the deoxyuridine triphosphatase family. *Nucleic Acids Res.* 18(14)(1990) 4105-10
75. Moroz OV, et al., The crystal structure of a complex of *Campylobacter jejuni* dUTPase with substrate analogue sheds light on the mechanism and suggests the "basic module" for dimeric d(C/U)TPases. *J Mol Biol.* (5)(2004) 1583-97
76. Cedergren-Zeppezauer ES, Larsson G, Nyman PO, Dauter Z, Wilson KS. Crystal structure of a dUTPase. *Nature.* (355)1992 740-3
77. Mol, C.D., et al., Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits. *Structure*, 4(9)(1996) 1077-92.
78. Caradonna SJ & Cheng YC The role of deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase, uracil-DNA glycosylase, and DNA polymerase alpha in the metabolism of FUdR in human tumor cells. *Mol Pharmacol* 18(1980) 513-520.
79. Ladner, R.D. and S.J. Caradonna, The human dUTPase gene encodes both nuclear and mitochondrial isoforms. Differential expression of the isoforms and characterization of a cDNA encoding the mitochondrial species. *J Biol Chem*, 272(30)(1997) 19072-80.
80. Caradonna, S. and S. Muller-Weeks, The nature of enzymes involved in uracil-DNA repair: isoform characteristics of proteins responsible for nuclear and mitochondrial genomic integrity. *Curr Protein Pept Sci*, 2(4) (2001) 335-47.
81. Tinkelenberg, B.A., et al., Identification of sequence determinants of human nuclear dUTPase isoform localization. *Exp Cell Res*, 287(1)(2003) 39-46.
82. Ladner, R.D., et al., Identification of a consensus cyclin-dependent kinase phosphorylation site unique to the nuclear form of human deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase. *J Biol Chem*, 271(13) (1996) 7752-7.
83. Strahler, J.R., et al., Maturation stage and proliferation-dependent expression of dUTPase in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(11)1993 4991-5.
84. Giroir, L.E. and W.A. Deutsch, *Drosophila* deoxyuridine triphosphatase. Purification and characterization. *J Biol Chem*, 262(1)1987 130-4.
85. Muha V, et al., Nuclear localization signal-dependent and -independent movements of *Drosophila melanogaster* dUTPase isoforms during nuclear cleavage. *Biochem Biophys Res Commun* 381(2009) 271–275.A.
86. Bekesi A., et al., Developmental regulation of dUTPase in *Drosophila melanogaster*, *J Biol Chem* 279(2004) 22362-22370.
87. Kovari, J., et al., Altered active site flexibility and a structural metal-binding site in eukaryotic dUTPase: kinetic characterization, folding, and crystallographic studies of the homotrimeric *Drosophila* enzyme. *J Biol Chem*, 279(17)(2004) 17932-44.
88. Ladner, R.D. The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. *Curr Protein Pept Sci*, 2(2001) 361-370.
89. Ahmad, S.I., Kirk, S.H. and Eisenstark, A. Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Microbiol*, 52(1998) 591-625.
90. Nyman, P.O., Introduction. dUTPases. *Curr Protein Pept Sci*, 2(4)2001 277-85.
91. Guillet, M. and Boiteux, S. Origin of endogenous DNA abasic sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 23(2003) 8386–8394.
92. Rogstad, D.K., et al., Endogenous DNA lesions can inhibit the binding of the AP-1 (c-Jun) transcription factor. *Biochemistry*, 41(25)2002 8093-102.

93. Goulian, M., B. Bleile, and B.Y. Tseng, The effect of methotrexate on levels of dUTP in animal cells. *J Biol Chem*, 255(22)(1980) 10630-7.
94. Lari, S.U., et al., Quantitative determination of uracil residues in Escherichia coli DNA: Contribution of ung, dug, and dut genes to uracil avoidance. *DNA Repair (Amst)*, 5(12)2006 1407-20.
95. el-Hajj, H.H., Zhang, H. and Weiss, B. Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in Escherichia coli. *J Bacteriol*, 170(1988) 1069-1075.
96. Gadsden, M.H., McIntosh, et al., dUtp pyrophosphatase is an essential enzyme in Saccharomyces cerevisiae. *Embo J*, 12(1993) 4425-4431.
97. Koehler, S.E. and Ladner, R.D. Small interfering RNA-mediated suppression of dUTPase sensitizes cancer cell lines to thymidylate synthase inhibition. *Mol Pharmacol*, 66(2004) 620-626.
98. Goulian, M., Bleile, et al., Mechanism of thymineless death. *Adv Exp Med Biol*, 195 Pt B(1986) 89-95.
99. Longley, D.B., Harkin, D.P. and Johnston, P.G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3(2003) 330-338.
100. Ádám Veronika. Orvosi Biokémia. 2002. Medicina Tankönyvkiadó.
101. Jeremy M Berg, John L Tymoczko, and Lubert Stryer, *Biochemistry*, 5th edition, New York: W H Freeman; 2002. ISBN-10: 0-7167-3051-0
102. Jackson R.C et al., *The Biochemical basis for Methotrexate Cytotoxicity.*, Academic New York (1988) 289-315
103. Houghton JA, Tillman DM, Harwood FG. Ratio of 2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate/thymidine-5'-triphosphate influences the commitment of human colon carcinoma cells to thymineless death. *Clin Cancer Res*. 7(1995) 1723-30.
104. Yoshioka A, et al., Deoxiribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine induced DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem*. 262(1987) 8235-8241
105. Kidd EA, Yu J, Li X, Shannon WD, et al., Variance in the expression of 5 Fluorouracil pathway genes in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 11(7)2005 2612-9.
106. Noordhuis, P., Holwerda, U., et al., 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Ann Oncol*, 15(2004) 1025-1032
107. Kufe, D.W. and Major, P.P. 5-Fluorouracil incorporation into human breast carcinoma RNA correlates with cytotoxicity. *J Biol Chem*, 256(1981) 9802-9805.
108. Kanamaru R, et al., The inhibitory effects of 5-fluorouracil on the metabolism of preribosomal and ribosomal RNA in L-1210 cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*. 17(1)1986 43-6.
109. Ghoshal K, et al., Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res*. 54(3)1994 632-6.
110. Cook A, Bono F, Jinek M & Conti E Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu Rev Biochem* 76(2007) 647–671.
111. Strambio-De-Castillia C, Niepel M, Rout MP. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(2010) 490-501.
112. Christophe D, Christophe-Hobertus C & Pichon B., Nuclear targeting of proteins: how many different signals? *Cell Signal* 12(2000) 337–341.
113. Fries T, Betz C, Sohn K, et al., A novel conserved nuclear localization signal is recognized by a group of yeast importins. *J Biol Chem* 282(2007) 19292–19301.

114. Kalderon D & Smith AE., In vitro mutagenesis of a putative DNA binding domain of SV40 large-T. *Virology* 139(1984) 109–137.
115. Robbins J, et al., C Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64(1991) 615–623.
116. Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc)*. 72(13)(2007) 1439-57.
117. Dang CV & Lee WM Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol Cell Biol* 8(1988) 4048–4054.
118. Jans DA, Hübner S. Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev*. 76(3)(1996) 651-85.
119. Hall, M. N., Craik, C., and Hiraoka, Y. Homeodomain of yeast repressor alpha 2 contains a nuclear localization signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(1990) 6954-6958.
120. Lange A, et al., Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem*. 282(8) 2007) 5101-5.
121. Zhou G, Doçi CL, Linggen MW. Identification and functional analysis of NOL7 nuclear and nucleolar localization signals. *BMC Cell Biol*. 11 (2010) 74.
122. Welch K, et al., RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin- α 3. *Mol Cell Biol* 19(1999) 8400–8411.
123. Makkerh JP, Dingwall C & Laskey RA Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr Biol* 6(1996) 1025–1027.
124. El Alami M, et al., Characterisation of a tripartite nuclear localisation sequence in the regulatory protein Lys14 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 38(2)2000 78-86.
125. Conti E, et al., Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell*. 94(2)(1998) 193-204.
126. Madrid AS & Weis K., Nuclear transport is becoming crystal clear. *Chromosoma* 115(2006) 98–109.
127. Patenaude AM, Orthwein A, Hu Y, Campo VA, Kavli B, Buschiazio A, Di Noia JM. Active nuclear import and cytoplasmic retention of activation-induced deaminase. *Nat Struct Mol Biol* 16 (2009) 517–527.
128. A. Farkas, P. et al., Autolytic activation and localization in Schneider cells (S2) of calpain B from *Drosophila*, *Biochem J* 378(2004) 299-305.
129. Ujhelly O, et al., Application of a human multidrug transporter (ABCG2) variant as selectable marker in gene transfer to progenitor cells. *Hum Gene Ther* 14 (2003): 403–412.
130. Horton P, et al.,: WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* 35 (2007), Web Server: W585-587.
131. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89 (1992) 5547-5551.
132. Gossen M, Bujard H. Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary. *Biotechniques*. 19 (1995) 213-216
133. Nishijima H, et al., Improved applications of the tetracycline-regulated gene depletion system. *Biosci Trends*. (5)2009 161-7.
134. Sun Y, Chen X, Xiao D., Tetracycline-inducible expression systems: new strategies and practices in the transgenic mouse modeling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. (4)(2007) 235-46.

135. Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 296(2002) 550-553.
136. Studebaker, A.W., et al., Modulation of human dUTPase using small interfering RNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 327(2005) 306-310.
137. Hu, C.M. and Chang, Z.F. Synthetic lethality by lentiviral short hairpin RNA silencing of thymidylate kinase and doxorubicin in colon cancer cells regardless of the p53 status. *Cancer Res*. 68(2008) 2831-2840.
138. Schmittgen TD, Livak KJ., Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 3(6)2008 1101-8.
139. Pfaffl, M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(2001)
140. Barabas, O., et al., dUTPase and nucleocapsid polypeptides of the Mason-Pfizer monkey virus form a fusion protein in the virion with homotrimeric organization and low catalytic efficiency. *J Biol Chem*, 278(2003) 38803-38812.
141. Varga, B., et al., Active site closure facilitates juxtaposition of reactant atoms for initiation of catalysis by human dUTPase. *FEBS Lett*, 581(2007) 4783-4788.
142. Sherman PA & Fyfe JA Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers. *Anal Biochem* 180(1989) 222-226.
143. Conti E & Kuriyan J Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure* 8(2000) 329–338.
144. G. Merenyi, E. Konya, B.G. Vertessy, Drosophila proteins involved in metabolism of uracil-DNA possess different types of nuclear localization signals, *FEBS J*. 277(2010) 2142-2156.
145. Canman CE, et al., Induction of resistance to fluorodeoxyuridine cytotoxicity and DNA damage in human tumor cells by expression of *Escherichia coli* deoxyuridinetriphosphatase. *Cancer Res* 54(1994) 2296-2298.
146. Webley SD, et al., Deoxyuridine triphosphatase (dUTPase) expression and sensitivity to the thymidylate synthase (TS) inhibitor ZD9331. *Br J Cancer* 83(2000) 792-799.
147. Grem JL, et al., Thymidine kinase, thymidylate synthase, and dihydropyrimidine dehydrogenase profiles of cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen. *Clin Cancer Res*. 4(2001) 999-1009.
148. Maley F & Maley GF A tale of two enzymes, deoxycytidylate deaminase and thymidylate synthase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 39(1990) 49-80.
149. Ladner RD, et al., dUTP nucleotidohydrolase isoform expression in normal and neoplastic tissues: association with survival and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Cancer Res* 60(2000) 3493-3503
150. Parsels LA, et al., Mechanism and pharmacological specificity of dUTPase-mediated protection from DNA damage and cytotoxicity in human tumor cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 42(1998) 357-362.
151. Baldwin, E.L. and Osherooff, N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 5(2005) 363-372.
152. Bebenek K & Kunkel TA) Frameshift errors initiated by nucleotide misincorporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(1990) 4946-4950.
153. Ke PY, et al., Control of dTTP pool size by anaphase promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability. *Genes Dev* 19(2005) 1920-1933.

154. Sclafani, R.A. and Fangman, W.L. Yeast gene CDC8 encodes thymidylate kinase and is complemented by herpes thymidine kinase gene TK. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(1984) 5821-5825.
155. Giovannetti E, et al. Changes in the status of p53 affect drug sensitivity to thymidylate synthase (TS) inhibitors by altering TS levels. *Br J Cancer* 96 (2007) 769-75.
156. 14. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74 (1993) 957-67.
157. Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, et al. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol* 21 (2003) 241-50.
158. Morgenroth, A., et al., Preferential tumor targeting and selective tumor cell cytotoxicity of 5-[131/125I]iodo-4'-thio-2'-deoxyuridine. *Clin Cancer Res*, 14(2008) 7311-7319.
159. Sandrini, M.P., Clausen, A.R., Munch-Petersen, B. and Piskur, J. Thymidine kinase diversity in bacteria. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 25(2006) 1153-1158.
160. Lavie, A. and Konrad, M. Structural requirements for efficient phosphorylation of nucleotide analogs by human thymidylate kinase. *Mini Rev Med Chem*, 4(2004) 351-359.
161. Hu, R., Li, et al., Behavior of thymidylate kinase toward monophosphate metabolites and its role in the metabolism of 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-beta-L-arabinofuranosyl)-5-methyluracil (Clevudine) and 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine in cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(2005) 2044-2049.
162. A Evrard, et al., Increased cytotoxicity and bystander effect of 5-fluorouracil and 5C-deoxy-5-fluorouridine in human colorectal cancer cells transfected with thymidine phosphorylase. *British Journal of Cancer* 80(1999) 1726-1733
163. Saenz DT, Poeschla EM., FIV: from lentivirus to lentivector. *J Gene Med. Suppl* 1(2004) S95-104.