

Uracil-DNS degradáló faktor szerkezeti és funkcionális analízise

Pukáncsik Mária

okleveles biomérnök

Témavezető:

Dr. Vértessy G. Beáta

A biológiai tudományok doktora, Tudományos tanácsadó

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ, Enzimológiai Intézet

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori iskola

A doktori iskola vezetője:

Prof. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Program

Programvezető:

Prof. Gráf László



Készült:

a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Enzimológiai Intézetében

2010.

Egyéni szerepem a disszertáció eredményeiben

A doktori értekezésemben foglalt eredmények több kutató közös munkájából születtek. Egyes szám első személyben fogalmaztam a saját és többes szám első személyben a közös munkából származó eredményekről szóló részeknél, továbbá minden esetben megneveztem az adott kísérletet végző kollégáimat.

Tartalomjegyzék

1.	Köszönetnyilvánítás	5
2.	Rövidítések jegyzéke	6
3.	Irodalmi Áttekintés	10
3.1.	DNS integritásának jelentősége	10
3.1.1.	A nukleinsavak felépítése.....	10
3.1.2.	A DNS károsodás és javítás	11
3.1.3.	A DNS integritás megváltozásának következményei	12
3.2.	Hogyan jelenhet meg uracil a DNS-ben?.....	12
3.2.1.	A timin bázis szerepe	12
3.2.2.	A timin helyett uracil a genomban	14
3.2.3.	Az uracil szerepe fiziológias folyamatokban	15
3.2.4.	Az uracil DNS-be épülésének útvonalai	15
3.3.	A báziskivágáson alapuló javító mechanizmus (BER)	17
3.4.	Az uracil-DNS metabolizmusban szerepet játszó fehérje családok	20
3.4.1.	Az uracil-DNS glikozilázok	20
3.4.2.	dUTPázok	23
3.5.	Az uracil szerepe a Drosophila melanogaster egyedfejlődésében	26
4.	Célkitűzések	28
5.	Alkalmazott Módszerek	29
5.1.	A Drosophila genomi DNS uracil tartalmának kimutatása során alkalmazott módszerek	29
5.1.1.	Ecetmuslica tenyésztése és különböző fejlődési stádiumok gyűjtése	29
5.1.2.	A genomi DNS preparálása.....	29
5.1.3.	Normál és uracil-tartalmú plazmid előállítása	30
5.1.4.	Nukleinsav koncentrációmérés	31
5.1.5.	DNS minták agaróz gélelektroforézise	31
5.1.6.	Agaróz assay	32
5.1.7.	Aldehid reaktív próba (ARP)	32
5.1.8.	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) kapcsolt tömegspektrometria (MS)	33
5.1.8.1	Szabad uracil mérése HPLC-MS módszerrel.....	33

5.1.8.2	Derivatizált uracil mérése HPLC-MS-sel	34
5.2.	Az UDE fehérje szerkezet és funkció vizsgálata során alkalmazott módszerek.....	34
5.2.1.	Fehérje termelés	34
5.2.1.1	Klónozás és mutagenézis	34
5.2.1.2	Fehérje expresszió és tisztítás	35
5.2.2.	A fehérjeminták jellemzése.....	37
5.2.2.1	SDS-gélelektroforézis, fehérje koncentráció meghatározása.....	37
5.2.2.2	Katalitikus aktivitás teszt	38
5.2.2.3	Elektroforetikus mobilitás teszt (EMSA).....	39
5.2.2.4	Western blot (immunblot).....	39
5.2.2.5	Glikoziláz aktivitás vizsgálata két független módszerrel.....	41
5.2.2.6	Limitált proteolízis.....	41
5.2.2.7	Az UDE-nukleinsav komplex elválasztása	42
5.2.3.	Reverz transzkripció és valós idejű PCR (RT-PCR).....	42
5.2.4.	Analitikai gélszűrés.....	43
5.2.5.	Analitikai ultracentrifuga	44
5.2.5.1	Szedimentációs sebességi mérés	44
5.2.5.2	Szedimentációs egyensúlyi mérés.....	44
5.2.6.	Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia.....	45
5.2.7.	Bioinformatikai módszerek.....	46
5.2.8.	Fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok.....	47
5.2.9.	ESPRIT technológia.....	48
5.2.9.1	Könyvtár struktúra létrehozása.....	48
5.2.9.2	A könyvtárak vizsgálata	49
6.	Eredmények és Kiértékelésük.....	51
6.1.	Lárva DNS uracil tartalmának meghatározása.....	51
6.1.1.	Kvalitatív kimutatás	51
6.1.1.1	Uracil tartalmú plazmid előállítása és felszaporítása	51
6.1.1.2	Agaróz assay optimalizálása kontrol plazmidokon.....	52
6.1.1.3	Genomiális DNS preparálása	53
6.1.1.4	Agaróz assay genomiális DNS-sel.....	54
6.1.2.	Fél- kvantitatív módszer.....	55
6.1.2.1	Glikoziláz reakcióval összekapcsolt aldehid reaktív próba.....	55
6.1.3.	Kvantitatív meghatározás.....	56

6.1.3.1	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (HPLC- MS).....	56
6.1.3.2	Derivatizált uracil kvantitatív analízise.....	59
6.2.	Uracil -DNS degradáló faktor szerkezet-funkció vizsgálata.....	65
6.2.1.	Uracil-DNS degradáló faktor (UDE) izolálása és azonosítása.....	65
6.2.2.	Egy új uracil-DNS-re specifikus fehérje család első tagja.....	66
6.2.3.	Az UDE szerkezetének vizsgálata.....	70
6.2.3.1	Domén organizációs analízis limitált proteolízissel.....	70
6.2.3.2	Fehérje domének azonosítása ESPRIT módszerrel.....	73
6.2.3.3	Az UDE szerkezeti predikciója és <i>de novo</i> modellezése	79
6.2.4.	A rekombináns UDE funkciójának karakterizálása	82
6.2.4.1	A fehérje katalitikus aktivitásának jellemzése	82
6.2.4.2	Az UDE homológ karakterizálása <i>Tribolium castaneumban</i>	88
6.2.4.3	Az UDE katalitikus helyének térképezése mutáció analízissel.....	96
6.2.4.4	Az UDE nukleinsav kötő képességének vizsgálata.....	99
6.2.4.5	Az UDE-ribonukleinsav által alkotott komplex analízise.....	107
6.2.4.6	Az UDE fehérje fejlődéshez kötött kontrollja.....	113
7.	Összefoglalás	114
8.	Summary	115
9.	Közlemények listája	116
9.1.	A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények	116
9.2.	Szóbeli előadások (az előadó neve aláhúzva)	117
9.3.	Poszter előadások (az előadó neve aláhúzva)	117
9.4.	További közlemények	118

1. Köszönetnyilvánítás

Elsőként köszönettel tartozom témavezetőmnek **Dr. Vértessy Beátának**, aki lehetőséget nyújtott arra, hogy a kutatócsoportjában dolgozhassak és megismertetett a téma alapjaival. Külön köszönöm, hogy szakértelemmel, valamint odafigyeléssel irányított és segített a felmerülő problémák megoldásában, támogatta hazai és külföldi konferenciákon és szakmai továbbképzéseken való részvételemet.

Köszönöm kollégáimnak **Dr. Békési Angélnak, Zagya Imrének, Merényi Gábornak, Horváth Andrásnak, Muha Villónak, Horváth Gergőnek, Kónya Emesének, Leveles Ibolyának**, hogy az itt leírt kutatásokban partnereim voltak és értékes eredményekkel járultak hozzá a kéziratok elkészüléséhez.

Továbbá köszönöm hazai és külföldi együttműködő partnereinknek **Dr. Darren Hartnak, Dr. Janusz Bujnicki-nek és Dr. Jan Kosinski-nek, Dr. Carlos Alfonso-nak, Dr. Germán Rivas-nak, Dr. Szabó Pálnak, Dr. Kele zoltánnak, Dr. Haracska Lajosnak, Dr. Burkovics Péternek, Dr. Hunyadi-Gulyás Évának, Klement Évának**, hogy olyan mérési eredményekkel járultak hozzá a munkámhoz, amelyek fontos részeit képezték az elkészült publikációknak.

Szeretném megköszönni **minden Munkatársamnak**, hogy építő hozzászólásaikkal számos esetben hozzájárultak hipotéziseim kialakulásához és a gondolatmenetek végigviteléhez.

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

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

Végül nagyon köszönöm **Szüleimnek és Páromnak**, hogy mindvégig hittek bennem, biztattak és támogatták tanulmányaimat.

2. Rövidítések jegyzéke

5hmeU:	5'-hidroximetil-uridin
5meCpG:	5-metil-citidinből és guanozinból álló dinukleotid szegmens
εC:	3, N4-eteno-dezoxicitidin
A:	Adenin
A:	alanin
AID:	Aktiválás Indukált citidin Dezamináz
ANS:	1-Anilin-naftil-8-szulfonsav
APE:	AP endonukleáz (APE1, APE2: exonukleáz III-típusú humán APE-k
APN1:	endonukleáz IV- típusú élesztő APE
AP hely:	bázismentes hely a DNS-en (apurin/apirimidin hely)
APCI:	Atmospheric Pressure Chemical Ionization, atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció
ARP:	Aldehyde Reactive Probe, Aldehyd reaktív próba
AUDG:	<i>Archeák</i> -ban kifejeződő UDG család
BAP:	biotin akceptor peptid
BER:	báziskivágásos javító mechanizmus (Base Excision Repair)
BrMMK:	4-brómmetil-7-metoxikumarin
BSA:	marha szérum albumin (Bovine Serum Albumin)
C:	Citozin
CAD:	kaspáz-aktiválta DNáz
CAPS:	N-ciklohexil-3-aminopropán-szulfonsav
CD:	cirkuláris dikroizmus
cDNS:	kódozó DNS, az mRNS reverz-transzkripciójával előállított DNS
CG18410:	az azonosított UDE-t kódozó gén kódja
CJ236:	<i>dut-, ung-</i> mutáns <i>E. coli</i> törzs
CpG:	citidinből és guanozinból álló dinukleotid szegmens
C-terminális:	karboxi terminális
D:	aszparaginsav
DHF:	dihidrofóliát-reduktáz
DMSO:	Dimetilszulfoxid
DNS:	dezoxiribonukleinsav

DNáz:	DNS-t hidrolizáló enzim
dRP:	dezoxiribóz foszfát
DRUDG:	<i>Deinococcus radiodurans</i> -ból és <i>Rhodococcus erithropolis</i> -ból izolált UDG család
dsDNS:	kettős szálú DNS
dTDP:	Dezoxitimidin-difoszfát
dTMP:	Dezoxitimidin-monofoszfát
DTT:	ditio-treitol
dTTP:	Dezoxitimidin-trifoszfát
dUMP:	Dezoxiuridin-monofoszfát
<i>dut</i> :	a dUTPáz gén <i>E. coli</i> -ban
dUTP:	Dezoxiuridin-trifoszfát
dUTPáz:	dezoxiuridin-trifoszfát-nukleotidohidroláz
E:	glutaminsav
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
ECL-reagens:	HRP-vel kemilumineszcenciát adó reagens (Enhanced ChemiLuminescent reagent)
EDTA:	etiléndiamin-N,N,N',N'-tetraecetsav
EMSA:	elektroforetikus mobilitás teszt (Electrophoretic Mobility Shift Assay)
ESPRIT:	Expression of Soluble Proteins by Random Incremental Truncation
F:	fenil-alanin
FdUMP:	Fluoro-dezoxiuridin- monofoszfát
FEN1:	„flaping” endonukleáz
G:	glicin
G:	Guanin
GAPDH:	glicerin aldehid-3-foszfát dehidrogenáz
H:	hisztidin
HA:	hidroxilamin
HEPES:	N-(2-hidroxietil) piperazin-N'-etánszulfonsav
HPLC:	High Performance Liquid Chromathography, Nagy elválasztó képességű folyadékkromatográfia
HRP:	torma peroxidáz (Horse Radish Peroxidase)
HRR:	homológ rekombinációs javítás (homologous recombination repair)
HS:	High salt

IPTG:	izopropil- β -D-tiogalaktozid
K:	lizin
LB:	Luria-Bertani (táplódat)
LS:	Low salt
M:	metionin
MBD4:	hibáspár specifikus UDG, (Metil Binding Domain)
MMR:	Mismatch javítás (mismatch repair)
mRNS:	hírvivő/ messenger RNS
MS:	Mass Spectrometry, Tömegspektrometria
MUG:	hibáspár specifikus UDG (Mismatch Uracil-DNA Glycosylase)
N:	aszparagin
NER:	nukleotidkivágó javító mechanizmus (nucleotide excision repair)
NHEJ:	nem homológ végek összekapcsolása (non-homologous end-joining)
NLS:	magi lokalizációs szignál (nuclear localisation signal)
NMR:	Mágneses magrezonancia (nuclear magnetic resonance)
N-terminális:	amino-terminális
OD:	optikai denzitás
p53:	53 kD-os tumorszupresszor fehérje
PBS:	fiziológiás só tartalmazó foszfát puffer (Phosphate Buffer Saline)
PBS2:	<i>Bacillus subtilis</i> fág 2
PCNA:	szaporodó sejt nukleáris antigén (proliferating cell nuclear antigene)
PCR:	polimeráz láncreakció
PMSF:	fenilmetánszulfonil-fluorid
PPi:	anorganikus pirofoszfát
R:	Arginin
RFC:	replikációs faktor C
RNáz:	RNS-t hidrolizáló enzim
RNS:	ribonukleinsav
ROS:	Reactive Oxygen Species, Reaktív oxigén gyökök
rRNS:	riboszomális RNS
RT-PCR:	reverz transzkripcióval kapcsolt PCR
SAM:	S-adenozil-metionin
SDS:	Na-dodecil-szulfát (Sodium dodecil sulfate)
SMUG1:	egyesszál specifikus UDG (Single-strand selective Monofunctional UDG)

SRM:	Single Reaction Monitoring
T:	Timin
TAE:	Tris-acetát-EDTA puffer
TBS:	fiziológiás só tartalmazó Tris puffer (Tris Buffer Saline)
TDG:	timin-DNS glikoziláz, az <i>E. coli</i> MUG emlős homológja
TE:	Tris-EDTA puffer
THF:	tetrahidrofolát
TS:	timidilát-szintáz
Tris/HCl:	(aminometántril) trimetanol
Trp:	triptofán
U:	Uracil
UDE:	uracil-DNS degradáló faktor
U-DNS:	uracil tartalmú DNS
UDG:	U-DNS glikoziláz (több fehérje család összefoglaló neve)
UDGX:	baktériumokból, mint a <i>Mycobacterium leprae</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> stb. izolált UDG család
UGI:	U-DNS glikoziláz inhibitor fehérje
UNG:	a fő U-DNS glikoziláz, <i>ung</i> : <i>E. coli</i> -ban az UNG génje,
UNG1:	UNG mitokondriális izoformája
UNG2:	UNG nukleáris izoformája
UV:	ultraibolya (ultraviolet)
XRCC1:	DNS-javító fehérje (XeRoderma Cross Complementing 1)
Y:	tirozin
W:	triptofán

3. Irodalmi Áttekintés

3.1. DNS integritásának jelentősége

3.1.1. A nukleinsavak felépítése

Minden élő szervezetben - a prokariótákon át az eukariótáig - a nukleinsavak a genetikai információ tárolásának és továbbításának makromolekulái. Kétféle vegyületípust különböztetünk meg: a dezoxiribonukleinsavat (DNS) és a ribonukleinsavat (RNS). Az élőlények túlnyomó többségében az öröklődő tulajdonságokat hordozó óriásmolekula a DNS. Kivételt képez néhány vírus, melyekben a teljes genetikai állományt tartalmazó anyag az RNS.

A DNS egy polimer molekula, amely adenin (A), guanin (G), timin (T), vagy citozin (C) nukleobázist tartalmazó foszfodiészter kötással egymáshoz kapcsolódó dezoxi-ribózból (nukleotidokból) felépülő kettős spirált alkot. A DNS gerincét képző cukor-foszfát egységek a polimer lánc külső hidrophil részén helyezkednek el, negatív töltést kölcsönözve a DNS felületének. A kettős hélix belesajában az egymás felett elhelyezkedő planáris bázispárok találhatóak. Az antiparallel lefutású polinukleotid láncokat a komplementer bázispárok között kialakuló hidrogénkötések rögzítik. A timin és az adenin kettő, míg a guanin és a citozin három hidrogénkötést alakít ki egymással, összhangban a bázisok stabilis tautomér formáival. Az információt a DNS primer szerkezete, a nukleotidszekvencia hordozza, míg a genetikai tartalom megőrzése és reprodukálása a bázispárok szigorú komplementaritásán alapszik.

A ribonukleinsav, - a DNS-hez hasonlóan - foszfodiészter kötésekkel egymáshoz kapcsoló purin és pirimidin nukleotidokból álló polimer. Az RNS-ben azonban a bázisok mindig ribózhoz kötődnek. Az RNS-molekulák nem tartalmaznak timin bázist, így a bázispárképzés során az adenin a timinnel teljesen analóg uracillal képez kötetést. A natív RNS általában egyszálú polinukleotid lánc, melyben az egymás mellé kerülő komplementer szakaszok hajtúszzerű hurkokat képezhetnek.

A dezoxiribóz építőköveket tartalmazó DNS az RNS-nél alacsonyabb oxigéntartalmú, mely nagyobb stabilitást biztosít a molekulának. Valószínű ezzel a nagyobb stabilitással magyarázható, hogy szinte minden élőlényben a hosszabb távú információ tárolására a DNS szelektálódott.

3.1.2. A DNS károsodás és javítás

A DNS kémiaiilag instabil molekula, így a benne tárolt információtartalom számos káros hatásnak van kitéve. A polimert érő károsító hatások lehetnek exogén és endogén eredetűek is. A külső károsító ágensek közül a különféle ionizáló sugárzások hatására egyes illetve kettős száltörések jöhetnek létre a DNS lánc egyik vagy mindkét szálán. Abszorbeált UV-fény a szomszédos timin bázisok között keresztkötések kialakításával stabil dimereket hozhat létre. Egyes forgalomban lévő kemikáliák és *in vivo* biokémiai folyamatok során keletkező kémiai vegyületek közül az alkilező szerek szintén keresztkötések alakíthatnak ki a különböző DNS szálak, illetve az azonos szálon elhelyezkedő bázisok között. A belső környezeti hatások közül az elsődleges genotoxikus ágensek a normál metabolikus útvonalak melléktermékeiből származó reaktív oxigén gyökök, melyek a bázisok oxidatív változását eredményezik. Emellett a bázisok hidrolízise és alkilációja – kiemelendő az S-adenozil-metionin (SAM) közvetítette nem enzimátikus metiláció- a DNS kovalens szerkezetének módosulásához vezetnek [1-3]. Gyakori a replikáció során össze nem illő bázisok összekapcsolódása, melynek során hibás bázis épül a DNS szálba.

A sejtekben különböző mechanizmussal működő DNS-javító rendszerek alakultak ki a sérült információ visszaállítására. Az egyik szálát érintő károsodást javító mechanizmusok közül a direkt javító rendszerek egy – egy típusú sérülésre specifikusak és a hibás bázist visszalakítják. A kivágásos javítómechanizmusok közül a báziskivágó javítás (BER) a károsodott nukleotidra korlátozódik, míg a nukleotidkivágó javítás (NER) nagyobb szakaszt érint. A replikáció során keletkező össze nem illő bázispárok korrekcióját a Mismatch javítás (MMR) végzi a hibás szálon. A DNS mindkét szálát érintő károsodás illetve törés két mechanizmus által javítódik. Az egyik a homológ rekombináció (HRR), a másik a nem homológ végek összekapcsolása (non-homologous end-joining- NHEJ).

3.1.3. A DNS integritás megváltozásának következményei

Amennyiben a hibák nem kerülnek kijavításra úgy a DNS integritása megszűnik, amely maradandó változásokhoz, azaz mutációk keletkezéséhez vezet. A szomatikus sejtekben bekövetkező mutáció a sejt normális funkciójának elvesztését vagy a sejt pusztulását, míg az ivarsejtek mutációja az öröklődő genetikai információ megváltozását idézheti elő. A protoonkogének és tumorszupresszor gének mutagén elváltozása a sejtek kontrollálatlan szaporodásához és rákos betegség kialakulásához vezethet.

A DNS javításban résztvevő komplexeket felépítő fehérjék hiánya vagy mutációja számos kórkép előidézője lehet. A javítás elmaradása áll a háttérben számos rákos megbetegedésnek, idegrendszeri károsodásnak, mozgásszervi és bőrelváltozásnak. A sejtek öregedése során a DNS-hibajavítás csökken, amely apoptotikus folyamatok illetve karcinogenezis kiváltói lehetnek [4-7].

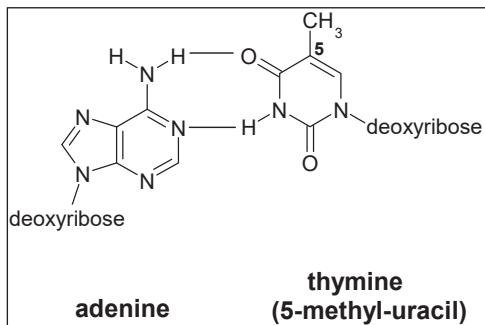
Az irodalomban leírtak számos olyan javító fehérjét, melyek túl sok javítatlan DNS-hiba esetén apoptózis (programozott sejthalál) indukciójában működnek közre [8].

A nukleinsavakban tárolt információ tehát a gének által kódolt fehérjék szerkezetére, adott időben és ideig tartó kifejeződésére valamint szintézisük mennyiségi szabályozására egyaránt vonatkozik. A sejtek szabályozott működése a genetikai információ stabilitásának függvénye, ezért a DNS integritásának megőrzése minden szervezet számára esszenciális feladat.

3.2. Hogyan jelenhet meg uracil a DNS-ben?

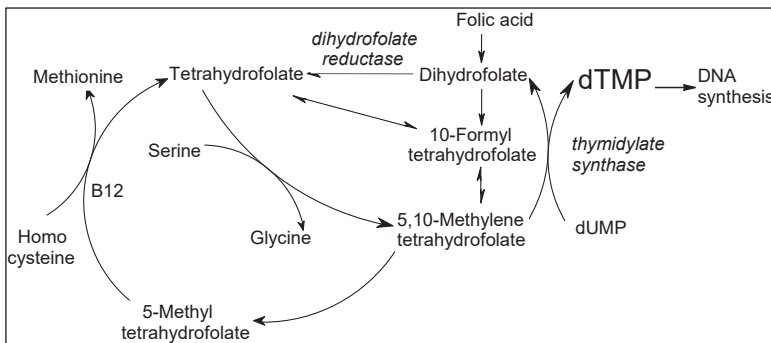
3.2.1. A timin bázis szerepe

Az uracil nukleobázis alapvetően nem alkotóeleme a DNS-nek, míg ezzel szemben a kémiaileg hasonló szerkezetű RNS-ben a timin funkcióját az uracil tölti be. A két bázis csupán egyetlen metil csoportban különbözik egymástól, mely csoport nem vesz részt a hidrogénkötések kialakításában, így adeninnel ugyanazt a bázispárosodási mintázatot alakítják ki (1. ábra).



1. ábra: Adenin és timin alkotta Watson-Crick bázispárosítás [9].

Az uracil és timin tehát az információ tárolása és továbbítása szempontjából is ekvivalensnek bizonyulnak, mégis a timin szelektálódott hosszú távon a DNS építőköveként. A timin (timidilát) bioszintézis egyúttal jelentős metabolikus terhet is jelent a sejt számára, mivel a metil csoport addícióját katalizáló dihidrofolát redukáz és a timidilát szintetáz enzimek jelenlétét és működésének szabályozását igényli [3, 9] (2. ábra).



2. ábra: A dezoxitimidin-monofoszfát *de novo* bioszintézise [9].

A nukleinsavak egy másik építőeleme, a citozin felelős tulajdonképpen azért, hogy az uracil szerepét a timin átvehette. A citozin ugyanis viszonylag instabil molekula és normál élettani körülmények között gyakran uracillá alakul spontán hidrolitikus dezaminálási reakció során [10]. Ezen mutagén változás elkerülésére a báziskivágáson alapuló javító mechanizmust hívja segítségül a sejt, mely során az uracilt a DNS-ből a javításért felelős enzimrendszer kihalítja, majd újbóli szintézissel a DNS eredeti állapotát helyreállítja [11]. Az uracil eltávolításáért felelős enzimrendszer nem csak a hibás, hanem az adeninnel szemben álló uracil molekulákat is kivágja. Ezért az evolúció során az uracil molekulára egy metil csoport került, mely átalakulással továbbra is megmaradtak a hidrogénkötéseket alkotó funkciók csoportjai, de megkülönböztethetővé vált a citozin oxidatív dezaminálásának eredményeként megjelenő uraciltól.

In vitro DNS szintézis során a megfelelő nukleotid építőkövek mellett, de ugyanakkor dTTP kizárásával dUTP jelenlétében a templát szál minden adeninjével szemben uracil fog beépülni az újonnan szintetizálódó DNS szálakban. Az uracil-tartalmú DNS templátról szintetizálódó mRNS bázissorrendje megegyezik az eredeti timin-tartalmú DNS-ről készült sorrendjével. Továbbá, az uracil-tartalmú DNS dTTP jelenlétében hibátlanul visszairható timin-tartalmúvá. A fentiek alapján elmondható tehát, hogy az uracillal helyettesített DNS a timin-tartalmú DNS-sel ekvivalens [12, 13].

3.2.2. A timin helyett uracil a genomban

Az *in vitro* adatok mellett az irodalomban felfedezhető számos eset, amikor a természetben uracil jelenik meg a genomban. A *Bacillus subtilis*-t fertőző PBS2 fág esetében írták le, hogy genomja timin helyett jórészt uracil tartalmaz [14]. A fág genomjában a C:G párok aránya jóval kisebb, mint az A:U (2:8) pároké, amely a citozin dezaminálódás következménye lehet. Az emelkedett uracil tartalomért valószínűleg egy dUTPáz inhibitor is felelős, amely megakadályozza az uracil kivágódását a megfertőződött gazdasejt genomjából [15]. Azonosítottak egy- több *Yersinia* fajt is fertőző- ϕ R1-37 fágot, melynek genomjában nem található timin, csak uracil [16].

Baktériumok életképességét is vizsgálták uracil-tartalmú DNS mellett. Mesterségesen létrehozott olyan mutáns egyedeket, amelyekben felborult a dUTP/dTTP arány, vagy a már beépült uracil nem javítódott kellőképpen. Az elmaradt báziskivágást az UNG mutációja eredményezte. Az *ung* mutáns sejtek uracil tartalma nem változott jelentős mértékben, de a C/G – T/A tranzíció gyakorisága megnövekedett bennük [13]. Az életképesség terén nem

történt változás [17]. A dUTP-áz mutáns baktérium sejteknek a fejlődési üteme lelassult és megnövekedett a mutációra, rekombinációra való hajlamuk. Az életképességük teljesen megszűnt, valószínűleg az uracil kivágásért felelős javítómechanizmus túlműködése miatt [18, 19]. A kettős mutáns (dut-/ung-) *E. coli* is életképesnek bizonyult (CJ236), genomjában a timin 1-2%-át helyettesíti uracil [12]. Az említett példák egyrészt igazolják az uracil-timin bázisok cseréjének lehetőségét, másrészt azt, hogy a dUTPáz és UNG enzimek aktivitásának kiesése esetén, adott mennyiségű uracil felhalmozódhat egy sejt genomjában, anélkül, hogy jelentős változást okozna a normál sejtciklusban.

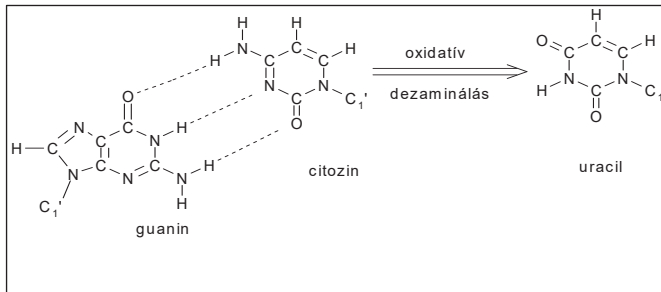
3.2.3. Az uracil szerepe fiziológias folyamatokban

Arra is találunk példát, hogy a DNS-ben átmenetileg megjelenő uracil fiziológias folyamatokban játszik fontos szerepet. Az aktiválás-indukált dezaminázt (AID) B-sejt specifikus, RNS-editáló fehérjeként azonosították [20]. A szerzők később megmutatták, hogy fontos szereppel bír aktivált B-sejtekben az osztályváltó („class switch”) rekombinációban és a szomatikus hipermutációban [21]. Az uracil az AID enzim katalizálta citozin oxidatív dezaminálása során tranzienst módon jelenik meg a DNS-ben, majd UNG által eliminálódik [22]. Az uracil tehát egy még részleteiben nem ismert enzimechanizmus intermedier terméként járul hozzá az immunoglobulin gének variabilitásához.

Egy másik irodalomban talált példa pedig arról számol be, hogy Burton és munkatársainak a *Chlamydomonas* kloroplaszt DNS-en végrehajtott vizsgálata azt eredményezte, hogy az uracil jelként szolgál a DNS degradációjához. Az uracil jelenléte tehát szerepet játszhat a maternális és a paternális eredetű kloroplaszt DNS metabolizmus különbözőségében. Tulajdonképpen a paternális kloroplaszt DNS, mely a zigótákban specifikusan degradálódik, tartalmaz uracilt, míg a megmaradó maternális kloroplaszt DNS nem [23].

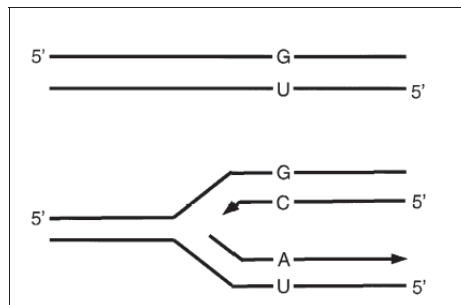
3.2.4. Az uracil DNS-be épülésének útvonalai

Annak ellenére, hogy a DNS-ben alapvetően uracil bázis nincs jelen, két különböző útvonalon is bekerülhet: citozin dezaminációjával illetve timin helyettesítéssel. Fiziológias körülmények között a leggyakoribb DNS-ben előforduló spontán mutagén változás a C → T tranzíció, mely során a citozin oxidatív dezaminálásával (3.ábra) [1] uracil keletkezik. A reakció során premutagén G:U bázispárok keletkeznek.



3. ábra: Citozin oxidatív dezaminálása.

Mivel az uracil adeninnel képez bázispárt, így a következő replikáció során az újonnan szintetizálódó DNS-száiba, az uracillal szemben, guanin helyett adenin épül be. Ez a következő replikációs ciklusban G:C → A:T stabil pontmutáció létrejöttéhez vezet (4. ábra). A DNS kettősszálú szerkezete jelentős védelmet nyújt a citozin hidrolitikus dezaminálásával szemben, mégis fiziológiai körülmények között naponta ~ 60-500 alkalommal is lejátszódik egy átlagos genomban [24, 25]. Ugyanakkor a transzkripció során hosszabb ideig egyszálú formában jelenlévő DNS esetén kb. 200-300-szor gyorsabb lehet a dezamináció [1].



4. ábra: Uracillal szemben az újonnan szintetizálódó száiba adenin kerül.

Uracil a DNS-be timin helyett is beépülhet a DNS replikáció során, amennyiben a sejtbeli dUTP/dTTP arány megnövekedik. A helyettesítés U:A bázispárokat eredményez, ugyanis a legtöbb DNS polimeráz, kivéve az archeák B típusú DNS polimerázát [26] a normál DNS-t felépítő timin helyett az idegen uracil bázist építi be az adeninnel szembe. A DNS polimerázok által felhasznált építőkövek – a nukleotid trifoszfátok – így a dUTP és dTTP szintje is szigorúan szabályozott. A megfelelően alacsony dUTP koncentrációt, mely esetben az újonnan szintetizálódó DNS száiba timin épül be uracil helyett, a dUTPáz enzim biztosítja. Maga az enzim a dUTP pirofoszforolízisét katalizálja [27]:



A dUMP beépülésekor mutáció ugyan nem keletkezik a DNS-ben, de citotoxikus és mutagén AP résszel rendelkező köztterméket eredményezhet a DNS javítás során [28]. Uracilt tartalmazó DNS tehát a fent leírt két útvonalon keletkezhet *in vivo* a szervezetben. A különbség a 'kétféle' uracil között az, hogy a citozin dezaminálásával keletkező hibás bázis mutagén változást eredményez, míg a másik ártalmatlan a DNS-re nézve, nem változtatja meg a genetikai információt.

Fontos azonban megemlíteni, hogy létezik számos olyan fehérje-DNS szekvencia specifikus kölcsönhatás, melyekben a timint az uraciltól megkülönböztető metil csoportnak is szerepe van [29]. Bizonyos transzkripció faktorok például, melyek a génkifejeződés szabályozásáért felelősek, nem ismerik fel az uracillal helyettesített kötőhelyet az adott promóter régiókban. Persze ezeknek a rendszereknek a DNS replikációban és a DNS javításhoz kapcsolódó szintézisben közvetlenül nincs szerepük, de a sejtek, - akár ezen folyamatokhoz is szükséges - fehérje expresszióját jelentősen befolyásolhatják.

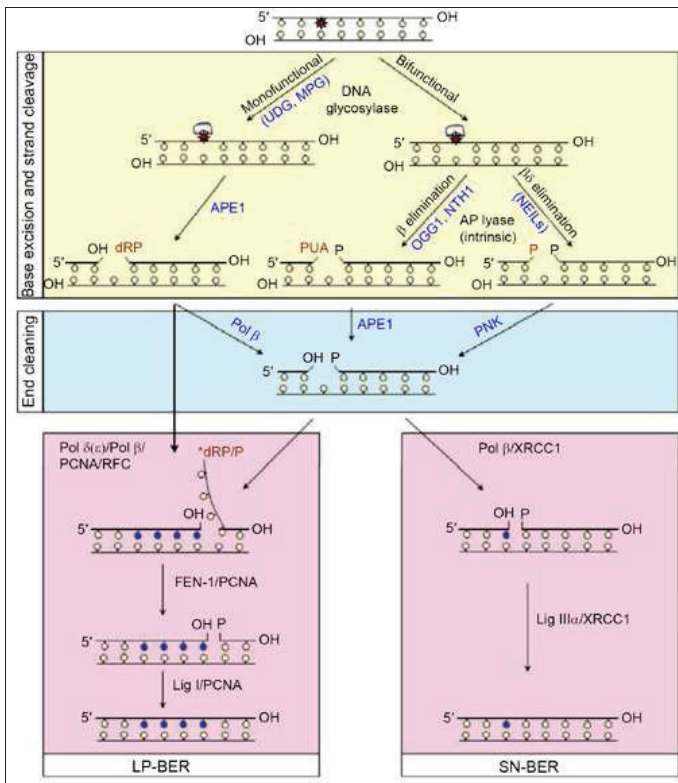
3.3. A báziskivágáson alapuló javító mechanizmus (BER)

A hibásan beépült bázisok, mint az uracil (ill. egyéb uracil analógok) illetve a sérült bázisok (pl. 3-metiladenin) eltávolítására és ezt követően a DNS szál helyreállítására szerveződött a báziskivágáson alapuló DNS javító (BER) mechanizmus [30, 31]. A többlépéses mechanizmusnak számos variációja létezik, melyek a különböző helytelen bázisokra specifikusak. A variánsok közös jellemvonásként rendszerint három fő lépésből állnak (5. ábra). A mechanizmus első lépéseként egy DNS N-glikoziláz elvágja a dezoxiribóz és a hibás

bázis közti glikozidos kötést. Az így bázis nélkül maradt helyen az AP-endonukleáz (apurin/apirimidin-endonukleáz) elhasítja a DNS dezoxiribóz-foszfát gerincét úgy, hogy a 3'OH-vég marad szabadon. Ezután a DNS-polimeráz endogén foszfodiészteráz hatása révén eltávolítja a bázis nélküli dezoxiribózt, és a 3'OH-vég valamint a megfelelő nukleotid-trifoszfát felhasználásával komplementer bázist épít be [11]. Végül pedig a DNS ligáz enzim elvégzi a gerincszál összevarrását.

A báziskivágásos javítómechanizmus elsősorban kisebb a DNS kettős hélixen torzulást nem okozó sérülések javításáért felelős. Ez alól kivételt képez a ciklobután dimerek javítása, ugyanis a pirimidin dimerek javítása a nukleotidkivágáson alapuló javító mechanizmus (NER) feladata. A BER végzi tehát a reaktív oxigén gyökök (ROS) hatására bekövetkező oxidatív bázismódosulások (8-oxoguanin, timinglikol, formamidopirimidin stb.), a normál sejtbeli metabolitok okozta alkilálások (3-metiladenin, 7-metilguanin), valamint a hidrolitikus dezaminációval járó változások (uracil, hypoxantin stb.) javítását is. A BER ezen kívül egyesszál törések javításában is részt vesz.

A BER a kivágásos javítómechanizmusok közül egyedülálló abban a tekintetben, hogy az egyes léziókat különböző az adott hibára specializálódott DNS glikozilázok ismerik fel. A DNS glikozilázok relatíve kisméretű (~30-50 kDa) monomer fehérjék, amelyek nem igénylik kofaktorok jelenlétét katalitikus aktivitásukhoz [32]. Az első azonosított DNS glikoziláz az *E. coli* Uracil DNS glikoziláz volt, később hasonló aktivitású fehérjéket találtak más baktériumokban, élesztőben, növényekben és emlős sejtekben is. A DNS glikozilázok a hibás bázisokat a DNS szekvencia alapos vizsgálatával lokalizálják. Mindez kétféle mechanizmussal történhet. A hélixet destabilizáló hibák esetén az enzim könnyen felismeri a DNS-ben létrejövő extrahelikális konformációt. A hélixet nem vagy kis mértékben destabilizáló károsodások esetén a DNS glikozilázok a DNS szálát meghajlítva minden bázist kifordítanak és megvizsgálják, hogy illeszkedik-e az enzim aktív centrumát alkotó pozitív töltésű zsebbe. Az így azonosított hibás bázist ezután eltávolítják az N-glikozidos kötés hasításával.



5. ábra: A sérült bázisok és a DNS száltörések javításáért felelős BER útvonalak sematikus ábrázolása. A sérült bázis csillaggal jelölt. A javítást követő DNS szintézist kék körök jelzik. (további részletek a szövegben)

A DNS glikozilázok katalitikus aktivitásukat tekintve két csoportba sorolhatók. A monofunkciós glikozilázok esetén a nukleofil támadásért egy aktivált vízmolekula, míg a bifunkciós enzimeknél egy adott amincsoport a felelős. Az AP-liáz aktivitás következtében egy β -eliminációs reakcióban a cukor –foszfát gerinc elhasad $3'\alpha,\beta$ - aldehid és $5'$ -foszfát végeket létrehozva. Néhány AP-liáz további δ -eliminációval a $3'$ -aldehid vég helyett szabad $3'$ foszfát véget képes kialakítani.

A DNS glikozilázok vagy AP-liázok által generált abázikus (AP) helyeket ismerik fel az AP endonukleázok, majd a bázismentes helytől 5' irányban a foszfodiészter kötés elhasításával 3'-OH véget és bázismentes 5'-dRP-t hagynak hátra. A hidrolitikus APE-k két szerkezeti családba sorolhatók, melyek első képviselőit egyaránt *E. coli*-ban azonosították. Az első családba az exonukleáz III-típusú fehérjék tartoznak, mint például a humán APE1 és APE2. A másik család tagjai az endonukleáz IV-típusúak, ahova az élesztőben talált APN1 is tartozik [33, 34]. A foszfátészter-hidrolízis katalízise során az AP endonukleázok is kihajlítják a bázismentes helyet a hélixből [35, 36]. A két család képviselői katalitikus aktivitásukhoz egyaránt igényelnek fémionokat, melyek az AP hely koordinálásában vesznek részt.

A BER utolsó szakaszán belül megkülönböztetünk rövid szakaszos („short patch”) és hosszú szakaszos („long patch”) útvonalat. A rövid szakaszos javítás során a DNS polimeráz β , liáz aktivitása révén, lehasítja az 5'-dRP-ot, majd polimeráz aktivitása révén beépíti a hiányzó bázist [37], azaz csak egyetlen nukleotid cseréje történik. A hosszú szakaszos BER mechanizmust a DNS polimeráz δ és ϵ katalizálja a szaporodó sejt nukleáris antigén (PCNA) fehérje és a replikációs faktor C (RFC) jelenlétében, melyben 2-15 nukleotidnyi DNS-szakasz újra szintézise is történhet [38, 39]. A polimerázok 5'-dRP-liáz aktivitásának hiányában a kimetszésre váró nukleotidokat a flap endonukleáz I (FEN1) távolítja el. A szintézist a DNS polimeráz β is katalizálhatja, de ebben az esetben csak maximum 6 nukleotidnyi szakasz cserélődik le [40, 41].

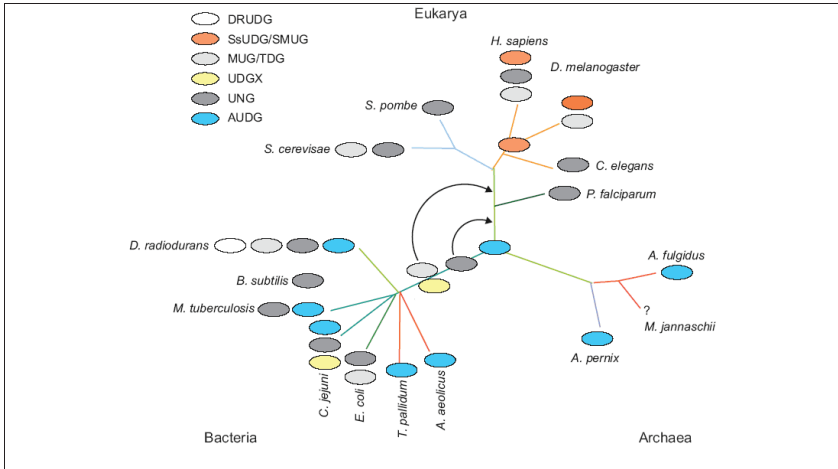
Végül a ligáz III az XRCC1 fehérjével kölcsönhatásban, összevarrja a DNS-szálat [42]. A ligáz I-ről *in vitro* kimutatták, hogy képes a DNS polimeráz β -val kölcsönhatásba lépni [43], és a BER-t lezárni *in vitro* [44].

3.4. Az uracil-DNS metabolizmusban szerepet játszó fehérje családok

3.4.1. Az uracil-DNS glikozilázok

A DNS-be hibásan beépült uracil bázis felismerésével és eltávolításával az uracil-DNS glikozilázok óvják meg a DNS molekulát a mutagén változástól. Az enzimeknek eddig hat családját azonosították, de ebből eukariótákban hármat jellemeztek mélyrehatóbban: UNG (Uracil-DNA N-glycosylase), SMUG (single-stranded selective monofunctional uracil-DNA glycosylase), TDG (thymine-DNA glycosylase)/MBD4 (Methyl-CpG binding protein).

Az UDGX család tagjai egyes baktériumokban, mint a *Mycobacterium leprae*, *Neisseria*, *Campylobacter jejuni* stb. fordulnak elő [45], míg a DRUDG családba tartozó fehérjéket *Deinococcus radiodurans*-ból és *Rhodococcus erithropolis*-ból izolálták [46]. A termofil *Archaea*-kban azonosított AUDG család tagjai még néhány baktériumban is részt vesznek a DNS javításban [47, 48].



6. ábra: Az uracil-DNS glikoziláz enzimek családfája és előfordulása az élő szervezetekben [45].

Az N-glikozidos kötést katalizáló enzimek mind a monofunkciós DNS glikozilázok közé sorolhatóak. A családok tagjai közös α/β feltekeredési mintázattal rendelkeznek, szerkezetileg nagy a hasonlóság köztük (6. ábra). Közös ősi evolúciós eredetükkel ellentétben szekvenciájukat tekintve extrém divergencia jellemzi őket. Hasonlóan nagy eltérés mutatkozik a katalitikus hatékonyságukat, szubsztrátspecificitásukat és sejteklushoz kötött szabályozásukat illetően.

AZ UDG-k közül elsőként az *Escherichia Coli* UNG fehérjét azonosították [49], az UDG enzimes család legkonzervatívabb képviselőinek tekinthetők [50]. Megtalálhatóak szinte az összes élő szervezet genomjában: baktériumokban, eukariótákban és számos DNS vírusban is, melyek magasabb rendű eukariótákat fertőznek meg. Kivételt képeznek az *Archaeák* és a teljes átalakulással fejlődő rovarok, mint a *Drosophila melanogaster* [45]. Az UNG enzim

mind az egyes- és kettősszálú DNS-ből képes eltávolítani a beépült uracilt, függetlenül attól, hogy milyen bázis áll az uracillal szemben, de inkább az egyesszálú szubsztrátot preferálja [51]. Az UNG a többi UDG-vel szemben, specifikusan gátolható az UGI fehérjével [52], valamint a termékként keletkező AP helyek is a humán enzim esetét kivéve gátló hatásúak [53].

A következő család a SMUG fehérjéké, melyek baktériumokban és élesztőben nincsenek jelen, főként magasabb rendű eukariótákban találhatók. Közülük először a *Xenopus* cDNS könyvtár *in vitro* transzlációja során azonosították a SMUG1 fehérjét. Az egyesszálú és a kettősszálú DNS-ből is képes kihasítani a citozin dezaminációjával keletkező uracilt, míg a timin helyett beépült uracilt kisebb hatékonysággal távolítja el. Az UNG-hoz hasonlóan az egyesszálú DNS-t részesíti előnyben, és hasonló hatékonysággal processzálja. Ugyanakkor az UNG-gal ellentétben kisebb az uracil specificitása, hiszen az 5-hidroxi-metil-uracilt is hasonló mértékben eltávolítja. A két enzim szekvenciálisan is távoli rokonságot mutat.

A TDG és az MBD4 kettősszálú DNS szubsztrátból a T:G hamis párok esetén a timint távolítják el, valamint a citozin és az 5-metilcitozin dezaminációjával képződő uracilt CpG ill. 5mCpG környezetből [54]. A TDG ezen kívül részt vesz az ϵ -citozin hamis párokból való kivágásában, ugyanakkor az 5-HmeU-t kevésbé hatékonyan eliminálja. A TDG transzkripciós faktorként is funkcionál [55]. Bakteriális homológja, a MUG U:G hibaspárban lévő uracilt képes vágni, a timint azonban nem. Az MBD4 felismeri az U:G és T:G mellett az 5-fluorouracilt és kevésbé hatékonyan az ϵ C-t is.

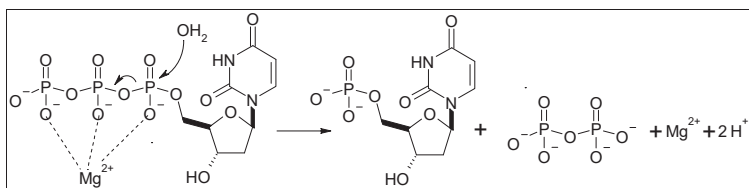
Az emberi szervezetben legalább négyféle uracil-DNS glikoziláz működik: az UNG, a TDG, a SMUG1 és az MBD4 [56]. Az UNG és a SMUG1 főleg az egyesszálú, míg a másik két enzim kizárólag a kettősszálú DNS-t processzálja [25]. A humán sejtekben az UNG-nak két izoformáját azonosították: az UNG1 mitokondriális, míg az UNG2 nukleáris lokalizációt mutat [57].

A teljes átalakulással fejlődő rovarokban így a *Drosophila melanogaster*ben sem mutattak ki eddig jelentős uracil-DNS glikoziláz aktivitást [54]. Két, az UDG-hez képest kisebb hatékonyságú, duplaszálú DNS-re specializálódott glikoziláz azonosítottak *Drosophilában* is. Ezek a SMUG és a TDG fehérjék homológjai. A SMUG1-nek sem szubsztrátspecificitását, sem katalitikus hatékonyságát még nem vizsgálták meg részletesebben, csak az emlős homológ aktivitását jellemezték. A TDG homológja *Drosophilában* egy hosszú C-terminális régióval rendelkezik. A C-terminális régió nélküli aktív magot rekombináns úton előállították és jellemezték: a humán TDG-hez hasonló specificitású, de a hibás párban lévő timint kisebb mértékben képes eliminálni [58].

A fenti két enzim a citozin dezaminálásával keletkező uracilt valószínűleg képes javítani, míg a timin helyettesítésével a DNS-be kerülő uracil eliminálását nem végzi el. Miután az uracil-DNS glikozilázok széles szubsztrát specificitással rendelkeznek, előfordulhat, hogy valamilyen eddig még nem azonosított alternatív útvonalon a két enzim mégis képes helyettesíteni a *Drosophila* genomban nem kódolt fő uracil-DNS glikoziláz.

3.4.2. dUTPázok

A dezoxiuridin trifoszfát nukleotidhidroláz (dUTPáz) enzim a dUTP pirofoszforolízisét katalizálja az alábbi reakció alapján [59, 60]:



7. ábra: A dUTPáz által katalizált hidrolízis. A reakció során az aktivált vízmolekula a dUTP α -foszfátja ellen indít nukleofil támadást, amely dUMP és pirofoszfát keletkezését eredményezi.

A reakcióban a dUTPáz enzim kofaktora a Mg^{2+} ion. A folyamat a nagyenergiájú foszfát hidrolízise miatt gyakorlatilag irreverzibilis.

Ezzel a reakcióval az enzim lecsökkenti a sejtben a dUTP szintet, és közben termeli a dUMP metabolitot, ami a dTTP bioszintézisének alapvető prekursora (a timidilát szintáz szubsztrátja). A dUTP/dTTP arány dönti el, hogy a DNS polimeráz timint vagy uracilt épít be ugyanarra a helyre az adeninnel szembe. A dUTPáz által katalizált reakció tehát az uracil DNS-ből való kizárása miatt fontos.

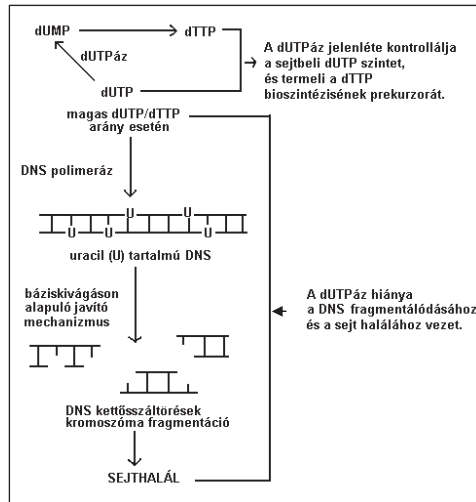
Az előzőekben már részletesen ismertetett báziskivágáson alapuló javítómechanizmus végzi az uracil eliminálását a DNS-ből. Az uracil-DNS glikoziláz enzimmel induló mechanizmus védelmet nyújt a citozin kémiai instabilitásával szemben, de nem tud különbséget tenni a citozin oxidatív dezaminálásával keletkezett mutagén, és a DNS szintézisekor esetleg timin

helyére beépült, nem mutagén uracil között. Ezért a timin helyére való uracilbeépülést a DNS polimeráz említett aspecifitása miatt a dUTP/dTTP arány visszaszorításával kell a sejtnk kivédenie, amit a dUTPáz enzim kétfelől is biztosít. dUTPáz hiányában azonban a magas dUTP/dTTP arány a DNS uracil tartalmának jelentős növekedését okozza. Ezáltal aktiválódik az uracil kivágásán alapuló javítómechanizmus. A javítás azonban a továbbra is fennálló magas dUTP/dTTP arány mellett nem lehet sikeres, mert a DNS polimeráz a kivágott uracil helyére újra uracil épít be. Az így felerősödő hiábavaló ciklus kettősszáltörésekhez, az pedig a kromoszóma fragmentálódásához, majd a sejt halálához vezet. Ezt a jelenséget nevezik timinmentes sejthalálnak (8. ábra) [61].

Az előbbieket alapján a dUTPáz specifikus gátlásával várhatóan sejthalál indukálható, amivel terápiás hatást érhetünk el a rákos vagy egyes fertőző megbetegedések esetén.

A dUTPáz antagonizmus hatékony rákterápiás alkalmazhatóságát több előzetes eredmény is indokolja:

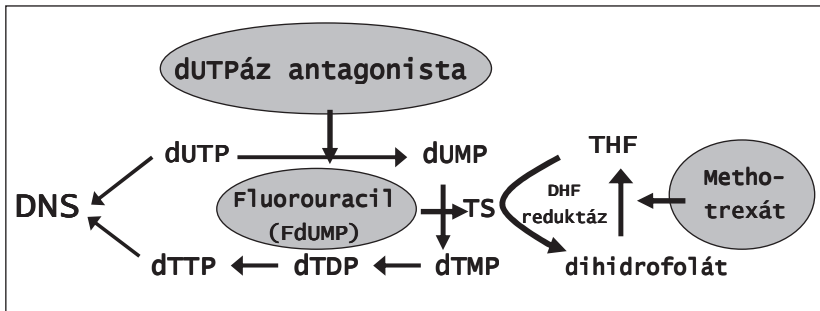
1. A dUTPáz gén kifejeződése a sejtciklustól függ [62]. Csak a sejtosztódáskor számottevő az enzim bioszintézise, ezért az enzim gátlása is csak az aktívan osztódó szövetekben okozhat jelentősebb kárt.
2. Két széles körben alkalmazott kemoterápiás szer, a fluoro-dezoxi-uridin monofoszfát és a methotrexát szintén a timidilát bioszintézist gátolva indukál sejthalált és fejt ki terápiás hatását (9. ábra).
3. Megfigyelték, hogy daganatokban rezisztencia indukálódhat az említett gyógyszerekre, mely rezisztenciával összefüggésbe hozták ezen sejtvonalakban kimutatható, erősen megnövekedett dUTPáz aktivitást. Ugyanakkor kimutatták, hogy a dUTPáz szint genetikai manipulálással előidézett növelése egyes humán tumoros sejtvonalakban fluorouracil-rezisztencia kiváltását okozza [63, 64].
4. Szubsztrátanalóg inhibitorok sejtburjánzás gátló hatását humán rákos sejtvonalakon *in vitro* is kimutatták [65].
5. A legfrissebb irodalomban közöltek adatokat arra vonatkozóan is, hogy a timinmentes sejthalál útvonal független a p53 fehérjétől [64, 66].
6. *Trichinella spiralis*-t és *Caenorhabditis elegans*-t tanulmányozva, megfigyelték, hogy nyugvó fonalas férgekben erős a timidilát metabolizmus. Mind a timidilát szintáz, mind a dihidrofolát redukáz, valamint a dUTPáz aktivitása különösen magas, vagyis olyan, mint az aktívan osztódó szövetekben. Ebből következően azt gondolják, hogy ezeknek a fonalas férgeknek szükségük van ezekre az enzimekre nyugalmi állapotukban is [67].



8. ábra: A dUTPáz szerepe a DNS integritásának megőrzésében.

A rákos sejtek már kialakulásukat is részben annak köszönhetik, hogy bennük az apoptotikus útvonalak jelentős része gátolt. Például a programozott sejthalál előidézésében általában kulcsfontosságú p53 fehérje rosszindulatú sejtekben gyakran olyan mutáció(ka)t mutat, mely(ek) funkciójának teljes, vagy részleges elvesztését okozzák, ezért a p53-függő apoptózis utakon történő terápia hatástalan marad. Ezekben az esetekben a timinmentes sejthalál indukálása mégis a gyógyulás reményével kecsegtethet, különösen, ha ez olyan hatékony módon történik, mint a dTTP bioszintézisének első lépését katalizáló dUTPáz specifikus gátlása. A fluoro-dezoxi-uridinre rezisztenssé vált daganatok esetén a dUTPáz antagonizmus szintén ígéretes kiegészítő terápia lehet.

Még a retrovírusok is gyakran kódolják genomjukban a saját dUTPáz fehérjéjüket. A virális dUTPáz elsősorban azon vírusok számára fontos, melyek differenciált sejteket támadnak meg, hisz az ilyen gazdasejtben nincs jelen elegendő saját dUTPáz. A virális dUTPáz gének nullmutációja csökkenti a vírus fertőző- és szaporodóképességét a differenciált sejtekben, szövetekben [68-70]. Ez reményt nyújt arra, hogy egyes vírusos megbetegedések gyógyításában a virális dUTPáz antagonistái terápiás jelentőséggel bírhatnak. Az enzim tehát ígéretes célpont új gyógyszertervezések számára.



9. ábra: Kapcsolat a timidilát-szintáz (TS), dihidrofolát-redukáz (DHFR) és a dUTPáz enzimek által katalizált reakciók között.

3.5. Az uracil szerepe a *Drosophila melanogaster* egyedfejlődésében

A DNS javítás vizsgálatával a *Drosophila melanogaster*ben Deutsch és munkatársai már a nyolcvanas évektől kezdődően foglalkoztak. Munkájuk számos érdekes és teljesen újszerű eredményhez vezetett, mely alapjául szolgál a rovarokban zajló programozott sejthalál folyamatok megértésének.

A korábban tárgyalt DNS-t manipuláló enzimekről bebizonyosodott, hogy fontos szerepet töltenek be a DNS javítás, az apoptózis és a karcinogenezis folyamatokban. Ezek közé tartoznak az emlős és bakteriális szervezetekben is azonosított uracil-DNS glikozilázok, melyek mind a citozin dezaminálásával spontán keletkező, mind a timin helyettesítéssel a DNS-be kerülő uracilt eltávolítják, megőrizve ezzel a DNS molekulában tárolt információ épségét. Miután azonos funkcióval rendelkező fehérjéket az élő szervezetek szinte mindegyikében találtak, meglepő volt Friedberg 1978-as közleménye, mely szerint ilyen aktivitású enzim a *Drosophila melanogaster*ben nem detektálható. Deutchék tulajdonképpen Friedberg publikációjának hatására kezdtek el uracil-DNS glikoziláz aktivitás után kutatni *Drosophila melanogaster*ben [71]. Helyette egy uracil tartalmú DNS-re specifikus nukleáz találtak- bár ezt fehérje szinten nem azonosították-, mely csak a késői lárvá stádiumokban termelődött. A nukleáz tranziens expressziójából arra a következtetésre jutottak, hogy az enzim nem érdekelt a DNS javításban ehelyett inkább egy sejtbeli mechanizmus részese, amely bizonyos periodicitással töréseket kreál a DNS szálaban az uracil bázisok környezetében és ezen folyamat eredményezi a harmadik lárvá stádiumban megfigyelhető DNS degradációt.

Figyelmeiket ezután a pirimidin nukleotid szintézisben és a dUMP DNS-be történő beépülésének megakadályozásában kulcsszerepet betöltő dUTPáz enzimre fordították [72]. A dUTPáz aktivitás csökkenését illetve az enzim expressziójának a hiányát figyelték meg az embriónál későbbi fejlődési stádiumokban. Ugyanakkor egy fejlődési állapothoz kötött dUTPáz inhibitor is azonosítottak az első lárv stádiumban, amely magyarázatként szolgálhat a dUTPáz aktivitás hanyatlására a lárv állapotok során [73]. *Drosophilában* ennek additív a jelentősége, hiszen embriókban hiányzik a timin helyett beépülő uracil eltávolítására szerveződött javító útvonal, mindez a dUTPáz hiányában az uracil tartalom megnövekedéséhez vezethet a különböző fejlődési állapotok során. Megkísérelték ezért a DNS emelkedett uracil tartalmát kimutatni a különböző fejlődési stádiumokban. Ahogy korábban másoknak az *E. coli dut-* mutáns sejtekben nekik sem sikerült uracilt detektálni az egyes fejlődési stádiumokhoz tartozó genomiális DNS-ekben. Azt feltételezték ezután, hogy valószínűleg az uracilt tartalmazó DNS-en aktív enzimek lecsökkentik az uracil tartalmat a detektálási szint alá, vagy esetleg maga az uracil szint olyan alacsony, hogy a detektálást megakadályozza. Később azt is megmutatták, hogy a *Drosophilához* hasonlóan csak a teljes átalakulással fejlődő rovarok nem rendelkeznek az uracil-DNS glikozilázzal egyező DNS javító aktivitású fehérjével [74, 75].

Konklúzióként ők vetették fel először, hogy dUTPáz hiányában az uracil a lárvális szövetek DNS-ében felhalmozódhat és UDG hiányában javítatlanul szubsztrátként szolgálhat a késői lárv stádiumok végén megjelenő uracil DNS-re specifikus nukleáz számára. Az enzim az uracil bázisok kihatásával nagyszámú DNS törést eredményezhet, mely a metamorfózis során zajló sejthalál folyamatokhoz járulhat hozzá [74].

4. Célkitűzések

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy minden eddig vizsgált állati és bakteriális szervezetben, kivéve néhány teljes átalakulással fejlődő rovar, kimutatható az uracil-DNS glikoziláz enzim. Ez a fehérje a DNS-ben található uracilt kimetszi, és bázismentes helyet hagy hátra [3]. Így az uracil-DNS glikoziláz enzim jelenlétében nem jöhet létre stabil uracil-tartalmú DNS. Az *ecetmuslica* genomjából azonban hiányzik az uracil-DNS glikoziláz szekvencia, ezért az *ecetmuslicában* létrejöhet uracil-tartalmú DNS, a megfelelő nukleotid arányok (dUTP-szint jelentős emelkedése) esetén [75]. A csoportunk egyik korábbi közleményében kimutattuk, hogy a *Drosophila* lárvákban hiányzik a dUTPáz nevű enzim, ami a sejtbeli dUTP szintet alacsonyan tartja [76]. A dUTPáz hiányában emelkedő dUTP szint tehát a lárvában valóban uracil-tartalmú DNS megjelenéséhez vezethet.

Mi lehet a szerepe az *ecetmuslica* lárvákban megjelenő uracil-tartalmú DNS-nek? Közismert, hogy a teljes átalakulással fejlődő rovaroknál a lárvaállapotot követő bábállapot során a lárva szövetei programozott sejthalál (apoptózis) útján lebomlanak, és anyagot szolgáltatnak a bábban kifejlődő felnőtt légy (imágó) számára. A lárvaszövetek programozott sejthalál útján történő lebomlásának indító, vagy felerősítő jelét adhatja, ha a lárvaszövetekben kettősszálú DNS törések következnek be. A kettősszálú DNS törés ugyanis rendkívül erős apoptotikus jelnek számít [77]. Egy uracil-tartalmú DNS-t endonukleáz módon mindkét szálon hasító enzim könnyen generálhat nagyszámú DNS törést az uracil-tartalmú DNS-en [78]. A folyamat megfelelő szabályozásához egyértelműen szükséges az is, hogy az uracil-DNS-t bontó endonukleáz csak a bebábozódás előtt, vagy közvetlenül azután, fejeződjön ki a rovarban.

Deutchék felvetésével összhangban, úgy gondoljuk, hogy *Drosophilában* az uracilos DNS sértetlenül megőrződhet a harmadik lárva stádium végéig, amikor egy általunk újonnan azonosított uracil-specifikus DNS degradáló faktor (UDE) el nem kezd termelődni [78]. Doktori munkám két fő célkitűzése így szorosan kapcsolódik a leírt hipotézishez. Egyrészt vizsgálni kívántam az UDE fehérje szerkezet- funkció összefüggéseit számos csonkított és hely specifikus mutáns konstrukció létrehozásával.

Másrészt, hogy közelebb kerüljünk a teljes átalakulással fejlődő rovarok metamorfózisa során végbemenő biokémiai folyamatok megértéséhez megkísérletem kvalitatív, fél-kvantitatív és kvantitatív eljárásokat kidolgozni és alkalmazni az *ecetmuslica* különböző fejlődési állapotából izolált genom DNS uracil tartalmának kimutatására.

5. Alkalmazott Módszerek

5.1. A *Drosophila* genomi DNS uracil tartalmának kimutatása során alkalmazott módszerek

5.1.1. *Ecetmuslica* tenyésztése és különböző fejlődési stádiumok gyűjtése

Oregon-R vad típusú *Drosophila melanogaster* törzset tartottam fenn a következő táptalajt tartalmazó üvegekben: 1, 5 % bakteriológiai agar, 6, 6 % kukoricadara, 6, 6 % élesztő, 9 % kristálycukor, továbbá 9, 2 mM NaCl, 3, 4 mM CaCl₂. A táptalajhoz etanolban oldott 10 %-os gombaölő hatású Nipagint is adagoltam, mely a táptalaj penészedését akadályozta meg. A legyeket petéztetés céljából egy erre kialakított műanyag edény aljára kiöntött táptalajra (2 % szálal agar, 10 % élesztő, 10 % kristálycukor, 10 % málnaszörp) helyeztem át és egy éjszakán át vagy szinkronizált tenyésztés esetén két órán át petéztettem. Az embriókat a petéztető táptalajról ecsettel távolítottam el. A kísérleteimhez késői 3. stádiumú („vándorló”) lárvákat és felnőtt legyeket (imágó) is gyűjtöttem. A 3. stádiumú lárva állapot a bábbá formálódást megelőző mintegy 10 órányi szakasz. A lárvák szüretelését a petéztetéstől számított 118h elteltével végeztem. A lárvák legyűjtését PBS pufferbe végeztem. A PBS puffer összetétele: 10X PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14, 4 g Na₂HPO₄, 2, 4g KH₂PO₄, 800 ml (pH = 7, 4). A mintákat folyékony N₂-ben lefagyasztva, -80°C-on tároltam a feltárásig.

5.1.2. *A genomi DNS preparálása*

A genomi DNS izolálását a különböző fejlődési stádiumokból Epicentre MasterPure DNA Purification Kittal végeztem a mellékelt protokoll szerint. Az 500 µl-nyi lárvákat illetve felnőtt legyeket 5 µl 50 µg/µl Proteináz K enzimet is tartalmazó lízis pufferben homogenizáltam. Az így kapott oldatot 30 percig 65°C-on inkubáltam. Ezután az oldathoz 50 µl 2mg/ml RNázt adtam és 37°C-on 30 percig kezeltem vele. A mintához fehérjéket precipitáló reagenst adtam és 10 000 g -vel 10 percig centrifugáltam. A kapott felülúszóból izopropanollal kicsaptam a DNS-t, majd a csapadékot nukleáz mentes desztillált vízben visszaoldottam.

5.1.3. Normál és uracil-tartalmú plazmid előállítás

Uracil-tartamú DNS előállítását CJ236 *dut-/ung-*, míg a normál plazmid DNS-ét XL1-Blue (vad típusú) *E. coli* törzsekben pSUPERIOR-puro plazmid szaporításával végeztem. A mutáns *E. coli* törzsből a timineket átlagosan 1-3 %-ban helyettesíti uracil [12]. A baktérium sejteket 5 ml LB (10g tripton+10g NaCl+ 5g élesztő kivonat 1 l desztillált vízben oldva) tápoldathoz tetraciklint (XL1-Blue) illetve kloramfenikolt (CJ236) adtam és ebbe átoltottam a -80°C-on tárolt *E. coli* sejteket. Egy éjszakán keresztül rázattam 37°C-on. A felszaporított sejtoldatokból 500 µl-t 50ml LB tápoldatba pipettáztam, amely szintén tartalmazott antibiotikumokat, majd 120 percig 37°C-os rázógépbe helyeztem. Az elegy optikai denzitását (OD) spektrofotométerrel követtem 600 nm-en. Amikor a sejtoldat OD értéke a 0,4-et elérte a sejteket 3600 rpm-en, 4°C-on, 20 percig centrifugáltam. A centrifugálás után a felüliszót leöntöttem, a sejtsapadékot pedig 5 ml 0,1M MgCl₂-ban felfuszpendáltam, és 15 percig jégen inkubáltam. Ezután az elegyet 5 percig centrifugáltam, 5000 rpm-en 4°C-on. A felüliszót leöntöttem, majd a leülepedett sejteket 1 ml 0,1M CaCl₂-ban felfuszpendáltam. 30 perc jeges inkubálás után a már kompetenssé tett sejtekkel folytatattam a munkát. A plazmidokat hősokk transzformációval (1 µl plazmid + 100 µl kompetens sejt, 30' jégen, 90'' 42°C-on, 100 ml LB tápoldatban 1h 37°C rázógép) juttattam a baktérium sejtekbe. A transzformált kultúrából 100 µl-t szélesztettem steril LB táptalajos, kloramfenikolt (CJ236) illetve tetraciklint (XL1 Blue) és ampicillint (pSUPERIOR) tartalmazó lemezekre, amit 37°C-on inkubáltam éjszakán át. Az így kinőtt kolóniákból steril LB tápoldatba oltottam és éjszakán át 37°C-on növesztettem őket. A felszaporított plazmidokat Qiagen Plasmid Midi szettel izoláltam. A tisztított cirkuláris plazmidokat NotI restrikciós enzimmal éjszakán át 37°C-on linearizáltam (37 µl 0,7 mg/ml plazmid + 3 µl NotI + 4,5 µl NEB Buffer3 + 0,5 µl BSA), majd 65°C-on 10 percig inaktiváltam. Az agaróz assay és az ARP kidolgozásához ezeket a linearizált, uracilos (pozitív kontrol) ill. normál (negatív kontrol) DNS plazmidokat használtam.

5.1.4. Nukleinsav koncentrációmérés

A DNS koncentrációját fotometriásan a minta 200-400 nm közti spektrumát felvéve határoztam meg Nanodrop (ND-1000) UV/VIS spektrofotométerrel. A spektrumról leolvastam a 260, 280, 350 nm-en mért értékeket. 260 nm-en a nukleinsavaknak, 280 nm-en a fehérjéknek (aromás aminosavaknak) van elnyelési maximumuk, 350 nm-en mért abszorbancia érték a fényszórásból eredő kontrol. A 280 nm-en mért érték a minta fehérjékké váló szennyezettségére utal. A Lambert-Beer-törvény szerint a minta DNS koncentrációja egyenesen arányos a mért abszorbancia értékkel. Tapasztalati úton meghatározták, hogy ha $A_{260}=1$, akkor a $[dsDNS]=50 \mu\text{g/ml}$. A két összefüggésből kiszámítható a dsDNS (kettősszalú DNS) koncentrációja.

5.1.5. DNS minták agaróz gélelektroforézise

A gélelektroforézis alapelve az, hogy a töltéssel rendelkező molekulák az ösztöltésüknek megfelelően elektromos térben az ellentétes töltéssel rendelkező elektród felé vándorolnak. A vándorlás sebessége függ a molekula töltésétől, tömegétől és alakjától, továbbá az elektromos térerőtől.

A nukleinsavak töltése arányos a tömegükkel és a hosszúságukkal, tehát a módszer tömeg szerinti elválasztásra is alkalmazható. A futás sebességét a nukleinsavak másodlagos szerkezete befolyásolja, azonos tömegű helikális és lineáris nukleinsav molekulák különböző sebességgel futnak.

Nukleinsavak elektroforézisét agaróz gélben végezzük, az elválasztani kívánt nukleinsav méretétől függ a gél agaróz koncentrációja. Általában 0,75%-os agaróz gélt használunk, de 1 kb-nál kisebb fragmensek elválasztására töményebb, 1-2%-os gél alkalmazása ajánlott.

A nukleinsavakat etídium bromiddal mutatjuk ki. Az etídium bromid, ha DNS-hez kötődik, akkor UV fény hatására fluoreszkál. Az etídium bromidot a gél mátrix tartalmazza.

Az agarózt TAE (40 mM Tris/acetát, 1 mM EDTA, pH = 8,5) pufferben felmelegítve oldottam, majd 50°C-ra hűtve 2-3 csepp 0,008 %-os etídium bromidot adtam hozzá, és a géllöntő apparátusban hagytam megdermedni. A géltre a DNS mintákat mintakóttalban („6X Loading dye”) vittem fel. Az elektroforézist TAE pufferben végeztem, 100 mV feszültséggel. A gélben lévő DNS-t UVI doc denzitométerben, UV megvilágítással detektáltam.

5.1.6. Agaróz assay

Az uracilt tartalmazó DNS-t (0,05 mg/ml) első lépésben 10^{-2} units/ml UNG enzimmel inkubáltam 37°C 1 órán át Bennett pufferben (25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$). Majd ehhez a reakcióelegyhez hozzáadtam 10^{-2} units/ml APE enzimet és a mintát további 60 percig inkubáltam APE reakció pufferben (500 mM HEPES (pH 7,5), 500 mM KCl, 100 mM $MgCl_2$, 0,5% Triton X-100, 10 μ g/ml BSA). Ezután az enzimeket inaktiváltam 15 percig 65 °C-on. A mintákat agaróz gélen megfuttatva uracil-tartalmú DNS esetén az UDG/APE hatására bekövetkező fragmentálódás volt látható.

5.1.7. Aldehyd reaktív próba (ARP)

Az aldehid reaktív próba [12] a glikoziláz reakció során keletkező bázismentes (AP) helyek detektálására alkalmas. Az uracilt a DNS-ből az uracil-DNS glikoziláz (UDG) enzimek vágják ki a glikozidos kötés hasításával, amely során bázismentes helyek keletkeznek. Majd a depurinált DNS-en a ribóz gyűrű felnyílásával keletkező aldehid csoportokkal reagál a biotinált hidroxilamin ARP (Dojindo Molecular Technologies) reagens. A biotin és a DNS között kovalens kötés alakul ki és a biotin valamilyen fluorofórral vagy enzimmel kapcsolt sztreptavidinnel detektálhatóvá válik. Az uracilt tartalmazó DNS szubsztrátot (0,1 mg/ml) 37°C-on 1 órán át 10^{-2} units/ml UNG enzimmel kezeltem olyan pufferben (25 mM Tris-HCl, 1 mM $MgCl_2$, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,5), amely 2 mM ARP reagenst is tartalmazott a reaktív AP helyek megjelölésére. A detektálást cseppblottal végeztem nitrocellulóz membránon. A membránt 1 M ammónium acetát oldattal hidratáltam, mielőtt az UDG-vel kezelt mintákat felcseppentettem. A felvitt DNS-t (10 μ l) UV keresztköti reakcióban (0,2 J/cm², 30 perc, 25°C) fixáltam a membránhoz. Majd a membránt blokkoló pufferben (20mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5, 50mg/ml BSA) inkubáltam szobahőmérsékleten 30 percig. Ezt újabb 60 perces inkubáció követte szintén szobahőmérsékleten sztreptavidint tartalmazó (20mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mg/ml BSA, 0,05% Tween, 0,05 μ g/ml sztreptavidin-peroxidáz) oldatban. Végül a membránt 5X TBS pufferben (20mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) mostam. Az előhíváshoz kemilumineszcens jelet adó ECL reagenseket használtam, mely jelet röntgenfilmen detektáltam. A blotokat 1 percig rázattam ECL reagensek 1:1 arányú elegyében. Szűrőpapíron hagytam a blotokat megszáradni. Majd sötétszobában a blotokra ráhelyeztem a röntgenfilmet, rövid ideig exponáltam. Ezután a filmet előhívtam és hagytam megszáradni.

5.1.8. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) kapcsolt tömegspektrometria (MS)

A HPLC-MS módszer két különböző analitikai technika egyesítéséből áll. Egy szelektív analitikai HPLC (nagyhatékonyságú folyadékkromatográf) kapcsolódik egy szintén nagy érzékenységu és specifikitású tömegspektrométerhez (MS). A tömegspektrométer alkalmazásával így egy további elválasztási eljárás párosul a folyadékkromatográfiához. A tömegspektrometria olyan elválasztási módszer, ahol ionos részecskéket választunk el fajlagos tömegük (töltésegységre eső tömegük: m/z) szerint csökkentett nyomáson, elektromos vagy mágneses mező segítségével. Az elválasztott ionok intenzitását mérjük és így egy ionáram intenzitás- fajlagos tömeg függvényt, a tömegspektrumot kapjuk. Ez a spektrum a minőségi információ alapja, mivel nincs két olyan ion, atom vagy molekula, amelynek azonos lenne a tömegspektruma. Az ionok abszolút intenzitásai, vagy azok összege a vizsgálandó anyag mennyiségével arányos.

5.1.8.1 Szabad uracil mérése HPLC-MS módszerrel

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát Applied Biosystem 140C készüléken a Szegedi Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében kollaboráló partnerünk, Dr. Kele Zoltán végezte. Állandó metanol-víz összetételű mozgófázis (250 $\mu\text{l}/\text{min}$) mellett a kromatográfiás oszlopon (YMC J'sphere ODS-H80) egyszerre 20 μl mintát választottunk el, melyet azután Finnigan TSQ 7000 hármás kvadrupol tömegspektrométeren analizáltunk. A készülék pozitív ionmódban működő Finnigan Atmoszférikus nyomású kémiai ionizáló (APCI) ionforrással volt ellátva. Az analizátort SRM, azaz szelektív reakciós módban használtuk. Ez azt jelenti, hogy a spektrométer ebben az üzemmódban csak az előre beállított prekursorokat (uracil esetén 113) és az ebből képződő előre beállított fragmentionokat (uracilnál 96 (NH₃ lehasadása esetén), és 70 (HNCO lehasadása esetén) detektáljuk [79]. A kedvezőbb jel/zaj arány miatt az uracil tartalom meghatározásához a 113-96 átalakulásból származó jeleket használtuk. Az uracil kalibrációs görbét 20 μl -es DMSO-ban feloldott szabad uracil tartalmazó 50-100 ng/ml-es oldatok injektálásával vettük fel. A mérést megelőző glikoziláz reakciót 20, 40 illetve 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vizsgálandó DNS-t, 10^2 units/ml UNG fehérjét tartalmazó 10 mM ammónium bikarbonát pufferben (pH=8) hajtottam végre. A reakciót 37°C-on 60 percig végeztem, majd 65°C -on 15 perces hevítéssel állítottam le.

5.1.8.2 Derivatizált uracil mérése HPLC-MS-sel

A derivatizált uracil mintákat szintén Applied Biosystem 140C készüléken választottuk el Dr. Szabó Pállal az MTA Kémiai Kutatóközpontban. Állandó metanol-víz-ecetsav összetételű mozgófázis (400 µl/min) alkalmaztunk. A tömegspektrométer paraméterei, mellyel a mérés végeztük, a fent leírtakkal megegyezik. Az SRM módban az előre beállított prekursor a derivatizált uracil esetén 489, míg az ebből képződő fragmentumok esetén: 161, 189, 232, 258 volt. A kedvezőbb jel/zaj arány miatt az uracil tartalom meghatározásához a 489-232 átalakulásból származó jeleket használtuk. Az uracil kalibrációs görbét metanol-ecetsav elegyében feloldott derivatizált uracilt tartalmazó 400 µg/ml-es oldatból hígított (2000-32000x) 20 µl-es alikvotok injektálásával vettük fel. A glikoziláz reakciót 20-400 µg/ml vizsgálandó DNS-t, 10² units/ml UNG fehérjét tartalmazó TE pufferben (pH=7.5) hajtottam végre. A reakciót 37°C-on 60 percig végeztem, majd 95°C -on 3 perces hevítéssel állítottam le. A glikoziláz reakció után a mintákat liofilizáltam, majd visszavettem őket 1,2 µl víz és 80 µl aceton elegyébe. Belső standardként 5 µg tiszta uracilt használtam. 40 mg káliumkarbonát hozzáadása után a mintákat 3 percig rázattam. Majd 50 µl 1 mg/ml-es 4-brómmetil-7-metoxikumarinnal (BrMMK) és 50 µl 2.5 mg/ml-es 18-crown-6-tal 60 percig szobahőmérsékleten derivatizáltam a mintákat. A derivatizálás után vákuum centrifugával beszáritottam, majd 70 µl metanol és ecetsav elegyébe visszazusuzpendáltam őket a méréshez [80].

5.2. Az UDE fehérje szerkezet és funkció vizsgálata során alkalmazott módszerek

5.2.1. Fehérje termelés

5.2.1.1 Klónozás és mutagenézis

A rekombináns UDE fehérjét Felföldi Ferenc állította elő. A *Drosophila melanogaster* CG18410 gén cDNS-ét (Open Biosystems) NdeI és XhoI restriktációs enzimekkel pET19b (Novagene) plazmidba klónozták. A rekombináns konstruktt egy hat hisztidinből álló címkét tartalmaz az N-terminális végén, így az expressziós vektort pET-HisUDE-nak neveztük el.

A *Tribolium Castaneumban* talált UDE homológoknak megfelelő csonkított G112-E355 *Drosophila melanogaster* UDE konstrukttot a pET-HisUDE -ből az 5'- GAG ATA TAC ATA TGG GCG GAG GGG CGT CCA GCA AG-3' és 5'- AAG CTT GAG CTC GAG CTC CTC

CCT CTT CTT CTT CC -3' primerekkel generáltam. A DNS fragmenst ezután NdeI és XhoI restriktációs enzimekkel pET22b (Novagene) vektorba klónoztam. A rekombináns csonkított fehérje így a hat hisztidinből álló címkét a C-terminális végén tartalmazza.

A K50, K137, H292 aminosavak cseréjét alaninre irányított mutagenézissel hoztam létre, ahol templátként a pET-HisUDE-t használtam. A PCR reakciót a következő primerekkel végeztem:

5'-GAA ATT TTG GCT TTC GCG GAC ATG GAG AAG G - 3' (UDE^{K50A}),

5'- GATTGG GGA TTC GCG GAC AAG GCT GCT G - 3' (UDE^{K137A}),

5' – ACC CAC CGACCT GGC CCT GCA GTT GA – 3'(UDE^{H293A}).

A kettősmutáns UDE^{K50A-K137A} előállításához templátként UDE^{K50A} konstrukt szolgált, primerként pedig a K137-es aminosav cseréjéhez tervezett primer.

A UDE^{112-355,W239F} pontmutáns a csonkított UDE¹¹²⁻³⁵⁵ izoformán generáltam. A PCR reakciót a következő primerrel hajtottam végre: 5' - GAA AAG ACC AGC TTT GAT ATT GTG CGC - 3'.

Az UDE⁴⁸⁻¹⁹⁷ és az UDE²⁴⁰⁻³¹⁸ csonkított mutánsokat az In-fusion módszerrel állította elő Kónya Emese az irodalomban leírtak szerint ([81],[82]) az oxfordi Protein Production Facility keretein belül. Mindkét konstrukt hat hisztidint és TEV-proteáz hasító helyet tartalmaz az N-terminálisán.

A polimeráz láncreakciót (PCR) követően az eredeti, metilált plazmidot minden esetben DpnI restriktációs enzimmel emésztettem. A megmaradó, mutáns fehérjét kódoló vektort XL1-Blue *E. coli* sejtekbe transzformáltam, és termeltem. A szekvenciákat szekvenálással ellenőriztem (Eurofins MWG Operon, Németország).

5.2.1.2 Fehérje expresszió és tisztítás

A rekombináns *Drosophila* UDE-t illetve a csonkított és pontmutáns UDE konstruktokat kódoló szekvenciákat tartalmazó plazmidokat hősokkal transzformáltam *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, BL21 (DE3) *ung-151* és BL21 (DE3) *ung-151* pLysS sejtekbe, amelyek tartalmazták a T7 RNS polimerázt kódoló génszekvenciát [83].

A transzformált sejteket, megfelelő antibiotikumot (ampicillin, tetraciklin, kloramfenikol) tartalmazó Luria-Bertani (LB)-agaron növesztettem egy éjszakán át 37 °C-on. A felnőtt telepekből másnap antibiotikumot nem tartalmazó LB tápoldatba oltottam, és az exponenciális növekedési fázis elérésekor izopropil-, D-tiogalaktoziddal (IPTG – az oldatban 0,5 mM a végkoncentráció) indítottam be a T7 RNS polimeráz expresszióját, és ezzel a

fehérjéket kódoló génről történő fehérje termelést. Indukálás után a sejteket még 4 órán keresztül 25°C-on növesztettem, majd 4 °C-on lecentrifugáltam (2750 x g, 20 perc, 4 °C).

A vad típusú és a mutáns fehérjéket azonos módon tisztítottam BL21 (DE3) *ung*-151 pLYS5 sejtekből. A tisztítási folyamat során a termelt fehérjéket végig 0 és 4 °C között tartottam.

A lecentrifugált sejtsapadékat feltáró pufferben (50 mM Tris/HCl (pH=8,0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) szuszpendáltam fel, amely kiegészült frissen hozzáadott fenil-metánszulfonil fluorid (PMSF – 1,0 mM) elegyével. A sejtszuspenziót 30 percig jégen kevertetem, majd 6 x 45 másodpercig szonikáltam, hogy a baktériumok sejtfalát roncsoljam. A kapott elegyet a szonikálás után lecentrifugáltam (18000 x g, 20 perc, 4 °C). A felülúszóból a rekombináns fehérjéket Ni-NTA oszlopon tisztítottam kétféleképpen.

A manuális tisztítás során először az oszlopot 3 oszloptérfogatnyi (Vo) LS pufferrel (50mM HEPES (N-(2-hidroxietyl) piperazin- N'-etánszulfonsav), pH = 7,5, 30 mM KCl) hoztam egyensúlyba. Miután a felülúszót oszlopra vittem a következő lépéseket végeztem: 2 Vo LS, 2 Vo HS (50 mM HEPES pH = 7,5, 300 mM KCl), újra 1 Vo LS puffer. Ezután LS pufferben oldott 50 mM imidazollal eluáltam az esetlegesen aspecifikusan kötődő szennyeződések, közben Bradford módszer segítségével követtem az eluálódó fehérjemennyiséget. Végül 200 mM vízben oldott imidazollal eluáltam a rekombináns UDE fehérjéket, az elúciót szintén Bradford reakcióval követtem. Ezt követően a fehérjéket 150 mM KCl-ot, 25 mM HEPES-t (pH = 7,5), 1 mM EDTA-t és 1000 x hig proteázgátló mixet (Sigma) tartalmazó dialízis pufferbe dializáltam. A preparátumokat 10-25 mg/ml végkoncentrációig töményítve (Vivaspin centrifugális töményítő), folyékony N₂-ben lefagyasztva -80°C-on tároltam.

A fehérjéket a manuális kromatográfiához hasonló módon HisTrap Ni-oszlopon (GE Healthcare) AKTA készülékkel, a rendszerhez tartozó Unicorn szoftver segítségével is tisztítottuk. Az eluátum abszorbanciáját 260 és 280 nm-en követtük. A fehérjét tartalmazó sejtextraktot az oszlopra vittük, majd A pufferrel (50 mM Tris-HCl (pH=7.5), 30 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM imidazol, 0.1 PMSF és 1 mM DTT) mostuk a gyantát az alapvonal eléréséig. Utána 50 % B pufferrel (A puffer 1 M KCl-os koncentrációval) az aspecifikusan kötődő szennyező fehérjéket távolítottuk el. Végül lineáris gradiens során C pufferrel (A puffer 1 M imidazol koncentrációval) eluáltuk az eltérő affinitással kötődő UDE frakciókat. A dialízist és a fehérje töményítést a fent leírtakkal azonos módon végeztük.

5.2.2. A fehérjeminták jellemzése

5.2.2.1 SDS-gélelektroforézis, fehérje koncentráció meghatározása

Na-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) Laemmli szerint (Laemmli 1970, Nature) 12%-os poliakrilamid minigéleken Protean III berendezésben (Bio-Rad) végeztem. A fehérje csíkokat kolloidális Coomassie Brilliant Blue festéssel (Biosafe Coomassie stain; Bio-Rad) tettem láthatóvá, és GelDoc denzitóméterrel (Bio-Rad) értékeltem ki. A tisztított fehérje minták egyedüli látható csíkként jelentek meg a géleken, és a gélképek denzitometriás analízise szerint legalább 95%-os tisztaságúnak mutatkoztak. A fehérjeminták koncentrációját Bradford-módszerrel [84], illetve a fehérje ultraibolya spektruma alapján határoztam meg. A Bradford-módszer alapja, hogy a fehérjemintát olyan, a fehérjemolekulához specifikusan kötődő festékanyaggal keverjük össze, amelynek molekulái szabad állapotukban másképpen nyelik el a fényt, mint fehérjéhez kötve. Az 595 nm-en bekövetkező fényelnyelés változás arányos a fehérjekoncentrációval. A módszer kalibrálására szarvasmarha szérum albumint (BSA) használtam. A fehérjeminták ultraibolya spektrumát JASCO-V550 és Nanodrop spektrofotométerrel vettem fel. A spektrumokat minden esetben a fehérjét nem tartalmazó, de az összes többi komponens tartalmazó pufferoldatról felvett alapvonallal korrigáltam. A spektrumban 280 nm-nél észlelhető abszorpciós csúcson elsősorban a fehérjében lévő aromás triptofán és tirozin oldalláncoktól származik. Így a fehérje aminosav összetétele alapján kiszámítható az úgynevezett elméleti fajlagos abszorpciós együttható ($\epsilon^{0,1\%}$ 1 cm, 280 nm), amely lényegileg 1 mg/ml-es fehérjeoldat elnyelését adja meg (<http://au.expasy.org>, PROTPARAM programmal kalkulálható). Ennek alapján a fehérjeoldat ultraibolya spektrumában 280 nm-en észlelt korrigált elnyelésből a fehérjekoncentráció közvetlenül számítható a Lambert-Beer törvény szerinti $A = c \cdot \epsilon \cdot l$ képlet alapján (ahol A: abszorbancia 280 nm-en, c: koncentráció [mg/ml], l: a fény úthossza a mintában (1cm)).

5.2.2.2 Katalitikus aktivitás teszt

A 5.1.3.-ban leírt módon nyert 50 µg/ml normál és uracil-tartalmú plazmid DNS-t UDE aktivitás pufferben (25 mM Tris/HCl, pH = 7,5, 100 µg/ml BSA, 2 mM MgCl₂ vagy 1 mM EDTA) 50 µg/ml UDE-val inkubáltam 37°C-on adott ideig. A terméket 65°C-on 15 percig denaturáltam, majd agaróz gélelektroforézis segítségével analizáltam. Összehasonlító mérésekben használtam UNG enzimet is, ugyanebben a pufferben ugyanezekben a szubsztrátokon. Ezt követően a mintákat a keletkező AP helyeket elhasítandó 60 mM NaOH-dal kezeltem 15 percig szobahőmérsékleten.

Haracska Lajos laborjában az uracilt meghatározott helyen (30. pozícióban) tartalmazó, 5' végén radioaktívan jelölt, 75 hosszú oligonukleotid szubsztrátokon vizsgáltuk az UDE reakciót. A termékeket denaturáló körülmények közt (8 M urea), nagyméretű szekvenáló gélen (4 % PAGE) választottuk el, majd a radioaktivitást detektáltuk.

Csoportunkban később optimalizáltunk egy újabb módszert az UDE aktivitásának folyamatos mérésére. A tesztet 60 hosszú szintetikus uracil-tartalmú egyes és kettősszálú oligonukleotidokon (Eurofin MWG Operon) végeztem. Az uracilt a 32. pozícióban tartalmazó oligonukleotid az 5' végén Cy3 fluoreszcens festékkel volt jelölt. A komplementer szál, amit a kettősszálú szubsztrát előállításához használtunk, nem tartalmazott uracilt és nem jelöltük fluoreszcensen.

Az uracil-tartalmú oligonukleotid szekvenciája: Cy3-5' – CTC GCA AAT GAA CTG GGC GAT GCG GTC GCA CUA CTT CAC CTC GAA ATC AAC ATC TGA GTG– 3';

A komplementer oligonukleotid szekvenciája: 5' – CAC TCA GAT GTT GAT TTC GAG GTG AAG TAG TGC GAC CGC ATC GCC CAG TTC ATT TGC GAG– 3'.

A kettősszálú oligonukleotidot az uracil-tartalmú és a komplementer oligonukleotid egyenlő mennyiségét 95°C-on 5 percig inkubálva állítottam elő.

Az aktivitás reakcióban 25 pmol egyes- vagy kettősszálú oligonukleotidot 50 µg/ml vad típusú vagy különböző UDE csonkított illetve pontmutáns fehérjékkel inkubáltam 10 µl 25 mM TRIS/HCl-t (pH 7.5), 0.1 mg/ml BSA-t, 1 mM EDTA-t tartalmazó pufferben 37°C-on. Adott reakcióidőnél a reakció termékeket 10% Tris-Borate-EDTA (TBE)-PAGE gélen vizsgáltam UV-fény alatt.

Az *in vitro* szintetizált 471 nukleotidból álló kettősszálú RNS-en végzett aktivitásmérést a plazmid DNS-en végzett tesztel analóg módon végeztem. A kettősszálú RNS szubsztrátot a duplaszálú DNS előállításával azonos eljárással készítettem.

5.2.2.3 Elektroforetikus mobilitás teszt (EMSA)

Az EMSA fehérjék DNS-kötő képességének vizsgálatára alkalmazott módszer. A fehérje-DNS komplex kevésbé mobilis a natív agaróz gélelektroforézis során, ezért a gélen a fehérjét nem kötő DNS-kontrollhoz képest a komplex a nagyobb molekulatömeg felé eltolódva jelenik meg a gélen.

A plazmid DNS-sel végzett mobilitás teszt során használt fehérje koncentrációkat a gél felett tüntettem fel $\mu\text{g/ml}$ -ben. A DNS koncentrációja minden elegyben (25 mM TRIS/HCl (pH 7.5), 0.1 mg/ml BSA, 1 mM EDTA) 20 $\mu\text{g/ml}$ volt. A különböző mennyiségű fehérjéket a DNS mintákhoz adtam, majd az elegyeket agaróz gélen elválasztottam. A DNS csíkokat a szokott módon UV-fény alatt detektáltam.

A szintetikus oligonukleotiddal végzett EMSA során kiindulásként 3 μM vad típusú UDE fehérje és 1 μM Cy3 jelölt 30 hosszú uracil tartalmú egyszálú oligonukleotid (5'-Cy3-ACG AAT TCG TAA UAT GCC TAC ACT GGA GCA-3') elegyből (25 mM TRIS/HCl (pH 7.5), 150 mM KCl, 1 mM EDTA) indultunk ki. A fehérje-jelölt oligonukleotid elegyet négy különböző (egyes- és kettőszálú, normál és uracil-tartalmú) 30 hosszú jelületlen kompetitor oligonukleotiddal titráltuk. Az oligonukleotid szekvenciája: 5'-ACT GCC ATG CCA XCG CCC TAA CGA TCC GCA-3', ahol X a T/U bázisok helyét jelöli. Az egyes titrálási pontoknak megfelelő elegyet 6%Tris-Borate-EDTA (TBE) -PAGE gélen vizsgáltam UV-fény alatt. Az UDE- jelölt oligonukleotiddal alkotott komplexének denzitometriás kiértékelését UviDoc szoftverrel végeztem.

5.2.2.4 Western blot (immunblot)

Az SDS-PAGE után a nitrocellulóz membránon a fehérjék részlegesen visszatekerednek, de eredeti natív formájukat nem nyerik vissza. A membránon a fehérjék festhetőek aspecifikusan (Ponceau) illetve a kiválasztott fehérje detektálható immuntechnikákkal. Az immuntechnika alkalmazása során a membránra blottolt fehérjét először az adott fehérjét felismerő antitesttel reagáltatjuk, majd az immunglobulinra specifikus, valamilyen enzimmel konjugált másodík ellenanyaggal inkubáljuk a blotot. Az inkubálás alatt lejátszódó enzimreakció után a fehérje detektálhatóvá válik.

A *Drosophila* szöveteket 500-szor híg proteázgátló koktélt, 1 mM DTT-t, 1 mM EDTA-t, 0,1 % Tween 20-t is tartalmazó PBS-ben, Potter-Elvehjem homogenizátorban homogenizáltuk, aztán 5 percig forró vízfürdőn inkubáltuk, szonikáltuk, majd SDS-es mintakoktéltban újra 5 percig forró vízfürdőn inkubáltuk, végül 13 000 g-vel 10 percig centrifugáltuk.

Az eljárás során az előzőleg poliakrilamid gélen elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk, 12 pH-jú CAPS (10 mM CAPS, 10 % metilalkohol) pufferben elektroforetikus úton. Ilyen pH-n a fehérjék többnyire negatív töltésűek, és az elektrolízis során a pozitív irányba fognak vándorolni, a gélből a nitrocellulóz membránra kerülnek.

Az elektrolízist az erre a célra kifejlesztett Mini Protean (BioRad) készülékben 4 °C-on kevertetés közben 350 Amperen, 3-4 órán át végeztük jegelve és folyamatos kevertetés mellett.

A blotot Ponceau-val megfestettük (0.5 % Ponceau 1% ecetsavban, 1-2 perc rázatás), amely reverzibilis aspecifikus fehérjefesték. Így láthatóvá váltak a blotra átkerült fehérje csíkok, amit fotózás után TBS pufferben 5-10 perc alatt el lehetett távolítani. Fotózás után vagy megkezdjük a Western blot fejlesztését, vagy szárazon el is tehetjük másnapra a membránt.

A Western blot eljárás menete [85] :

A membránokat 0,1% Tween-t is tartalmazó blokkoló pufferben 1 órán át szobahőmérsékleten rázattuk, az elsődleges ellenanyaggal 2 órán át inkubáltuk 0,1% Tween-t is tartalmazó blokkoló pufferben 150 000x-es hígításban. A membránokat ezután TBS-sel illetve TBS/TWEEN-nel mostuk. Ezután a másodlagos ellenanyaggal (2500X híg) rázattuk a membránokat 1 órán át, mialatt az IgG-t felismerő toma peroxidáz (HRP) konjugált antitest az UDE-ra specifikus elsődleges antitesthez kötődött. Majd újra a fent említett pufferekkel mostuk a membránokat, végül desztillált vízzel öblítettük le őket.

A felhasznált pufferek: TBS (20 mM TRIS (pH=7,5), 150 mM NaCl), Blokkoló puffer (TBS+5V/V% (5g/100 ml) sovány tejpor), TBS/TWEEN (TBS + 0,1% TWEEN).

A fehérjék detektálására alkalmazott módszert:

Enhanced Chemiluminescence (ECL) reagenseket (Pharmacia) használtunk, ami kemilumineszcens jelet ad, melyet röntgenfilmen detektáltunk. A blotokat 1 percig rázattuk ECL reagensek 1:1 arányú elegyében. Szűrőpapíron hagytuk a blotokat megszáradni. Majd sötétzobában a blotokra ráhelyeztük a röntgenfilmet, rövid ideig exponáltuk. Ezután a filmet előhívtuk és hagytuk megszáradni.

Az antiszérumokat Prof. Erdei Anna (ELTE TTK Immunológiai Tanszék) csoportjában állították elő nyulak rekombináns fehérjével történt immunizálásával. Az antiszérum specificitását Western bloton teszteltük. Az UDE esetén a 150 000-szeres hígítás megfelelő specificitású és érzékenységgű jelet adott.

5.2.2.5 Glikoziláz aktivitás vizsgálata két független módszerrel

5.2.2.5.1 Aldehid reaktív próba (ARP)

Az 1 mg/ml uracil-tartalmú plazmid DNS-t 37°C-on 1 órán át 10^{-2} units/ml UNG illetve 50 µg/ml UDE enzimmel kezeltem 25 mM Tris-HCl-ot (pH=7.5), 1 mM MgCl₂-t, 0.1 mg/ml BSA-t és 2 mM ARP reagenst is tartalmazó pufferben. A detektálást és az előhívást a 5.1.7.-ben leírtak szerint hajtottam végre.

5.2.2.5.2 HPLC-MS módszer

Az 1 mg/ml uracil-tartalmú plazmid DNS-t 37°C-on 1 órán át 10^{-2} units/ml UNG-ot illetve 50 µg/ml UDE enzimet tartalmazó 10 mM Ammóniumbikarbonát (pH=8) pufferben inkubáltam. A reakciót 1.2 M-os HCl-dal állítottam le, majd a mintákat 10-szeresére hígítottam vízben az injektálás előtt. A mintákhoz ellenőrzésképpen hozzáadott uracil mennyisége 4 ng volt. A mérést a 5. 1. 8. 1.-ben leírtak szerint végeztük.

5.2.2.6 Limitált proteolízis

Az UDE fehérje limitált emésztését specifikus proteázokkal (tripszin, nagy specificitású kimotripszin, Aszparagin-N endoproteináz) végeztem. Ezen felül a *T. castaneum* UDE homológnak megfelelő fehérje szegmensét hidroxilamminal végrehajtott proteolízissel állítottam elő.

A **tripszin** (Sigma) 67 potenciális hasító hellyel bír az UDE szekvencián. K és R után hasít.

A **nagy specificitású kimotripszin** (Princeton Separations, Inc.) 19 potenciális hasító hellyel bír az UDE szekvencián. A proteáz W, Y és F utáni peptidkötést hidrolizálja.

Az **Asp-N endoproteináz** (Sigma) 21 potenciális hasító hellyel bír az UDE-n. A proteáz aszpartát és ciszteinsav előtt vág.

A reakciók során 0,5 mg/ml UDE-t, 50 ng/ml tripszinnel vagy 1,25 µg/ml kimotripszinnel vagy 2,5 µg/ml Aszparagin-N endoproteinázzal 0,5 mg/ml uracil-tartalmú DNS jelenlétében és anélkül 150 mM KCl-ot és 1mM DTT-t tartalmazó 20 mM Hepes (pH=7.5) vagy 1 mM CaCl₂-ot tartalmazó 50 mM Tris/HCl (pH = 8) vagy 5 mM MgCl₂-ot tartalmazó 100 mM Tris/HCl (pH = 8,5) pufferben inkubáltam szobahőmérsékleten. A reakciókat 1 mM PMSF-dal illetve Asp-N endoproteináz esetén 5 mM EDTA-val állítottam le és azonnal lefagyasztottam őket.

A **hidroxilamin** (Sigma) aszparagin és glicin közti peptidkötést képes hasítani [86]. Az UDE szekvenciában csak egyetlen ilyen hely van az N111 és G112 aminosavak között. A reakció során: 2 mg/ml UDE fehérjét 2 M hidroxilaminnal, 0,2 M NH_4HCO_3 -ban éjszakán át 37°C-on inkubáltam, majd UDE dialízis pufferbe dializáltam (ld. 7. 2. 1. 2. pontban). Az emésztéssel kapott két fehérje fragmenst Ni-NTA oszlopon szétválasztottam és a G112-E355 szegmensnek megfelelő csonkított UDE izoformát a fent említett dialízis pufferben tároltam. Az emésztményeket SDS-PAGE-n analizáltam, és az Asp-N endoproteináz valamint a nagy specificitású kimotripszin esetén a specifikus fragmenseket tömegspektrometriával azonosítottuk is. Az MS méréseket Dr. Hunyadi-Gulyás Éva és Klement Éva végezték a Medzihradzsky F. Katalin vezette MTA SzBK Proteomika Kutatócsoportban.

5.2.2.7 Az UDE-nukleinsav komplex elválasztása

10 μl 3-10 mg/ml UDE fehérjét 0. 45 mg/ml Proteináz K-val (Sigma) vagy ugyanannyi mennyiségű DNázal (Sigma) vagy RNázal (Epicentre) 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk Az agaróz gélelektroforézist és a detektálást a 5. 1. 5. pontban leírtak szerint hajtottuk végre.

5.2.3. Reverz transzkripció és valós idejű PCR (RT-PCR)

Tisztított RNS-UDE frakcióból az RNS-t TRIZOL reagenssel (Invitrogen) a gyártó által javasolt protokoll szerint izoláltuk. A fehérje-nukleinsav frakciót Trizol reagenssel 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd kloroformmal összeértük. Ezt 15 percig 4°C-on 12000 g-vel centrifugáltuk. A centrifugálás után háromfázisú oldatot kaptunk, melyben a felső vizes fázis tartalmazta az RNS frakciót. Ezt elkülönítve, izopropanollal 10 percig szobahőmérsékleten inkubálva az RNS kicsaptuk. A csapadékot 4°C-on 10 percig 12000 g-vel centrifugáltuk, majd hideg 75 %-os etanollal mostuk. A beszárított csapadékot jégen 30-60 percig inkubálva RNáz mentes vízben oldottam. Az RNS koncentrációt UV spektrum alapján határoztuk meg $A_{260\text{nm}, 10\text{mm}}^{10\mu\text{g/ml}} = 0,25$ koeficienssel számolva.

1 μg izolált RNS templátból reverz transzkripcióval random hexamer primer (Fermentas) segítségével M-MuLV reverz transzkriptáz enzimmal (New England Biolabs) RiboLock RNáz inhibitor (Fermentas) jelenlétében 37°C- on éjszakán át cDNS-sé írtuk. Másnap 10 percig 65 °C-on inaktívtuk az enzimet. Ezt követően a teljes cDNS készletből hígítási sort (1, 10, 100, 1000, 10000X) készítettünk, majd ebből 1 μl -t a PCR elegyhez használtunk fel.

PCR-ben felszaporítottuk Immomix reagens (Bioline) és EvaGreen (Fermentas) fluoreszcens festék jelenlétében három vizsgálni kívánt mRNS (rRNS, UDE mRNS és GAPDH) szekvenciát specifikus primerekkel Stratagene Mx3000P valós idejű PCR készülékben (Agilent Technologies) MxPro szoftverrel követve az amplifikációt.

23S rRNS V. Doménre specifikus primerek: (5' – GCGGTGTTTGGCACCTCGAT – 3', 5' – AGTGATGCGTCCACTCCGGT – 3');

UDE mRNS-re specifikus primerek (5' – GGAGAAGGCGTTAGAGACGTTG – 3', 5' – CTCTGTCTTGGCATTCTTGCTG – 3');

E. coli GAPDH-ra specifikus primerek (5'-CAACGCTTCCTGCACCACCA-3', 5'-AGCAGCACCGGTAGAGGACG-3').

5.2.4. Analitikai gélszűrés

Az analitikai gélszűrést Superdex 200HR (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.) oszlopon végeztem. A vizsgált vad típusú UDE és a csonkolt UDE izoforma natív molekulatömegének kiszámításához, és ezen keresztül a fehérjék oligomerizációs állapotának meghatározásához először kalibrációs egyenest vettem fel, majd a vizsgált enzimmel is végrehajtottam a gélszűrést. Az egyenes felvételéhez a Superdex oszlopokhoz javasolt standard kalibrációs fehérjéket használtam, név szerint tiroglobulint (669 kDa), BSA-t (67 kDa), ovalbumint (43 kDa), kimotripsint (25 kDa) és RNáz-t (13,7 kDa). Az oszlopra 500 µl pufferoldatban 1-6 mg/ml koncentrációban vittem fel a fehérjéket.

A kiértékelés során a papírsebesség és az áramlási sebesség segítségével kiszámítottam a minta elúciós térfogatát (V_e). Az oszlop saját paramétereinek között szerepel az interpartikuláris (üres) térfogat (V_o), és a teljes oszloptérfogat ml-ben (V_t). Ekkor a hasznos elválasztási térfogatot a teljes oszloptérfogat és az üres térfogat különbségéeként kapjuk ($V_t - V_o$). Ezen értékek felhasználásával kiszámítottam a K_{av} térfogati megoszlási együtthatót, ami az adott pórusméretű gél típus és molekula kölcsönhatására jellemző, dimenziótól független anyagi állandó:

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o).$$

Ezután ábrázoltam az öt kalibráló fehérjére kapott K_{av} értékeket a hozzájuk tartozó molekulatömegek tízes alapú logaritmusának függvényében. A pontokra egyenest illesztettem, majd az egyenes paramétereiből kiszámoltam a vad típusú fehérjére és a csonkolt UDE izoformára vonatkozó látszólagos molekulatömeget.

Ezt a módszert alkalmaztuk a rekombináns UDE fehérjének, valamint kezeletlen illetve DNÁzzal vagy RNÁzzal kezelt *Drosophila* lárvá extraktok nukleinsav tartalmú és nukleinsav mentes frakcióinak vizsgálatára.

5.2.5. Analitikai ultracentrifuga

A méréseket Optima XL-A (Beckman-Coulter, Palo Alto, CA) analitikai ultracentrifugával Dr. Carlos Alfonso és Dr. Germán Rivas (Chemical and Physical Biology, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain) hajtották végre. A kísérletet 0.53 mg/ml-es vad típusú UDE-val és 0.8 mg/ml-es csonkított UDE izoformával (UDE^{G112-E355}) végezték 20°C-on, miközben az UV-abszorbanáciát 280 nm-en detektálták.

5.2.5.1 Szedimentációs sebességi mérés

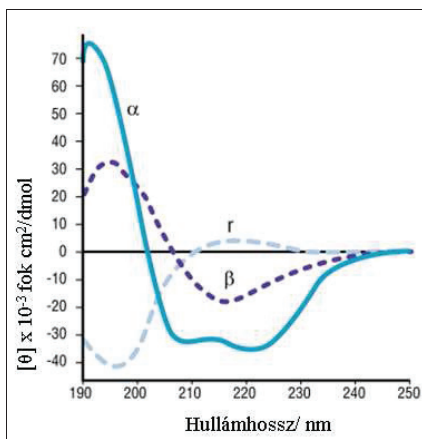
A szedimentációs sebességi mérések során a kiválasztott sebesség 48 krpm volt 400 µl mintatérfogaton. Az ülepedési állandók eloszlását a legkisebb négyzetek módszerét alkalmazva a SEDFIT programmal a szedimentációs sebességi mérésekből nyert adatok felhasználásával határozták meg [87, 88]. A kísérleti ülepedési együtthatókat az oldószer összetételére és a mérési hőmérsékletre a SEDNTERP programmal korrigálták.

5.2.5.2 Szedimentációs egyensúlyi mérés

A szedimentációs egyensúlyi méréseket 85 µl mintatérfogaton különböző sebességeken, 10, 13 és 16 krpm-en hajtották végre. Ezt követően nagy sebességű 42 krpm-en történő centrifugálást végeztek az alapvonal eltolódás becslése céljából. A kísérleti adatokra Hetero-Analysis programmal illesztett single species modell alapján állapították meg a súlyozott molekulatömegeket [89]. A vad típusú UDE és a csonkított UDE izoforma súlyozott molekulatömegét a 0,737 és 0,734 ml/g részleges specifikus térfogatuk alapján határozták meg [90].

5.2.6. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia hatékony vizsgálati módszer királis molekulák térszerkezetének kutatásához. A fehérjéket felépítő aminosavak – a glicin kivételével – királisak, a fehérjék kromofor csoportjai, a peptidkötések és az aromás oldalláncok akirálisak. Azonban az önmagukban akirális kromofórok fehérjén belüli aszimmetrikus környezetéből is adódhat kiralitás, és ilyenkor is megfigyelhető a cirkuláris dikroizmus jelensége. A fehérjék ismétlődő kromofórja az amid csoport, aminek távoli UV tartományban jellemző elnyelése van (230-210 nm és 190-200 nm), ezért 250 nm alatt a CD spektrumot az amid csoportok határozzák meg. A távoli ultraibolya (UV) tartományban (190-260 nm) felvett CD spektrumból következtethetünk a másodlagos szerkezeti elemek (α -hélix, β -szerkezet, rendezetlen láncok) meglétére (10. ábra), illetve ezek arányára a fehérje térszerkezetében, míg a közeli UV tartomány (230-350 nm) az aromás oldalláncokról, azok egymáshoz viszonyított térbeli orientációjáról, vagyis a harmadlagos szerkezetről ad információt. A CD spektroszkópia természetesen nem helyettesítheti a nagyfelbontású szerkezetvizsgáló módszereket (röntgenkristallográfia, NMR), azonban azok hasznos kiegészítője lehet.



10. ábra: Fehérjék másodlagos szerkezeti elemeire jellemző CD spektrumok [91] α -hélix: világoskék folytonos vonal; β -redő: sötétkék szaggatott vonal; rendezetlen szerkezet: világoskék szaggatott vonal.

Távoli-UV CD spektrumokat (190-240 nm) szintén a JASCO 720 spektropolariméteren vettem fel. A mintákat 25 °C-on egy Neslab RTE-100 számítógép vezérelt termosztáttal 1 mm úthosszú küvetében mértem. A méréseket 0,2 mg/ml vad típusú UDE-val és csonkolt UDE izoformával 20 mM nátrium-foszfát pufferrben végeztem (pH=7,5). A fehérjék másodlagos szerkezetielem-összetételét a k2d és SELCON programmal határoztam meg [92-94].

5.2.7. Bioinformatikai módszerek

Az UDE fehérjével homológ szekvenciákat az NCBI honlapján (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) elérhető Tblastp és genomi BLAST programmal végeztük. A homológ szekvenciák összerendezését az ExPaSy (<http://au.expasy.org>) honlapon elérhető CLUSTALW programmal készítettük [95]. Ugyanitt a homológ fehérjék elsődleges paramétereit, mint méret, tömeg, aminosav-összetétel, elméletileg számított extinkciós koefficiens és pI, a PROTPARAM programmal határoztuk meg. A nukleotid szekvenciák hat keretben történő fordítását az ExPaSy honlapon elérhető TRANSLATE programmal végeztük.

Az UDE fehérje limitált emésztésénél alkalmazott proteázokat és kémiai hasítószert szintén az ExPaSy honlapon elérhető PEPTIDCUTTER program segítségével választottuk ki. Az IUPred, DISOPRED, RONN programokat a fehérje szerkezetében fellelhető rendezetlenség becslésére használtam [96-98].

Lengyel együttműködő partnereink, Dr.Janusz Bujnicki és Dr. Jan Kosinski (Laboratory of Bioinformatics and Protein Engineering, International Institute of Molecular and Cell Biology, Warsaw, Poland) a domén határok, a másodlagos szerkezeti elemek és a fehérje feltekeredés predikcióját a GeneSilico Metaserver (<http://genesilico.pl/meta2/>) [99] segítségével hajtották végre.

Az 1A és 1B fragmensek de novo szerkezetmodellezését ROSETTA módszerrel készítették el [100]. A modell elektrosztatikus potenciál eloszlását APBS programmal [101] kalkuláltuk ki és PyMol szoftverrel készítettük el a felszíni potenciál térképet [102].

Munkánk során az annotált *Drosophila* Genom adatbázist is használtuk (FlyBase: <http://flybase.bio.indiana.edu>) [103].

5.2.8. Fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálatok

Az UV- fényel gerjesztett molekulák relaxációja fényemisszióval járhat. A jelenséget a lejátszódó elektronátmenettől függően fluoreszcenciának ($S_1 \rightarrow S_0$ átmenet, nem jár elektronspin-változással), vagy foszforeszcenciának ($T_1 \rightarrow S_0$, elektronspin-változással járó átmenet) nevezzük.

A fehérjék többségében a fluoreszcencia főként a triptofán aminosav gerjesztésének köszönhető. Emellett a tirozin is viselkedhet fluorofórként, de az általa kibocsátott fény intenzitása jóval kisebb, mint a triptofáné. Így ha a fehérjében nincs triptofán, és a tirozinok száma is csekély, a fluoreszcenciás analízis nem ad megbízható eredményt [104]. Fontos megjegyezni, hogy a triptofán fluorofórként való viselkedését jelentősen befolyásolja a körülötte kialakult fehérje mikrokörnyezet. Mikor a fehérje kitekeredésével a triptofán kikerül a fehérje belsejében eltemetett hidrofób magból, az oldószernek jobban kitett környezetben megváltozik az aminosav emissziós spektrumának jellege.

A méréseket JOBIN YVON HORIBA Fluoromax-3 spektrofluoriméterrel végeztem, 10 mm-úthosszú küvetában 25°C-on a beépített Excitation Acquisition programot használva. A méréseimet 1-Anilin-naftil-8-szulfonsav (ANS) jelenlétében végeztem [105], amely a fehérjék hidrofób részéhez képes kötődni, így emissziójának maximuma és helye a fehérje szabad apoláris felületétől függ. Apoláris környezetben így az ANS-től származó jelintenzitás megnő. Az ANS-nek mind a gerjesztési mind az emissziós hullámhossza eltér a triptofánétól, mely lehetővé tette együttes alkalmazásukat.

A gerjesztés spektrumot triptofán esetén 250-350 nm az ANS esetén 350-420 nm-es tartományban vettem fel. A kapott spektrumok alapján megállapítottam, hogy a triptofán gerjesztési hullámhossza 285 nm, míg az ANS esetén 385 nm, a továbbiakban ezeket a gerjesztési hullámhosszokat alkalmaztam.

Az emissziós spektrumot triptofán esetén 300-420 nm, ANS esetén 430-530 nm tartományban detektáltam. A jel maximumához tartozó intenzitás értéket a csak fehérjéket tartalmazó oldat esetén 340 nm-en (Trp) és 470 nm-en (ANS) olvastam le. A mérés során először felvettem a puffer (25 mM Tris, pH=7,5, 150 mM KCl, 100 mM PMSF, 1000x híg proteázgátló mix) emissziós spektrumát (alapvonal), később ezzel korrigáltam az eredményeket.

A kísérletben az UDE és a mutáns fehérjéket uracil-tartalmú és normál 30 hosszú kettős- és egyesszálú oligonukleotiddal titráltam. Az uracil-tartalmú oligonukleotid szekvenciája: 5'-ACT GCC ATG CCA UCG CCC TAA CGA TCC GCA-3' a normál oligonukleotid szekvenciája: 5'-ACT GCC ATG CCA TCG CCC TAA CGA TCC GCA-3'.

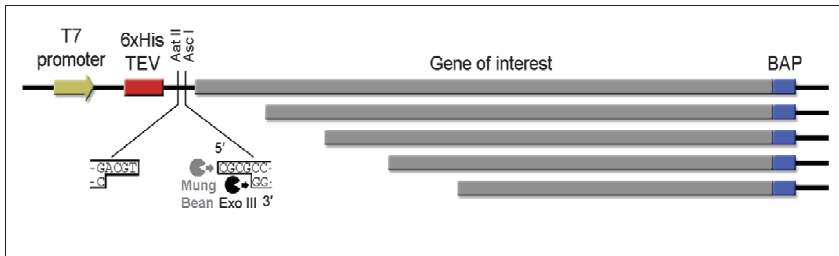
A vizsgálat során alkalmazott koncentráció 400 µl végtérfogatú reakció elegyben: 3 µM enzim, 3-12 µM uracil-tartalmú és normál egyes és kettős szálú oligonukleotid. A titrálás során mindig a már meglévő oldathoz adtam az újabb alikvot oligonukleotidot.

5.2.9. *ESPRIT technológia*

5.2.9.1 Könyvtár struktúra létrehozása

A PCR alapú metodikával ellentétben a Dr. Darren Hart és csoportja (European Molecular Biology Laboratory, Grenoble, France) által kidolgozott random „pásztázó” módszer során exonukleáz protokollt alkalmaztunk [106, 107] az összes lehetséges *ude* gendelációs mutáns előállítására. Ez azt jelenti, hogy a fehérjét kódoló gén minden egyes pontja start vagy stop helyként szolgált. Ezzel a technikával létrejövő nagyobb deléciós konstruktok az egyes domének elkülönítését eredményezhetik, amíg a kisebb deléciós mutánsok a közel teljes hosszúságú fehérje expressziós szintjét illetve oldhatóságát segíthetik elő [108].

Az *ude*-t kódoló gént pTAR010 vektorba klónoztuk mely az exonukleáz csonkoláshoz szükséges helyek kialakításához restrikciós enzim hasító helyeket és a C-terminális végén az oldható formában termelődő konstruktok indukációjához egy biotint kötő peptidet tartalmaz (11. ábra) [109].

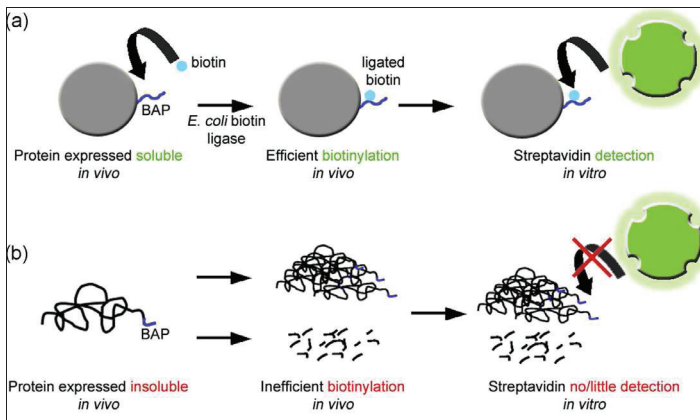


11. ábra: Az ESPRIT módszer molekuláris biológiai alapja. Az ábra a pTAR010 vektor expressziós régióját ábrázolja. AatII restrikciós enzimmel hasítva a vektort megkapjuk az exonukleáz III rezisztens túlnyúló véget, míg AscI enzimmel hasítva generálódik az exonukleáz III számára szubsztrátként szolgáló túlnyúló egyesszálú vég. Az exonukleáz III emésztés után Mung bean endonukleáz eltávolítja a megmaradó egyesszálú DNS darabot a vektor ligálás utáni recirkularizációja előtt.

Egyirányú géndelécíók létrehozásához az *ude* gént tartalmazó linearizált plazmidot exonukleáz III enzimmel inkubáltuk 12 °C-on, majd minden 30. másodpercben mintát vettünk a reakcióelegyből. Ezzel tulajdonképp az *ude* gén lineáris méret eloszlású egyre növekvő csonkítását értük el [110]. Az Exonukleáz III enzim azonban csak egyszálú DNS-en aktív, ezért a reakció végén Mung bean nukleáz adtunk a reakcióelegyhez a megmaradt egyszál eltávolítása érdekében. Végül a csonkolt UDE fragmenseket az N-terminális végen hat hisztidinből álló címkét is tartalmazó vektorba ligáltuk.

5.2.9.2 A könyvtárak vizsgálata

Minden konstrukt esetén 3-5 mintavételezést hajtottunk végre azon csonkolt konstruktok azonosítása céljából, melyek jól oldható és termelődő doméneket adhatnak. Dr. Hart laborjában rutin eljárás keretében 28 000 kolóniát tudnak felvenni kísérletenként 384 lyukú plétekbe kolónia-szedő robotok segítségével. Mivel lehetetlen a létrehozott konstruktok ezreinek az oldhatóságát és expressziós szintjét megmérni, ezért egy rövid biotin kötő fehérjét használtunk indikátorként erre a célra (12. ábra).



12. ábra: Oldhatóság vizsgálata *in vivo* biotínálással. Az expresszált célfehérjét rövid összekötő (linker) szakasz kapcsolja a biotin akceptor peptidhez (BAP). Az oldható fehérje (a) nagyobb mennyiségben köti az *E. coli* termelte biotint, mint az esetlegesen degradált vagy oldhatatlan fehérje (b) [107].

Ha ugyanis a vizsgált fehérje fragmens oldható, az *E. coli* sejtek endogén BirA enzime közvetíti a peptid *in vivo* biotinálását [109]. A klónokat ezért a robotok segítségével nitrocellulóz membránra blottoltuk át, hogy ezen növezzük őket és az arabinóz indukálta fehérje expressziót vizsgálhassuk. Fluoreszcens molekulával konjugált sztreptavidinnel hibridizációs kísérlet során azonosítottuk Visualgrid programmal a jól oldható és termelő UDE fragmenseket. A 96 legerősebb expressziós szinttel és oldhatósággal rendelkező konstruktokat 24 lyukú pléteken 4 ml LB tápoldatban termeltettük és Tecan folyadék-kezelő robottal Ni^{2+} -NTA gyantán tisztítottuk. Az eluált frakciókat nagy áteresztő képességű SDS-PAGE-n analizáltuk, hogy igazoljuk az oldhatóságukat és tisztaságukat. A pozitív klónokat elküldtük szekvenálásra, hogy utána azoníthassuk az UDE fehérje oldható régióit.

6. Eredmények és Kiértékelésük

6.1. Lárva DNS uracil tartalmának meghatározása

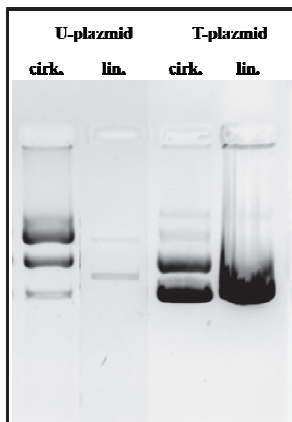
6.1.1. Kvalitatív kimutatás

6.1.1.1 Uracil tartalmú plazmid előállítása és felszaporítása

Első lépésként a kompetenssé tett *E.coli* CJ-236 ung-/dut- sejtekbe pSUPERIOR-puro plazmidot transzformáltam. A kettős mutáns sejtekben felszaporított és ennek következtében uracilt tartalmazó plazmidokat pozitív kontrollként használtam az uracil kimutatását célzó kísérleteimben.

Párhuzamosan XL1-Blue *E.coli* sejtekkel is elvégeztem a transzformációt, ugyanis az így kapott DNS-t „normál” bázisok alkotják, azaz timin-tartalmú maradt. Ezeket a további kísérletekben negatív kontrollként használtam.

A plazmid preparálást Qiagen Midi Kittel végeztem, majd a kinyert DNS-t tartalmazó oldat koncentrációját UV spektrofotométerrel határoztam meg. A cirkuláris plazmid agaróz gélen több csíkban fut a különböző szupercsavart szerkezetei miatt, ami a gélek denzitometriás kiértékelését megnehezíti.



13. ábra: Cirkuláris és linearizált uracil tartalmú és normál plazmid DNS.

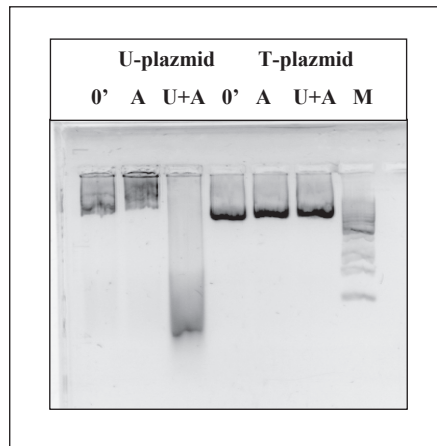
A tisztított cirkuláris plazmidokat ezért NotI restriktíós enzimmal linearizáltam. A hatékonyságot agaróz gélen ellenőriztem (13. ábra).

Kísérleteimhez azért választottam a NotI enzimet, mert a felismerő helyében nincs timin, ezért az enzimet biztosan nem zavarja a plazmid uracil tartalma, továbbá a plazmidon, csupán egyetlen NotI hasító hely van.

6.1.1.2 Agaróz assay optimalizálása kontrol plazmidokon

A DNS-ben megnövekedett szintű uracilt- ahogy az Irodalmi áttekintés című fejezetben említettem- az uracil-DNS glikoziláz (UDG) enzimek kivágják úgy, hogy elhasítják a glikozidos kötést, amivel a bázis a cukor-foszfát lánc dezoxiribózához kapcsolódik. Ennek következtében a DNS-ben bázis nélküli (AP) hely keletkezik, amit az AP endonukleázok (APE) ismernek fel, odakötődnek és elvágják a cukor-foszfát gerincet. Ezzel a keletkező DNS száltörések agaróz gélen detektálhatóvá válnak.

A preparált uracilt illetve timint (normál) tartalmazó plazmidokat UDG és/vagy APE-val kezeltem az Alkalmazott módszerekben leírtak szerint (14. ábra).



14. ábra: UNG és/vagy APE kezelés uracil tartalmú és normál plazmidon.
U: UDG, A: APE, U+A: UDG és APE kezelést jelent. M: DNS létrát jelöli.

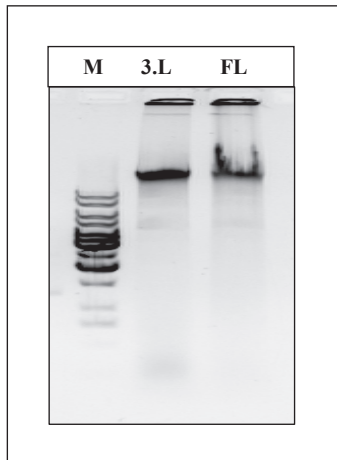
A csak APE-val való kezelésre azért volt szükség, mert a DNS az UDG reakciótól függetlenül is tartalmazhat bázismentes helyet, amely az APE szubsztrátjaként szolgál. Ezzel igyekeztem kiszűrni a nem uracil bázis eltávolításából származó AP helyeket.

Miután az uracilos plazmid random módon tartalmazza az uracilt, ezért hasítása sok különböző tömegű terméket eredményez. A gélen csak a kiindulási anyag fogyását tudjuk detektálni. A módszer lehetőséget ad a DNS uracil tartalmának kvalitatív detektálására.

6.1.1.3 Genomiális DNS preparálása

Felnőtt legyekből és 3. stádiumú vándorló lárvákból Epicentre MasterPure DNA Purification Kittal végeztem a DNS izolálást, a forgalmazó által mellékelte protokoll szerint (15. ábra). A célom az volt, hogy minél kevésbé fragmentálódott DNS-t tudjak kinyerni az *acetumolica* és a lárva szövetekből, azért hogy az UNG és az UNG/APE reakció jól követhető legyen az így kapott szubsztrátokon.

A fenti ábrán jól látható, hogy a legkisebb DNS darabok is 10 000 bázispár felett jelentek meg az agaróz gélen. Ennél nagyobb fragmentek is épen maradtak, melyek méretüknél fogva nem tudtak a gélbe vándorolni, így a zsebekben maradtak.



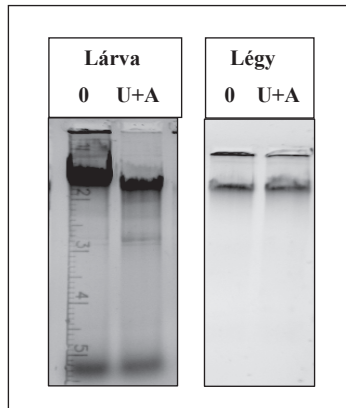
15. ábra: 3. stádiumú lárvából és felnőtt légyből izolált totál DNS.
3.L: 3. stádiumú mászó lárvát, FL: felnőtt legyet jelent. M: DNS létrát jelöli.

6.1.1.4 Agaróz assay genomialis DNS-sel

A korábban ismertetett hipotézisünk értelmében azt vártam, hogy a fő UNG és dUTPáz enzimek hiányában a 3. stádiumú lárva genomi DNS-e a felnőtt légy DNS-éhez képest megnövekedett uracil tartalommal bír.

A lárvából és felnőtt legyekből izolált genomi DNS-t UNG és APE enzimmel kezeltem, hogy azután agaróz gélen denzitometriás kiértékeléssel összehasonlíthassam a felnőtt légy és a lárva DNS-t (16. ábra). A DNS csökkenése csak a lárvális DNS esetében volt detektálható, bár a fogyás közel sem volt olyan jelentős mértékű, mint az uracilos plazmidnál, ami a kevesebb uracil tartalomnak tulajdonítható.

Az agaróz assay ezért nem bizonyult megfelelően érzékeny módszernek a késői lárvák genomi DNS uracil tartalmának detektálására.



16. ábra: UNG és APE reakció 3. stádiumú (balra) és felnőtt légy (jobbra) totál DNS-en. 0: enzimet nem tartalmazó reakcióelegyet, U+A: UDG és APE kezelést jelent.

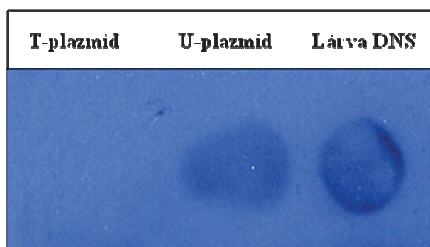
6.1.2. Fél- kvantitatív módszer

6.1.2.1 Glikoziláz reakcióval összekapcsolt aldehid reaktív próba

Az aldehid reaktív próbát az irodalom mint az agaróz assay-nél jóval szenzitívebb módszert említi a DNS uracil tartalmának meghatározására [12]. Az aldehid reaktív reakció bázismentes (AP) helyek detektálására alkalmas. Az ARP reagens a depurinált DNS-ben a felnyíló ribóz gyűrű aldehid csoportjával reagál. A reagens és a DNS között kovalens kötés alakul ki, mely ezután valamilyen fluoreszcens vagy kemilumineszcens módszerrel detektálhatóvá válik.

A kísérlet során a késői lárvákból izolált genomi DNS-t és a kontrollként használt uracil tartalmú és normál plazmid DNS-eket UDG-vel kezeltem a biotinált hidroxilamint tartalmazó ARP reagens jelenlétében. Az UDG kezelés hatására létrejött AP-helyeket cseppploton detektáltam torna peroxidázzal konjugált sztreptavidinnel.

Az eredményt röntgen filmen hívtam elő kemilumineszcens jelet adó ECL reagenssel.(17. ábra).



17. ábra: ARP reakció normál (T-plazmid), uracil tartalmazó (U-plazmid) plazmidon és 3. stádiumú lárva DNS-en.

Pozitív jelet csak az uracilos plazmid és a lárva genomi DNS esetében kaptam. Az eredmény alátámasztja hipotézisünket, miszerint a lárvális genomi DNS uracil tartalma megnövekedett a lárva állapotok során. A filmen detektált jelek denzitometriás kiértékelését tekintve azt állapítottam meg, hogy nincs jelentős mennyiségbeli különbség az uracilos plazmid és a lárva DNS uracil tartalma között. Ez azonban ellentmond az agaróz módszerrel kapott eredménynek.

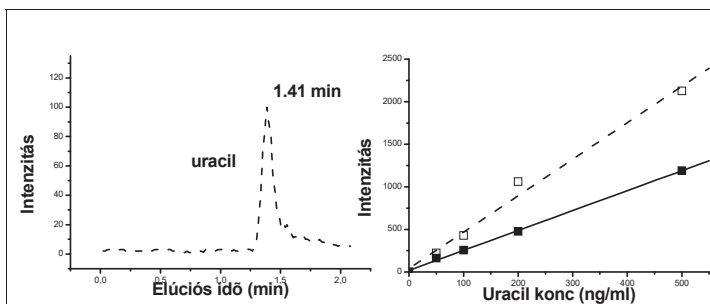
A két kvalitatív módszerrel kapott eredmények alapján azt állíthatom tehát, hogy a lárvális DNS-ben az uracil felhalmozódik, de arra nem kaptam választ egyik eljárással sem, hogy az uracil-szint emelkedése milyen mértékű.

6.1.3. Kvantitatív meghatározás

6.1.3.1 Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (HPLC- MS)

Egy szelektív és érzékeny eljárást, a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriát alkalmaztam a *Drosophila* lárvák uracil tartalmának mennyiségi meghatározására [79]. A méréseket a Szegedi Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében kollaboráló partnerünk, Dr. Kele Zoltán végezte. A kimutatás tulajdonképpen a korábban tárgyalt minőségi meghatározáson alapszik. A DNS mintákat ugyanis először UDG enzimmel emésztettem, majd a felszabaduló uracil koncentrációját folyadékkromatográfiás elválasztás után a keletkező fragmentationokra jellemző molekulatömeg szelekció alapján tömegspektrométerrel határoztam meg.

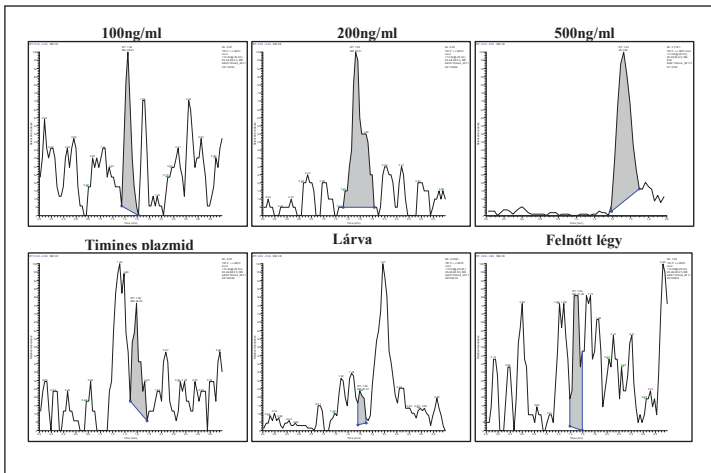
A DNS minták uracil koncentrációjának meghatározásához kereskedelmi forgalomban kapható különböző koncentrációjú szabad uracilt tartalmazó oldatokkal kalibrációs egyenest készítettem (18. ábra).



18. ábra: A: szabad uracil spektruma HPLC-MS-sel. B: Kalibráló egyenesek uracil vizes oldatával (üres szimbólum) ill. a glikoziláz reakcióegyhez adott uracillal (fekete szimbólum).

Az egyenesen az uraciloldatok koncentrációjának függvényében a tömegspektrumokon kapott uracilszcusok csúcs alatti területét ábrázoltam. A kalibráció során kimertem azt a legkisebb uracil koncentrációt, ami a készülékkel az adott mérési körülmények között detektálható volt. A kimutatás alsó határának 50 ng/ml-es uracil koncentrációt kaptam.

A kalibráció után elvégeztem az UDG kezelést 3. stádiumú lárva és felnőtt légyből származó DNS-en illetve a negatív kontrollként használt timines plazmidon. A folyadékkromatográfiás elválasztást követően felvettem a minták tömegspektrumát (19. ábra).



19. ábra: A növekvő koncentrációjú uracil kalibráló oldatok (felső sor) és a kontroll (timines plazmid) illetve a *Drosophila* genom DNS-ek (3. stádiumú lárva, felnőtt légy) tömegspektruma.

A kontroll plazmidból és a felnőtt légyből származó mintáknál a lárva mintához képest nagyobb, - az uracilnak megfelelő retenciós időnél (1,41 perc) megjelenő- csúcsot kaptam. Ez egyrészt abból adódhatott, hogy a kiindulási DNS mennyiség a plazmid és a felnőtt légy esetén nagyobb volt. Az is torzíthatta az eredményt, hogy a citozin az uracilhoz hasonló tömegű ionokra fragmentálódik. Az uracil fajlagos tömege pozitív ionmódban 113 és 96 illetve 70 tömeg/töltésű ionokra fragmentálódik NH_3 vagy HNCO elvesztésével. A tömegspektrum felvételekor mindig csak az egyik ion képződését követtem, ami az uracilnál a

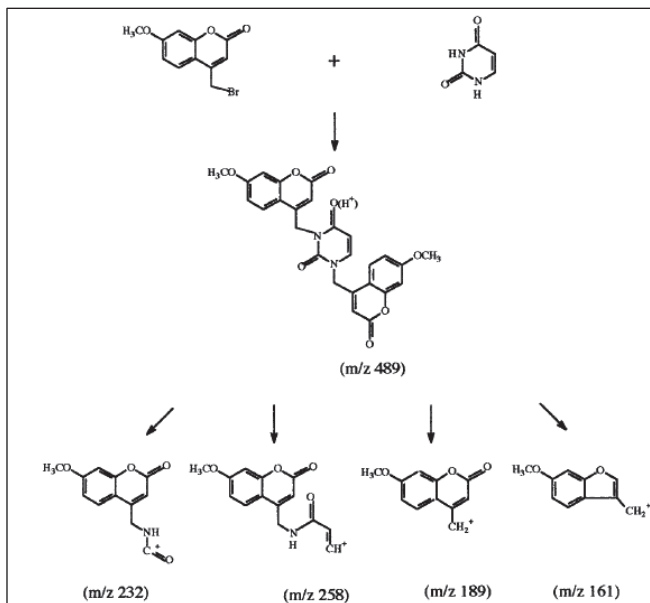
113-96-os átalakulásból származott, mivel az ebből származó jel sokkal szelektívebbnek bizonyult. A citozinból, amely 111 tömeg/töltésű szintén képződhet 96-os fajlagos tömegű fragmention. Így a genomi DNS-ekből és a plazmidból származó uracil spektrumához hozzáadódhatott a citozintól származó fragmention mennyisége is.

A lárva DNS uracil tartalma éppen a kimutatási határ környékén volt mérhető, amelyből azt a következtetést vontam le, hogy növelni kell a kiindulási DNS mennyiségét. Nagyobb kiindulási DNS mennyiségnél azonban annyira megnövekedett az úgynevezett mátrixhatás, hogy a szabad uraciltól származó jelet elfedték az oldószer és egyéb előforduló anyagoktól származó jelek.

A módszer tehát nem elég érzékeny olyan kis tömegű molekulák kimutatására, amellyel a szennyező anyag összemérhető mennyiségben van jelen. A továbbiakban az uracil bázis derivatizálását azért választottam, mert az így keletkező iontermékek nagyobb tömegük következtében a tömegspektrometriás detektálás során nagyobb jelet adnak megnövelve így a specifikus kimutatást.

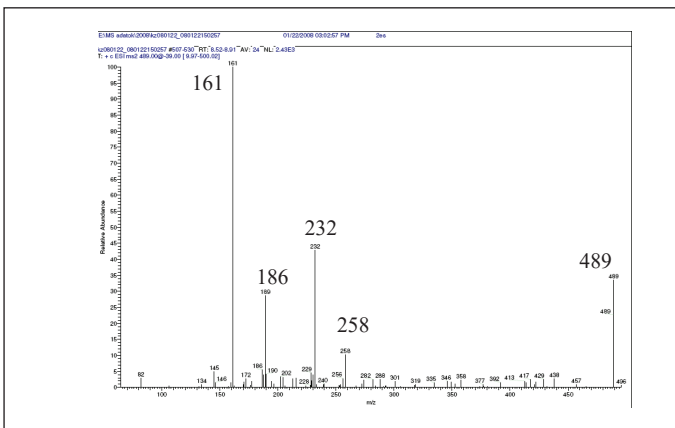
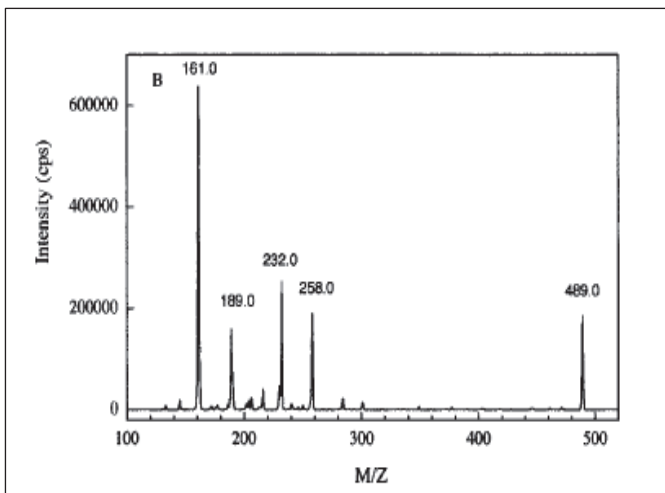
6.1.3.2 Derivatizált uracil kvantitatív analízise

Ez az eljárás az előző módszer, a HPLC-vel összekötött MS továbbfejlesztése. A méréseket a Kémiai Kutatóközpontban Dr. Szabó Pállal végeztem kollaborációban. A preparált genomi DNS-eket először ez esetben is UDG-vel kezeltem majd a felszabaduló uracilt 4-brommetil-7-metoxikumarinnal (BrMMK) reagáltattam.



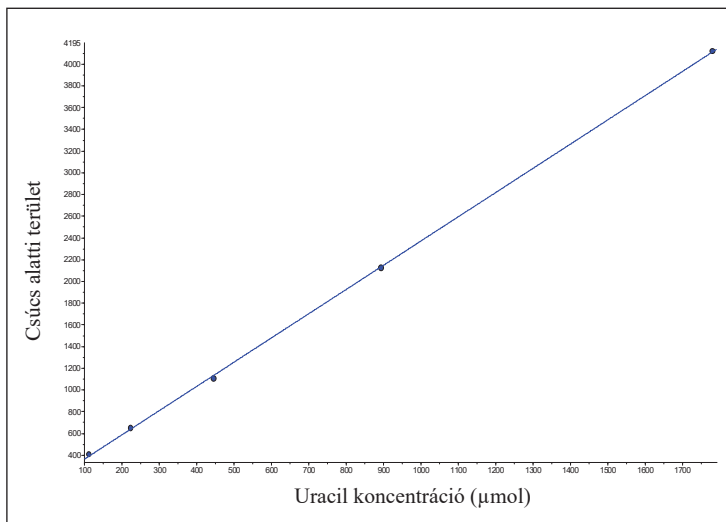
20. ábra: Uracil derivatizálása 4-brommetil-7-metoxikumarinnal és a derivátumból képződő fragmentionok.

A derivatizálószer az uracil gyűrű nitrogénjaival lép reakcióba és létrejön a 4-metilén-7-metoxikumaril-uracil (20. ábra). A 489 m/z -ű derivátum négy ionterméket hoz létre, melyek 161, 189, 232, 258 m/z -űek (20-21. ábra). A mérések során a 232 m/z -ű iont követtem, mivel ez adott szelektív és megfelelően nagy jelet. Ezzel a beiktatott reakcióval kiküszöböltem az előző módszernél fellépő, a citozin esetleges fragmentionjaitól származó zavaró jelet.



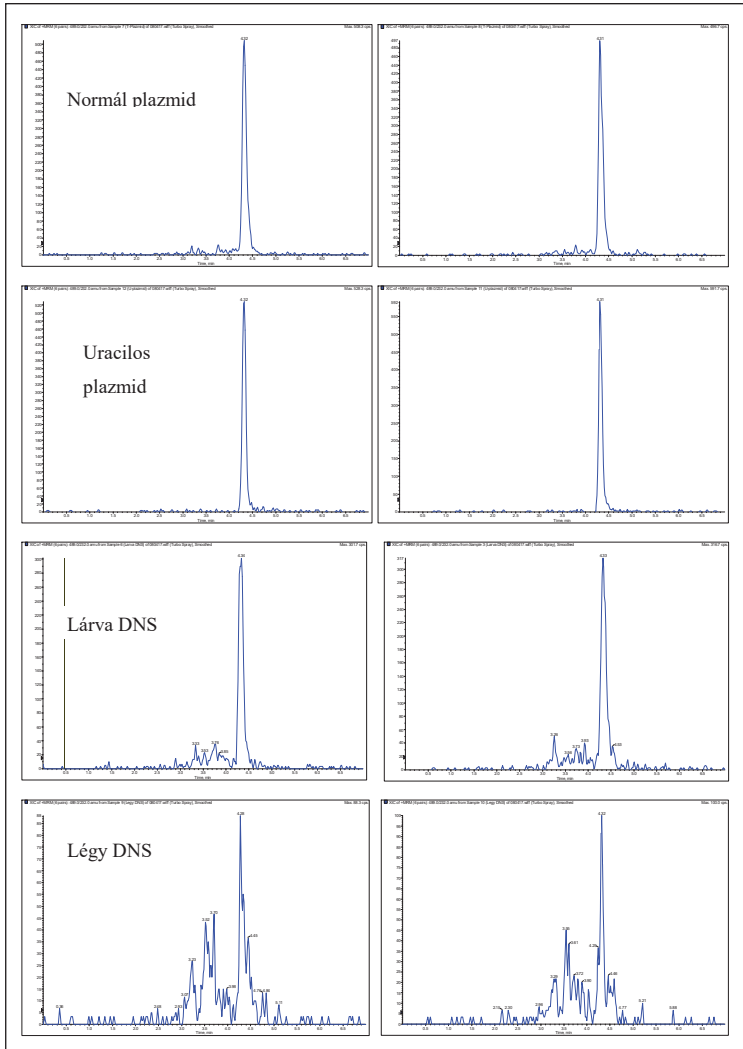
21. ábra: A keletkezett fragmentionok teljes spektruma az irodalmi adatok (fent) és az általunk mért tömegspektrum (lent).

A kalibráló egyenest a szabad uracilokkal is elvégzett derivatizálás után vettem fel, ahol a 232 m/z-ű terméktől származó csúcs területét használtam fel (22. ábra). Sikertült a hígítási sorral olyan nagy tartományt lefedni, hogy a lényegesen több uracilt tartalmazó uracil-plazmid és a lárva mintákból származó jelek a mérési tartományon belül voltak.



22. ábra: A felvett kalibrációs egyenes derivatizált uracil standarddal.

Ezután a teljes procedúrát elvégeztem légy és lárva genomi DNS-sel illetve kontrollként normál és uracilos-plazmiddal is (23. ábra).



23. ábra: A kontrol plazmidok (normál és uracilos plazmid), a lárva és a légy minták 232 m/z-ű fragmencionjainak tömegspektruma (két párhuzamos mérés).

A kalibrációs egyenes egyenlete és a kiindulási DNS mennyiség alapján visszakövetkeztettem a kontrol és a *Drosophila* minták uracil tartalmára melyet az 1. Táblázatban foglaltam össze. A normál plazmidban egyáltalán nem vártam kimutatható uracil mennyiséget, míg az uracilos plazmid esetén az irodalmi adatokhoz képest több nagyságrendbeli eltérést detektáltam. Ennek fényében feltehetően a lárva és légy DNS-ben mért uracil mennyiség sem a valós mennyiséget tükrözi.

	Normál – plazmid	Uracilos- plazmid	Lárva DNS	Légy DNS
	(Uracil/ millió bp)	(Uracil/ millió bp)	(Uracil/ millió bp)	(Uracil/ millió bp)
1.mérés	1883	248 175	432	126
2.mérés	1830	240 875	436	140
Irodalmi adatok	-	3 -8 000	-	-

1. táblázat: A kontrol plazmidok (normál és uracilos plazmid), a lárva és a légy DNS uracil tartalma egymillió nukleotidra vonatkoztatva.

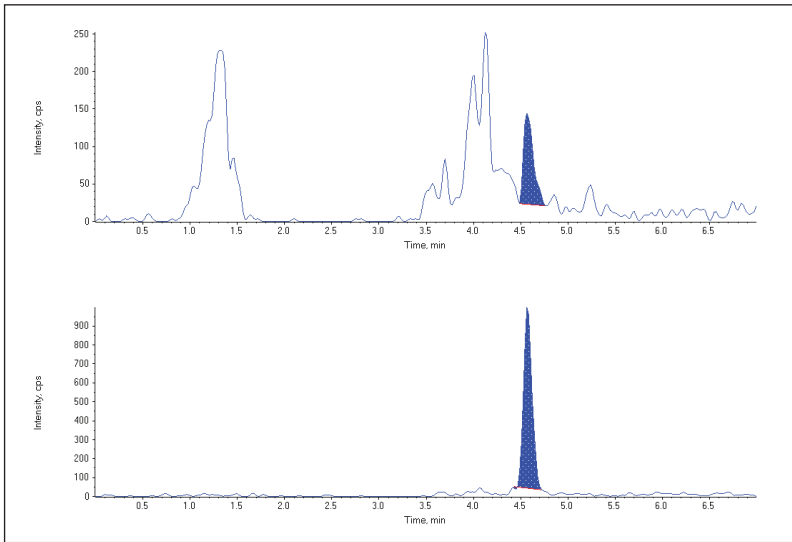
A továbbiakban pozitív kontrollként BL21lung- *E.coli* sejtekből preparált DNS-t próbáltam használni. Ezekben a mintákban nem sikerült uracilt kimutatnom, ami az elvárt és az irodalmi adatoknak is ellentmondott.

Negatív kontrollként humán HeLa sejtek genomi DNS-ét használtam, melyben nem detektáltam uracilt, ahogy ezt vártam.

Ezen a ponton azonban el kellett döntenem, hogy a mintaelőkészítés, azaz a derivatizálás nem tökéletes vagy esetleg a HPLC-s elválasztás illetve a mérés nem működik megfelelően.

A következő mérésorozatnál ezért a lárva DNS-hez UDG reakciót követően ismert mennyiségű tiszta uracilt adtam, majd együtt derivatizáltam őket. A 24. ábrán jól látható, hogy a lárva minta spektrumának területe a hozzáadott uracil hatására jelentősen növekedett.

A tömegspektrumból számított uracil mennyiség azonban jóval a hozzáadott uracil mennyiség alatt volt. Valószínű tehát, hogy maga a derivatizálási reakció nem megy végbe teljesen és a derivatizált uracil jelentős részét nem tudjuk detektálni. Ebből még az is következik, hogy a kalibrációs egyenesem sem volt tökéletes, hiszen ahhoz is derivatizált uracil oldat hígítási sorát használtam.



24. ábra: A lárva 232 m/z-ű fragmentionjainak tömegspektruma hozzáadott uracil nélkül és hozzáadott uracillal.

Továbbiakban ezért majd optimalizálnom kell tiszta uracilra a derivatizálási reakciót, hogy a kalibrációs egyenesem megfelelő legyen, hiszen ez alapján következtek a kontrol és a *Drosophila* minták uracil tartalmára. Majd újra el kell végeznem az eddigi méréseket az optimalizált derivatizálással előkészített mintákon.

A kvalitatív analízisek azt bizonyítják, hogy ténylegesen felhalmozódik az uracil a lárvális szövetek DNS-ében, bár a két módszerrel nyert mennyiségi adatok ellentmondóak egymásnak. Ezért nagyon fontos egy megbízható kvantitatív módszer kidolgozása, mely információt adhat arról, hogy a minor UDG-k milyen mértékben helyettesíthetik a fő UNG-ot ecetmuslicában és más teljes átalakulással fejlődő rovarokban. A HPLC/MS módszer mellett a laborban folyamatban van egy valós idejű PCR alapú uracil kimutatási eljárás is, mely úgy tűnik, gyorsabban eredményre vezet a genomi DNS uracil tartalmának mennyiségi meghatározásában.

6.2. Uracil-DNS degradáló faktor szerkezet-funkció vizsgálata

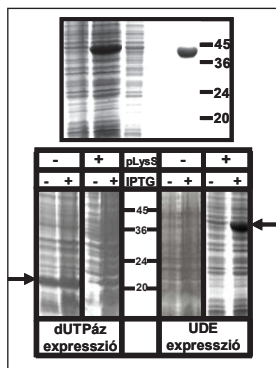
6.2.1. Uracil-DNS degradáló faktor (UDE) izolálása és azonosítása

Deutsch és munkatársai eredményein elindulva csoportunkban Békési Angéla uracil-DNS affinitás kromatográfiával izolálta a *Drosophila melanogaster* metamorfózishoz kötött fejlődési állapotokban kifejeződő nukleáz aktivitásért felelős fehérjét. Deutschék ugyanis késői 3. lárvá extraktban nukleáz aktivitást mutattak ki, majd tovább jellemezték az aktivitást és vizsgálták az aktivitásért felelős fehérje kifejeződését a különböző fejlődési stádiumokban, de magát az enzimet nem azonosították.

A kísérlet során brómciánnal (CNBr) aktivált szefaróz gyantához *E.coli* CJ236 *dut-hung*-sejtekben felszaporított és azokból izolált uracil-DNS-t kötött, majd az így kapott affinitás oszlopra késői 3. lárvá extraktumot töltött. Az oszlopról eluálta az uracil tartalmú DNS-hez specifikusan kikötődött fehérjéket, majd SDS gélen elválasztotta őket. Az így detektált fehérje sávokat tömegspektrometriás azonosításhoz kipreparálta a gélből. A gélen a legnagyobb intenzitású sávban megjelenő, 35,5 kDa látszólagos molekulatömegű fehérje a *Drosophila* adatbázisból a CG18410 gén által kódolt ismeretlen funkciójú fehérje szekvenciájával bizonyult megegyezőnek.

A munkába ezen a ponton kapcsolódtam. A CG18410 gén cDNS-ét pet19b vektorba klónoztuk úgy hogy a majdani rekombináns fehérje az N-terminálisán hat hisztidinből álló címkét (His-tag) tartalmazzon, mely lehetővé teszi a fehérje tisztítását Ni- affinitás oszlopon (25.ábra). Az azonosított fehérjét uracil DNS degradáló faktornak - röviden UDE-nak-, az expressziós vektort pET-HisUDE-nak neveztük el.

A rekombináns UDE termelését *E.coli* bakteriális expressziós rendszerben kívántuk megvalósítani. Az *E.coli* sejtek azonban tartalmaznak endogén UNG-ot, így ha a két fehérjét –UDE és UNG- egyszerre nyerjük ki a sejtekből, akkor az esetleges UNG szennyezés könnyen gátolhatta volna az UDE katalitikus funkciójának független vizsgálatát.



25. ábra: (A) A rekombináns UDE fehérje expressziója és tisztítása. 1.sáv: *E.coli* sejtextinkt indukción elótt, 2.sáv: *E.coli* sejt extractt indukción után, 3.sáv: Ni-NTA oszlop áteső frakciója, 4.sáv: üres , 5. sáv: tisztított UDE fehérje. **(B)** dUTPáz enzim és UDE expressziója BI21 (DE3) ung-151 és BL21(DE3)ung-151pLysS *E.coli* sejtekben. A dUTPáz enzim pLysS plazmid jelenlétében és anélkül is termelődik, míg az UDE csak pLysS plazmid jelenlétében fejeződik ki.

Az UDE-t ezért *E.coli* (DE3) BL21ung-151 sejtekben termeltem pLysS plazmid szigorú kontrolja mellett (25.ábra). Az UDE expressziója ugyanis az *E.coli* sejtekre toxikus hatásúnak bizonyult. Ez azzal magyarázható, hogy a baktériumok DNS-ének uracil tartalma UNG aktivitás hiányában feldúsult, mely a sejtek genomális DNS-nek degradációját okozhatta az UDE termelődésével. A pLysS plazmid azonban a fehérje expresszióját kizárólag az indukálást követő periódusra korlátozta. Ezzel igyekeztem biztosítani, hogy a fehérje további karakterizálása során megfigyelt UDE katalitikus funkciója nem az UNG szennyeződésnek köszönhető.

6.2.2. Egy új uracil-DNS-re specifikus fehérje család első tagja

Az UDE fehérje *in silico* elemzését, azaz részletes homológiakeresést különböző genomadatbázisokban, az NCBI honlapján elérhető blast programmal végeztük. Az analízis során csak teljes átalakulással fejlődő rovarok genomjában találtunk homológ szekvenciákat, melyek szintén ismeretlen funkcióval bíró, idáig még nem karakterizált fehérjéket kódolnak.

Az UDE-val feltételezhetően azonos funkciót betöltő fehérjék szerkezetéről sem találtunk publikált adatot. A homológ szekvenciák összerendezésével öt konzervált motívum rajzolódott ki, melyek közül az első kettő kiterjedtebb és általában két kópiában van jelen (26. ábra, 1A, 1B motívumok). Ez alól kivételt képez a *Tribolium castaneumban* talált UDE homológ, melynek N-terminális végéről hiányzik a duplikált első motívum 1A kópiája (26. ábra).

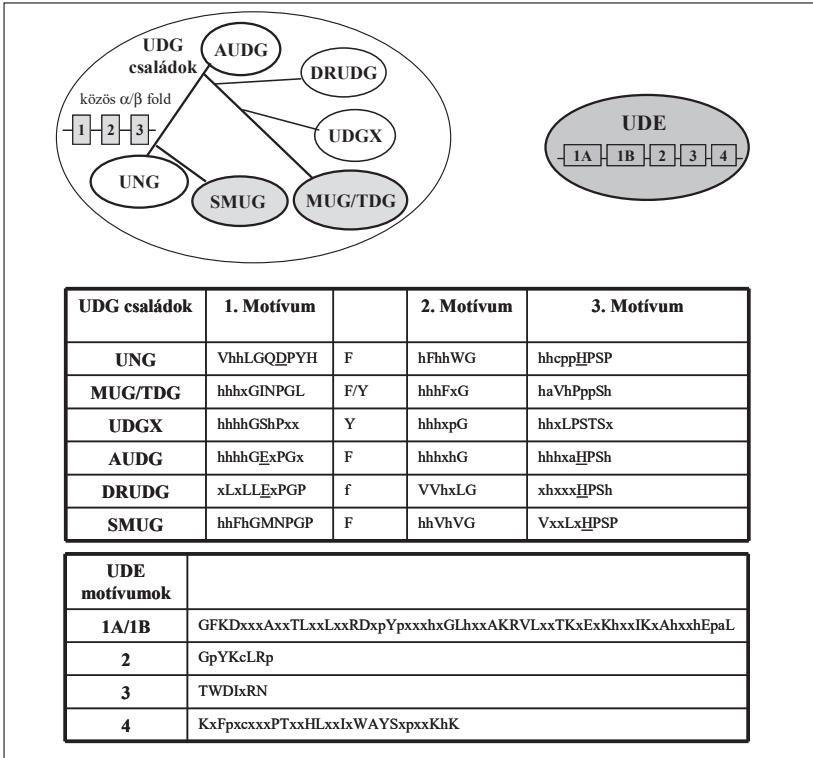
A már azonosított konzervált motívumokat használva a homológiakereséshez, az UDE nem mutatott rokonságot az eddig leírt nukleázokkal és uracil DNS-t felismerő fehérjékkel. Ezt bizonyítja a 27. ábrán bemutatott és korábban már részletesen ismertetett UDG családokra és az UDE-ra jellemző konzervált motívumok összevetése is. Az UDG családok mindegyikére ugyan azonos α/β fold jellemző, de a katalízisükben fontos szerepet játszó konzervált motívumaik meglepően alacsony szintű hasonlóságot mutatnak [45]. Az UDG-k három és az UDE öt konzervált régiójának konszenzus szekvenciái nem feleltethetők meg egymásnak, így ebből nem jutottam információhoz az UDE szerkezetét és funkcióját illetően. Ez is azt sugallja, hogy az UDE fehérje vizsgálatával újfajta betekintést nyerhetünk a nukleázok fiziológiai szerepét és katalitikus mechanizmusát illetően.

A fehérje elsődleges fizikai és kémiai paramétereit a ProtParam program segítségével értékeltem ki és azt kaptam, hogy 355 aminosavból áll, látszólagos molekulatömege 39,895 kDa. A fehérje aminosav összetétele alapján prediktált izoelektromos pontja ($pI=9,41$) viszonylag magas. A bázikus oldalláncú aminosavak túlsúlya is arra utal, hogy a fehérje feltehetően nagy potenciállal kötődik negatív töltésű makromolekulákhoz -, mint például a DNS- elektrosztatikus kölcsönhatások révén.

A PSORTII szoftverrel két különböző feltételezett nukleáris lokalizációs szignált (NLS) is azonosítottunk a fehérje C-terminális nem konzervált régiójában [111]. Az egyik szakasz (PEKRRKQE) egyaránt tartalmaz pozitív és negatív töltésű oldalláncokat is, míg a másikat (PKRKKKR) nagyrészt bázikus aminosavak alkotják. A Merényi Gábor által irányított mutagenézissel létrehozott pontmutáns és a csonkított UDE fehérjékből generált YFP-riporter konstrukttokkal végzett kísérletekből kiderült, hogy a rovar sejtekben a nukleáris lokalizációért csak a szinte kizárólag pozitív töltésű oldalláncokat tartalmazó szakasz (PKRKKKR) a felelős. Ez a szegmens megegyezik a már jól ismert SV40 T-antigén NLS-vel. Mindez azt demonstrálja, hogy az UDE specifikusan és kizárólag a magban lokalizálódik összhangban a rovar sejtekben feltételezett nukleáris funkciójával.

40. meI.	---GOSKFFQDMEKALETIKLLESHMOFKLITVRLGLGAAKAVITLWABEILKNIKEALINAGVFEIERNENGASKNANT--ESEDKVE---TVFGLGFOKAAEAIAISLIA150
D. psc.	1 MSE---GSEKFFQDMEKALETIKLLESHMOFKLITVRLGLGAAKAVITLWABEILKNIKEALINAGVFEIERNENGASKNANT--DQDDKVE---TVFGLGFOKAAEAIAISLIA111
D. vir.	121 MSE---GSEKFFQDMEKALETIKLLESHMOFKLITVRLGLGAAKAVITLWABEILKNIKEALINAGVFEIERNENGASKNANT--DNEDKVE---TVFGLGFOKAAEAIAISLIA111
A. aeg.	1 MSK---EESKFFQDKAAEESIKLLESHMOFKLITVRLGLGAAKAVITLWABEILKNIKEALINAGVFEIERNENGASKNANT--EEDDKVE---TVFGLGFOKAAEAIAISLIA231
A. gam.	1 MSK---EESKFFQDKAAEESIKLLESHMOFKLITVRLGLGAAKAVITLWABEILKNIKEALINAGVFEIERNENGASKNANT--EEDDKVE---TVFGLGFOKAAEAIAISLIA111
C. pip.	1 MSK---EESKFFQDKAAEESIKLLESHMOFKLITVRLGLGAAKAVITLWABEILKNIKEALINAGVFEIERNENGASKNANT--EEDDKVE---TVFGLGFOKAAEAIAISLIA112
A. mel.	1 MSK---PEESYWFQDKALITKALDROISIQVHVASFSAKATQITDEBEILKNIKEALINAGVFEIERNENGASKNANT--EEDDKVE---TVFGLGFOKAAEAIAISLIA119
B. mor.	49 MKDKDDETFQDKALITKALDROISIQVHVASFSAKATQITDEBEILKNIKEALINAGVFEIERNENGASKNANT--EEDDKVE---TVFGLGFOKAAEAIAISLIA161
T. cas.	---MSEKFD---TVFGLGFOKAAEAIAISLIA28
D. mel.	EDDDQRLAKLIGLSSKVLGSKNEEDKITAIKESVOVLEDFEIKFPAENNIKIDORAVLPLAVYKLPF---DFOELAKEFLIAGGSKAKKYNVHLLTDFPKDSTKIDSHDVEN264
D. ana.	EDDDQRLAKLIGLSSKVLGSKNEEDINAKEGVOVLEDFEIKFPAENNIKIDORAVLPLAVYKLPF---EFOELAKSFLIAGGPKAKKYNVHLLTDFPKDSTKIDSHDVEN225
D. psc.	EDDDQRLAKLIGLSSKVLGSKNEEDISAKEGVOVLEDFEIKFPAENNIKIDORAVLPLAVYKLPF---EFOELAKSFLIAGGPKAKKYNVHLLTDFPKDSTKIDSHDVEN225
D. vir.	EDDPEQLAKLIGLSSKVLGSKNEEDISAKEGVOVLEDFEIKFPAENNIKIDORAVLPLAVYKLPF---EFOELAKSFLIAGGPKAKKYNVHLLTDFPKDSTKIDSHDVEN344
A. aeg.	GDUPDQLAKLIGLSSKAVLPSKNEEDIKSKEMATEFDIFETFORSEESQWAVLISLQIKMLSS---DFEODALAAEFVFCY-DKVAKNVHLLTDFPKDSTKIDSHDVEN225
A. gam.	GDUPDQLAKLIGLSSKAVLPSKNEEDIDAKAVALDFEJFETFORSEESQWAVLISLQIKMLSS---DQEQSDKLAIAFLIACY-ETQAKKNVHLLTDFPKDSTKIDSHDVEN229
C. pip.	GDUPDQLAKLIGLSSKAVLPSKNEEDIDAKAVALDFEJFETFORSEESQWAVLISLQIKMLSS---VSRFSEALAAEFVFCY-AKVAKNVHLLTDFPKDSTKIDSHDVEN229
A. mel.	GDUPDQLAKLIGLSSKAVLPSKNEEDIDUKAVFEMWITDFKONGRANEDFHLISVLRSEIYF---LADKTKEDINGPHIAY---SEVODUKKUNLVQVFPD--SSTIWOIENR237
B. mor.	GDUPDQLAKLIGLSSKAVLPSKNEEDIDUKAVFEMWITDFKONGRANEDFHLISVLRSEIYF---LADKTKEDINGPHIAY---SEVODUKKUNLVQVFPD--SSTIWOIENR237
T. cas.	GDUPDQLAKLIGLSSKAVLPSKNEEDIDUKAVFEMWITDFKONGRANEDFHLISVLRSEIYF---LADKTKEDINGPHIAY---SEVODUKKUNLVQVFPD--SSTIWOIENR237
D. mel.	ROLESKLEIQIKSEAKLIFDAET---GANFTDILQLIHLHVAISFPQPKLQVTEKLAJKTPEKPKQSSSSASDSSATSQDS---DGENK-PKPKKKREB--355
D. ana.	ROJAKLLEKIKSEAKLIFDPES---GANFTDILQLIHLHVAISFPQPKLQVTEKLAJKTPEKPKQSSSSASDSSASDSSKGS---DEEDV-PKPKKKTEB--316
D. psc.	ROJAKLLEKIKSEAKLIFDPES---GANFTDILQLIHLHVAISFPQPKLQVTEKLAJKTPEKPKQSSSSASDSSASDSSKGS---DEEDV-PKPKKKTEB--316
D. vir.	ROJAKLLEKIKSEAKLIFDPKET---GANSEIHLQLIHLHVAISFPQPKLQVTEKLAJKTPEKPKQSSSSASDSSADNSENDBE--SDENSVPKPKKK--E---436
A. aeg.	KLJKLKVYKONGSKLIFPSD---GPTKIVLEMIYVAISFVOKLQVATKIKSSS---AKKRSHSSS---EEDSEB--EDEDVYKPKKKK--306
A. gam.	KLJKLKVYKONGSKLIFPSD---GPTKIVLEMIYVAISFVOKLQVATKIKSSS---AKKRSHSSS---EEDSEB--EDEDVYKPKKKK--315
C. pip.	KLJKLKVYKONGSKLIFPSD---GPTKIVLEMIYVAISFVOKLQVATKIKSSS---AKKRSHSSS---EEDSEB--EDEDVYKPKKKK--315
A. mel.	KILJONVYKVEOK-KVFTLITGEBEDLITGELHCTHVAISHDAAKELGLPTLAKLKS---EEDSEB--EDEDVYKPKKKK--292
B. mor.	NALJKLKVATV-HAAKLPNEE---GPTKIVLEMIYVAISFVOKLQVATKIKSSS---AKKRSHSSS---EEDSEB--EDEDVYKPKKKK--292
T. cas.	TELKLLKLEIDKPKDWKDD---LPTAEILKLLIHLHVAISFPDASKLNSVAFEEKLGSQSSKEDEKSNKKGSGKAS---EESPTKPKKSID---234

26. ábra: A teljes átalakulással fejlődő rovarok genomjában talált homológ fehérjékés az UDE szekvenciáimuk összehasonlítása. Szürke háttér jelzi a konzervált motívumokat, pirossal pedig a szigorúan konzervált aminosavakat jelöltem. A feltüntetett fajok: *D.mel.*: *Drosophila melanogaster*, *D.ana.*: *Drosophila ananassae*, *D.psc.*: *Drosophila pseudoobscura*, *D.vir.*: *Drosophila virilis*, *A.aeg.*: *Aedes aegypti*, *A.gam.*: *Anopheles gambiae*, *C.pip.*: *Culex pipiens*, *A.mel.*: *Apis mellifera*, *B.mor.*: *Bombyx mori*, *T.cas.*: *Tribolium castaneum*.



27. ábra: Az UDE és az UDG szuperfamilia tagjainak konzervált motívumai. A felső panelek az UDG családok közötti evolúciós kapcsolatot, valamint az UDG-ban és az UDE-ban azonosított konzervált motívumokat ábrázolja. A *Drosophila melanogaster* genomja által kódolt uracil- DNS-t felismerő fehérjék szürke háttérrel jellettek. Az alsó panelek az UDG és az UDE konzervált motívumainak konszenzus szekvenciáit mutatják. Nagy betűk jelzik a konzervált aminosavakat, a kisbetűk az aminosavak jellemzőit (h: hidrofób; a: aromás; p: poláris/töltéssel rendelkező). A nem konzervált helyeket x jelöli. Az uracil gyűrűvel átlapoló konzervált F/Y aminosavak az UDG-k C-terminális végétől kezdve az 1. motívumig helyezkedhetnek el. Az UDG családok 1. motívumában elhelyezkedő aláhúzott D/E aminosavak a katalízisben játszanak szerepet, míg a 3. motívumban található aláhúzott H-ek az UDG-k katalitikus reakciójának köztitermékét stabilizálják.

6.2.3. Az UDE szerkezetének vizsgálata

6.2.3.1 Domén organizációs analízis limitált proteolízissel

Miután az UDE szekvencia *in silico* elemzése során kiderült, hogy az enzim nem mutat hasonlóságot egyetlen ismert szerkezetű fehérjével sem, így nem is sikerült azonosítanom ismert DNS kötő motívumokat illetve a konzervált régiókon belül uracil DNS-t processzáló fehérjékre jellemző katalitikus helyeket, ezért megkezdtem a fehérje kezdeti domén szerkezetének felderítését limitált proteolízissel. Három eltérő specificitással rendelkező proteázt (tripszin, kimotripszin, Asp-N endoproteináz) alkalmaztam a lehetséges funkcionális domének azonosítására. A kísérleteket hozzáadott uracil tartalmú DNS jelenlétében is elvégeztem az esetleges DNS-kötő szegmentek tanulmányozása érdekében.

Elsőként a tripszint választottam, mivel az UDE számos triptikus hasító hellyel rendelkezik a szekvenciája mentén. A nem konzervált, ugyanakkor lizinben és argininben gazdag N – és C-terminális végeken kezdeti gyors degradációt figyeltem meg, amely 5-7 kDa-os fragmensek elvesztését eredményezte (28. A ábra). Az emésztés során detektált hasítási termékek nagy száma szinte lehetetlenné tette mindegyikük izolálását az SDS gélből és tömegspektrometriás analízisét. Sikertült mégis azonosítanom egy a DNS jelenlétében stabil fragmenst (csillag jelöli), mely DNS hiányában több kisebb darabra degradálódott (nyilakkal jelölve). Feltehetően ez a fragmens a fehérje szerkezetének egy belső jól feltekert, aktív magját alkotja, mely a DNS kötésben vesz részt.

További specifikus illetve DNS-kötő szegmensek lokalizálása céljából a jelentősen kevesebb potenciális hasító hellyel rendelkező nagy specificitású kimotripszinnel és aszparagin-N endoproteinázzal is elvégeztem a kísérletet (28. B és C ábra). Mindkét esetben egyértelmű védelmet nyújtott az UDE számára a hozzáadott DNS megkötése a proteolízissel szemben.

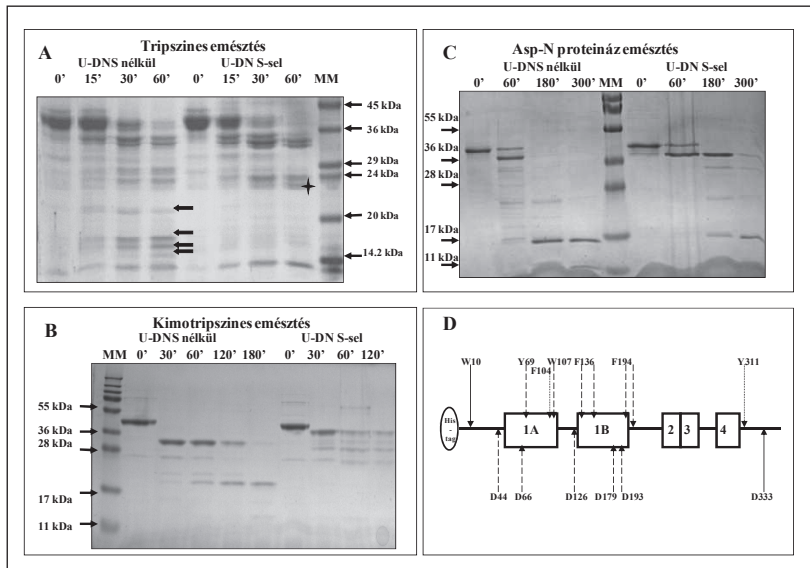
A kimotripszin esetében a tömegspektrometriás analízis eredményeként azt kaptam, hogy a kezdeti degradáció során egy 9.6 kDa nagyságú szegmens távozik, míg DNS jelenlétében egy kisebb 3 kDa körüli fragmens hasítódik le. Részletesebb vizsgálódás után azt találtam, hogy az UDE N-terminális végén a flexibilis régióban elhelyezkedő W10 és az 1A motívum Y69 – ja a DNS jelenlététől függetlenül mindig kitett a proteolitikus hasításnak, míg a DNS-kötés jelentős védelmet nyújtott a konzervált 1A motívumban található Y69 és R70 peptidkötés számára. DNS- kötés hatására létrejövő konformációs változások kialakulását támasztják alá a DNS jelenlétében exponálttá váló F104 és E105 valamint W311 és I312 peptidkötések.

A C-terminális régió DNS-kötésben betöltött szerepének tanulmányozására további specifikus proteázt alkalmaztam. A kísérletben aszparagin endoproteinázt használtam, mivel az UDE C-

terminális része aszparaginban meglehetősen gazdag. Ez esetben azt állapítottam meg, hogy az emésztés során elsőként egy 3.4 kDa nagyságú fragmens távozik a fehérje C-terminális végéről (D333), melyet a DNS megkötése sem akadályoz meg. Ezen kívül 23-25 kDa körüli és 17 kDa látszólagos molekulatömegű polipeptidek is megjelentek az SDS gélen, melyeket DNS jelenlétében nem detektáltam.

A limitált proteolízis során tömegspektrometria segítségével azonosított hasító helyeket a 28. D ábrán összesítettem. A kísérletekből konklúzióként levontam, hogy a 2-3-4 motívumokat magába foglaló fehérje szegmens egy jól feltekert, kompakt részét alkotja az UDE-nak, hiszen még DNS jelenléte nélkül sem sikerült ebben a régióban egyetlen proteolitikus helyet sem kimutatnom, annak ellenére, hogy a proteázok számos potenciális hasító hellyel rendelkeznek ezekben a C-terminális motívumokban is. Az 1A és 1B motívumok sokkal nagyobb mértékben hozzáférhetőnek bizonyultak a proteázok számára, különösen hozzáadott DNS hiányában.

A DNS kötés tehát jelentős védelmet biztosított a proteolitikus vágással szemben a konzervált 1A és 1B motívumok mentén vagy a DNS kötés indukálta konformációs változások vagy az egyébként exponált hasító helyek elfedésével.



28. ábra: UDE domén analízise limitált proteolízissel. **A:** Tripszines emésztés mintázata: Nyílak a DNS hiányában képződött fragmenseket, a csillag a DNS jelenlétében keletkezett stabil fragmenst jelzi. **B és C:** A nagy specificitású kimotripsines és aszparagin-N endoproteináz emésztés mintázatai. A limitált emésztés időskálája valamint a hozzáadott Uracil-DNS jelenléte illetve hiánya a gél tetején található. MM a látszólagos molekulatömeg markert jelöli. **D:** Az MS-sel azonosított hasító helyek összefoglalása: Felső sorban a kimotripszin, alsó sorban az Asp-N endoproteináz hasító helyek láthatók. Normál nyílak a DNS jelenlétében és távollétében egyaránt megfigyelhető hasító helyeket, a szaggatott nyílak a DNS kötés által védett, a pontozott vonalú nyílak a DNS jelenlétében kitétté vált hasító helyeket mutatják.

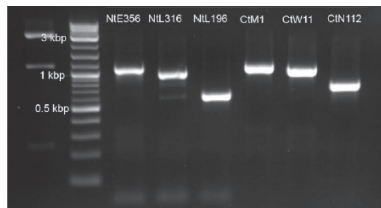
6.2.3.2 Fehérje domének azonosítása ESPRIT módszerrel

A limitált proteolízis kísérletekből származó eredmények arra utalnak, hogy az UDE multidoménnel szerkezettel rendelkezik. A domének elkülönített vizsgálatának legegyszerűbb módja a PCR alapú klónozással rövidebb, csonkított fehérje fragmensek előállítására és karakterizálására. Az eljárás hátránya, hogy a domén határok pontos predikciója szükséges a PCR reakcióhoz használatos primerek tervezéséhez. Mivel az UDE-nak csak más teljes átalakulással fejlődő rovarok genomjában találtunk eddig ismeretlen szerkezettel és funkcióval bíró homológjait, nyilvánvalóan a szekvencia összerendezéssel kapott öt konzervált motívum nem határozza meg a lehetséges fehérje domének pontos határát. Ez egy gyakori akadály új célfehérjék esetén és nagyban gátolja a fehérje szerkezeti és funkcionális vizsgálatát, mert hosszadalmas klónozási és expressziós kísérletek sorozatát kell végrehajtani mire jól feltekeredett, nagy mennyiségben termelhető, oldható fehérjét vagy fehérje fragmenst kapunk [112].

A random mutáció alapuló stratégiák közül, amely a legközelebb áll a hagyományos genetikai konstruktok létrehozásakor alkalmazott eljáráshoz, az egyik az exonukleáz III degradáció alapuló ESPRIT módszer. Az ESPRIT-et (Expression of Soluble Proteins by Random Incremental Truncation), mely egy új DNS könyvtár-alapú nagy hatékonyságú technika, az EMBL-ben (European Molecular Biology Laboratory) fejlesztették ki expresszálnak domének rövid időintervallum alatti azonosítása céljából [107]. A módszer segítségével több tízezer random UDE konstruktot generáltam, és automatizált, robotok vezérelte eszközökkel *E.coli* rendszerben jól expresszálnak oldható doméneket és multidoménnel fehérje fragmenseket azonosítottam.

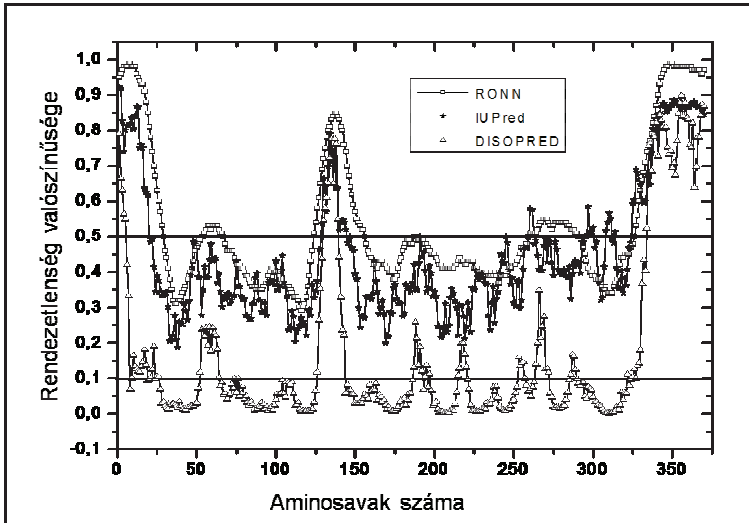
A klasszikus "feltételezésen-alapuló", azaz a szekvencia szerint potenciális doménnek ítélt szegmensek klónozásához képest az ESPRIT előnyei, hogy egyrészt ebben az esetben az összes konstruktot egyetlen, néhány hétig tartó kísérletben létrehozhatjuk, megtakarítva ezzel a klónozások és expressziók ismétlésére fordított rengeteg időt. Másrészt számos azonos domén fedő csonkított mutáns nyerhetünk, mellyel a kristályosítás esélyét is megnövelhetjük. Az eljárás hatékonyságát már számos virális fehérje esetén bizonyították [110, 113, 114].

	<u>N-term. 1.</u>		<u>N-term. 2.</u>			
1	MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MPSSWRRLRK	ISRILALTGS	RQILTQVLAT	50
51	KGAAMAEGDS	KFGFKDMEKA	LETLKLESH	DMQYRKLTVR	GLLGRAKRVL	100
			<u>N-term. 3.</u>			
101	TMTKAEELK	NINAAIGVFE	KWLEENGGGA	SSKNAKTESE	DKVETVPLGL	150
151	FKDKAAAEAT	LSILAERDPD	YQRLAIKGLI	GSSKRVLSGT	KNEDKITAIK	200
	<u>C-term. 1.</u>					
201	EGVQVLEDFL	EKFEAENRIK	DNRAYLPLAV	VTKLDPKDE	LAKEFLEAYG	250
251	GSKAKGNYKH	LRTMFPKTE	KTSWDIVRNR	QLSKLLEQIK	SEEAKLFDAE	300
			<u>C-term. 2.</u>			
301	TGAPTDLHLQ	LIHWAYSPOP	DKLKQYIEKL	AKKTPEKRKQ	ESSSSASDSS	350
		<u>C-term. 3.</u>				
351	ATSQSDSGED	KPKRKKKREE				



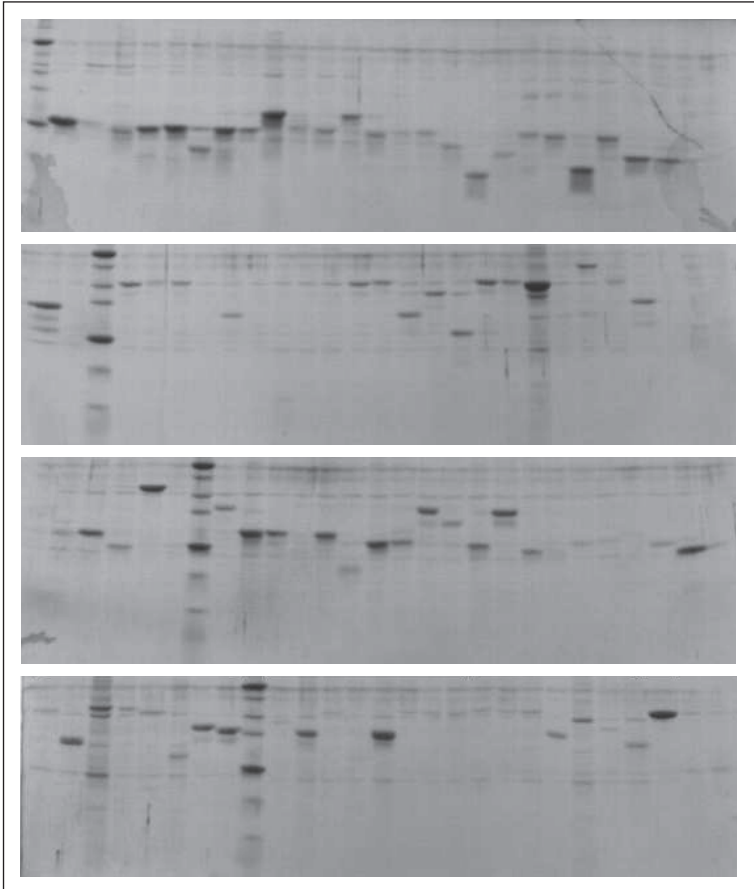
29. ábra: Az exonukleáz emésztéshez tervezett kiindulási pontok elhelyezkedése az UDE szekvenciában (felül). Az ennek megfelelő PCR reakció során felszaporított UDE fragmensek (alul).

Az ESPRIT módszert azért alkalmaztam az UDE esetén, hogy a limitált proteolízis során nyert eredményeken túlmenően további információkat tudjak meg a fehérje domén összetételét és tagoltságát illetően. Az exonukleáz III emésztést hat kiindulási pontból hajtottam végre (29.ábra), ami azt jelenti, hogy hatféle UDE inzertet klónoztam az erre a célra kifejlesztett pTAR010 vektorokba és ezek mindegyikét alávettem a nukleáz reakciónak.



30. ábra: Az UDE rendezetlenségi profilja. Az ábra az aminosav szekvencia függvényében ábrázolja a rendezetlenség valószínűségét. Az analízis során használt szoftverek: RONN, IUPred, DISOPRED [96-98].

A startpontok megtervezésénél figyelembe vettem a fehérje aminosav szekvenciája alapján szerkezeti rendezetlenséget jósló programokkal kapott eredményt is (30.ábra). A szervek mindegyike nagy flexibilitású régiót azonosított az UDE N- és C-terminális végein, valamint az 1A és 1B motívumok között. Így három startpontot terveztem az N-terminális irányú és hármat a C-terminális irányú exonukleáz reakcióhoz. A csonkítás során kapott több tízezer konstruktot expressziós vektorba klónoztam, így létrehoztam egy N-terminális és egy C-terminális könyvtárat. A továbbiakban a konstruktok N-terminális végén elhelyezkedő His-címke és a C-terminális végén található biotin tagot a fehérje expresszió és az oldhatóság tesztelésére használtam. A hisztidin címke a fehérjék Ni-affinitás kromatográfiával történő tisztítását is lehetővé tette (31.ábra). Mind a termelékenység és az oldhatóság vizsgálatát, mind a fehérje tisztítását automatizált, nagy áteresztőképességű műszerekkel végeztem dr. Darren Hart csoportjában.

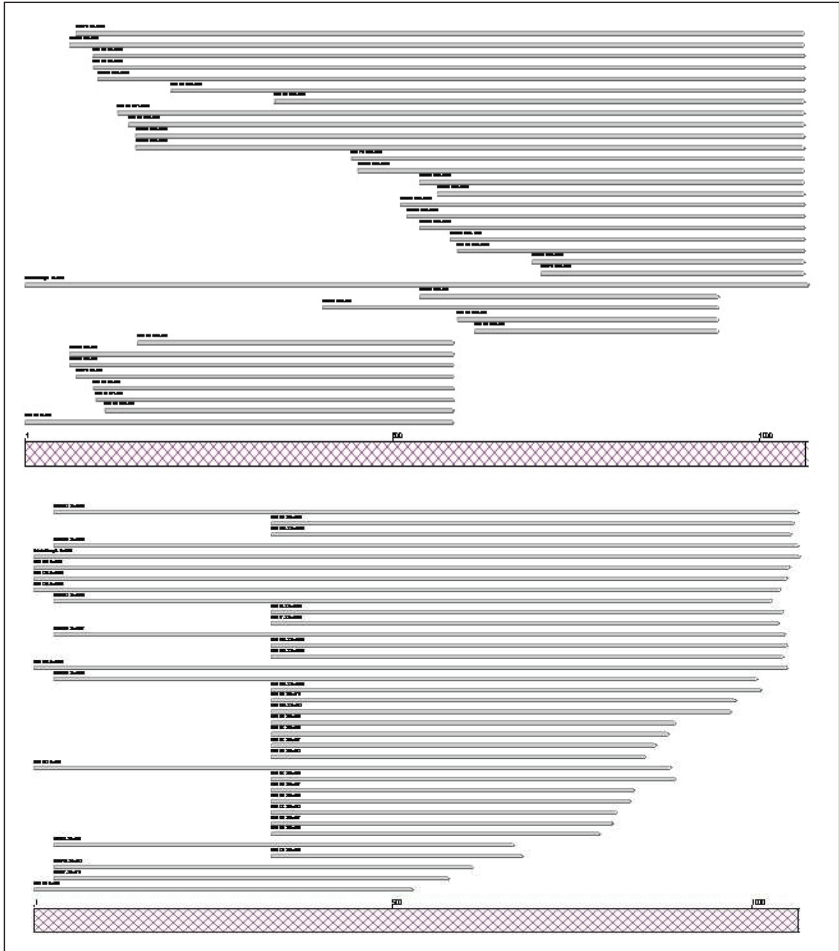


31. ábra: A Ni-affinitás oszlopon tisztított N-terminális (felső kettő) és C-terminális (alsó kettő) könyvtárhoz tartozó fehérje frakciók elválasztása SDS-PAGE gélelektroforézissel.

A nagy mennyiségben expresszálódó és jól oldható SDS gélen detektált fehérje fragmenteket kódoló konstruktokat megszekvenáltattuk, hogy azonosíthassam a létrehozott csonkított UDE konstruktokat (32. ábra).

Az így kapott aminosav szekvenciákat összerendeztem és a 33. ábrán feltüntetett doméneket találtam az expresszió szintjének erőssége és a szekvenciálisan lefedett fehérje szegmensek

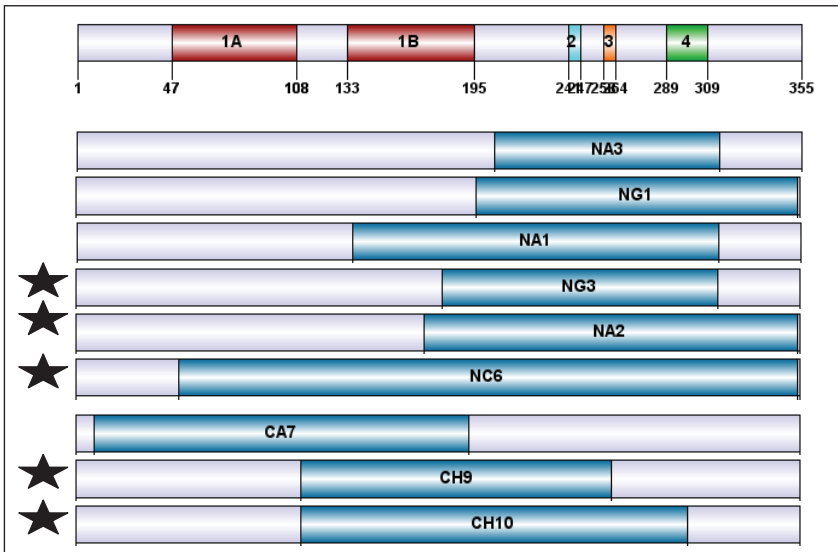
figyelembe vételével a kristályosítás céljára kiválasztott kilenc konstrukt esetén. Fontos megemlíteni, hogy a korábbi homológ szekvenciák összehasonlításakor kijelölt doménhatárokhoz képest öt esetben, még ha csak néhány aminosavnyi eltéréssel is, de új doménhatárokat sikerült azonosítanom.



32. ábra: Az N-terminális (felső) és a C-terminális (alsó) emésztésből származó fehérje fragmenseket kódoló DNS szekvenciák összerendezése.

Jelenleg a kristályosítást megelőzve a nagyobb léptékű (100-500ml) fehérje termelés és tisztítás optimalizálását végzem. Az ESPRIT során ugyanis, amikor az oldhatóságát és termelékenységét teszteltem a csonkított UDE konstruktoknak, elegendőnek bizonyult a kis léptékű (4 ml) fehérje expresszió is. Kilátásba helyeztem a limitált proteolízis kísérletének megismétlését is a csonkított UDE fehérjéken, mert a teljes hosszú enzimmel végzett vizsgálathoz képest valószínűleg új hasító helyeket tudnék azonosítani és esetleg a DNS kötésben résztvevő további szegmenseket is találnék.

A fehérje 3D szerkezetének ismerete, valamint a DNS szubsztrátokon és a fehérje pontmutációival végzett funkcionális vizsgálatok jelentős új információkat eredményeznének az uracil-DNS felismerése és a nukleázok katalízise terén.



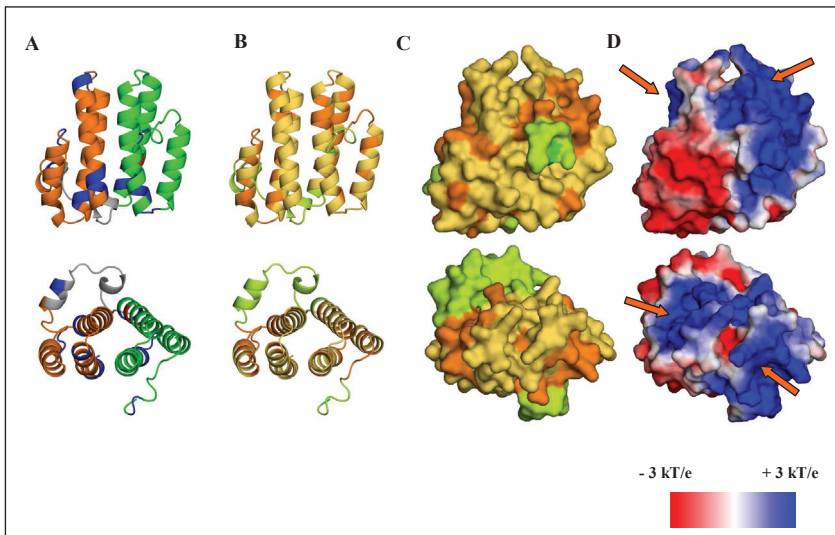
33. ábra: Az N-terminális és C-terminális könyvtárból kiválasztott kilenc UDE konstrukttal lefedett szakaszok, valamint a teljes hosszú fehérje konzervált motívumainak ábrázolása.

A csillaggal jelölt fragmensek esetén új doménhatárokat azonosítottam.

6.2.3.3 Az UDE szerkezeti predikciója és *de novo* modellezése

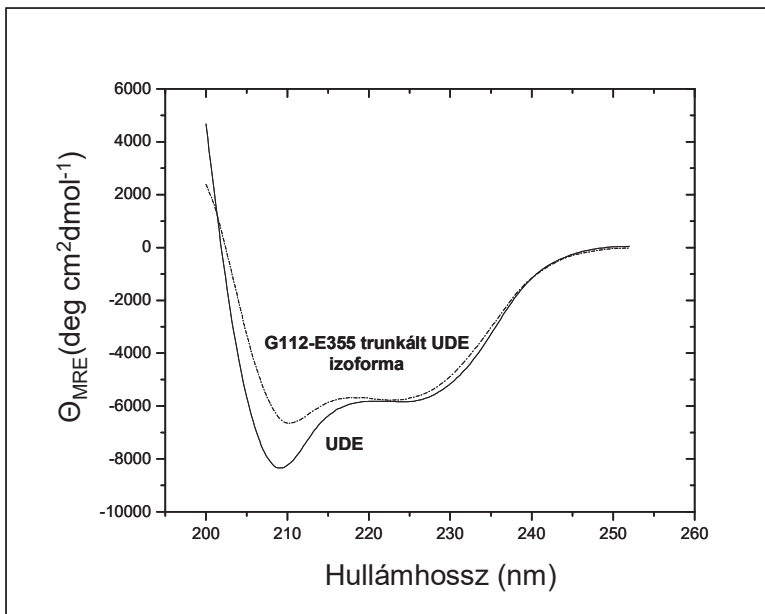
Az UDE számítógépes szerkezeti szimulációját együttműködő partnerünk, J. Bujnicki és J. Kosinski végezték el a GeneSilico Metaserveren [99] azaz a teljes hosszú fehérje szekvenciája alapján, annak másodlagos és harmadlagos szerkezetét próbálták megjósolni. A fehérje domén összetételét illetően azt állapították meg, hogy az UDE három főbb szerkezeti domént tartalmaz az 1A és 1B illetve a C-terminális 2-3-4 –es motívumoknak megfelelően. Mindhárom domént főként alfa-helikális szerkezetűnek jósolták, bár a 3. domén esetén a predikciót bizonytalannak ítélték, ugyanis az alternatív szerverekkel nem kaptak egybevágó eredményt. A fehérje N-terminális végén egy 30 aminosavnyi helikális, flexibilis szegmenst találtak. Az 1A és 1B motívumokat összekötő régiót a C-terminális végen elhelyezkedő 40-50 aminosavból álló szakaszhoz hasonlóan javarészt rendezetlen szerkezetűnek prediktálták.

A fehérje feltekeredésének analízise során nem találtak az UDE-ra ismert feltekeredési mintázatot. Így a negyedleges szerkezet részleges predikciója érdekében elvégezték az 1A és 1B motívumok *de novo* modellezését ROSETTA programmal [115]. A modellezés során összesen kb. 500 000 modellt generáltak, majd a legkisebb energiájú szerkezeteket hasonlóságuk alapján csoportosították és finomították [116, 117]. A legtöbb szerkezetet tartalmazó csoportokat kiértékeltek és ez alapján az 1A és 1B motívumokra azt találták, hogy mindkét fragmenst három alfa hélix alkotja azonos topológiával és relatív orientációval.



34. ábra: Az UDE első két duplikált motívumának szerkezeti modellje. A felső paneleken látható szerkezeteket előlnézetben, az alsó paneleken lévőket felül nézetben ábrázoltam. A 3-3 alfa-hélixből felépülő 1A (zöld) és 1B (narancssárga) motívumok szalagmodelljén a nem konzervált összekötő régiót szürkével, a DNS kötés által védett proteolitikus hasító helyeket késsel jelöltem. A duplikált fragmensek csak megközelítőleg szimmetrikusak mivel a modell alacsony felbontású (A panel). A B és C panel szalagmodelljén illetve a felszíni modellen a szigorúan konzervált aminosavakat narancssárgával, a konzervált szekvenciákat sárgával, a variábilis szegmenseket zölddel jelöltem. A D panelen a felszíni modellen az elektrosztatikus potenciál eloszlást vetítettem. A pozitív töltésű régiók kék színűek, a negatív töltésűek pirosak. Nyilak jelzik a pozitív töltésű konzervált felszíneket, amelyek potenciális DNS kötő helyként szolgálhatnak.

A prediktált másodlagos szerkezeti elemek igazolására CD spektroszkópia méréseket hajtottam végre a teljes hosszú fehérje és egyik csomkított izoformája (nem tartalmazza az 1A motívumot) esetén távoli UV tartományban (190-240 nm). A CD görbéken detektált két lokális minimum, 208 és 222 nm-en, egyértelműen az alfa-helikális karakterisztikára jellemző (35. ábra). A CD spektroszkópiával nyert adatok kvantitatív analízise során a k2d és SELCON programokkal becsült másodlagos szerkezeti elemek aránya a teljes hosszú fehérjében: 37%-ban alfa-helikális és 18-26 %-ban β -szerkezet.



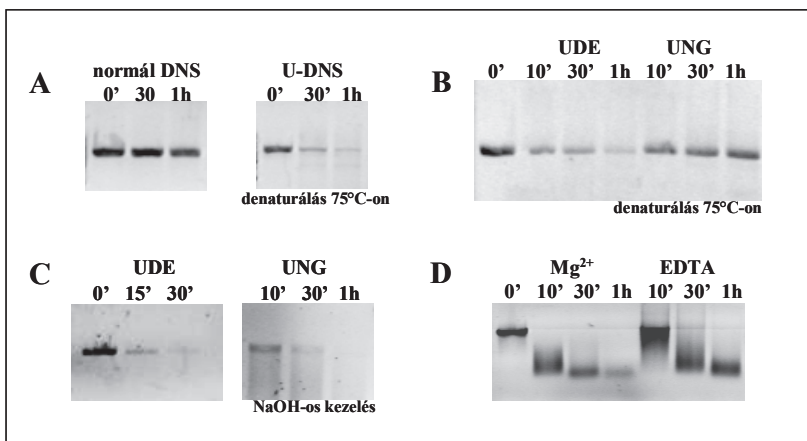
35. ábra: A teljes hosszú UDE és egy csomkított változatának CD spektruma, mely igazolja a fehérje túlnyomórészt alfa-helikális szerkezetét.

6.2.4. A rekombináns UDE funkciójának karakterizálása

6.2.4.1 A fehérje katalitikus aktivitásának jellemzése

6.2.4.1.1 Az enzimaktivitás kezdeti karakterizálása

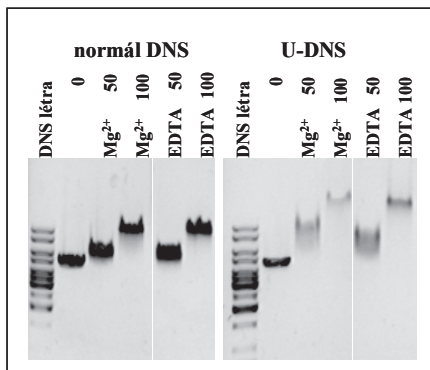
A rekombináns úton előállított fehérje uracil DNS degradáló aktivitását normál és uracil tartalmú plazmid DNS-en vizsgáltam, majd az eredményt agaróz gélen detektáltam. A DNS fogyását csak az uracilt tartalmazó szubsztrát esetén tapasztaltam. Ugyanilyen körülmények között végzett inkubáció során a normál DNS intakt maradt (36. A ábra).



36. ábra: A: A rekombináns UDE DNS degradáló aktivitásának ellenőrzése normál és uracil tartalmú DNS szubsztráton. B, C: Az UDE katalitikus aktivitásának összevetése az UNG katalízissel hődenaturációt illetve alkáli kezelést követően. D: Az UDE aktivitás fémfüggetlenségének bizonyítása. Az UDE 1 mM EDTA jelenlétében is aktív uracilos DNS-en. (Az inkubálási időket a gélek felett tüntettem fel.)

A DNS degradációja csak hő indukálta (75°C-ra hevítés) DNS denaturáció után, azaz a DNS szálak szétválása után vált láthatóvá. Ez arra utal, hogy a fehérje nagy valószínűséggel csak egyesszálon aktív, vagyis csak az egyik DNS szálát hasítja. A kontrollként használt uracil-DNS glikoziláz reakcióban a DNS fragmentáció, ahogy vártam, csak a bázismentes helyek alkáli (NaOH) kezelése után jelent meg agaróz gélen (36. B és C ábra). Az UDE fehérje uracil

DNS-re specifikus aktivitását EDTA jelenlétében is megőrizte, ami azt támasztja alá, hogy katalitikus aktivitásához nem igényli kétértékű fémionok jelenlétét (36.D ábra). A kezdeti kísérletek során az is kiderült, hogy az UDE más uracil DNS-en aktív enzimekhez képest jóval alacsonyabb hatékonyságú, ugyanis meglehetősen hosszú inkubációs időt igényelt, hogy jelentős DNS degradációt detektáljak.



37. ábra: Elektroforetikus mobilitás teszt. Normál és uracilos plazmidot növekvő koncentrációjú (a gélek felett nanogrammban kifejezve) UDE enzimhez adagoltam és a fehérje–DNS komplexeket agaróz gélen detektáltam.

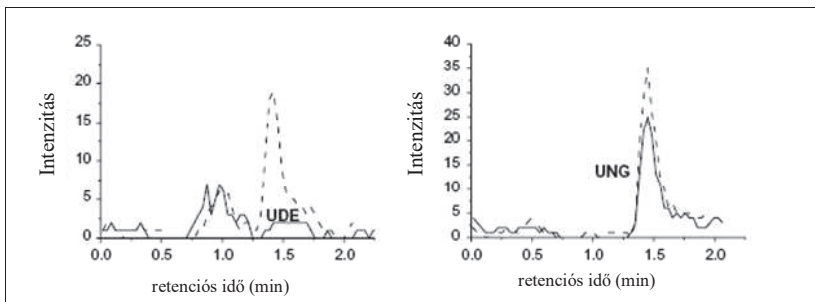
Elektroforetikus mobilitás teszttel az UDE DNS kötő képességét analizáltam emelkedő fehérje koncentráció esetén. Mind a normál, mind az uracil tartalmú plazmid DNS-nél láttam eltolódást, bár a normál plazmid esetén kisebb mértékben (37. ábra). Az uracilos plazmid fogyasztásával az UDE specifikus aktivitása egyértelműen igazolódott.

6.2.4.1.2 Az UDE nem mutat uracil-DNS glikoziláz aktivitást

Az UDE fehérjét a korábban már tárgyalt módon, *E. coli* (DE3) BL21ung-151 sejtekben termeltem a lehetséges UNG szennyezés kiküszöbölése érdekében. Így megtehettem, hogy két egymástól teljesen eltérő módszerrel is összehasonlítsam az UDE és az UNG katalitikus aktivitását.

Először az uracil tartalmú DNS-t az UDE illetve UNG enzimekkel kezelt reakcióból felszabaduló szabad uracilt, azaz az esetleges reakció termékeket HPLC-hez kapcsolts MS

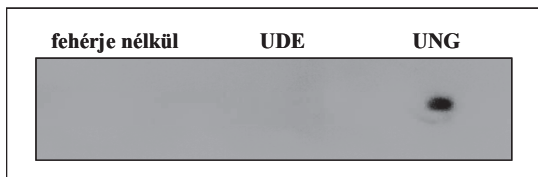
módszerrel próbáltam kimutatni (38.ábra). Az UDE és a szubsztrát DNS inkubációja során nem sikerült uraciltól származó jelet megfigyelni. Azért, hogy ellenőrizhessem az esetlegesen fellépő mátrixhatást, ismert mennyiségű uracilt adtam a plazmid DNS-t és az UDE-t is tartalmazó reakcióelegyhez. Ezt követően megismételtem a mérést és a hozzáadott uracil a várt retenciós időnél (1.4 min) jelent meg, de csökkent intenzitással. Ez arra utal, hogy a mátrix csökkentette ugyan a jel intenzitást, de a mérés érzékenységét nem befolyásolta. Az eredmény tehát azt mutatja, hogy az UDE nem képes uracilt felszabadítani az uracil tartalmú DNS-ből ellentétben az UNG-gal, amely a várt pozitív reakciót mutatta.



38. ábra: A glikoziláz reakcióban felszabaduló uracil kimutatása HPLC-hez kapcsolt MS módszerrel. UDE és U-DNS (bal) valamint UNG és U-DNS (jobb) reakcióelegyek tömegspektruma hozzáadott uracil jelenlétében (szaggatott vonal) és anélkül (folytonos vonal).

Az aldehid reaktív próba (ARP), a már korábbi kísérleteimben is alkalmazott eljárás, a bázismentes helyek kimutatására alkalmas. Ezzel a módszerrel is csak az UNG esetén kaptunk pozitív eredményt (39. ábra). Az UDE nem adott jelet a filmen, mert aktivitása során nem keletkezik abázikus hely, vagyis nemcsak az uracil bázist távolítja el, hanem magát a nukleotidot vagy nukleotidokat is.

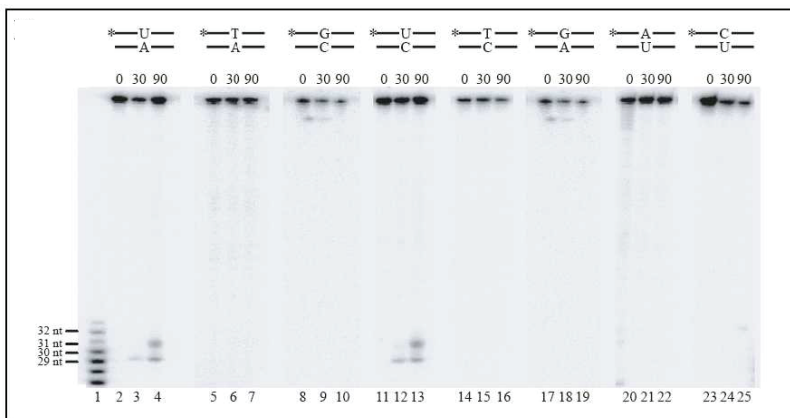
Bebizonyosodott ezzel a két kísérlettel, hogy az UDE nem katalizálja a glikozidos kötés hasítását valamint az is, hogy a tisztított UDE fehérje preparátum nem tartalmaz UNG szennyezést.



39. ábra: Aldehid reaktív próba az abázikus helyek kimutatására. Fehérje nélkül és UDE-val kezelt U-DNS esetén nem detektáltam jelet, míg az UNG reakció pozitív jelet adott.

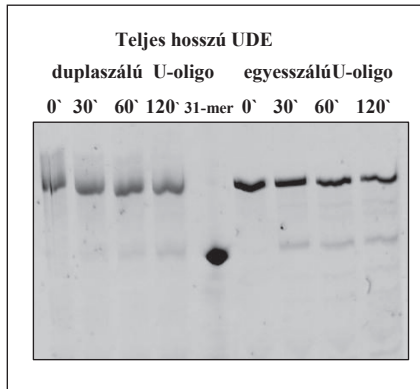
6.2.4.1.3 Az UDE katalitikus reakciója során keletkező termék azonosítása

Az UDE által katalizált reakció termékét radioaktívan jelölt szintetikus oligonukleotidokon vizsgáltam nagyméretű denaturáló poliakrilamid gélen Haracska Lajos laborjában a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban. A szubsztrátok 75 nukleotid hosszúak és az egyik DNS szál 5' végén voltak radioaktívan jelölve. Az uracil bázist a 30. pozícióban tartalmazták a jelölt illetve néhány esetben a jelöletlen DNS szálon. A nyolcféle oligonukleotidon elvégzett kísérletek azt igazolták, hogy az UDE reakció uracil DNS-re specifikus (40. ábra). Az enzim csak az uracilt tartalmazó szálát hasította el, függetlenül attól, hogy az uracil adeninnel vagy citozinnal állt e szemben. A többi esetben hasítási terméket nem detektáltam, még a T:C és G:A hibás párok esetén sem. Amikor az uracilt a radioaktívan nem jelölt szál tartalmazta, reakciótermék a gélen nem jelent meg, ami azt bizonyítja, hogy az UDE csak a DNS egyik szálán aktív. A gélen két különböző pozícióban megjelenő terméket azonosítottam, ami arra utal, hogy az enzim két helyen is képes hasítani a cukor-foszfát gerincet. Ha az időskálát is figyelembe vesszük, akkor azt mondhatjuk, hogy az UDE először az uraciltól 5' irányban hasít, így 29 nukleotid hosszú termék keletkezik, majd 3' irányban is ejt egy vágást létrehozva így a 31 nukleotid hosszú terméket.



40. ábra: Az UDE katalitikus aktivitásának vizsgálata radioaktívan jelölt oligonukleotid szubsztrátokon. Az alkalmazott szubsztrátokat a gél felett ábrázoltam feltüntetve az uracilt, a vele szemben elhelyezkedő, illetve a normál oligonukleotid esetén a pozíciójában lévő bázist. A radioaktív jelölést csillaggal jelöltem. Az inkubációs időket a gél felett percben adtam meg, oldalt pedig a markerként használt 29-32 hosszú oligonukleotidokat tüntettem fel.

Miután Intézetünk ekkor még nem rendelkezett megfelelően kialakított izotóp laborral, így kidolgoztunk egy szintetikus fluoreszcens jelölt oligoval végezhető aktivitás próbát. A teszthez az 5' végén Cy3 fluoreszcens festékkel jelölt 60 nukleotidból álló, az uracil bázist a 30. pozícióban tartalmazó kettősszálú és egyesszálú oligonukleotid szubsztrátokat használtam (41. ábra). A reakciótermékeket denaturáló poliakrilamid gélen választottam el. A teljes hosszú UDE mindkét szubsztráton aktívnak bizonyult, hiszen mindkét esetben a 31 nukleotid hosszú marker pozíciója környékén jelentek meg a termékek. A detektált jel az egyesszálú oligonukleotid esetén sokkal erősebb volt, ami azt sugallja, hogy az enzim az egyesszálú DNS-en aktívabb. Az előző kísérlettel ellentétben itt csak egyfajta termék keletkezését láttam, ez azonban a gél kisebb felbontóképességéből is adódhatott.



41. ábra: UDE aktivitás próba fluoreszcens jelölt kettősszálú és egyesszálú szintetikus oligonukleotid szubsztráton. (Az inkubálási időket a gélek felett tüntettem fel. Markerként 31 hosszú fluoreszcens jelölt nukleotidot használtam.)

Fontos azt is észrevenni, hogy a termékek a markerhez képest kicsit feljebb jelentek meg a gélen, ami azt is jelentheti, hogy az UDE nem feltétlenül az AP endonukleázokhoz hasonló módon hasítja el a cukor foszfát gerincet, hanem a glikoziláz aktivitással is rendelkező AP liázokhoz hasonlóan. Az UDG reakciót követően keletkező abázikus helyet felismerve az AP endonukleázok katalizise során szabad 3'OH és 5' dezoxiribóz foszfát vég keletkezik, míg az AP liázok aktivitása nyomán 3' α , β -aldehid és 5' foszfát vég keletkezik β eliminációval [118-120]. Ha az UDE AP endonukleázhoz hasonló aktivitással rendelkezne, akkor a reakcióterméket a 31-es marker pozícióban kellene detektálnom, míg AP liáz aktivitás esetén a reakcióterméknek a 32-es pozícióknak megfelelő magasságban kellene a gélen megjelenie, azaz a 31-es markehez képest feljebb. A tényleges UDE katalitikus aktivitás azonosítását 31 illetve 32 nukleotidból álló markerek segítségével, egy az eddigiehez képest nagyobb felbontású gélen, ahol a markerek jól szétválaszthatóak kiválóan el lehetne végezni. Ilyen irányú kísérletek jelenleg is folynak a csoportban.

6.2.4.2 Az UDE homológ karakterizálása *Tribolium castaneum*ban

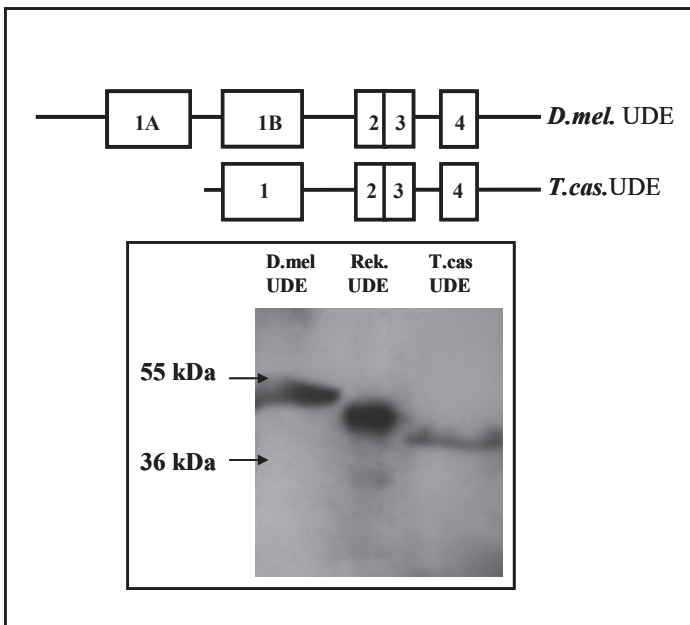
6.2.4.2.1 A fiziológiásan létező csonkított UDE izoforma azonosítása

Részletes homológiakereséssel teljes átalakulással fejlődő rovarok genomjában találtunk UDE homológ fehérjéket. A szekvenciák összerendezésével négy konzervált motívumot azonosítottunk, melyből az első kettő két kópiában van jelen. A *Tribolium castaneum*, azaz a vörös lisztbogár UDE homológja - egyetlen kivételként- az N-terminális végén rövidebb, ugyanis csak az 1B motívummal rendelkezik. Gyakorlatban előfordulhat, hogy a rovarok speciális adatbázisában fellelhető genomok annotációja hibás, ezért megkezdtem az *in silico* prediktált géntermék jellemzését.

A predikció igazolása céljából *T. castaneum* lárvá extraktot vizsgáltunk Western blot módszerrel az rekombináns UDE ellen termeltetett poliklonális antiszérummal. A bloton, melyet Békési Angéla készített, azt detektáltuk (42.ábra), hogy az UDE-ra specifikus antitest felismert egy fehérjét a *Tribolium* lárvá extraktban, amely jóval alacsonyabb molekulatömegnek megfelelő pozícióban jelent meg a rekombináns és a fiziológiás *D. melanogaster* UDE-hoz képest. Az antiszérummal reagált *Tribolium* fehérje pozíciója megegyezett a jósolt genomi adatokkal és arra engedett következtetni, hogy a fiziológiás *Tribolium castaneum*ban talált UDE homológ valóban nem tartalmazza a többi rovarban talált fehérjékben meglévő N-terminális szegmensét.

Azt is megfigyeltük, hogy a *Drosophila* és a *Tribolium* extraktok UDE fehérjei az aminosav szekvenciák alapján kalkulált molekulatömegekhez képest jóval magasabb pozícióban jelentek meg. A gélelektroforézis alapján meghatározott molekulatömegek 53,3 kDa és 41.7 kDa volt a *Drosophila* illetve a *Tribolium* UDE fehérje esetén, míg a várt elméleti tömegek 39.9 kDa és 28 kDa. A rekombináns *Drosophila* UDE nem mutatott ilyen nagymértékű eltérést, ugyanis a becsült molekulatömeg 41.446 kDa, az elektroforetikus kalkuláció 44.2 kDa volt. A fiziológiás minták esetén megfigyelt eltolódás a magasabb molekulatömegek felé valamilyen jellegű poszttranszlációs módosítás lehetőségét veti fel. Ennek a módosításnak az azonosítására irányuló kísérletek folyamatban vannak.

Mindenesetre az immunológiai módszerrel végzett kísérlet arra utal, hogy az 1A motívumot nem tartalmazó UDE izoforma egy jól feltekeredő funkcionális fehérjét alkothat.

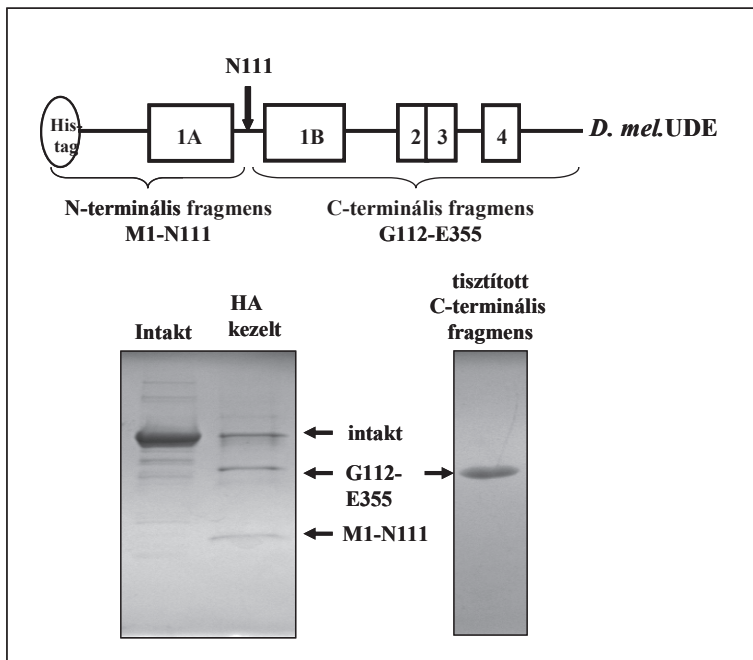


42. ábra: UDE homológ fehérje detektálása Western bloton. A rekombináns UDE elleni poliklonális antiszérum felismerte a *Tribolium castaneum*ban talált UDE homológ fehérjét. A bloton látható minták sorrendje: 1. *D.melanogaster* lárva extrakt, 2. rekombináns *D.mel.* UDE, 3. *T. castaneum* lárva extrakt.

6.2.4.2.2 Az 1A motívum szükséges-e az UDE katalitikus aktivitásához?

Annak tisztázása érdekében, hogy az azonosított csonkított UDE izoforma is ugyanazzal a specifikus funkcióval rendelkezik, mint a *D. melanogaster* UDE, DNS kötő képességének és katalitikus aktivitásának ellenőrzését tűztem ki célul.

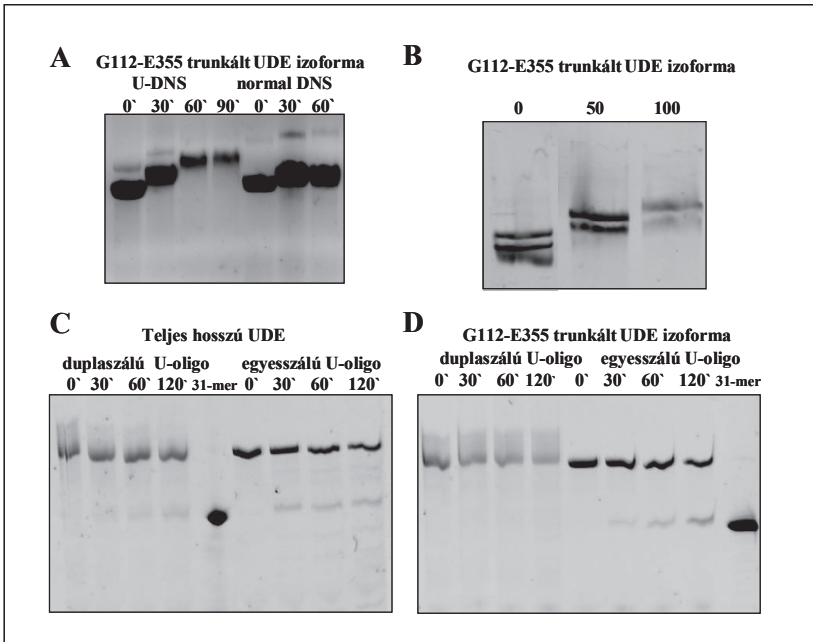
Ehhez azonban magának a csonkított fehérjének az előállítására volt szükségem. A fiziológias *Tribolium* fehérjének megfelelő csonkított *Drosophila* UDE izoformát egy kémiai reagenssel, a hidroxilaminnal állítottam elő, amely aszparagin és glicin aminosavak közötti peptidkötést hasítja. Az UDE szekvencia egyetlen ilyen hasító helyet tartalmaz a 111. aszparagin és 112. glicin (N111-G112) között (43. ábra).



43. ábra: A csonkított UDE izoforma előállítása hidroxilaminos emésztéssel. A fenti panel a hidroxilamin egyetlen hasító helyét (N101) az UDE szekvenciában valamint a vágás nyomán létrejövő N-terminális (M1-N101) és C-terminális (G102-E355) fragmensek megoszlását mutatja. Az alsó panelen a hidroxilaminos hasítás gélelektroforetikus vizsgálatát illetve a tisztított C-terminális fragmens homogenitásának ellenőrzését reprezentálják.

A hidroxilamin tehát az 1A és 1B motívumokat összekötő szakaszon elhelyezkedő peptidkötés hasításával egy N-terminális (M1-N111) és egy C-terminális (G112-E355) fragmensre osztja a teljes hosszú fehérjét. Az így előállított szegmensek közül a C-terminális fragmens felel meg a *Tribolium castaneum* fiziológiai UDE izoformájának. Az rekombináns *Drosophila* UDE-n található hat hisztidinből álló címke nyújtott lehetőséget arra, hogy Ni-affinitás kromatográfia segítségével elválasszam a hidroxilaminos emésztéssel létrejött N-terminális és C-terminális fragmenseket (43 . ábra). A későbbiekben a körülményes előállításhoz szükséges preparatív munka lerövidítése céljából a *Tribolium castaneum* UDE-

nak megfelelő kódozó szakaszt az *ude* génből pET22b vektorba klónoztam, mely konstrukt a C-terminálisán tartalmaz egy His-címkét. Az expresszióját és tisztítását a teljes hosszú UDE-vel azonos módon tudtam kivitelezni. A csonkított UDE izoforma karakterizálására irányuló kísérleteket természetesen mindkét úton előállított fehérjével elvégeztem.



44. ábra: **A:** Aktivitás teszt lineáris normál és uracil tartalmú plazmid DNS-en. **B:** Elektroforetikus mobilitás teszt uracil-tartalmú plazmid DNS-en növekvő fehérje koncentráció mellett (0-100 ng). **C, D:** A teljes hosszú UDE és a csonkított UDE izoforma aktivitásának összevetése fluoreszcens jelölt egyesszálú és kettősszálú oligonukleotid szubsztrátokon.

Annak ellenőrzésére, hogy az 1A motívum megváltoztatja-e a csonkított fehérje specifikus funkcióját katalitikus és elektroforetikus mobilitás tesztet hajtottam végre a tisztított C-terminális fragmenssel. A katalitikus aktivitás analízisét EDTA jelenlétében normál és uracil tartalmú plazmid DNS-en végeztem, így ez a kísérlet nemcsak azt igazolja, hogy a C-

terminális fragmens katalitikus aktivitását megőrizte, hanem azt is, hogy kétértékű fémionok jelenlétét ehhez nem igényelte (44.A ábra). A 44.B ábra ábrán látható géleltolódás azt bizonyítja, hogy a csonkított izoforma megőrizte DNS kötő képességét is, valamint demonstrálja a specifikus uracil DNS hasítást is.

A pontos hasító hely megállapításához a katalitikus tesztet szintetikus, fluoreszcens jelölt 60 nukleotidból álló, az uracil bázist a 32. pozícióban tartalmazó, egyszálú és kettősszálú oligonukleotidokon is elvégeztem (44.D ábra). Összehasonlítva a teljes hosszú UDE katalitikus aktivitásával, azt tapasztaltuk, hogy a reakciótermékeket ugyanúgy a 31 nukleotid hosszúságú marker pozíciójában detektáltuk, de a csonkított UDE izoforma csak egyszálú szubsztráton mutatott aktivitást (44.C és D ábra).

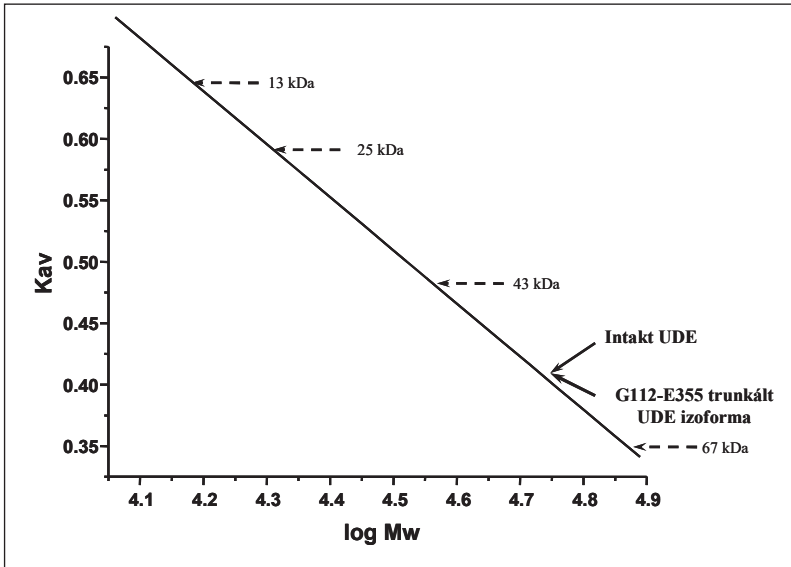
A *Tribolium castaneum* fiziológiai formájának tehát a *D. melanogaster* UDE-hoz hasonló újszerű funkciója van, és ugyanazt a feltételezett fiziológiai szerepet töltheti be.

6.2.4.2.3 A teljes hosszú és a csonkított UDE izoforma negyedleges szerkezete

Az előzőekben jellemzett csonkított UDE izoformában az N-terminális vége a fehérjének jelentősen rövidebb, amely esetleg hatással lehet a negyedleges szerkezet kialakulására.

Ezt vizsgálva meghatároztam a teljes hosszú UDE és a C-terminális fragmens natív molekula tömegét analitikai gélszűrőssel (45. ábra).

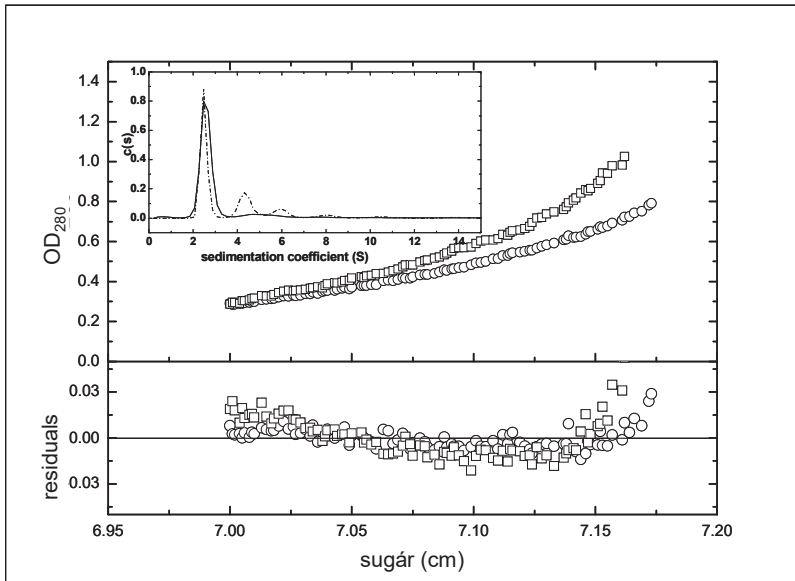
A teljes hosszú UDE 52 kDa molekulatömegnek megfelelő pozícióban eluálódott az oszlopról, amely valamivel meghaladja a teljes hosszúságú monomer fehérjére kalkulált 41.446 kDa molekulatömeget. Ez az eltérés adódhat a részleges dimer képződésből, vagy a fehérje rendellenes permeációs tulajdonságának lehet a következménye. Az anomális permeációs viselkedés pedig a már rendezetlenséget prediktáló programokkal is kimutatott, rendezetlenséget hordozó, jelentősen flexibilis fehérje szegmensek jelenlétére utal. A C-terminális fragmens a teljes hosszú fehérjével azonos pozícióban, szintén 52 kDa molekulatömegnél eluálódott az oszlopról. A monomer fragmens becslött molekulatömege 28 kDa, tehát az eredmény egyértelműen azt sugallja, hogy a C-terminális fragmens, a teljes hosszú fehérjétől eltérő módon dimert képez.



45. ábra: A teljes hosszú UDE és a C-terminális fragmens oligomer állapotának meghatározása analitikai gélszűrőssel. Szaggatott nyilak a markerként használt fehérjék molekulatömegét jelzik: RNáz (13 kDa), Kimotripszin (25 kDa), Ovalbumin (43 kDa), BSA (67 kDa). Folytonos vonalú nyilak A teljes hosszú UDE és a C-terminális fragmens elúciós pozícióját jelölik.

A gélszűrőssel kapott eredményeket analitikai ultracentrifugával végzett mérésekkel erősítettem meg, mely méréseket együttműködő partnereink C. Alfonso és G. Rivas végezték Madridban (46.ábra). Ezen belül a két fehérje natív molekulatömegét a szedimentációs ekvilibrium technikával határoztuk meg. A teljes hosszú UDE esetén az így kapott 42.8 ± 2 kDa molekulatömeg, szinte teljesen megegyezik az aminosav szekvencia alapján becsült molekulatömegével (41.446 kDa). A C-terminális fragmens esetén megállapított 49 ± 1.2 kDa-os tömeg inkább a csonkított izoforma dimer molekulatömegéhez (56 kDa) áll közelebb. Az ülepedési sebesség mérésére irányuló kísérletekből kiderült (46.ábra), hogy a teljes hosszú fehérje fő tömegének (82 %) ülepedési állandója $2.6 \text{ S} \pm 0.1 \text{ S}$. Ez a szedimentációs ekvilibrium mérésekből származó adatokkal együtt olyan fehérjére utal, amelynek hidrodinamikai viselkedése eltér a globuláris fehérjékétől. A csonkított UDE izoforma

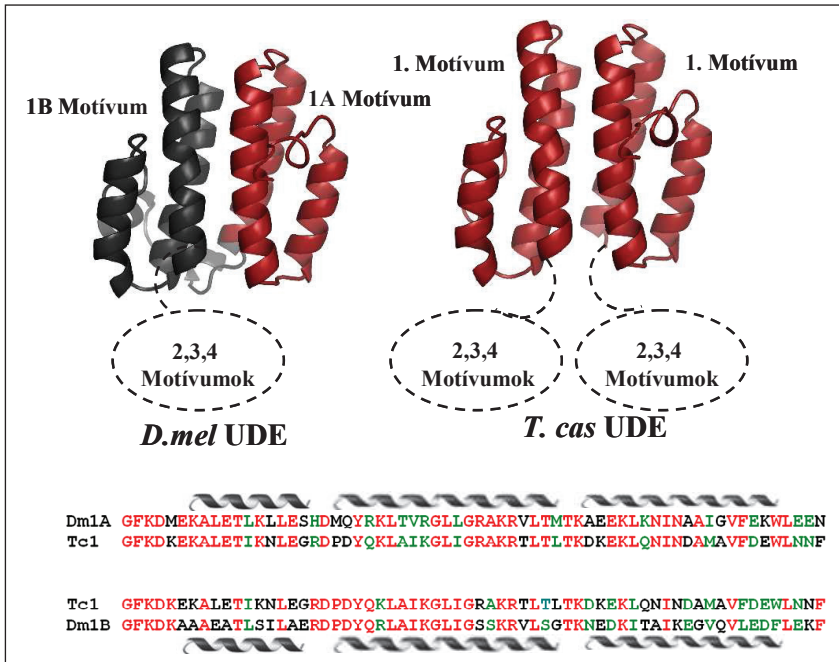
nagyfokú polidiszperzitást mutatott, a megállapított ülepedési állandó a fehérje betöltési koncentrációjának 70 %-a esetén 2.5 S, 20 %-nál 4.3 S, 6%-nál pedig 6 S volt. A fő tömeg 2.5 S ülepedési állandója a csonkított izoforma globuláris monomerjének felel meg, de az adatok arra utalnak, hogy a monomer dimerré illetve nagyobb oligomerré is összeállhat.



46. ábra: A teljes hosszú UDE és a csonkított UDE izoforma oligomer állapotának meghatározása analitikai ultracentrifugával. A felső panelen a teljes hosszú UDE (○) és a csonkított izoforma (□) szedimentációs egyensúlyi gradiense látható. Az alsó panel a kísérleti és az egyes pontokra illesztett adatok közti különbséget ábrázolja. A beszűrt panelen a teljes hosszú UDE (folytonos vonal) és a csonkított UDE izoforma (szaggatott vonal) ülepedési állandóinak eloszlását mutatja.

Konklúzióként elmondható, hogy az analitikai gélzűrőssel és ultracentrifugával elvégzett kísérletekből származó eredmények azt támasztják alá, hogy a teljes hosszú UDE natív monomert, míg a csonkított UDE izoforma natív dimert képez (47. ábra). Az erről készített szerkezeti modellen azt próbáltuk bemutatni, hogy az 1A és 1B motívumok a teljes hosszú

fehérjében részleges pseudodimert képeznek és ugyanezt a kölcsönható felületet őrzi meg a fiziológias *T. castaneum*nak megfelelő csonkított UDE izoforma homodimer alkotásával.



47. ábra: A *Drosophila melanogaster* UDE alkotta pszeudodimer és a *Tribolium castaneum*ban azonosított UDE homológ alkotta homodimer szerkezeti modellje. A 2-3-4 motívumokat csak sematikusán ábráztuk. Az alsó panelen a *Tribolium* UDE 1. motívumát hasonlítottam össze a *Drosophila* UDE 1a és 1B motívumával. Pirossal és zölddel az azonos és konzervált aminosavakat jelöltem. A helikálisnak prediktált részeket a szekvencia felett tüntettem fel.

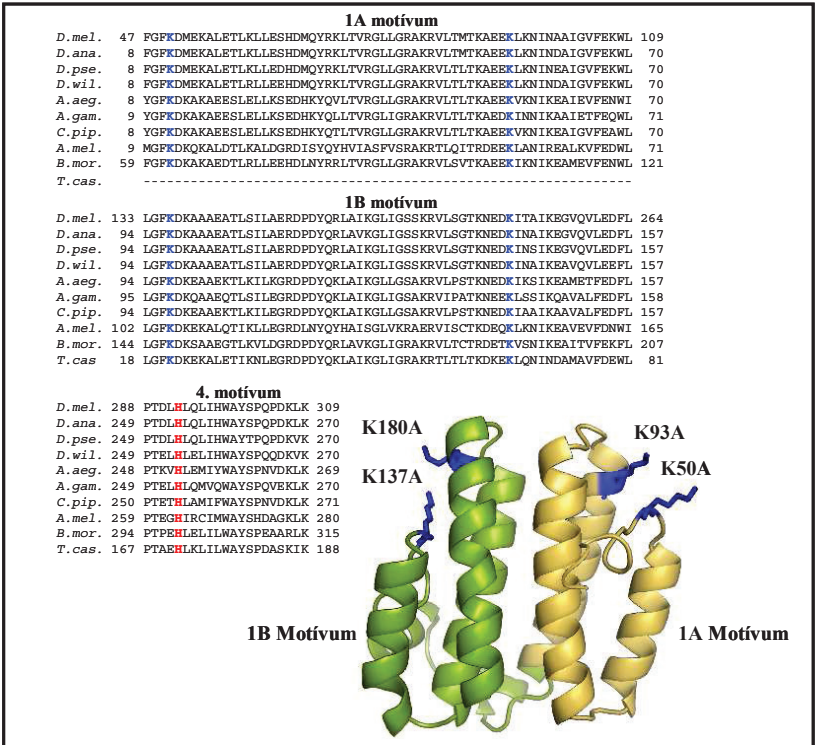
6.2.4.3 Az UDE katalitikus helyének térképezése mutáció analízissel

Az UDE enzim kémiai katalízisének megismeréséhez kiindulási pontként az uracil hiba felismerésére és eltávolítására szerveződött báziskivágáson alapuló javítómechanizmus fehérjéinek ismert katalitikus mechanizmusa szolgált. A kezdeti aktivitás tesztek során azonban hamar kiderült, hogy az általunk azonosított fehérje teljesen újszerű aktivitással rendelkezik, és nem mutat azonosságot az eddig leírt glikozilázokkal és nukleázokkal. Megállapítottam, hogy az UDE uracil-DNS degradáló aktivitással rendelkezik, bár a reakció során szabad uracil nem keletkezik. A foszfodiészter kötés hasítását a fehérje EDTA jelenlétében is megőrzi, és nem feltétlenül igényel kétértékű fémionokat, ami az enzim relatív fémfüggetlenségére utal.

Az irodalomból ismert fém független nukleázok úgy, mint a foszfolipáz D szupercsalád tagjai vagy az eukarióta Ogg1 AP liáz általában pozitív töltésű hisztidin vagy lizin/arginin aminosavakat használnak a DNS szál foszfátgerincének nukleofil támadásához [121, 122]. Apoptotikus nukleázok, mint a kaspáz-aktiválta DNáz (CAD) vagy a DNáz II enzimek esetén konzervált hisztidinek töltenek be funkcionálisan releváns szerepet [123]. Összhangban az előzőekkel, megpróbáltam olyan hisztidin, lizin vagy arginin aminosavakat azonosítani az UDE enzim szekvenciáján belül, melyek a fém-független funkcióban esetlegesen szerepet játszhatnak.

A korábban már bemutatott szerkezeti modell szerint az UDE 1A és 1B motívumai a konzervált pozitív töltésű felszínnel rendelkező szegmensein keresztül kölcsön hatnak egymással. A predikció szerint a DNS kötő és a katalitikus hely kialakításában az egyes motívumok egymásnak megfeleltethető részei vesznek részt. Ezt figyelembe véve számos olyan pozitív töltésű aminosavat találtam az UDE szekvencián belül, amely potenciális jelentőséggel bírhat a DNS kötésben vagy az aktív hely formálásában.

Az irodalmi adatok és az *in silico* modell alapján pontmutációkat terveztem a konzervált motívumokon belül. Az N-terminális duplikált motívumok számos konzervált lizint tartalmaznak, melyek közül kettő, a két motívumban, ugyanabban a pozícióban helyezkedik el, az 50. lizin az 1A és a137. lizin az 1B motívumban. A negyedik motívumban azonosítottam egy hisztidin aminosavat is, mely az egyetlen konzervált hisztidin a teljes fehérje szekvenciában (48. ábra). A kiválasztott aminosavak mindegyikét az apoláris alaninra cseréltem irányított mutagenézissel. Az így létrehozott UDE pontmutánsokat (UDE^{K50A}, UDE^{K137A}, UDE^{H293A}) nagy mennyiségben tudtam termelni, és Ni-affinitás kromatográfiával megfelelő tisztaságúra pucolni a további funkcionális analízishez.



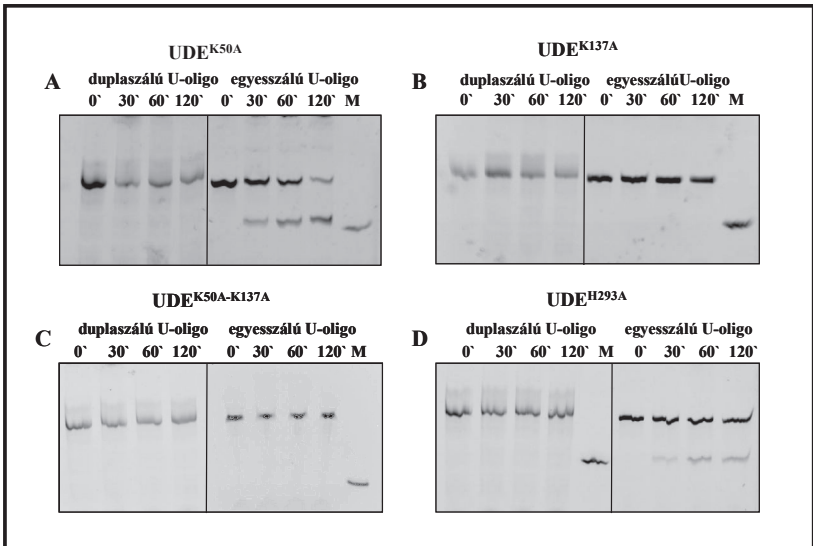
48. ábra: A tervezett pontmutációk az adott konzervált motívumokban. Az azonos pozícióban elhelyezkedő konzervált lizineket az 1A és 1B motívumokban pirossal, míg z egyetlen konzervált hisztidint a 4. motívumban késsel jelöltem. A pozitív töltésű konzervált lizineket az 1A és 1B motívumok prediktált szerkezeti modelljén is feltüntettem.

A két egyező pozíciójú lizinben mutáns UDE^{K50A} és UDE^{K137A} fehérje aktivitását fluoreszcens jelölt uracil tartalmú oligonukleotidon vizsgáltam. Egyik mutáns sem bizonyult aktívának dupla szálú oligonukleotidon, egyszálú szubsztráton pedig csak az UDE^{K50A} mutáns mutatott aktivitást (49. A és B ábra). A később előállított kettős mutáns UDE^{K50A-K137A} fehérje szintén a vártan megfelelően inaktív volt mindkét szubsztráton (49.C ábra). Az egyetlen konzervált hisztidin szerepének felderítésére megvizsgáltam az UDE^{H293A} mutáns

katalitikus aktivitását, mely szintén csak az egyesszálú uracilt tartalmazó oligonukleotidot hasította (49.D ábra).

Az eredmények arra utalnak, hogy az 50. lizin és a 293. hisztidin nem szükséges az UDE katalitikus funkciójához, míg a 137. lizin mutációja valamint a kettős mutáció drasztikus hatással van az UDE funkciójára.

Az szintén kiolvasható az eredményekből, hogy a duplikált motívumok közül az 1B motívum jelentősebb funkciót tölt be. Ez összhangban áll a fiziológiásan is létező *T. castaneumban* azonosított csonkított UDE izoforma jellemzésekor tapasztaltakkal, miszerint a csonkított fehérje megőrizte aktivitását uracil-tartalmú egyesszálú oligonukleotidon annak ellenére, hogy az 1A motívumot nem tartalmazza.



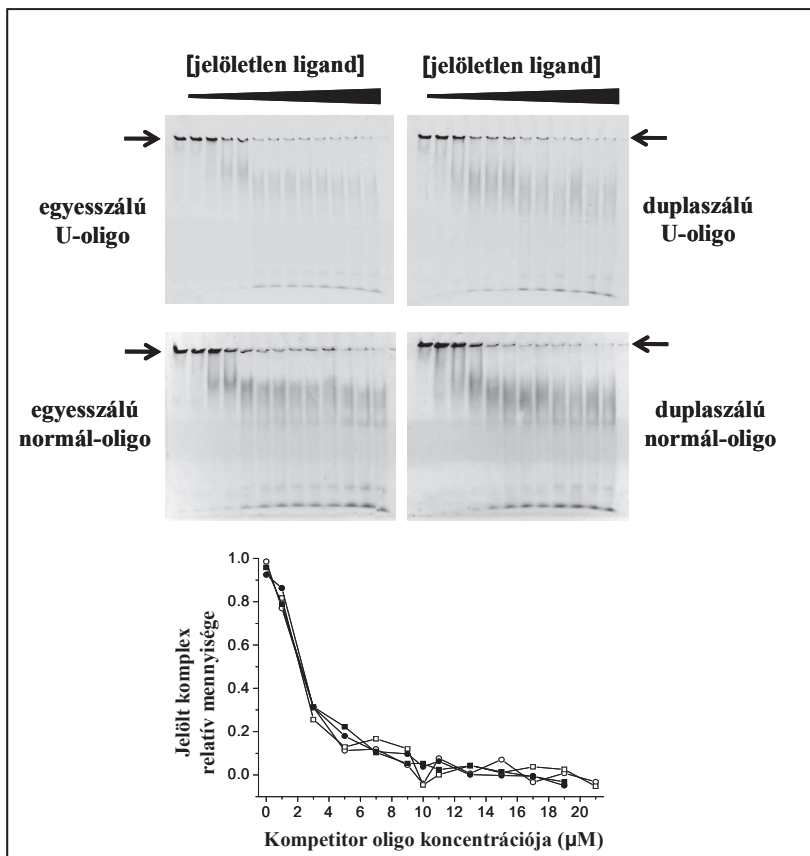
49. ábra: Az UDE pontmutánsok aktivitás tesztje fluoreszcens jelölt egyes és kettős szálú uracil tartalmú oligonukleotidon. A specifikus reakciótermékeket a 31 nukleotidból álló marker pozíciójában detektáltam. Az inkubációs időket, a szubsztrátokat és az egyes mutánsok elnevezésére utaló rövidítéseket a gélek felett jeleztem.

6.2.4.4 Az UDE nukleinsav kötő képességének vizsgálata

6.2.4.4.1 A vad típusú és a pontmutáns UDE fehérjék DNS kötésének tanulmányozása

A teljes hosszú UDE fehérje affinitását normál és uracil tartalmú oligonukleotidok felé elektroforetikus mobilitás teszt során ellenőriztük. A kísérletet Békési Angéla úgy hajtotta végre, hogy az UDE enzim és a fluoreszcens jelölt uracil tartalmú egyszálú oligonukleotid elegyét jelöletlen normál illetve uracil tartalmú egyszálú és kettősszálú oligonukleotiddal titrálta. Az egyes titrálási ponthoz tartozó elegyeket poliakrilamid gélen denaturáló körülmények között vizsgáltuk (50.ábra). A kiértékeléshez az UDE- jelölt oligonukleotid komplex gélen detektált denzitásának változását használtuk fel (50.ábra). Az eredmények azt támasztják alá, hogy az UDE hasonló affinitással képes kötni a normál és uracil tartalmú oligonukleotidot is, függetlenül attól, hogy a ligand egyszálú vagy kettősszálú oligomer.

A teljes hosszú és a pontmutáns fehérjéken egy másik, a DNS és fehérje kölcsönhatások analízisekor gyakran alkalmazott módszert, a fluoreszcencia spektroszkópia mérést végeztem [124]. A módszer azon alapszik, hogy a fehérjék belső fluoreszcenciájáért felelős triptofán aminosav fluoreszcens emisszióját, a DNS-t alkotó bázisok képesek kioltani. Az UDE fehérje szekvenciája négy triptofánt is tartalmaz, melyek közül az egyik a flexibilis N-terminális végen oldószernek mindig kitett helyen, míg a másik három különböző konzervált motívumokban valószínűleg eltemetett, hidrofób környezetben található. Ennek következtében a fehérje emissziós maximumát 340-341 nm-en detektáltam. Ez összhangban áll az irodalmi adatokkal, miszerint poláris közegben a triptofán emissziós maximuma 355 nm-en mérhető. Míg apoláros, hidrofób környezetben ez az érték eltolódik 337 nm-re.



50. ábra: Az UDE fehérje DNS kötő képességének vizsgálata elektroforetikus mobilitás teszttel. Az UDE és a fluoreszcens jelölt egyesszálú uracil tartalmú oligonukleotid elegyét növekvő koncentrációjú jelöletlen 30 hosszú egyes és kettősszálú, normál illetve uracil tartalmú kompetitor oligonukleotiddal titráljuk, majd denaturáló poliakrilamid gélen megfutattuk. A nyilak az UDE és a jelölt oligonukleotid komplexek pozícióit mutatják. A komplexek denzitometriás kiértékelését az alsó diagramon ábrázoltuk. Az egyesszálú (nyitott szimbólum) és kettősszálú (zárt szimbólum), normál (négyzet) és uracil tartalmú (kör) oligonukleotiddal végzett titrálási pontokat ábrázoló görbék azonos lefutásúak.

A mérés során egyre növekvő mennyiségű uracil tartalmú és normál, egyesszálú illetve kettősszálú oligonukleotiddal titráltam a vad típusú és a pontmutáns UDE fehérjét. Minden titrálási pontban felvettem az emissziós spektrumot, és így a triptofán fluoreszcencia fokozatos csökkenését figyelhettem meg az egyre növekvő mennyiségben adott DNS ligand hatására. Ezt a csökkenő jelet használtam az egyes fehérje–DNS komplexek disszociációs állandójának meghatározásához. Az egyes komplexekre kapott K_d adatok (2. táblázat) nem mutattak jelentős különbségeket, ami arra utalt, hogy a pontmutációk a DNS hasító képességét ugyan befolyásolták a fehérjének, de a DNS kötő képességét nem befolyásolták meghatározó módon.

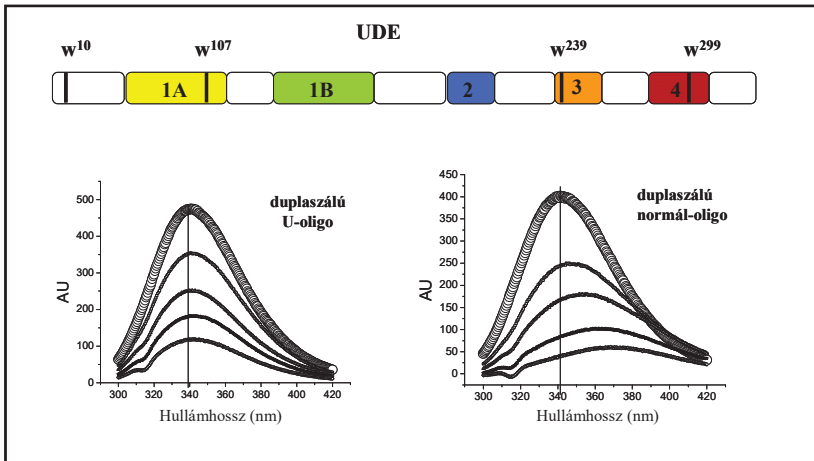
	K_d, dsU (μM)	K_d, ssU (μM)	K_d, dsT (μM)	K_d, ssT (μM)
UDE	11,6 ± 1,5	7,08 ± 1,0	6,84 ± 0,4	4,71 ± 1,6
UDE ^{K50A}	4,03 ± 1,75	18,5 ± 8,3	7,11 ± 2,8	6,84 ± 1,85
UDE ^{K137A}	0,98 ± 0,2	13,7 ± 2,8	2,2 ± 0,75	5,22 ± 2,45
UDE ^{K50A-K137A}	7,9 ± 3,0	11,29 ± 10,0	3,42 ± 0,3	2,9 ± 1,2
UDE ^{H293A}	4,36 ± 0,21	19,33 ± 1,51	3,83 ± 0,22	13,6 ± 11,0
UDE ⁴⁸⁻²⁰²	15,67 ± 1,65	6,29 ± 3,91	6,74 ± 1,76	8,09 ± 2,35
UDE ²⁴⁰⁻³¹⁸	2,11 ± 0,91	0,94 ± 0,8	2,62 ± 0,13	7,44 ± 1,59
UDE ¹⁰²⁻³⁵⁵	1,84 ± 0,48	12,96 ± 7,21	21 ± 4,81	3,62 ± 1,54
UDE ^{102-355,W239F}	9,05 ± 4,9	1,38 ± 1,03	16,43 ± 12,28	9,37 ± 1,98

2. táblázat: A vad típusú, a pontmutáns valamint a csonkított UDE fehérjék egyesszálú és kettősszálú normál illetve uracil tartalmú oligonukleotidokkal alkotott komplexek disszociációs állandói (K_d).

A vad típusú és a mutáns UDE fehérjék közel hasonló disszociációs állandóval jellemezhető módon kötődnek a normál és az uracil tartalmú oligonukleotidokhoz. Különbség volt azonban tapasztalható abban, hogy a normál oligonukleotidokkal való titrálás során az emissziós maximumokhoz tartozó hullámhossz értékek megváltoztak, fokozatosan a magasabb hullámhossz tartomány felé tolódtak el. Ez a hatás mind a vad típusú (51.ábra), mind a mutáns UDE fehérjéknél érvényesült. Ez az ún. vörös-eltolódás arra utal, hogy a fehérje és a

DNS komplexében a fehérjében található triptofán oldalláncok környezete megváltozik (jobban poláros környezetbe kerülnek).

A fluorimetriás kísérletekből tehát nyilvánvalóvá vált, hogy az UDE fehérje és a normál illetve uracil tartalmú oligonukleotidok által létrehozott komplexek különböző spektrális tulajdonsággal jellemezhetők. Ez a megkülönböztetés független új eredményként támasztja alá azt, hogy az UDE fehérje képes különbséget tenni a normál és az uracil tartalmú DNS között.



51. ábra: A vad típusú fehérje kettősszálú uracil tartalmú (jobb oldali panel) és kettősszálú normál (bal oldali panel) oligonukleotiddal végzett titrálás során detektált emissziós spektruma. Az ábrákon (340nm-nél) függőleges vonallal jelöltem a fehérje emissziós maximumát. A növekvő normál oligonukleotid koncentráció (0 μM , 3 μM , 6 μM , 9 μM és 12 μM) hatására megnövekedett az eltolódás mértéke is, míg az uracil tartalmú ligand esetén csak a fluoreszcencia intenzitás csökkenését tapasztaltam. A fenti panel a négy triptofán aminosav elhelyezkedését jelzi az UDE szekvenciában.

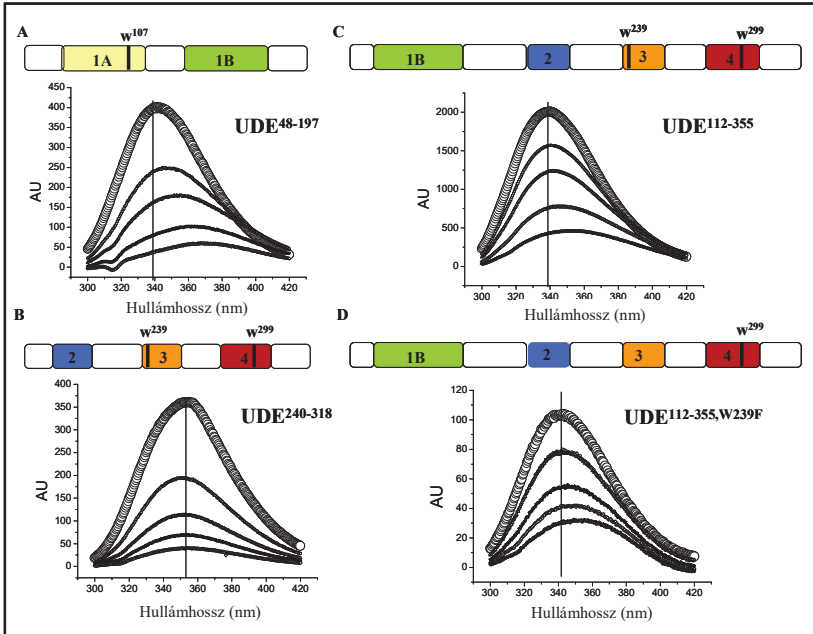
6.2.4.4.2 A DNS kötésért felelős fehérje szegmensek azonosítása

A triptofán aminosavak nagyon érzékenyek mikrokörnyezetük változására, ezért, hogy felderíthessem a vörös eltolódás hátterében álló változásokat, három csonkított UDE mutánst hoztunk létre. Az első fragmens az 1A és 1B motívumokat (UDE⁴⁸⁻¹⁹⁷), a második a 2-3-4 konzervált motívumokat (UDE²⁴⁰⁻³¹⁸) foglalja magába. A harmadik csonkított forma (UDE¹¹²⁻³⁵⁵), melyből csak az 1A motívum hiányzik, a korábban már karakterizált fiziológiásan is előforduló *T. castaneumban* azonosított UDE csonkított izoformája. Az így létrehozott konstruktok egyike sem tartalmazza a fehérje N-terminális flexibilis régiójában található, exponált pozíciójú W10 aminosavat.

UDE⁴⁸⁻¹⁹⁷ fragmenst normál oligonukleotiddal titrálva a vad típusú és a pontmutáns UDE fehérjékhez hasonló eredményre vezetett, azaz a triptofán emissziós maximumának hullámhossza hasonló mértékű vörös eltolódást mutatott. A prediktált DNS kötés indukálta konformáció változás tehát az 1A motívumban elhelyezkedő W107-es aminosav mikrokörnyezetének megváltozását vonja maga után, hiszen ez az egyetlen triptofán az UDE⁴⁸⁻¹⁹⁷ fragmensben (52.A ábra, 3. táblázat). A következtetés összhangban áll a limitált proteolízis eredményével is, miszerint az 1A és 1B motívumokat magába foglaló régió egy kiterjedt DNS kötő felszint alkot.

Az UDE²⁴⁰⁻³¹⁸ fragmens az előzőektől teljesen eltérő spektrális karakterisztikát adott (52. B ábra). A triptofán emissziós maximum hullámhossza már az apoenzim esetén is a magasabb hullámhossz tartomány felé tolódott el, és nem is detektáltam változást a normál és uracil tartalmú oligonukleotiddal történt titrálás alatt sem. Ez a megfigyelés egyrészt arra utal, hogy az UDE²⁴⁰⁻³¹⁸ fragmens nem képes az uracil tartalmú és a normál DNS megkülönböztetésére. Másrészt az UDE²⁴⁰⁻³¹⁸ fragmens a teljes hosszú UDE fehérjéhez képest feltételezhetően másképp tekeredik fel.

A korábban jellemzett UDE¹¹²⁻³⁵⁵ csonkított UDE izoformáról, mely fiziológiás formája a *T. castaneumban* talált UDE homológ fehérjének, bebizonyosodott, hogy megőrzi katalitikus aktivitását, annak ellenére, hogy az 1A motívumot nem tartalmazza. Annak ellenére, hogy az UDE¹¹²⁻³⁵⁵ az UDE²⁴⁰⁻³¹⁸ fragmenshez hasonlóképpen ugyanazt a két triptofán aminosavat, a W239-et és a W299-et hordozza, normál oligonukleotiddal titrálva emissziós maximuma hasonlóan a vad típusú UDE-hoz eltolódott a nagyobb hullámhosszú tartomány felé (52. C ábra).



52. ábra: A normál DNS kötés hatása a csonkított UDE fragmensek triptofán emissziójára. DNS kötés indukálta vörös eltolódást detektáltam az UDE⁴⁸⁻¹⁹⁷ (A) és az UDE¹¹²⁻³⁵⁵ fragmensek (C) esetén. A W239-es aminosav mutációjával bebizonyítottam, hogy a W299 felelős az UDE¹¹²⁻³⁵⁵ fragmens emissziós maximumának eltolódásáért (D). Az UDE²⁴⁰⁻³¹⁸ fragmens titrálásakor nem tapasztaltam változást az emissziós maximum hullámhosszában a spektrum felvételekor. A titrálás során a ligandum koncentrációk a következők voltak: 0 μ M, 3 μ M, 6 μ M, 9 μ M és 12 μ M.

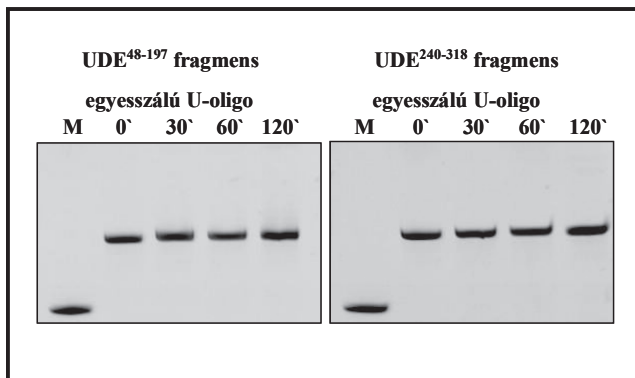
Azért, hogy kiderítsem, hogy a két triptofán (W239 és W299) közül, melyik felelős a vörös eltolódásért, a hármas konzervált motívumban található W239-es aminosavat fenilalaninre cseréltem az UDE¹¹²⁻³⁵⁵ fragmensben (UDE^{112-355, W239F}). Mivel a normál oligonukleotiddal történő titrálás során a triptofán emissziós maximumának eltolódása továbbra is megfigyelhető volt, arra következtettem, hogy a W299-es aminosav mikrokörnyezetében történik változás, azaz ez a triptofán helyezkedik el a DNS kötésben részt vevő fehérje felszínén.

	λ_{max} emisszió	
	Apoenzim	Enzime + normál oligonukleotid
UDEwt	340.5 nm	368 nm
UDE48-197	341.5 nm	367.5 nm
UDE240-318	355 nm	355 nm
UDE112-355	340 nm	352 nm
UDE112-355,W239F	341 nm	352 nm

3. táblázat: A teljes hosszú és a csonkított UDE fragmensek triptofán emissziós maximumának hullámhossza (λ_{max}). Az első oszlop a fragmensek rövidítését, a második az apoenzimek emissziós maximumának hullámhosszát, a harmadik a normál oligonukleotiddal végzett titrálás végén (12 μM végkoncentráció) detektált triptofán emissziós maximumok hullámhosszát tartalmazza.

A teljes hosszú UDE-t valamint a csonkított mutánsok közül, az UDE¹¹²⁻³⁵⁵ és az UDE^{112-355,W239F} fragmenseket az oligonukleotidok mellett ANS-sel is titráltam. Az ANS az aminosavak pozitív töltésű oldalláncaihoz képes kötni és általában a vízdoldható fehérjék apoláris tulajdonságának karakterizálására használják [105]. Az UDE esetében a festéket a DNS kötés indukálta konformációs változás következtében esetlegesen exponálttá váló hidrofób felszínek detektálására alkalmaztam. Ezt az tette lehetővé, hogy a molekula gerjesztési és emissziós hullámhossza is különbözik a triptofánétól, így az ANS jelet ettől függetlenül tudtam vizsgálni. A kísérlet azonban azt bizonyította, hogy az UDE-DNS komplex kialakulása nem vonja maga után olyan hidrofób felszínek megjelenését, amely az ANS számára is hozzáférhető.

Az UDE⁴⁸⁻¹⁹⁷ és az UDE²⁴⁰⁻³¹⁸ fragmensek specifikus aktivitását szintetikus fluoreszcens jelölt oligonukleotidokon ellenőriztem, de a két csonkított forma közül egyik sem bizonyult aktívnak (53. ábra). A harmadik csonkított fragmensről már előzőleg kimutattam, hogy megőrzi DNS degradáló aktivitását, mely az 1B motívum UDE funkciójában betöltött kulcsfontosságú szerepét hangsúlyozza.

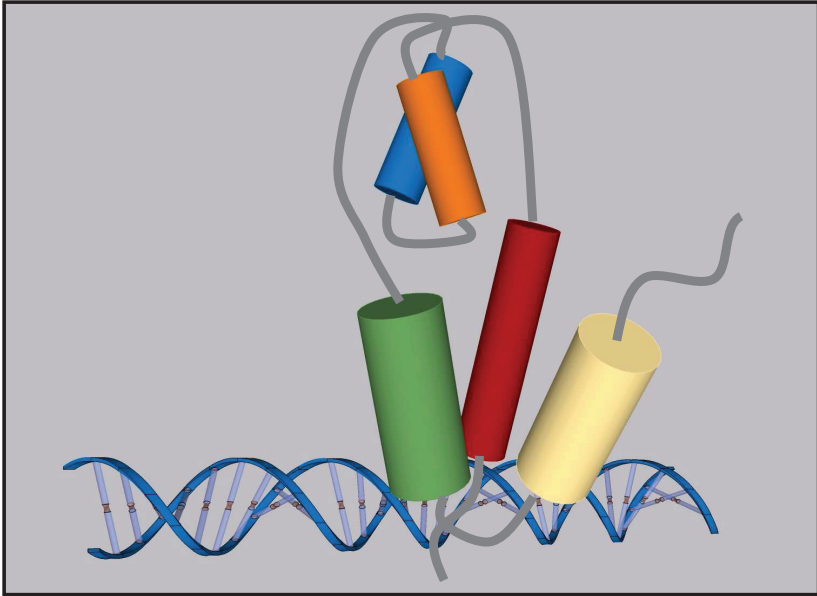


53. ábra: Az UDE⁴⁸⁻¹⁹⁷ és az UDE²⁴⁰⁻³¹⁸ csonkított fragmensek katalitikus aktivitásának vizsgálata egyesszálú uracil tartalmú oligonukleotid szubsztráton. (inkubációs időket a gélek felett jelöltem, M: 31 hosszú oligonukleotid marker).

	Motívumok					DNS kötés	U/T megkülönböztetés	DNS hasító aktivitás
	1A	1B	2	3	4			
UDE ^{wt}	+	+	+	+	+	+	+	+
UDE ⁴⁸⁻¹⁹⁷	+	+				+	+	-
UDE ²⁴⁰⁻³¹⁸			+	+	+	+	-	-
UDE ¹¹²⁻³⁵⁵			+	+	+	+	+	+

4. táblázat: A teljes hosszú UDE és a csonkított fragmensek DNS kötő képességének és katalitikus aktivitásának vizsgálata során nyert eredmények összefoglalása. Az első oszlop az UDE konstruktok rövidítését tartalmazza, a következő oszlopok mutatják az egyes fragmensek által lefedett konzervált motívumokat, a vizsgált fehérjék DNS kötő képességét, a normál és az uracil tartalmú DNS felismerésének képességét, valamint az uracil degradáló aktivitást.

A mért és a prediktált adatok (4. táblázat) arra engednek következtetni, hogy a DNS kötésben és ezen felül az uracil tartalmú illetve a normál DNS megkülönböztetésében mind az 1A és 1B valamint a 4. motívumok egyaránt részt vesznek (54. ábra).

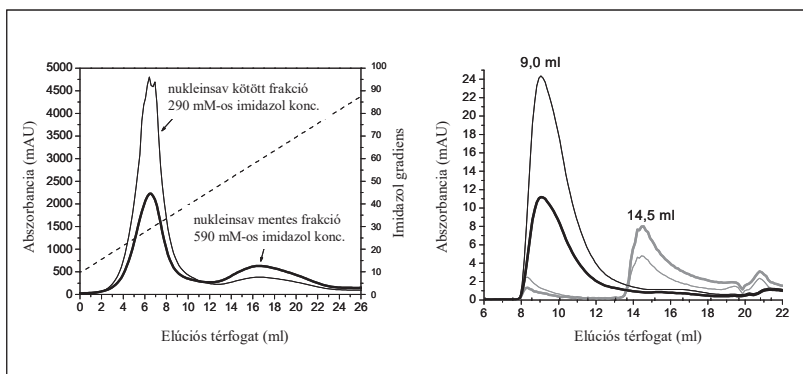


54. ábra: A teljes hosszú UDE és a normál DNS feltételezett modellje. A hengerek képviselik a fehérje szekvenciában azonosított konzervált motívumokat: 1A motívum (sárga), 1B motívum (zöld), 2 motívum (kék), 3 motívum (narancssárga), 4 motívum (piros). Az egyes motívumokat összejövő szakaszokat szürkére színeztem.

6.2.4.5 Az UDE-ribonukleinsav által alkotott komplex analízise

6.2.4.5.1 Az UDE nukleinsav tartalmú frakciójának jellemzése

A rekombináns UDE fehérjét Ni- affinitás oszlopon, teljesen automatizált folyadék kromatográfiás rendszerrel (AKTA system) tisztítva a gradiens elúció során két fehérje frakciót detektáltunk (55.A ábra). Az egyik frakció nagy mennyiségű nukleinsavat tartalmazott, míg a második frakciót a fehérjéhez képest relatíve nukleinsav mentesnek tekintettük. A két frakciót analitikai gélszűrésnek is alávetettük, és azt kaptuk eredményül, hogy a nukleinsavas frakció az oszlop kizárási térfogatának megfelelő (> 660 kDa) pozícióban, míg a nukleinsavtól mentes frakció 52 kDa-nál eluálódott (55. B ábra). Ezt követően megkezdtük a nukleinsav kötött UDE frakció karakterizálását.

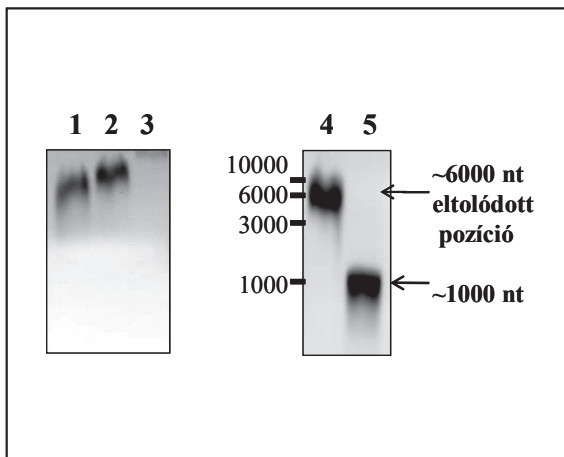


55. ábra: A: A rekombináns UDE fehérje elúciós profilja Ni-affinitás kromatográfia során. A 290 mM-os imidazol koncentrációnál a nukleinsav kötött frakciót, 590 mM-os koncentrációnál pedig a nukleinsavtól mentes frakciót eluáltuk. A vastag vonal a fehérje frakció 280 nm-en detektált UV-abszorbanciáját, míg a vékony vonal a DNS 260 nm-en mért abszorbanciáját jeleníti meg. A szaggatott vonal az imidazol gradienst jelöli.

B: A két UDE frakció analitikai gélszűrőssel kapott elúciós profilja. A fekete vonal a nukleinsav kötött, míg a szürke a nukleinsavtól mentes fehérje frakciót jelöli. A 9 ml-es elúciós térfogat 660 kDa, a 14,5 ml-es pedig 52 kDa látszólagos molekulatömegnek felel meg. A vastag vonal a fehérje frakció 280 nm-en detektált UV-abszorbanciáját, míg a vékony vonal a DNS 260 nm-en mért abszorbanciáját jeleníti meg.

Az UDE-nukleinsav komplexet DNázssal és RNázssal kezeltük, hogy azonosíthassuk a kötött nukleinsavat. Az agaróz gélen csak RNáz kezelés után észleltük a nukleinsav degradációját (56. ábra), amely azt bizonyította, hogy az UDE fehérje a tisztítása során jelentős mennyiségű RNS-t hoz magával.

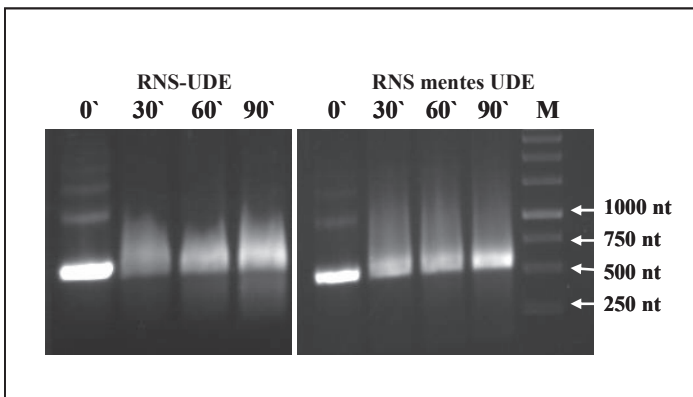
A kötött RNS látszólagos méretének meghatározásához az UDE-RNS komplexet Proteináz K-val emésztettük. Natív agaróz gélen ezután az 1000 bázispárnak megfelelő pozícióban viszonylag homogén jel jelent meg (56. ábra).



56. ábra: A nukleinsav kötött frakció karakterizálása. A bal oldali agaróz gél a nukleinsav kötött UDE frakció DNáz és RNáz emésztését mutatja. 1: kezeletlen, 2: DNáz kezelt, 3: RNáz kezelt minták. A jobb oldali natív agaróz gélen pedig a nukleinsav kötött UDE frakció Proteináz K kezelése látható. 4: intakt UDE-nukleinsav komplex, 5: Proteináz K-val emésztett frakció.

Az RNS kötött és az RNS mentes UDE frakciók UV-spektrumának kiértékelése után, a 260 és 280-on mért abszorbanciák arányából arra következtettünk, hogy egy UDE monomer körülbelül 17-22 nukleotidhoz kötődik. Ugyanahhoz az RNS molekulához tehát számos (kb. 50) UDE fehérje kötődhet nem szekvencia specifikus módon.

Annak ellenére, hogy az UDE fehérjét uracil-DNS degradáló enzimként azonosítottuk, potenciális RNS degradáló aktivitását is analizáltam. Az aktivitás tesztet in vitro szintetizált 471 nukleotidból álló kettősszálú RNS-en végeztem. Sem az RNS-t kötő sem a nukleinsavtól mentes UDE fehérje frakció nem mutatott az RNS szubsztráton aktivitást (57. ábra).

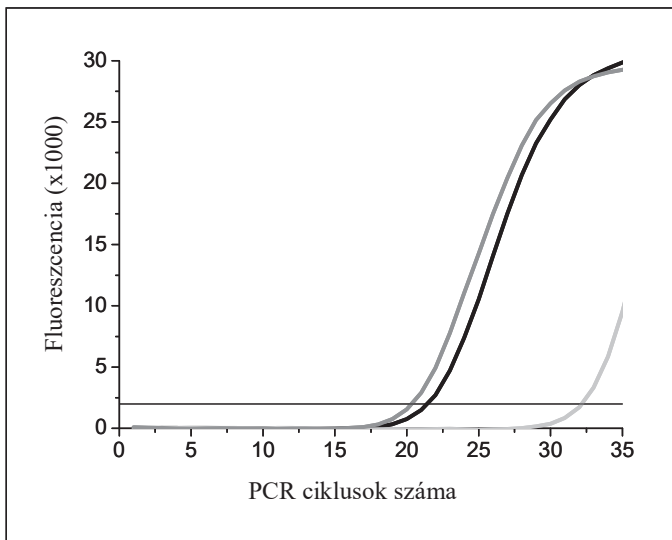


57. ábra: A rekombináns UDE nem rendelkezik RNáz- aktivitással. Az RNS-UDE és a nukleinsavtól mentes UDE frakció RNS degradáló aktivitását 471 nukleotid hosszú kettős szálú szintetikus RNS szubsztráton teszteltem. Az inkubációs időket a gélek felett tüntettem fel. A nyilak a különböző hosszúságú markerek pozícióját jelölik.

6.2.4.5.2 A kötött RNS tartalom azonosítása és fiziológus jelentősége

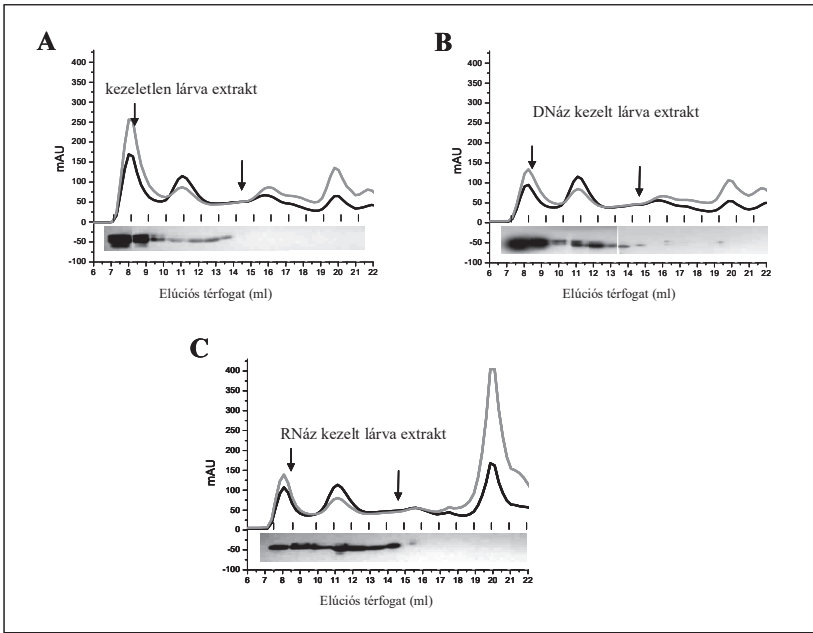
A rekombináns UDE fehérjével együtt tisztított RNS tartalom azonosítása céljából reverz transzkripción alapuló valós idejű PCR technikát alkalmaztunk. Az UDE által kötött RNS izolálását és reverz transzkripcióját követően specifikus primerekkel megpróbáltuk felszaporítani az UDE mRNS-t, amely a rekombináns overexpressziós rendszer miatt nagy mennyiségben jelen lehet, a 23S riboszómális fehérje V. doménjét, amely a translációhoz kötött *de novo* fehérje feltekeredést segíti, illetve kontrollként a GAPDH fehérje mRNS-ét.

A kísérlet az UDE mRNS és a 23S riboszómális fehérje V. doménjének jelenlétét is igazolta az UDE-RNS komplexben (58. ábra). Az eredmény azt sugallja, hogy az UDE-RNS komplex a translációhoz kapcsolódó *de novo* fehérje folding során alakul ki.



58. ábra: Az RNS-UDE RNS tartalmának karakterizálása valós idejű PCR-rel. Az UDE mRNS, a 23S riboszómális fehérje V. doménje, a GAPDH mRNS amplifikációs görbéit rendre szürke, fekete, világosszürke színek jelölik.

Azt is megvizsgáltuk, hogy az UDE fiziológias körülmények között is nagy mennyiségű RNS-t köt. *Drosophila melanogaster* lárva extraktot analitikai gélszűrőssel elemeztünk és az egyes frakciókban az UDE fehérje jelenlétét Western bloton követtük. Ugyanezt a kísérletet elvégeztük DNáz és RNáz kezelt lárva extraktokkal is. Eredményül azt kaptuk, hogy az intakt és a DNáz emésztett extraktok esetén az endogén UDE az oszlop kizárási térfogatának pozíciójában jelent meg (59. B ábra), hasonlóan a rekombináns fehérje RNS kötött frakciójához. Az RNáz kezelt lárva extraktnál az UDE elúciós profilja a rekombináns fehérje RNS mentes frakciójának profiljával egyezett meg (59. C ábra). A megfigyelés azt támasztja alá, hogy az endogén UDE jelentős része szintén RNS-sel komplexálódik.

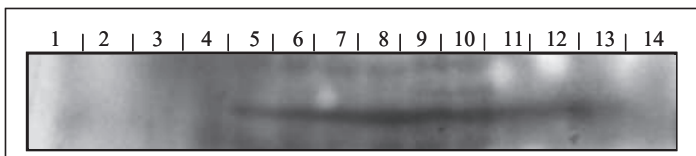


59. ábra: Az UDE fiziológiás formája RNS függő komplexálódást mutat. Az analitikai géliszűréssel kapott kromatogrammon a fekete vonal az extrakt 280 nm-en detektált UV-abszorbanciáját, míg a szürke vonal a 260 nm-en mért abszorbanciáját jeleníti meg. Az endogén UDE jelenlétét Western bloton követtük, melyek a kromatogrammok alatt helyezkednek el. A nyilak az RNS-UDE komplex illetve az RNS mentes fehérje vált pozícióját mutatják. A kezeletlen lárva extrakt analízise az **A** panelen, az RNáz kezelt a **B** panelen, a DNáz kezelt a **C** panelen látható.

6.2.4.6 Az UDE fehérje fejlődéshez kötött kontrollja

Az UDE fehérje kifejeződését a *Drosophila melanogaster* különböző fejlődési stádiumaiban Western bloton követtük a rekombináns UDE ellen termeltetett antitest segítségével. Azt figyeltük meg, hogy a fehérje a késői 3. stádiumú vándorló lárvákban jelenik meg először, szintje jelentősen megemelkedik a bábállapotok során, és még a fiatal felnőtt légyben is detektálható.

A bebábozódáshoz kötött UDE expressziós mintázata valamint a fehérje specifikus aktivitása mind azt támasztja alá, hogy az újonnan felfedezett enzim az *ecetmuslica* lárvá állapotok alatt felhalmozódó uracil-DNS felismerésében és degradálásában játszik szerepet, mely a metamorfózis során zajló sejthalál folyamatok indító jeleként szolgálhat.



60. ábra: Az UDE fehérje szintjének detektálása Western bloton. 1: embrió, 2: első lárvá stádium, 3: második lárvá stádium, 4: korai harmadik lárvá stádium, 5: vándorló, késői harmadik lárvá stádium, 6: korai báb stádium, 7: bábállapot fej kifejlődése előtt, 8: bábállapot fej kifejlődése után, max 17h, 9: bábállapot 24-42 h, 10: bábállapot 50 h, 11: bábállapot 80 h, 12: bábállapot >96 h, 13: fiatal légy, 14: felnőtt légy.

7. Összefoglalás

A *Drosophila* lárvákban hiányzik két DNS hibákat javító enzim, az uracil-DNS glikoziláz és a dUTPáz enzim, az ecetmuslicában így létrejöhet uracil-tartalmú DNS. Célul tűztem ki az uracil-DNS kimutatását *Drosophila* lárvális szövetekben. Összehasonlítottam a lárvákból és felnőtt egyedekből izolált genomi DNS-t, miután UNG-gal és APE-val - a BER mechanizmus tagjaival- kezeltém őket. A lárvális genomi DNS-ben jelentős degradációt detektáltam. Továbbá alkalmaztam egy még érzékenyebb módszert, az aldehid reaktív próbát, mellyel szintén kimutattam, hogy a lárvális DNS uracilt tartalmaz. A *Drosophila* szövetek uracil tartalmának mennyiségi meghatározására megkezdtem egy szintén érzékeny és szelektív analitikai módszer a HPLC-vel kapcsolt MS optimalizálását.

A bebábozódáskor kifejeződő uracil-DNS degradáló faktor (UDE) által felismert uracil a DNS-ben a *Drosophila* egyedfejlődésben jelátviteli szerepet tölthet be. Az UDE nem mutat hasonlóságot más uracil-DNS-t kötő faktorial és nem ismert homológ fehérjeszerkezet vagy funkció sem. A különböző proteázokkal elvégzett limitált proteolízissel szemben kiterjedt DNS-kötés által védett szegmenseket azonosítottam az N-terminális konzervált 1A és 1B motívumok mentén, míg a C-terminális konzervált 2-3-4 motívumokból álló rész kompaktnak bizonyult. Az N-terminális végén csonkolt (első motívum nélküli) fehérje képes stabilan feltekeredni. Vörös lisztbogárban (*Tribolium castaneum*) ez a csonkolt forma van jelen, mely megőrzi specificitását és katalitikus aktivitását. A fehérje uracil-DNS-re specifikus, egyesszálú uracil-tartalmú DNS-t hasít, és aktivitásához nem igényli hozzáadott kétértékű fémionok jelenlétét. Az UDE DNS kötő szegmenseinek karakterizálása során azonosítottam egy konzervált lizint (K137) a konzervált 1B motívumban, mely esszenciálisnak bizonyult a fehérje DNS-hasító funkciójához. Az elektroforetikus mobilitás tesztek azt igazolták, hogy az UDE hasonló affinitással kötődik a normál és az uracil-tartalmú oligonukleotidhoz is. A fehérjék triptofán fluoreszcenciáján alapuló kötődési analízis viszont azt mutatta, hogy a DNS-sel alkotott komplexben a fehérje képes különbséget tenni az uracil és a timin bázis között. Emellett az is kiderült, hogy az UDE fehérjével együtt tisztított nukleinsav a fehérjéhez szorosan kötődő RNS. Ecetmuslica báb extraktban ilyen RNS-függő UDE komplexalódást figyeltünk meg, ami az RNS kötés fiziológiás jelentőségére utal. Az UDE fehérje tehát egy új fehérjecsalád képviselője, amely a metamorfózishoz kapcsolódó uracil-DNS degradációjában vesz részt.

8. Summary

Fruitfly larvae lack two repair enzymes, the major uracil-DNA glycosylase and dUTPase, and may accumulate uracil-DNA. I set out to analyze the presence of uracil-DNA in *Drosophila* larval tissues. I compared genomic DNA from larvae and imago after treating them with UNG and APE, members of BER mechanism. In larval genomic DNA, notable degradation was detectable. I also applied a more sensitive method, the Aldehyde Reactive Probe assay, which was also capable to determine the uracil content of larval DNA. For quantitative determination of the uracil content of *Drosophila* tissues, we started with the optimization of HPLC - MS which is also a sensitive and selective analytical method.

Uracil in DNA may be used for signalling in *Drosophila* development *via* recognition by a novel uracil-DNA degrading factor (UDE) expressed during pupation. The UDE protein has no detectable similarity to any other uracil-DNA binding factors and has no structurally or functionally described homologues. Limited proteolysis with different proteases shows extensive protection by DNA at the N-terminal duplicated conserved Motif 1A/1B, and a well-folded domain within the C-terminal conserved Motifs 2-4. Fold prediction models for Motif 1A and 1B suggest similar α -helical bundles and two conserved positively charged surface patches that may bind DNA. A truncated protein construct, lacking one copy of the N-terminal conserved Motif 1, is capable to fold on its own. This physiologically occurring truncated isoform in *T. castaneum* preserved its specificity and catalytic activity. The protein is specific for uracil, it cuts single stranded uracil-containing DNA and does not require the presence of any divalent metal ions. I characterized DNA-binding segments of UDE and identified a conserved lysine residue (K-137) within conserved Motif 1B that may be essential for DNA-cleaving function. Electrophoretic mobility shift assay showed that UDE has comparable binding affinities towards normal and uracil-containing oligonucleotides. Binding assays based on protein tryptophan fluorescence revealed that the protein is capable of uracil/thymine distinction in complex with DNA. We also found that recombinant UDE is co-purified with significant amount of RNA species strongly bound to the protein. RNA-dependent complexation of UDE was also demonstrated in fruit-fly pupal extract suggesting physiological relevance of RNA-binding.

UDE represents a new class of proteins that process uracil-DNA with potential involvement in metamorphosis.

9. Közlemények listája

9.1. A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények

1. Békési, A., **Pukáncsik, M.**, Muha, V., Zagyva, I., Leveles, I., Hunyadi-Gulyás, E., Klement, E., Medzihradzky, K. F., Kele Z., Erdei A., Felföldi F., Kónya E., Vértessy B. G.
„A novel fruitfly protein under developmental control degrades uracil-DNA”

Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. 355 (3): p. 643-8.

2. Békési, A., Felföldi, F., **Pukáncsik, M.**, Zagyva, I., Vértessy, G.B.

Uracil-DNA nuclease: protein enzyme possessing nuclease activity specific for uracil containing nucleic acid, process for its preparation and methods of use

United States Patent and Trademark Office. 2005: USA. No.: 11/160040, 2005

3. **Pukáncsik M.**, Békési A, Klement E, Hunyadi-Gulyás E, Medzihradzky KF, Kosinski J, Bujnicki JM, Alfonso C, Rivas G, Vértessy BG.

„Physiological truncation and domain organization of a novel uracil-DNA-degrading factor”

FEBS J. 2010 Mar; 277 (5):1245-59.

4. **Pukáncsik M.**, Békési A., Horváth G., Kónya E., Vértessy B. G.

„Identification of conserved residues and segments responsible for specific DNA binding and catalytic activity of a novel uracil-sensor protein”

(közlésre beküldve)

5. Békési A., Haasz P., Felföldi L., **Pukáncsik M.**, Leveles I., Muha V., Hunyadi-Gulyás E., Erdei A., Medzihradzky K. F., Vértessy B. G.

“Association of RNA to the uracil-DNA degrading factor has major conformational effects and is potentially involved in protein folding”

(közlésre beküldve)

6. Muha V., Horváth A., Erdélyi M., **Pukáncsik M.**, Békési A., Hodoscsek B., Merényi G., Jankovics F. and Vértessy B. G.

“Uracil-DNA in Drosophila: interpretation and developmental involvement”

(közlésre beküldve)

9.2. Szóbeli előadások (az előadó neve aláhúzva)

2009: Pukáncsik M., Békési A., Klement E., Hunyadi-Gulyás E., Medzihradzsky KF, Kosinski J, Bujnicki JM, Alfonso C, Rivas G, Vértessy BG.

„*Structural and functional characterization of a novel uracil-DNA degrading protein*”

Straub Meeting of the Biological Research Center, Hung. Acad. Sci., 2009, Szeged, Hungary

2008: Pukáncsik M., Békési A., Klement E., Hunyadi-Gulyás E., Medzihradzsky KF, Kosinski J, Bujnicki JM, Vértessy BG.

„*Uracil-DNS degradáló faktor szerkezeti és funkcionális analízise*”

A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Szeged.

2007: Pukáncsik, M., Békési, A., Kónya, E., Zagyva, I., Vértessy, G. B.

„*Uracil-DNS nukleáz fehérjeszerkezeti jellemzése*”

A Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülése, Balatonszemes.

2007: Pukáncsik, M., Leveles, I., Muha, V., Zagyva, I., Hunyadi-Gulyás, É., Klement, É., Kele, Z., Medzihradzsky, F. K., Erdei, A., Vértessy, G. B., Békési, A.

„*A novel uracil-DNA specific nuclease in development of pupating insects.*”

Alexander von Humboldt Workshop on Structure-Based Approaches Towards Disease Control, Mátraháza.

2006: Békési, A., Muha, V., Pukáncsik, M., Leveles, I., Zagyva, I., Felföldi, F., Hunyadi-Gulyás, É., Klement, É., Burkovics, P., Haracska, L., Medzihradzsky, F. K., Erdei, A.,

Vértessy, G. B., „*Uracil-DNS nukleáz: egy új nukleáz család.*” A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Pécs.

9.3. Poszter előadások (az előadó neve aláhúzva)

2009: Békési A., Pukáncsik M., Muha V., Leveles I., Hunyadi-Gulyás É., Medzihradzsky F. K., Erdei A., Vértessy G. B.

„*Mérföldkövek az első uracil-DNS nukleáz enzim szerkezeti és funkcionális jellemzésében*”

Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Budapest.

2008: Békési Angéla, Pukáncsik Mária, Leveles Ibolya, Zagyva Imre, Vértessy G. Beáta

„*Az első uracil-DNS nukleáz funkcionális jellemzése*”

Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Szeged.

2007: Pukáncsik Mária, Angéla Békési, Imre Zagyva, Ibolya Leveles, Hunyadi-Gulyás Éva, Klement Éva, Medzihradzsky F. Katalin, Janusz Bujnicki, Vértessy Beáta.

„Uracil-DNS degradáló faktor doménanalízise”

Magyar Biokémia Egyesület Vándorgyűlése, Debrecen.

2007: M. Pukáncsik, A.Békési ,I. Zagyva, I. Leveles, Emese Kónya, F. Felföldi, É. Klement, K. F. Medzihradzsky, B. G. Vértessy.

„Structural analysis of a new nuclease”

EMBO Workshop on Integrated Approaches in Structural Enzymology

EMBL Hamburg

2007: M. Pukáncsik, A.Békési ,I. Zagyva, I. Leveles, Emese Kónya, F. Felföldi, É. Klement, K. F. Medzihradzsky, **B. G. Vértessy**.

„Structural analysis of a new nuclease”

SPINE2 First Annual Congress, Praha.

2007: M. Pukáncsik, A.Békési ,I. Zagyva, I. Leveles, F. Felföldi, É. Klement, K. F. Medzihradzsky, A. Erdei, P. Szabó, B. G. Vértessy.

„Characterization of the nuclease responsible for uracil-DNA signaling in *Drosophila melanogaster*”.

„UDE protein in the fly and design of specific mutants based on structural predictions”.

Alexander von Humboldt Workshop on Structure-Based Approaches Towards Disease Control, Mátraháza.

2006: Pukáncsik Mária, Békési Angéla, Felföldi Ferenc, Zagyva Imre, Leveles Ibolya, Hunyadi-Gulyás Éva, Medzihradzsky F. Katalin, Erdei Anna, Vértessy G. Beáta.

„Uracil-DNS-re specifikus nukleáz karakterizálása *Drosophila melanogaster*ben”.

Magyar Biokémia Egyesület Vándorgyűlése, Pécs.

2006: A. Békési, **M. Pukáncsik**, V. Muha, I. Zagyva, I. Leveles, F. Felföldi, É. Klement, K. F. Medzihradzsky, A. Erdei, P. Burkovics, L. Haracska, B. G. Vértessy.,

„Characterization of the nuclease responsible for uracil-DNA signaling in *Drosophila melanogaster*”

31st FEBS Congress, Istanbul.

9.4. További közlemények

1. Merényi G, Kónya E, Vértessy BG.

„*Drosophila* proteins involved in metabolism of uracil-DNA possess different types of nuclear localization signals”

FEBS J. 2010 May; 277 (9):2142-56.

2. Mária Pukáncsik.

„The interacting protein network of dUTPase: analysis by immunological methods”

MSC STUDENTS: CONFERENCE OF MSC STUDENTS,

Per. Pol. Chem. Eng., 47/2 (2003), 117-155.

10. Irodalomjegyzék

1. Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715.
2. Friedberg EC (2003) DNA damage and repair. *Nature* **421**, 436-440.
3. Friedberg EC, Walker, G. C., Siede, W. (1995). (1995) *DNA Repair and Mutagenesis* Washington, D. C.
4. Lehmann AR (2003) DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* **85**, 1101-1111.
5. Ishikawa T, Ide F, Qin X, Zhang S, Takahashi Y, Sekiguchi M, Tanaka K & Nakatsuru Y (2001) Importance of DNA repair in carcinogenesis: evidence from transgenic and gene targeting studies. *Mutat Res* **477**, 41-49.
6. Hanawalt PC (1994) Transcription-coupled repair and human disease. *Science* **266**, 1957-1958.
7. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM & Garewal H (2002) DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* **511**, 145-178.
8. Berardi P, Russell M, El-Osta A & Riabowol K (2004) Functional links between transcription, DNA repair and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2173-2180.
9. Vertessy BG & Toth J (2008) Keeping Uracil Out of DNA: Physiological Role, Structure and Catalytic Mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res*.
10. Pearl LH & Savva R (1996) The problem with pyrimidines. *Nat Struct Biol* **3**, 485-487.
11. Seeberg E, Eide L & Bjoras M (1995) The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* **20**, 391-397.
12. Lari SU, Chen CY, Vertessy BG, Morre J & Bennett SE (2006) Quantitative determination of uracil residues in Escherichia coli DNA: Contribution of ung, dug, and dut genes to uracil avoidance. *DNA Repair (Amst)* **5**, 1407-1420.
13. Duncan BK, Rockstroh PA & Warner HR (1978) Escherichia coli K-12 mutants deficient in uracil-DNA glycosylase. *J Bacteriol* **134**, 1039-1045.
14. Price AR & Cook SJ (1972) New deoxyribonucleic acid polymerase induced by Bacillus subtilis bacteriophage PBS2. *J Virol* **9**, 602-610.

15. Price AR & Frato J (1975) Bacillus subtilis deoxyuridinetriphosphatase and its bacteriophage PBS2-induced inhibitor. *J Biol Chem* **250**, 8804-8811.
16. Kiljunen S, Hakala K, Pinta E, Huttunen S, Pluta P, Gador A, Lonnberg H & Skurmik M (2005) Yersiniophage phiR1-37 is a tailed bacteriophage having a 270 kb DNA genome with thymidine replaced by deoxyuridine. *Microbiology* **151**, 4093-4102.
17. Duncan BK & Weiss B (1982) Specific mutator effects of ung (uracil-DNA glycosylase) mutations in Escherichia coli. *J Bacteriol* **151**, 750-755.
18. Warner HR, Duncan BK, Garrett C & Neuhard J (1981) Synthesis and metabolism of uracil-containing deoxyribonucleic acid in Escherichia coli. *J Bacteriol* **145**, 687-695.
19. Hochhauser SJ & Weiss B (1978) Escherichia coli mutants deficient in deoxyuridine triphosphatase. *J Bacteriol* **134**, 157-166.
20. Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO & Honjo T (1999) 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**, 18470-18476.
21. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y & Honjo T (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553-563.
22. Honjo T, Nagaoka H, Shinkura R & Muramatsu M (2005) AID to overcome the limitations of genomic information. *Nat Immunol* **6**, 655-661.
23. Burton WG, Grabowy CT & Sager R (1979) Role of methylation in the modification and restriction of chloroplast DNA in Chlamydomonas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1390-1394.
24. Krokan HE, Standal R & Slupphaug G (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* **325 (Pt 1)**, 1-16.
25. Krokan HE, Drablos F & Slupphaug G (2002) Uracil in DNA--occurrence, consequences and repair. *Oncogene* **21**, 8935-8948.
26. Fogg MJ, Pearl LH & Connolly BA (2002) Structural basis for uracil recognition by archaeal family B DNA polymerases. *Nat Struct Biol* **9**, 922-927.
27. Nyman PO (2001) Introduction. dUTPases. *Curr Protein Pept Sci* **2**, 277-285.
28. Kavli B, Sundheim O, Akbari M, Otterlei M, Nilsen H, Skorpen F, Aas PA, Hagen L, Krokan HE & Slupphaug G (2002) 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**, 39926-39936.

29. Plaxco KW & Goddard WA, 3rd (1994) Contributions of the thymine methyl group to the specific recognition of poly- and mononucleotides: an analysis of the relative free energies of solvation of thymine and uracil. *Biochemistry* **33**, 3050-3054.
30. Dogliotti E, Fortini P, Pascucci B & Parlanti E (2001) The mechanism of switching among multiple BER pathways. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **68**, 3-27.
31. Nilsen H, Rosewell I, Robins P, Skjelbred CF, Andersen S, Slupphaug G, Daly G, Krokan HE, Lindahl T & Barnes DE (2000) Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication. *Mol Cell* **5**, 1059-1065.
32. Hegde ML, Hazra TK & Mitra S (2008) Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res* **18**, 27-47.
33. Ljungquist S (1977) A new endonuclease from *Escherichia coli* acting at apurinic sites in DNA. *J Biol Chem* **252**, 2808-2814.
34. Ljungquist S & Lindahl T (1977) Relation between *Escherichia coli* endonucleases specific for apurinic sites in DNA and exonuclease III. *Nucleic Acids Res* **4**, 2871-2879.
35. Mol CD, Hosfield DJ & Tainer JA (2000) Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. *Mutat Res* **460**, 211-229.
36. Hosfield DJ, Guan Y, Haas BJ, Cunningham RP & Tainer JA (1999) Structure of the DNA repair enzyme endonuclease IV and its DNA complex: double-nucleotide flipping at abasic sites and three-metal-ion catalysis. *Cell* **98**, 397-408.
37. Allinson SL, Dianova, II & Dianov GL (2001) DNA polymerase beta is the major dRP lyase involved in repair of oxidative base lesions in DNA by mammalian cell extracts. *Embo J* **20**, 6919-6926.
38. Frosina G, Fortini P, Rossi O, Carrozzino F, Raspaglio G, Cox LS, Lane DP, Abbondandolo A & Dogliotti E (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* **271**, 9573-9578.
39. Matsumoto Y, Kim K & Bogenhagen DF (1994) Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Mol Cell Biol* **14**, 6187-6197.
40. Wilson SH (1998) Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta. *Mutat Res* **407**, 203-215.

41. Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, Sobol RW, Wilson SH & Dogliotti E (1998) Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry* **37**, 3575-3580.
42. Cappelli E, Taylor R, Cevasco M, Abbondandolo A, Caldecott K & Frosina G (1997) Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair. *J Biol Chem* **272**, 23970-23975.
43. Prasad R, Singhal RK, Srivastava DK, Molina JT, Tomkinson AE & Wilson SH (1996) Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. *J Biol Chem* **271**, 16000-16007.
44. Nicholl ID, Nealon K & Kenny MK (1997) Reconstitution of human base excision repair with purified proteins. *Biochemistry* **36**, 7557-7566.
45. Aravind L & Koonin EV (2000) The alpha/beta fold uracil DNA glycosylases: a common origin with diverse fates. *Genome Biol* **1**, RESEARCH0007.
46. Sandigursky M, Sandigursky S, Sonati P, Daly MJ & Franklin WA (2004) Multiple uracil-DNA glycosylase activities in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amst)* **3**, 163-169.
47. Sandigursky M & Franklin WA (1999) Thermostable uracil-DNA glycosylase from *Thermotoga maritima* a member of a novel class of DNA repair enzymes. *Curr Biol* **9**, 531-534.
48. Sandigursky M & Franklin WA (2000) Uracil-DNA glycosylase in the extreme thermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *J Biol Chem* **275**, 19146-19149.
49. Lindahl T (1974) An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 3649-3653.
50. Olsen LC, Aasland R, Wittwer CU, Krokan HE & Helland DE (1989) Molecular cloning of human uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme. *Embo J* **8**, 3121-3125.
51. Kavli B, Slupphaug G, Mol CD, Arvai AS, Peterson SB, Tainer JA & Krokan HE (1996) Excision of cytosine and thymine from DNA by mutants of human uracil-DNA glycosylase. *Embo J* **15**, 3442-3447.
52. Wang ZG, Smith DG & Mosbaugh DW (1991) Overproduction and characterization of the uracil-DNA glycosylase inhibitor of bacteriophage PBS2. *Gene* **99**, 31-37.

53. Parikh SS, Mol CD, Slupphaug G, Bharati S, Krokan HE & Tainer JA (1998) Base excision repair initiation revealed by crystal structures and binding kinetics of human uracil-DNA glycosylase with DNA. *Embo J* **17**, 5214-5226.
54. Gallinari P & Jiricny J (1996) A new class of uracil-DNA glycosylases related to human thymine-DNA glycosylase. *Nature* **383**, 735-738.
55. Hardeland U, Bentele M, Lettieri T, Steinacher R, Jiricny J & Schar P (2001) Thymine DNA glycosylase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **68**, 235-253.
56. Bellacosa A (2001) Role of MED1 (MBD4) Gene in DNA repair and human cancer. *J Cell Physiol* **187**, 137-144.
57. Otterlei M, Haug T, Nagelhus TA, Slupphaug G, Lindmo T & Krokan HE (1998) 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**, 4611-4617.
58. Hardeland U, Bentele M, Jiricny J & Schar P (2003) The versatile thymine DNA-glycosylase: a comparative characterization of the human, Drosophila and fission yeast orthologs. *Nucleic Acids Res* **31**, 2261-2271.
59. Larsson G, Svensson LA & Nyman PO (1996) Crystal structure of the Escherichia coli dUTPase in complex with a substrate analogue (dUDP). *Nat Struct Biol* **3**, 532-538.
60. Barabas O, Pongracz V, Kovari J, Wilmanns M & Vertessy BG (2004) Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase. *J Biol Chem* **279**, 42907-42915.
61. Traut TW (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* **140**, 1-22.
62. Ladner RD & Caradonna SJ (1997) 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**, 19072-19080.
63. Canman CE, Radany EH, Parsels LA, Davis MA, Lawrence TS & Maybaum J (1994) Induction of resistance to fluorodeoxyuridine cytotoxicity and DNA damage in human tumor cells by expression of Escherichia coli deoxyuridinetriphosphatase. *Cancer Res* **54**, 2296-2298.
64. Pugacheva EN, Ivanov AV, Kravchenko JE, Kopnin BP, Levine AJ & Chumakov PM (2002) Novel gain of function activity of p53 mutants: activation of the dUTPase gene expression leading to resistance to 5-fluorouracil. *Oncogene* **21**, 4595-4600.

65. Vertessy BG, Zalud P, Nyman PO & Zeppezauer M (1994) Identification of tyrosine as a functional residue in the active site of Escherichia coli dUTPase. *Biochim Biophys Acta* **1205**, 146-150.
66. Munoz-Pinedo C, Oliver FJ & Lopez-Rivas A (2001) Apoptosis of haematopoietic cells upon thymidylate synthase inhibition is independent of p53 accumulation and CD95-CD95 ligand interaction. *Biochem J* **353**, 101-108.
67. Rode W, Dabrowska M, Zielinski Z, Golos B, Wranicz M, Felczak K & Kulikowski T (2000) Trichinella spiralis and Trichinella pseudospiralis: developmental patterns of enzymes involved in thymidylate biosynthesis and pyrimidine salvage. *Parasitology* **120 (Pt 6)**, 593-600.
68. Lerner DL, Wagaman PC, Phillips TR, Prospero-Garcia O, Henriksen SJ, Fox HS, Bloom FE & Elder JH (1995) Increased mutation frequency of feline immunodeficiency virus lacking functional deoxyuridine-triphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7480-7484.
69. Pyles RB, Sawtell NM & Thompson RL (1992) Herpes simplex virus type 1 dUTPase mutants are attenuated for neurovirulence, neuroinvasiveness, and reactivation from latency. *J Virol* **66**, 6706-6713.
70. Threadgill DS, Steagall WK, Flaherty MT, Fuller FJ, Perry ST, Rushlow KE, Le Grice SF & Payne SL (1993) Characterization of equine infectious anemia virus dUTPase: growth properties of a dUTPase-deficient mutant. *J Virol* **67**, 2592-2600.
71. Spiering AL & Deutsch WA (1981) Apurinic DNA endonucleases from Drosophila melanogaster embryos. *Mol Gen Genet* **183**, 171-174.
72. Spiering AL & Deutsch WA (1986) Drosophila apurinic/aprimidinic DNA endonucleases. Characterization of mechanism of action and demonstration of a novel type of enzyme activity. *J Biol Chem* **261**, 3222-3228.
73. Deutsch WA (1987) Enzymatic studies of DNA repair in Drosophila melanogaster. *Mutat Res* **184**, 209-215.
74. Deutsch WA (1995) Why do pupating insects lack an activity for the repair of uracil-containing DNA? One explanation involves apoptosis. *Insect Mol Biol* **4**, 1-5.
75. Aravind L, Walker DR & Koonin EV (1999) Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res* **27**, 1223-1242.
76. Bekesi A, Zagyva I, Hunyadi-Gulyas E, Pongracz V, Kovari J, Nagy AO, Erdei A, Medzihradzsky KF & Vertessy BG (2004) Developmental regulation of dUTPase in Drosophila melanogaster. *J Biol Chem* **279**, 22362-22370.

77. Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.
78. Bekesi A, Pukancsik M, Muha V, Zagyva I, Leveles I, Hunyadi-Gulyas E, Klement E, Medzihradzsky KF, Kele Z, Erdei A, Felfoldi F, Konya E & Vertessy BG (2007) A novel fruitfly protein under developmental control degrades uracil-DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **355**, 643-648.
79. van Kuilenburg AB, van Lenthe H, Löffler M & van Gennip AH (2004) Analysis of pyrimidine synthesis "de novo" intermediates in urine and dried urine filter- paper strips with HPLC-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* **50**, 2117-2124.
80. Ren J, Ulvik A, Refsum H & Ueland PM (2002) Uracil in human DNA from subjects with normal and impaired folate status as determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **74**, 295-299.
81. Berrow NS, Alderton D & Owens RJ (2009) The precise engineering of expression vectors using high-throughput In-Fusion PCR cloning. *Methods Mol Biol* **498**, 75-90.
82. Berrow NS, Alderton D, Sainsbury S, Nettleship J, Assenberg R, Rahman N, Stuart DI & Owens RJ (2007) A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res* **35**, e45.
83. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ & Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.
84. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
85. Gallager S, Winston, S. E., Fuller, S. A., Hurrell, J. G. R. (1997) Immunoblotting and Immunodetection. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel FM, Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., ed^eds), pp. 10.18. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
86. Bornstein P & Balian G (1977) Cleavage at Asn-Gly bonds with hydroxylamine. *Methods Enzymol* **47**, 132-145.
87. Schuck P, Perugini MA, Gonzales NR, Howlett GJ & Schubert D (2002) Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophys J* **82**, 1096-1111.
88. Schuck P (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* **78**, 1606-1619.
89. Cole JL (2004) Analysis of heterogeneous interactions. *Methods Enzymol* **384**, 212-232.

90. Laue TM, Shah, B.D., Ridgeway, T.M., and Pelletier, S.L. (1992) Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science* ed^eds), pp. pp. 90-125.
91. Petsko GA, R. D. (2004) *Protein Structure and Function* New Science Press.
92. Whitmore L & Wallace BA (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392-400.
93. Andrade MA, Chacon P, Merelo JJ & Moran F (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng* **6**, 383-390.
94. Deleage G & Geourjon C (1993) An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. *Comput Appl Biosci* **9**, 197-199.
95. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ & Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
96. Dosztanyi Z, Csizmok V, Tompa P & Simon I (2005) IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* **21**, 3433-3434.
97. Ward JJ, Sodhi JS, McGuffin LJ, Buxton BF & Jones DT (2004) Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J Mol Biol* **337**, 635-645.
98. Yang ZR, Thomson R, McNeil P & Esnouf RM (2005) RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics* **21**, 3369-3376.
99. Kosinski J, Cymerman IA, Feder M, Kurowski MA, Sasin JM & Bujnicki JM (2003) A "Frankenstein's monster" approach to comparative modeling: merging the finest fragments of Fold-Recognition models and iterative model refinement aided by 3D structure evaluation. *Proteins* **53 Suppl 6**, 369-379.
100. Clark AG & Eisen MB & Smith DR & Bergman CM & Oliver B & Markow TA & Kaufman TC & Kellis M & Gelbart W & Iyer VN & Pollard DA & Sackton TB & Larracuent AM & Singh ND & Abad JP & Abt DN & Adryan B & Aguade M & Akashi H & Anderson WW & Aquadro CF & Ardell DH & Arguello R & Artieri CG & Barbash DA & Barker D & Barsanti P & Batterham P & Batzoglou S & Begun D & Bhutkar A & Blanco E & Bosak SA & Bradley RK & Brand AD & Brent MR &

Brooks AN & Brown RH & Butlin RK & Caggese C & Calvi BR & Bernardo de Carvalho A & Caspi A & Castrezana S & Celniker SE & Chang JL & Chapple C & Chatterji S & Chinwalla A & Civetta A & Clifton SW & Comeron JM & Costello JC & Coyne JA & Daub J & David RG & Delcher AL & Delehaunty K & Do CB & Ebling H & Edwards K & Eickbush T & Evans JD & Filipski A & Findeiss S & Freyhult E & Fulton L & Fulton R & Garcia AC & Gardiner A & Garfield DA & Garvin BE & Gibson G & Gilbert D & Gnerre S & Godfrey J & Good R & Gotea V & Gravely B & Greenberg AJ & Griffiths-Jones S & Gross S & Guigo R & Gustafson EA & Haerty W & Hahn MW & Halligan DL & Halpern AL & Halter GM & Han MV & Heger A & Hillier L & Hinrichs AS & Holmes I & Hoskins RA & Hubisz MJ & Hultmark D & Huntley MA & Jaffe DB & Jagadeeshan S & Jeck WR & Johnson J & Jones CD & Jordan WC & Karpen GH & Kataoka E & Keightley PD & Kheradpour P & Kirkness EF & Koerich LB & Kristiansen K & Kudrna D & Kulathinal RJ & Kumar S & Kwok R & Lander E & Langley CH & Lapoint R & Lazzaro BP & Lee SJ & Levesque L & Li R & Lin CF & Lin MF & Lindblad-Toh K & Llopart A & Long M & Low L & Lozovsky E & Lu J & Luo M & Machado CA & Makalowski W & Marzo M & Matsuda M & Matzkin L & McAllister B & McBride CS & McKernan B & McKernan K & Mendez-Lago M & Minx P & Mollenhauer MU & Montooth K & Mount SM & Mu X & Myers E & Negre B & Newfeld S & Nielsen R & Noor MA & O'Grady P & Pachter L & Papacit M & Parisi MJ & Parisi M & Parts L & Pedersen JS & Pesole G & Phillippy AM & Ponting CP & Pop M & Porcelli D & Powell JR & Prohaska S & Pruitt K & Puig M & Quesneville H & Ram KR & Rand D & Rasmussen MD & Reed LK & Reenan R & Reily A & Remington KA & Rieger TT & Ritchie MG & Robin C & Rogers YH & Rohde C & Rozas J & Rubenfield MJ & Ruiz A & Russo S & Salzberg SL & Sanchez-Gracia A & Saranga DJ & Sato H & Schaeffer SW & Schatz MC & Schlenke T & Schwartz R & Segarra C & Singh RS & Sirot L & Sirota M & Sisneros NB & Smith CD & Smith TF & Spieth J & Stage DE & Stark A & Stephan W & Strausberg RL & Strempel S & Sturgill D & Sutton G & Sutton GG & Tao W & Teichmann S & Tobar YN & Tomimura Y & Tsolas JM & Valente VL & Venter E & Venter JC & Vicario S & Vieira FG & Vilella AJ & Villasante A & Walenz B & Wang J & Wasserman M & Watts T & Wilson D & Wilson RK & Wing RA & Wolfner MF & Wong A & Wong GK & Wu CI & Wu G & Yamamoto D & Yang HP & Yang SP & Yorke JA & Yoshida K & Zdobnov E & Zhang P & Zhang Y & Zimin AV & Baldwin J & Abdouelleil A & Abdulkadir J &

- Abebe A & Abera B & Abreu J & Acer SC & Aftuck L & Alexander A & An P & Anderson E & Anderson S & Arachi H & Azer M & Bachantsang P & Barry A & Bayul T & Berlin A & Bessette D & Bloom T & Blye J & Boguslavskiy L & Bonnet C & Boukhgalter B & Bourzgui I & Brown A & Cahill P & Channer S & Cheshatsang Y & Chuda L & Citroen M & Collymore A & Cooke P & Costello M & D'Aco K & Daza R & De Haan G & DeGray S & DeMaso C & Dhargay N & Dooley K & Dooley E & Doricent M & Dorje P & Dorjee K & Dupes A & Elong R & Falk J & Farina A & Faro S & Ferguson D & Fisher S & Foley CD & Franke A & Friedrich D & Gadbois L & Gearin G & Gearin CR & Giannoukos G & Goode T & Graham J & Grandbois E & Grewal S & Gyaltzen K & Hafez N & Hagos B & Hall J & Henson C & Hollinger A & Honan T & Huard MD & Hughes L & Hurhula B & Husby ME & Kamat A & Kanga B & Kashin S & Khazanovich D & Kisner P & Lance K & Lara M & Lee W & Lennon N & Letendre F & LeVine R & Lipovsky A & Liu X & Liu J & Liu S & Lokyitsang T & Lokyitsang Y & Lubonja R & Lui A & MacDonald P & Magnisalis V & Maru K & Matthews C & McCusker W & McDonough S & Mehta T & Meldrim J & Meneus L & Mihai O & Mihalev A & Mihova T & Mittelman R & Mlenga V & Montmayeur A & Mulrain L & Navidi A & Naylor J & Negash T & Nguyen T & Nguyen N & Nicol R & Norbu C & Norbu N & Novod N & O'Neill B & Osman S & Markiewicz E & Oyono OL & Patti C & Phunkhang P & Pierre F & Priest M & Raghuraman S & Rege F & Reyes R & Rise C & Rogov P & Ross K & Ryan E & Settipalli S & Shea T & Sherpa N & Shi L & Shih D & Sparrow T & Spaulding J & Stalker J & Stange-Thomann N & Stavropoulos S & Stone C & Strader C & Tesfaye S & Thomson T & Thoulutsang Y & Thoulutsang D & Topham K & Topping I & Tsamla T & Vassiliev H & Vo A & Wangchuk T & Wangdi T & Weiland M & Wilkinson J & Wilson A & Yadav S & Young G & Yu Q & Zembek L & Zhong D & Zimmer A & Zwirko Z & Alvarez P & Brockman W & Butler J & Chin C & Grabherr M & Kleber M & Mauceli E & MacCallum I (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* **450**, 203-218.
101. Stuebaker AW, Balendiran GK & Williams MV (2001) The herpesvirus encoded dUTPase as a potential chemotherapeutic target. *Curr Protein Pept Sci* **2**, 371-379.
102. DeLano W (2002) *The PyMOL Molecular Graphics System*.
103. Gerald Rubin AS, Roger Hoskins, Hugo Bellen, Susan Celniker, and Gary Karpen laboratories (2004) *Drosophila* Genome Project, Release 4. In ed^eds). Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP).

104. Cantor CRaS, P. R. (1980) *Biophysical Chemistry* W. H. Freeman and Company, San Francisco.
105. Matulis D & Lovrien R (1998) 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation. *Biophys J* **74**, 422-429.
106. Ostermeier M, Nixon AE, Shim JH & Benkovic SJ (1999) Combinatorial protein engineering by incremental truncation. *Proc Natl Acad Sci US A* **96**, 3562-3567.
107. Yumerefendi H, Tarendeau F, Mas PJ & Hart DJ ESPRIT: An automated, library-based method for mapping and soluble expression of protein domains from challenging targets. *J Struct Biol*.
108. Cornvik T, Dahlroth SL, Magnusdottir A, Flodin S, Engvall B, Lieu V, Ekberg M & Nordlund P (2006) An efficient and generic strategy for producing soluble human proteins and domains in *E. coli* by screening construct libraries. *Proteins* **65**, 266-273.
109. Beckett D, Kovaleva E & Schatz PJ (1999) A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci* **8**, 921-929.
110. Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas PJ, Bougault CM, Boulo S, Baudin F, Ruigrok RW, Daigle N, Ellenberg J, Cusack S, Simorre JP & Hart DJ (2007) Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 229-233.
111. Merenyi G, Konya E & Vertessy BG *Drosophila* proteins involved in metabolism of uracil-DNA possess different types of nuclear localization signals. *FEBS J* **277**, 2142-2156.
112. Hart DJ & Tarendeau F (2006) Combinatorial library approaches for improving soluble protein expression in *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**, 19-26.
113. Tarendeau F, Crepin T, Guilligay D, Ruigrok RW, Cusack S & Hart DJ (2008) Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathog* **4**, e1000136.
114. Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, Sehr P, Lewis J, Ruigrok RW, Ortin J, Hart DJ & Cusack S (2008) The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 500-506.
115. Mitrophanous K, Yoon S, Rohll J, Patil D, Wilkes F, Kim V, Kingsman S, Kingsman A & Mazarakis N (1999) Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector. *Gene Ther* **6**, 1808-1818.

116. Wallner B, Fang H & Elofsson A (2003) Automatic consensus-based fold recognition using Pcons, ProQ, and Pmodeller. *Proteins* **53 Suppl 6**, 534-541.
117. Kosinski J, Gajda MJ, Cymerman IA, Kurowski MA, Pawlowski M, Boniecki M, Obarska A, Papaj G, Sroczynska-Obuchowicz P, Tkaczuk KL, Sniezynska P, Sasin JM, Augustyn A, Bujnicki JM & Feder M (2005) FRankenstein becomes a cyborg: the automatic recombination and realignment of fold recognition models in CASP6. *Proteins* **61 Suppl 7**, 106-113.
118. Doetsch PW & Cunningham RP (1990) The enzymology of apurinic/aprimidinic endonucleases. *Mutat Res* **236**, 173-201.
119. You HJ, Swanson RL & Doetsch PW (1998) *Saccharomyces cerevisiae* possesses two functional homologues of *Escherichia coli* endonuclease III. *Biochemistry* **37**, 6033-6040.
120. Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, Otterlei M & Slupphaug G (2000) Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett* **476**, 73-77.
121. Gottlin EB, Rudolph AE, Zhao Y, Matthews HR & Dixon JE (1998) Catalytic mechanism of the phospholipase D superfamily proceeds via a covalent phosphohistidine intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9202-9207.
122. Girard PM, Guibourt N & Boiteux S (1997) The Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: a 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase/AP lyase whose lysine 241 is a critical residue for catalytic activity. *Nucleic Acids Res* **25**, 3204-3211.
123. Cheng YC, Hsueh CC, Lu SC & Liao TH (2006) Identification of three crucial histidine residues (His115, His132 and His297) in porcine deoxyribonuclease II. *Biochem J* **398**, 177-185.
124. Lakowicz JR (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy* Plenum Press, New York.