



---

**BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM  
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR  
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA**

**A DNS-BELI URACILSZINT JELENTŐSÉGÉNEK ÉS A  
METABOLIZMUSÁBAN FONTOS SZEREPET JÁTSZÓ FEHÉRJÉK  
VIZSGÁLATA**



**Tézisfüzet**

**Szerző: Nagy Kinga**  
okleveles biomérnök

**Témavezető: Prof. Vértessy G. Beáta**  
az MTA doktora, egyetemi tanár

Készült a Magyar Tudományos Akadémia  
Természettudományi Kutatóközpont  
Enzimológiai Intézetében



**Budapest, 2019**

## 1 Bevezetés és irodalmi áttekintés

A genom integritásának megőrzése minden élőlény számára nagy fontossággal bír. A DNS-ben bekövetkező változások, mutációk számos megbetegedés (köztük gyakran daganatos és neurodegeneratív megbetegedések) forrásai lehetnek, illetve akár a sejt pusztulásához is vezethetnek. A különböző típusú elváltozásokra specifikus hibajavító mechanizmusok alakultak ki, melyek többsége megtalálható a baktériumoktól kezdve egészen az emberig. Amennyiben a károsodás a DNS egyik szálát érinti valamelyik kivágásos mechanizmus (BER - báziskivágásos hibajavítás, MMR - hamispár javítás, NER - nukleotid kivágó javítás) fogja javítani a hibát. Kettős száltörés esetében a sérülés javítására két fő hibajavító útvonal alakult ki. A homológ rekombináción alapuló javítás (HR), valamint a nem homológ végek összekapcsolása (NHEJ)<sup>1,2,3,4</sup>.

Az egyik ilyen leggyakrabban bekövetkező elváltozás az uracil megjelenése a DNS-ben. A DNS-be kétféleképpen jelenhet meg: i, már DNS-ben jelenlévő citozinok spontán vagy enzimatis hatásra bekövetkező oxidatív dezaminációja során uracil keletkezik. ii, DNS szintézis során, mivel a DNS polimerázok az alacsony szubsztrát specifitásuk révén nem képesek különbséget tenni a dUTP és a dTTP között. Ekkor a sejten belüli arányuktól függ, hogy melyik fog nagyobb valószínűséggel beépülni adeninnel szemben. Az uracil-DNS glikoziláz (UDG) enzimcsalád tagjai felelősek a DNS-ben megjelenő uracil bázisok eltávolításáért, együttes aktivitásuknak köszönhetően mind az adeninnel, mind pedig a guaninnal szemközti uracilok kivágása megtörténik a BER mechanizmus által<sup>5</sup>.

A uracil DNS-ben való megjelenése nem minden esetben számít hibának. Néhány példa a természetben előforduló esetekre, ahol a DNS-beli uracil normális, vagy megjelenése nélkülözhetetlen a sejtben lezajló egyes folyamatokhoz:

**i, az immunrendszer működésének esetében:** Az antitesteket termelő B-limfociták esetében kimutatták, hogy antigén hatására történő aktivációjukat követően egy APOBEC enzimcsalád egyik tagja, az AID (aktiválás-indukált dezamináz) enzim a citozin bázisok dezaminációja

---

<sup>1</sup> Hans E Krokan and Magnar Bjørås, 'Base Excision Repair.', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5.4 (2013), a012583 <<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>>.

<sup>2</sup> Guo-Min Li, 'Mechanisms and Functions of DNA Mismatch Repair.', *Cell Research*, 18.1 (2008), 85–98 <<https://doi.org/10.1038/cr.2007.115>>.

<sup>3</sup> Graciela Spivak, 'Nucleotide Excision Repair in Humans.', *DNA Repair*, 36 (2015), 13–18 <<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.09.003>>.

<sup>4</sup> Joonyoung Her and Samuel F Bunting, 'How Cells Ensure Correct Repair of DNA Double-Strand Breaks.', *The Journal of Biological Chemistry*, 293.27 (2018), 10502–11 <<https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000371>>.

<sup>5</sup> Elisa Fadda and Régis Pomès, 'On the Molecular Basis of Uracil Recognition in DNA: Comparative Study of T-A versus U-A Structure, Dynamics and Open Base Pair Kinetics.', *Nucleic Acids Research*, 39.2 (2011), 767–80 <<https://doi.org/10.1093/nar/gkq812>>.

révén uracilok megjelenését katalizálja a DNS-ben. Az uracilok egy része javítatlan marad, melyek pontmutációkat eredményeznek, valamint a hibajavítás során kettős száltörések keletkeznek a DNS-en, amelyek fontos szerepet játszanak a szomatikus hipermutációban, valamint az osztályváltó rekombinációban, ezzel pedig a keletkező antitestek változatosságának kialakításában<sup>6</sup>. Az APOBEC enzimcsalád más tagjainak (elsősorban az APOBEC3 alcsalád tagjai) is fontos szerep jut a vírusokkal szembeni immunitásban. Szükségszerű, hogy ezen DNS módosító enzimek működése szigorú szabályozás alatt álljon. Az APOBEC enzimcsalád tagjai közül a hármas alcsalád tagjai tehetők felelőssé „kataegis” típusú mutációk kialakulásáért. A „kataegis” görögül zivatart jelent. A molekuláris biológiában a „kataegis” a rákos genomokban azonosított lokalizált hipermutáció mintáját írja le. Ilyen típusú mutációs mintázatról akkor beszélünk, amennyiben a rákos sejtek genetikai állományának kis kiterjedésű régióiban egyszerre nagyszámú mutáció jelenik meg. Ezekben a régiókban az alapmutációk szinte kizárólag citozin és timin között fordulnak elő. Az APOBEC3B az egyetlen dezamináz családtag, amely konstitutív nukleáris lokalizációval rendelkezik. Emellett szignifikánsan megemelkedett expressziós szintet figyeltek meg emlő-, méh-, hólyag-, fej / nyaki-, valamint tüdőrák esetében (az egészséges szövettípusok expressziós szintjéhez viszonyítva)<sup>7</sup>. Munkám során célt volt a magas APOBEC3B expressziós szint hatásának vizsgálata a genomi DNS uracilszintjére p53 proficiens és deficiens 293 (HEK) sejt vonalak esetében. A genomi uracilszint vizsgálatára egy - a jelen dolgozat tárgyát is képező - a kutatócsoportunk által kidolgozott dot blot alapú módszert használtam. A módszer alapja, hogy az uracil DNS-ből való eltávolításában legjelentősebb szereppel bíró enzimet, az uracil-DNS glikoziláz (UNG) inaktív mutánsát használjuk mint specifikus uracil szenzort.

**ii, A *Drosophila melanogaster* egyedfejlődésének esetében:** A *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) genomja nem tartalmazza az UNG enzimet, lárvális stádiumokban pedig a dUTP/dTTP szint alacsony tartásáért felelős dUTPáz enzim sincs jelen a szövetekben. A két fő olyan enzim hiányában, amely a genomi uracilszint alacsony tartásáért felelős, megemelkedik a DNS uracil tartalma. Míg a pete genomi DNS-ében még nem detektálható számottevő uracil, ennek mértéke a bebábozódás előtti, harmadik lárva stádiumban éri el a legmagasabb szintet. Emellett felmerül a kérdés, hogy vajon az *ung* gén hiányában kódol-e az

---

<sup>6</sup> M Muramatsu and others, ‘Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme.’, *Cell*, 102.5 (2000), 553–63  
<[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00078-7)>.

<sup>7</sup> Stefan Rebhandl and others, ‘AID/APOBEC Deaminases and Cancer.’, *Oncoscience*, 2.4 (2015), 320–33  
<<https://doi.org/10.18632/oncoscience.155>>.

ecetmuslica genomja más olyan fehérjét, amely az uracilos DNS eliminálásáért felelős<sup>8</sup>. A csoportunknak 2007-ben sikerült azonosítania az UDE (uracil-DNS degradáló faktor) fehérjét, amely glikoziláz aktivitással nem rendelkezik, azonban specifikusan degradálja az uracilos DNS-t. Az enzim működése szigorú szabályozás alatt áll, csak a bebábozódás előtt kimutatható az aktivitása. Az ecetmuslica egyedfejlődése során a lárva, báb és imágó állapotok alatt megemelkedett uracilszintnek fontos szerepe lehet a teljes átalakulás során lejátszódó sejthalál folyamatokban. Az uracil tartalom a lárvák szöveti típusától függően is változik. A nyálmirigy, amely a bebábozódás során fellépő dagradáció egyik reprezentatív szövete, nagy mennyiségű uracilt halmoz fel, míg az immaginális diszkuszok amelyek nem mennek át a metamorfózissal összekapcsolt sejthalál folyamatokban, sokkal kevesebb uracilt tartalmaznak. Az uracil mennyisége szignifikánsan csökken a bebábozódást követően a teljes átalakulás során. Az azonosított UDE fehérjének feltételezhetően szerepe van a bebábozódást követően a teljes átalakulás során elpusztuló sejtek megemelkedett uracil tartalmú DNS-ének degradálásában. A fehérjének semmilyen homológot nem találtak fehérje adatbázisokban, amelyek szerkezete vagy funkciója ismert lenne. Szekvenciálisan hasonló fehérjéket azonban sikerült azonosítani más teljes átalakulással fejlődő rovarok esetében is, mint pl.: a háziméh, a selyemhernyó, valamint a maláriaszúnyog<sup>9</sup>. A fehérje rendelkezik egy nukleáris lokalizációs szignállal, ami a sejten belül sejtmagi dúsulást eredményez<sup>10</sup>. Munkám során célom volt az UDE fehérje szerkezeti analízise.

**iii, Uracilos genommal rendelkező vírusok esetében:** Olyan vírusok is léteznek, melyek DNS-e timin helyett szinte teljes egészében uracil bázissal helyettesített. Ilyen például a *Bacillus subtilis*-t fertőző PBS fág, a *Yersinia* fajokat fertőző  $\Phi$ R1-37 bakteriofág, valamint a *Staphylococcus*okat fertőző S6 fág<sup>11,12,13</sup>. Ahhoz, hogy a fág létre tudja hozni, és fent tudja

---

<sup>8</sup> Villő Muha and others, 'Uracil-Containing DNA in *Drosophila*: Stability, Stage-Specific Accumulation, and Developmental Involvement.', *PLoS Genetics*, 8.6 (2012), e1002738 <<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002738>>.

<sup>9</sup> Angéla Békési and others, 'A Novel Fruitfly Protein under Developmental Control Degrades Uracil-DNA', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355.3 (2007), 643–48 <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.196>>.

<sup>10</sup> Gábor Merényi, Emese Kónya, and Beáta G Vértessy, 'Drosophila Proteins Involved in Metabolism of Uracil-DNA Possess Different Types of Nuclear Localization Signals.', *The FEBS Journal*, 277.9 (2010), 2142–56 <<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07630.x>>.

<sup>11</sup> I TAKAHASHI and J MARMUR, 'Replacement of Thymidylic Acid by Deoxyuridylic Acid in the Deoxyribonucleic Acid of a Transducing Phage for *Bacillus subtilis*.' , *Nature*, 197 (1963), 794–95 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13980287>>.

<sup>12</sup> Saija Kiljunen and others, 'Yersiniophage PhiR1-37 Is a Tailed Bacteriophage Having a 270 Kb DNA Genome with Thymidine Replaced by Deoxyuridine.', *Microbiology (Reading, England)*, 151.Pt 12 (2005), 4093–4102 <<https://doi.org/10.1099/mic.0.28265-0>>.

<sup>13</sup> Jumpei Uchiyama and others, 'Intragenus Generalized Transduction in *Staphylococcus* Spp. by a Novel Giant Phage.', *The ISME Journal*, 8.9 (2014), 1949–52 <<https://doi.org/10.1038/ismej.2014.29>>.

tartani uracilos DNS-ét egy olyan sejten belül, ahol olyan enzimek működnek, amelyek a dUTP/dTTP szint alacsonyan tartásáért felelősek, valamint az UNG, amely az uracil DNS-ből való eltávolításáért felelős nagyban meg kell változtatni a sejten belüli körülményeket. Az irodalomban nem írnak olyan DNS-polimerázról, amelynek a dUTP és a dTTP ne lenne egyaránt szubsztrátja, tehát a mai ismereteink alapján a DNS polimerázok mindkét nukleotid beépülését katalizálják. Ezért, a sejten belüli dUTP/dTTP arány fogja meghatározni, hogy a DNS-polimeráz melyiket fogja adeninnel szembe beépíteni a DNS-be. A PBS fág esetében sikerült azonosítani az első UNG inhibitor (UGI) fehérjét, amely magyarázza, hogy a vírus DNS-e miért nem degradálódik a baktérium sejtbe kerülést követően<sup>14</sup>. A  $\Phi$ R1-37 és az S6 fág esetében nem találtak olyan gént, amely az UGI-hoz hasonló fehérjét kódolna. Ez azonban nem zárja ki, hogy ezen fágok genomja nem tartalmaz UNG inhibitor fehérjét, mivel az eddig ismert három UNG inhibitor nem mutat szekvenciális hasonlóságot. Hasonlóságuk abban rejlik, hogy harmadlagos szerkezetük kialakulását követően felszínük egy része negatív töltésű, amellyel a DNS-t mimikálva kötődnek a DNS kötő UNG aktív centrumába<sup>15</sup>. Vizsgálni kívántam, hogy egy, a DNS-ében timin helyett uracilt tartalmazó vírus miként él túl olyan környezetben, amely a DNS-beli uracil mennyiségének minimalizálására törekszik. Munkám során a *Yersinia* fajokat – köztük a humán patogén *Yersinia enterocolitica* baktériumot – fertőző  $\Phi$ R1-37 bakteriofág genom könyvtárát használtam fel. Ezen kívül részt vettem „A Metagenomikai Teleszkóp” módszer tesztelésében. A „teleszkóp” mesterséges intelligenciát használva segít a metagenomikai vizsgálatok során talált ismeretlen fehérjéknek funkciót találni, valamint már ismert fehérjékhez új funkciót rendelni. A Metagenomikai teleszkóp tesztelése során a DNS-hibajavításban fontos szerepet játszó fehérjék vizsgálatát tűztük ki célul, extrém élőhelyekről származó metagenomikai mintákat felhasználva.

## 2 Módszerek

A  $\Phi$ R1-37 bakteriofág genomjában lehetséges UNG inhibitorok keresésére egy nagyátersztő képességű módszert hoztam létre. Ennek során *E. coli* CJ236 (*dut- ung-*) sejteket kotranszformáltam a fág genom könyvtárát tartalmazó-, valamint az UNG génjét tartalmazó plazmid DNS-ekkel. A kinőtt telepekben lévő fág genom részleteket kolónia PCR-t követő szekvenálással azonosítottam, majd bioinformatikai módszerekkel elemeztem.

---

<sup>14</sup> Zhigang Wang and Dale W Mosbaughs, ‘Uracil-DNA Glycosylase Inhibitor Gene of Bacteriophage PBSB Encodes a Binding Protein Specific for Uracil-DNA Glycosylase ’, 264.2 (1989), 1163–71.

<sup>15</sup> Hao-Ching Wang and others, ‘Staphylococcus Aureus Protein SAUGI Acts as a Uracil-DNA Glycosylase Inhibitor.’, *Nucleic Acids Research*, 42.2 (2014), 1354–64 <<https://doi.org/10.1093/nar/gkt964>>.

Az általunk kidolgozott és validált dot blot alapú genomi uracil kvantitatív mérésére alkalmas módszer során inaktívvá tett humán UNG enzimet használunk, mint specifikus uracil szenzor. Az aktivitást agaróz-esszével, az uracilos DNS kötést elektroforetikus mobilitás teszttel (EMSA) ellenőriztem. A vizsgálandó DNS-t pozitívan töltött nylon membránra rögzítjük, majd hozzáadjuk az inaktív UNG-ot, melyről eltávolítottuk az első 84 aminosavat az aspecifikus kölcsönhatások elkerülése végett. Az előhívást az UNG-on lévő Flag epitóp jelölés teszi tehetővé. A kalibrációt *E. coli* CJ236 (*dut- ung-*) genomi DNS-ével készítjük, mely genomi DNS-ének uracil tartalma irodalmi adatokból ismert.

A fenti módszer kapcsán számos kollaborációban részt vettünk. Az általam bemutatott kísérlet során Professor Chris Lord (Toby Robins Emlőrák Kutatóközpont, Rákkutató Intézet, London) kutatócsoportjával együttműködve 239(HEK) sejteken vizsgáltuk az APOBEC3B expressziójának hatását a genomi uracilszintre p53 fehérje jelenlétében illetve hiányában. A mintákból genomi DNS-t izoláltunk, majd a dot blot módszer segítségével meghatároztuk azok uracil tartalmát.

Az UDE szerkezet vizsgálata során az ESPRIT technikával létrehozott 9 fehérje konstrukciót *E. coli* BL21(DE3) *ung-151* sejtekben termeltem, majd Ni-affinitás kromatográfiával tisztítottam. A fehérjék oligomerizációs fokát analitikai gélszűrőssel, termostabilitását és megfelelő feltekeredtségét differenciális pásztázó fluorimetriával mértem. A konstrukciókra jellemző másodlagos szerkezeti elemeket cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával vizsgáltam. A Metagenomikai teleszkóp módszert az ELTE PIT bioinformatikai kutatócsoportjával együttműködve hoztuk létre és teszteltük DNS-hibajavító fehérjéken. HMM (Hidden Markov Model) módszert és extrém élőhelyekről származó metagenom adatokat használtunk fel, hogy eddig ismeretlen DNS-hibajavító fehérjéket azonosítsunk jól ismert modellorganizmusokban.

### **3 Eredmények és értékelésük**

A túlélési kísérletek során kapott eredmények alapján elmondható, hogy az UNG katalitikus aktivitásának hatására a magas genomi uracilszinttel rendelkező *E. coli* CJ236 (*dut- ung-*) sejtek elpusztulnak, valamint, hogy a fágkönyvárban találhatóak olyan genomi részletek, amelyek a duplamutáns sejteket képesek menekíteni.

Azt, hogy a túlélő sejtek milyen fág genomi részletet kódoló vektort tartalmaznak kolónia PCR-t követő Sanger szekvenálással határoztam meg. A szekvenálás során kapott szekvenciákat az NCBI blastx adatbázisa segítségével azonosítottam, majd bioinformatikai módszerekkel elemeztem. A fehérjéket osztályoztam méretük és izoelektromos pontjuk

szerint, figyelembe vettem, hogy a fertőzés során mikor termelődnek – ehhez az adatokat a <sup>16</sup>-os publikációból vettem – valamint, hogy hányszor kaptam vissza az adott szekvenciát a szekvenálások során. Az így azonosított fág fehérjéket az alábbi táblázat tartalmazza.

fehérje	Mw (kDa)	pI	termelődés	találatok száma
g084	13,4	9,12	konstitutív	3
g085	50,5	5,16	konstitutív	4
g089	40,2	4,56	konstitutív	4
g119	12,99	5,39	korai	3
g120	14,6	8,73	konstitutív	3
g133	17,2	6,29	konstitutív	5
g185	14,6	9,60	konstitutív	7
g186	14,6	5,87	konstitutív	6
g191	49,9	9,01	konstitutív	4
g295	151,9	5,36	konstitutív	3

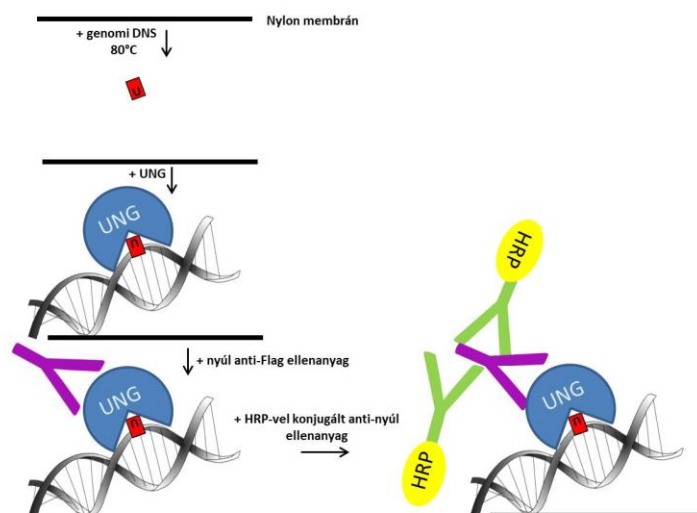
1. táblázat A túlélési kísérletek során azonosított és a szelektálás során kiválasztott fág fehérjék.

Az 1. táblázatban felsorolt fehérék közül a g119-est, g185-öst és a g186-ost vizsgáltam tovább bioinformatikai módszerekkel. A g119-es mind méretében, mind izoelektromos pontjában hasonlít az eddig azonosított három uracil-DNS glikoziláz inhibitorhoz. A g185-ös és g186-os fehérjéket a legtöbbször kaptuk vissza a szekvenálások során, azaz a túlélő sejtek többsége ezen fág fehérjék génjét tartalmazó vektort tartalmazta. A rendezettség vizsgálatához az IUPred a másodlagos szerkezeti elemek vizsgálatához a JPred programot használtam. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy ezen fehérjéknek nincs eddig ismert szekvenciális, illetve szerkezeti homológjuk, így a harmadlagos szerkezeti modellek megbízhatósága limitált, azonban feltételezhetően rendezett fehérjék<sup>17</sup>. Annak ellenőrzésére, hogy ezek a fehérjék valóban képesek az UNG inhibíciójára, *in vitro* kísérleteket tervezünk végezni.

A DNS-beli uracilszintek meghatározására egy olyan módszert dolgoztunk ki, amely a DNS-ben található uracil bázisokra specifikus UNG enzimet használja fel, mint uracil szenzor (1. ábra). A vad típusú enzimről eltávolítottuk az N-terminális első 84 aminosavat ( $\Delta$ UNG), amely más DNS-kötő fehérjékkel való kölcsönhatásokért felelős. Ennek elsősorban az *in situ* vizsgálatoknál van fontos szerepe. A fehérjét két pontmutációval (D154N és H277N) tettük inaktívvá. Az ellenanyag jelölést pedig egy 1x- illetve 3xFlag jelölés teszi lehetővé.

<sup>16</sup> Katarzyna Leskinen and others, 'RNA-Sequencing Reveals the Progression of Phage-Host Interactions between  $\Phi$ R1-37 and *Yersinia Enterocolitica*.' *Viruses*, 8.4 (2016), 111 <<https://doi.org/10.3390/v8040111>>.

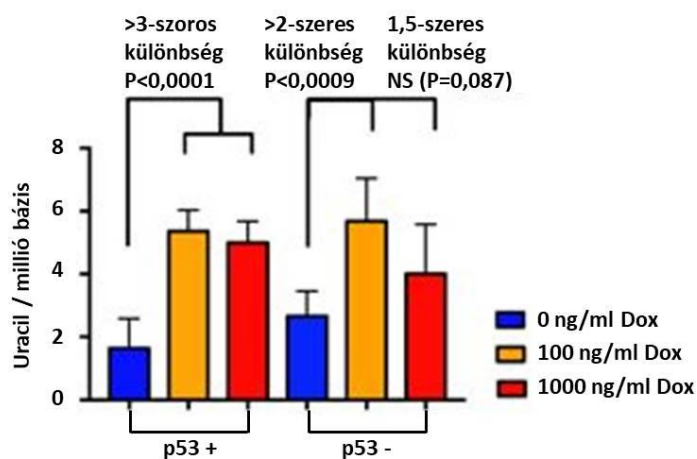
<sup>17</sup> Nagy Kinga and Vértessy G. Beáta, 'URACIL-DNS ALAPÚ VÍRUSOK:MI LEHET A TÚLÉLÉSI STRATÉGIA?', *BIOKÉMIA*, XVIII.1 (2019).



**1. ábra A dot blot módszer sematikus ábrája.** A vizsgálandó DNS mintát ismert mennyiségben egy pozitívan töltött membránhoz rögzítjük, majd hozzáadjuk a DNS-beli uracil felismerésért és megjelölésért felelős inaktívvá tett UNG konstrukciót. A fehérjén lévő Flag epitóp jelölést felhasználva antitestes jelölést alkalmazunk.

Az általunk előállított UNG konstrukciók uracil kötő képességét elektroforetikus mobilitás teszttel, aktivitását (illetve annak hiányát) agaróz-esszével ellenőriztem. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy mind az 1x-, mind pedig a 3xFlag jelölést tartalmazó  $\Delta$ UNG konstrukciók inaktívak, valamint specifikusan kötik az uracil tartalmú DNS-t<sup>18</sup>.

Professor Chris Lord laborjától (Toby Robins Emlőrák Kutatóközpont, Rákkutató Intézet, London) kapott 293 (HEK) sejtvonalak genomi DNS-ének uracil tartalmát az általunk kidolgozott dot blot alapú módszerrel vizsgáltam. A kapott eredmények a 2. ábrán láthatóak.



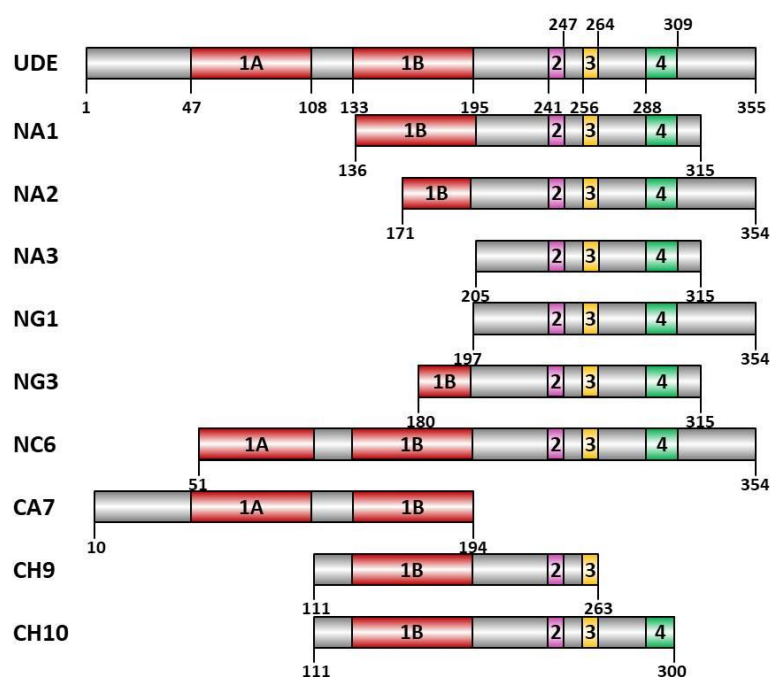
**2. ábra Az APOBEC3B enzim hatása a genomi uracilszintekre.** Az APOBEC3B expressziója doxiciklinnel (Dox) indukálható. A fehérje indukálásának hatására a 293 (HEK) sejtek genomi uracilszintje szignifikánsan megemelkedik a p53-ra nézve vad típusú (p53 +) és p53 csendesített (p53 -) sejtek esetében is. Minden adatpont legalább hat ismétlés átlagát jelenti. A statisztikai analízishez kétmintás T-próbát használtunk (NS.: nem szignifikáns).

<sup>18</sup> Gergely Róna and others, 'Detection of Uracil within DNA Using a Sensitive Labeling Method for in Vitro and Cellular Applications.', *Nucleic Acids Research*, 44.3 (2016), e28 <<https://doi.org/10.1093/nar/gkv977>>.



Közös kutatómunkánk során megállapítottuk, hogy az APOBEC3B expressziója megemelkedett genomi uracilszintet eredményez p53 fehérjét expresszálló, illetve p53 csendesített 293 (HEK) sejtekben egyaránt, DNS károsodás sejtválaszt indít be, valamint megállítja a sejtosztódást G2 / M fázisban p53 vad típusú sejtekben, míg a csendesített sejtekben nem. A kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy a p53 funkció elvesztése lehetővé teszi, hogy a sejtek tolerálják az emelkedett APOBEC3B expressziót egy folyamatban lévő DDR-ben (DNA damage response) és a daganatos sejtek továbbra is osztódó képesek maradjanak<sup>19</sup>.

Az UDE fehérje szerkezetvizsgálatához Dr. Pukáncsik Mária kolléganőm számos csonkított változatot hozott létre ESPRIT technikával<sup>20</sup>. Ezek közül kiválasztottuk a 9 legígéretesebb konstrukciót (3. ábra), melyeket analitikai gélszűréssel, differenciális pásztázó fluorimetriával (Thermofluor) valamint cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával vizsgáltam. A kapott eredményeket a 2. táblázatban foglaltam össze.



**3. ábra** Az UDE és az ESPRIT technológiával létrehozott kilenc UDE konstrukció sematikus ábrája. A legfelső a teljes hosszúságú UDE. Az 1A, 1B, 2, 3, 4: a fehérje szekvenciájában azonosított konzervált motívumok.

<sup>19</sup> Jenni Nikkilä and others, 'Elevated APOBEC3B Expression Drives a Kataegic-like Mutation Signature and Replication Stress-Related Therapeutic Vulnerabilities in P53-Defective Cells.', *British Journal of Cancer*, 117.1 (2017), 113–23 <<https://doi.org/10.1038/bjc.2017.133>>.

<sup>20</sup> Hayretin Yumerefendi and others, 'ESPRIT: An Automated, Library-Based Method for Mapping and Soluble Expression of Protein Domains from Challenging Targets.', *Journal of Structural Biology*, 172.1 (2010), 66–74 <<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.02.021>>.

UDE konstrukciók	T <sub>m</sub> (°C)	Analitikai gélszűrés			Oligomerizációs fok
		V <sub>el</sub> (ml)	M <sub>app</sub> (kDa)	M <sub>kalk</sub> (kDa)	
NA1	51,3	62,4	42,1	25,7	dimer
NA2	53,9	56,6	57,0	26,3	dimer
NA3	57,1	69,6	28,9	18,0	dimer
NC6	53,7	55,7 65,6	59,7 35,6	34,7	monomer
NG1	56,4	60,0	47,7	23,3	dimer
NG3	51,5	64,6	37,5	20,9	dimer
CA7	+ (nincs)	44,3	-	25,4	-
CH9	+ (nincs)	58,3	52,1	22,1	dimer
CH10	-	56,0	58,8	32,1	dimer
UDE	-	-	-	-	monomer

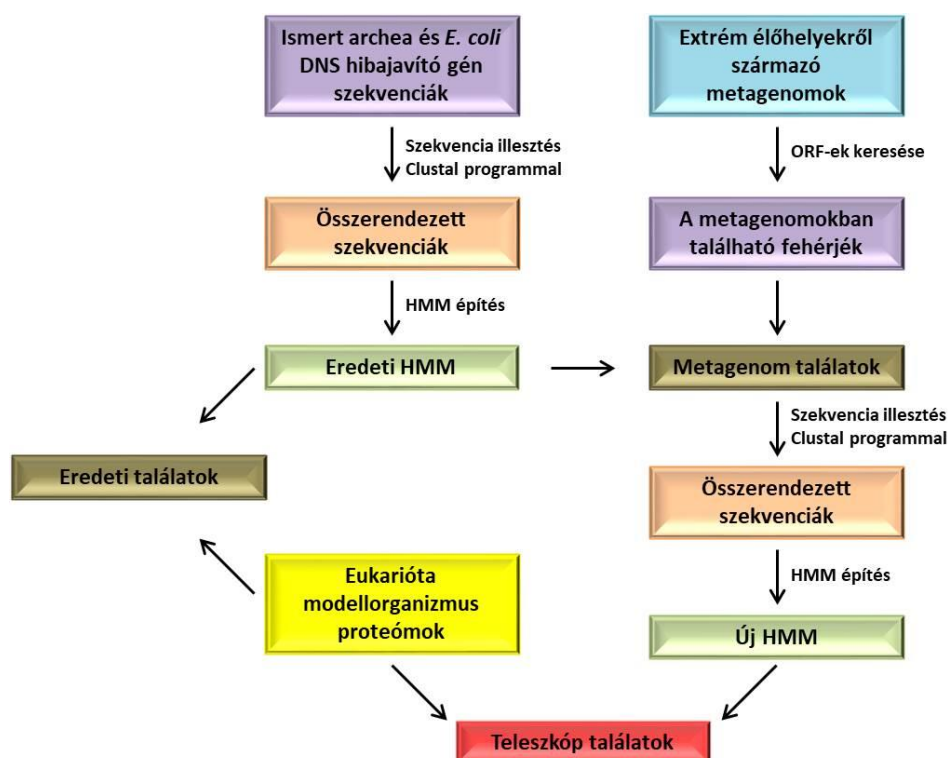
**2. táblázat** Összefoglaló táblázat az UDE konstrukciókkal elvégzett mérések eredményeiről. A „+” jelek jelölik, hogy a mérés el lett végezve az adott konstrukción, csak nem rendelkeznek jól meghatározható letekeredési hőmérséklettel. V<sub>el</sub>: elúciós térfogat; M<sub>app</sub>: látszólagos molekulatömeg (a gélszűréshez használt oszlop kalibrálása alapján számolt molekulatömeg); M<sub>kalk</sub>: az aminosav szekvencia alapján számolt molekulatömeg; T<sub>m</sub>: a fehérjék thermofluor mérésével meghatározott olvadáspontja. A monomer/dimer besorolás kritériumaként maximum 20%-os eltérést engedtünk meg az adott aminosavszekvencia alapján számított molekulatömege és a gélszűrésben becsült látszólagos molekulatömeg között. Az NC6 konstrukció 2 csúcsot adott a kromatogrammon. Az egyik a monomerrel megegyező molekulatömegnek felel meg, a másik viszont a monomernek és a dimernek megfelelő elúciós térfogatok közé esik.

A CD spektrumok alapján a teljes hosszúságú UDE és a 9 csonkított konstrukció esetében is elmondható, hogy nagy részben (62 - 92 %)  $\alpha$ -helikális másodlagos szerkezeti elemet tartalmaznak. Az ESPRIT technika és a CD spektroszkópia közös alkalmazásának egyik fő előnye, hogy nagy moláris tömegű fehérjék híg oldataira alkalmazható, ahol a röntgen- és a mágneses magrezonancia spektroszkópia technikák nem alkalmazhatók<sup>21</sup>.

Az extrém élőhelyeken élő organizmusok feltételezhetően összetettebb DNS-hibajavító készlettel rendelkeznek, hogy genomjukat megvédjék a drasztikus károsító hatásokkal szemben. A feltevést több irodalmi adat is alátámasztja. Az ilyen élőhelyekről származó metagenom szekvenciákat arra használtuk fel, hogy új DNS-hibajavításban szerepet játszó fehérjéket azonosítsunk jól ismert modellorganizmusokban, illetve már ismert funkciójú fehérékhez új funkciókat rendeljünk. Ehhez a PIT bioinformatikai kutatócsoporttal együttműködve létrehoztuk „A Metagenomikai Teleszkóp” módszert, amely mesterséges intelligenciát használva segít a tesztelésben. A jelen munkában a HMM-et újszerű módon alkalmaztuk annak érdekében, hogy eddig ismeretlen fehérjefunkciókat találhassunk ismert modellorganizmusokban. A DNS-károsodás javításában résztvevő fehérjék szekvencia-illesztéséből kiindulva megalkottuk a rejtett Markov-modelleket, és ezeket a modelleket

<sup>21</sup> Mária Pukáncsik and others, ‘Secondary Structure Prediction of Protein Constructs Using Random Incremental Truncation and Vacuum-Ultraviolet CD Spectroscopy.’, *PLoS One*, 11.6 (2016), e0156238 <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156238>>.

használtuk hasonló gének keresésére a különböző környezetekből származó metagenom mintákban. Az eredeti HMM-et a metagenomokban található génekkel kombinálva egy második, továbbképzett HMM-et hoztunk létre, amelyet a magasabb rendű modellorganizmusok proteómjaiban való keresésre használtunk (4. ábra). A létrehozott módszer segítségével azonosítottunk jól ismert DNS-hibajavító fehérjéket, számos ismeretlen funkciójú fehérjét, és már ismert funkciójú fehérjéket is, amelyek eredményeink alapján más funkcióval is rendelkezhetnek az adott modellorganizmusokban. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Metagenomikai teleszkóp hatékony módszer lehet az új fehérjék azonosítására magasabb rendű modellorganizmusokban<sup>22</sup>.



4. ábra A DNS-javító enzimekre alkalmazott metagenomikai teleszkóp folyamatábrája.

<sup>22</sup> Balázs Szalkai and others, 'The Metagenomic Telescope.', *PloS One*, 9.7 (2014), e101605 <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101605>>.

## 4 Tézisek

- 1) Kimutattam, hogy az APOBEC3B fehérje expressziója szignifikánsan megemelkedett genomi uracilszintet eredményez p53-re nézve mind vad típusú, mind csendesített sejtekben. (1)
- 2) Az UDE konstrukciók termostabilitását differenciális pásztázó fluorimetriával vizsgáltam. Megállapítottam, hogy a CA7 és CH9 konstrukciók nem mutatnak kooperatív hődenaturációs átmenetet, így ezek valószínűleg nem rendelkeznek jól meghatározható harmadlagos (és negyedleges térszerkezettel) A többi konstrukció vélhetően jól definiált harmadlagos szerkezettel rendelkezik. (2)
- 3) A UDE konstrukciók oligomerizációs fokát analitikai gélszűréssel vizsgáltam. A CH9-es konstrukció a gélszűrés alapján feltételezhetően kevésbé rendezetlen, mint a CA7-es. (2)
- 4) A UDE konstrukciók nagyfokú  $\alpha$ -helikális másodlagos szerkezeti elem tartalmát CD spektroszkópia mérésekkel igazoltam. (2)
- 5) EMSA módszerrel megállapítottam, hogy mind az 1x-, mind a 3xFlag $\Delta$ UNG specifikusan köti az uracil tartalmú DNS-t. (3)
- 6) A Metagenomikai teleszkóp módszerrel azonosított fehérjetalálatok között számos DNS-javító funkciót találtam. (4)
- 7) Megállapítottam, hogy a magas genomi uracil tartalommal rendelkező *E. coli* CJ236 (*dut-ung-*) sejtekben az UNG expressziója letális. (5)
- 8) Létrehoztam egy nagyátersztő képességű módszert, amely alkalmas könyvtárakban olyan fehérjék keresésére, melyek védik az uracilos DNS-t az UNG aktivitásával szemben. A módszer segítségével több potenciális UNG inhibitorot sikerült azonosítanom a  $\Phi$ R1-37 bakteriofág genomjában. (5)

## 5 Alkalmazási lehetőségek

Az uracilos genommal rendelkező vírusok vizsgálata kiemelt érdeklődésre tarthat számot, mivel egyediek a Földön és az élet kialakulásának megértésében segíthetnek. Továbbá genomjukban olyan fehérjéket kódolhatnak, amelyek létfontosságú enzimeket gátolhatnak. Emellett a bakteriofágok patogén baktériumok elleni védekezésben is felhasználhatóak lehetnek. A genomi uracilszint mérésére kidolgozott módszert már számos alkalommal alkalmaztuk – több esetben nemzetközi kollaborációban. Ezek közül az egyik az APOBEC3B hatásának vizsgálata volt, amely közelebb vihet egyes daganatos megbetegedések mechanizmusának megértéséhez, valamint specifikus terápiák kidolgozásában is hasznos lehet. Az a jelen kollaborációban végzett munka során többek között az is kiderült, hogy a magas APOBEC3B szint túlérzékenységet okoz a DDR-t célzó kis molekulájú inhibitorokkal szemben, ami arra utal, hogy az APOBEC3B expressziója sebezhetővé teszi a sejteket célzott terápiákkal szemben. Az ESPRIT technika CD spektroszkópiával (és más analitikai módszerekkel) történő együttes alkalmazásával közelebb kerülhetünk olyan fehérjék szerkezetének ismeretéhez, melyek sem NMR-el, sem röntgenkrisztallográfiával nem vizsgálhatóak, valamint a homológia modellek megbízhatósága is limitált ismert szerkezetű szekvenciális homológok hiányában. A „Metagenomika Teleszkóp” módszer segítségével pedig eddig ismeretlen fehérjéket azonosíthatunk.

## 6 Közlemények listája

### A doktori értekezésem alapjául szolgáló közlemények:

(1) J. Nikkilä, R. Kumar, J. Campbell, I. Brandsma, H. N. Pemberton, F. Wallberg, **K. Nagy**, I. Scheer, B. G. Vértessy, A. A. Serebrenik, V. Monni, R. S. Harris, S. J. Pettitt, A. Ashworth, C. J. Lord, „Elevated APOBEC3B expression drives a kataegic-like mutation signature and replication stress-related therapeutic vulnerabilities in p53-defective cells.” *British Journal of Cancer*, 117(1), 113–123, 2017.

IF: 5,922 I: 18

(2) M. Pukáncsik, Á. Orbán, **K. Nagy**, K. Matsuo, K. Gekko, D. Maurin, D. Hart, I. Kézsmárki, B. G. Vértessy, „Secondary Structure Prediction of Protein Constructs Using Random Incremental Truncation and Vacuum-Ultraviolet CD Spectroscopy.”, *PloS One*, 11(6), e0156238, 2016.

IF: 2,806 I: 5

(3) G. Róna, I. Scheer, **K. Nagy**, H. L. Pálinkás, G. Tihanyi, M. Borsos, A. Békési, B. G. Vértessy, „Detection of uracil within DNA using a sensitive labeling method for in vitro and cellular applications.”, *Nucleic Acids Research*, 44(3), e28, 2016.

IF: 10,162 I: 14

(4) B. Szalkai, I. Scheer, **K. Nagy**, B. G. Vértessy, V. Grolmusz, „The Metagenomic Telescope.”, *PLoS One*, 9(7), e101605, 2014.

IF: 3,234 I: 7

(5) **Nagy Kinga**, Vértessy G. Beáta, „Uracil-DNS alapú vírusok: mi lehet a túlélési stratégia?” *Biokémia folyóirat*, 2019.

### A doktori értekezés témájához kapcsolódó konferencia előadások:

(1) **Nagy Kinga**, Herczeg Viktória, Balogh Bianka, Vértessy G. Beáta

XIV. PEME PhD Konferencia; Budapest, 2017

Előadás címe: Túlélés uracilos genommal: Hogyan lehetséges?

(2) **Kinga Nagy**, Viktória Herczeg, Bianka Balogh, Beata G. Vértessy

XIV. Oláh György Doktori Iskola PhD Konferencia; Budapest, 2017

Előadás címe: Viruses with uracil-DNA: How can they survive?

(3) **Kinga Nagy**, Éva Bertalan, Gergely Róna, Mikael Skurnik, Beáta G. Vértessy

Athen's Chemistry, Budapest, 2015 (poszter prezentáció)

„Uracil or thymine? Minor difference in structure - Major key difference in the physiological role”