



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Oláh György Doktori Iskola

A trimer szerveződésű dUTPázok szerkezeti eltéréseinek
vizsgálata

Tézisfüzet

Szerző: Benedek András
Témavezető: Dr. Vértessy G. Beáta

Genom Metabolizmus és DNS Hibajavítás Munkacsoport

Alkalmazott Biotechnológiai és Élelmiszertudományi Tanszék
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Enzimológiai Intézet
Természettudományi Kutatóközpont
MTA Kiváló Kutatóhely



2019

1. Bevezetés

1.1. A dUTPáz enzim élettani szerepe

A dUTPáz (dezoxiuridin-nukleotid-trifoszfátáz) enzimcsaládnak kiemelkedően fontos megelőző szerepe van a DNS épségének megőrzésében. A dUTPázok az uracil DNS-be való beépülését képesek megakadályozni azáltal, hogy a dezoxiuridin-trifoszfát (dUTP) nukleotidokat monofoszfáttá (dUMP) hidrolizálják el, disszipálva ezzel a dUTP beépítéséhez a trifoszfát kötésben tárolt energiát [1].

Az uracil DNS-ből való kizárására a citozin viszonylagos instabilitása miatt van szükség. A citozin a DNS-t felépítő négy alapvető bázis (adenin, citozin, guanin, timin) egyike, de képes spontán módon elveszíteni amino-csoportját és ezáltal uracillá alakulni. Az uracil ugyanazt a genetikai információt hordozza, mint a timin (5-metiluracil), így ez az átalakulás javítás nélkül stabil pontmutációhoz, a genetikai kód megváltozásához vezetne. Ennek elkerülése érdekében a báziskivágásos javító mechanizmus során a DNS-ben talált uracil kivágásra kerül és a szemközti szálnak megfelelő komplementer bázissal kerül helyettesítésre [1].

A DNS-ben való uracil megjelenését azonban az is előidézhetheti, ha a DNS polimeráz enzimek timin (5-metiluracil) helyett uracilt építenek be adeninnel szemben a DNS-be. A konvencionális DNS polimerázok ugyanis nem képesek az egyetlen metil csoportban különböző két molekulát megkülönböztetni, így a sejtbeli dUTP/dTTP (uracil/timin) aránytól függő gyakorisággal uracilt is beépíthetnek a DNS-be. Ez utóbbi folyamat ugyan nem mutagén, de ha a dUTP/dTTP arány magas, az a báziskivágásos javítómechanizmus túlterhelődéséhez, ezáltal kijavíthatlanul maradó DNS kettősszál törésekhez és a folyamat megszaladásán keresztül a sejt halálához vezethet. Ezt a „timinmentes sejthalál”-ként ismert jelenséget hivatott a dUTPáz a sejtbeli dUTP/dTTP arányt megfelelően alacsonyan tartva megelőzni [1].

2. A kutatás háttere

2.1 Kutatásunk alapvető célja a dUTPáz fajspecifikus gátlása

Mivel a dUTPáz központi szerepet játszik a báziskivágásos javító-mechanizmus megszaladásának megelőzésében, terápiás célú gátlása hasznos eszköznek bizonyulhat olyan betegségek leküzdésében, ahol a szervezet önszabályozó mechanizmusait megkerülő DNS szintézis zajlik. Ennek megfelelően célunk lehet az emberi dUTPáz gátlása egy gyógyszerkombinációs terápia részeként daganatos megbetegedésekben [2], vagy kórokozók szaporodásának gátlása az általuk kódolt dUTPáz enzim homológra specifikusan ható inhibitor segítségével, az emberi dUTPáz homológ működését nem gátolva [3]. Ez utóbbi cél eléréséhez azonban mindenképpen fajspecifikus dUTPáz inhibitorokra volna szükség. Ennek az elvárásnak csak akkor lehet maradéktalanul megfelelni, ha a különböző fajokban kódolt dUTPázok közötti szerkezeti eltéréseket feltérképezzük.

2.2 A kovalens pszeudo-heterotrimer dUTPáz szerkezet vizsgálata

A dUTPázok elsöprő többsége homotrimer szerveződésű, β -redős szerkezeti felépítésű fehérje. Ezek közös jellemzője 5 konzervált szekvencia motívum jelenléte, amelyek az aktív helyek felépítésében vesznek részt. Három aktív hely jön létre, ezek létrehozásában mindhárom alegység mind az 5 konzervált motívumával részt vesz. Az aktív helyek felépítésében csak kis eltérés van a különböző fajok által kódolt dUTPáz homológok között, de az ezeken kívül eső szekvencia szakaszokban az evolúciós távolság függvényében akár jelentősebb különbségek is lehetnek az enzim homológok között [1], felcsillantva a fajspecifikus gátolhatóság reményét.

Fajspecifikus szerkezeti különbségek kialakulásának kedvezett a

1. Vertessy, B. G. & Toth, J. (2009) Accounts of chemical research. 42, 97-106.
2. Ladner, R. D. et al. (2000) Cancer research. 60, 3493-503.
3. Recio, E., et al. (2011) European journal of medicinal chemistry. 46, 3309-14.

kovalens pszeudo-heterotrimer dUTPázok létrejötte. Ezekben a trimer szerveződés már a genetikai kód szintjén biztosított azáltal, hogy az enzimet kódoló gén (*dut* gén) az evolúció során triplikálódott és a másolatok egy leolvasási keretben maradtak. A fonálféreg *Caenorhabditis elegans* genomjában fedezték fel elsőként a háromszoros *dut* gén szerkezetet és azzal a feltételezéssel éltek, hogy az állat dUTPáza erről a gén hármáról egyetlen polipeptidként íródik át, amelynek alegységei rövid összekötő aminosav szekvenciákon keresztül, kovalensen is kapcsolódnak egymáshoz [1]. A kovalensen összekötött, külön-külön gén kópia által kódolt alegységek között az evolúció során pontmutációs különbségek halmozódtak fel, ezáltal még egyedibbé téve a fehérjeszerkezetet, amelyet kovalens pszeudo-heterotrimernek nevezünk el.

Gén és domén adatbázisok elemzése alapján azt feltételeztük, hogy egy másik fonálféreg, a *Caenorhabditis briggsae* és a gyümölcslegyek közé tartozó *Drosophila virilis* is kovalens pszeudo-heterotrimerként kódolja dUTPázát. Doktori munkám kezdő lépéseként kísérletesen is igazolni szeretnénk volna, hogy a háromszoros genetikai kód valóban kovalens pszeudo-trimer enzimként íródik át. Ezt követően a *Drosophila virilis* dUTPázának példáján keresztül szerettem volna ezt a ritka dUTPáz szerkezeti elrendeződést jellemezni. Mivel a triplikált genetikai kód feltehetően két, egymástól eltérő időpillanatban lezajlott gén duplikáció eredménye, célul tűztem ki a duplikált *dut* gén ősi, az alegységeket egyedivé tévő pontmutációkat még nem tartalmazó formájának előállítását és erről egy kovalens homodimer szerveződésű dUTPáz átírását. Azt szerettem volna kísérletesen igazolni, hogy a kovalens dimerként átírt feltételezett evolúciós láncszem képes-e megfelelő stabilitású szerkezetet felvenni és a dUTP hidrolízisét a vad típusú kovalens pszeudo-heterotrimer enzimével összehasonlítható sebességgel katalizálni. Szerettem volna a feltételezett ősi, egyszeresen kódolt dUTPáz gént is előállítani és az erről átírt homotrimer dUTPáz is összehasonlítási alapként használni az enzimreakció sebességét és

a szerkezeti stabilitást vizsgáló kísérleteimhez. Végül arra kívántam választ kapni, hogy a *Drosophila virilis* dUTPáz alegységei között fennálló pontmutációk hogyan befolyásolják az alegységek közötti kölcsönhatásokat.

2.3. Az *Stl* fehérje, mint dUTPáz inhibitor

A jelenleg ismert dUTPáz inhibitorok szinte mindegyike szubsztrát analóg kismolekula, amely az aktív helyen kötődik. Ezek a molekulák általában nem fajspecifikusak, és nehezen tudnak átjutni a biológiai membránokon nagy negatív felületi töltéseik miatt. Ugyanakkor egy 2010-ben közzétett kutatás alapján a *Staphylococcus aureus* baktériumokat megfertőző $\Phi 11$ és 80α bakteriofágok dUTPázának egyes baktérium törzsekben jelen van egy kölcsönható partnere, az $Stl_{SaPi_{\text{bov1}}}$ fehérje (Stl). Az Stl a *S. aureus* patogénitási szigetek (SaPi-k) represszora, amelyek a baktériumot fertőző egyes fágokon élősködő mobilis genetikai elemek. A bakteriofágokon élősködnek azáltal, hogy a fertőzés hatására hátráltatják azok DNS-ének átírását, miközben önmagukat a genomból kivágva és sokszorosítva ellopják a bakteriofágok kapszidjait, és ezekben távoznak a fertőzött baktérium sejtéből, új gazdát keresve. A fág fertőzés során a fág dUTPáza és az Stl fehérje közötti kölcsönhatás kialakulása szabadítja fel a gátlás alól a patogénitási szigeteket kódoló DNS szakaszt. Mivel a kölcsönhatás kialakulása az Stl fehérje represszor funkciójának megszűnésével jár [4], kollégáim szerették volna megvizsgálni, hogy a kölcsönhatás kialakulása vajon a dUTPáz katalitikus aktivitását is akadályozza-e. Kísérleteik rávilágítottak, hogy a $\Phi 11$ dUTPáz aktivitását *in vitro* 100 %-ban gátolja a kölcsönhatás létrejötte, mi több, a *Mycobacterium tuberculosis* és az ember dUTPázát is képes az Stl fehérje 84, illetve 70 %-ban gátolni [5,6]. Kutatómunkám során először arra kerestem a választ, hogy lehet-e az Stl fehérje a trimer szerveződésű dUTPázok uni-

4. Tormo-Mas et al. (2010) Nature. 465, 779-82.

5. Szabo, JÉ. et al. (2014) Nucleic Acids Res. 42, 11912-20.

6. Hirmondo, R. et al. (2015) DNA Repair (Amst). 30, 21-7.

verzális inhibitora, majd a trimer szerveződésű dUTPázok Stl fehérjével való gátolhatóságában döntő szerepet játszó aminosav oldalláncokat vagy szerkezeti motívumokat kívántam azonosítani.

3. Kísérleti rész

A vizsgált fehérjéket *Escherichia coli* BL21-Rosetta expressziós rendszerben termeltem meg. A háromszoros másolatban jelenlévő *dut* gén kovalens pszeudo-heterotrimer polipeptidként való átíródását western blot analízissel, a *Drosophila melanogaster* dUTPázra specifikus elsődleges antitest használatával igazoltuk. A *D. virilis* *dut* génjének legvalószínűbb ősi szekvenciáját többszörös szekvencia illesztéseken alapuló fejlődéstörténeti elemzéssel kerestük meg. Az ősi dUTPáz gén szekvenciákat irányított mutagenézissel hoztuk létre, illetve gén szintézissel rendeltük meg.

A dUTPázok katalitikus hatékonyságát fotometriásan vizsgáltam. A reakciót protonok felszabadulása kíséri, amit fenolvörös indikátor hozzáadásával szemmel láthatóvá, illetve az abszorbancia változáson keresztül műszeresen követhetővé tettünk. Ugyanez a módszer használható az Stl inhibitor fehérje hatékonyságának követésére is, amennyiben a két fehérjét a mérést megelőzően legalább 5 perccel összekeverjük, időt hagyva ezzel a kölcsönhatás kialakulására. A hőstabilitást differenciális pásztázó fluorimetriával (termofluorimetria), hőinaktiválás mérésekkel és a *D. virilis* dUTPázok esetében cirkuláris dikroizmus spektrometriával vizsgáltam. A fehérjék oligomerizációs állapotának becslésére tömegspektrometriás méréseket és dinamikus fényszórás mérést használtunk.

A dUTPázok és az Stl fehérje közötti kölcsönhatást méretkizárásos kromatográfiával, termofluorimetriával, natív gélelektroforézissel mutattam ki. A dUTPáz-Importin- α és a dUTPáz-Stl kölcsönhatás létrejöttéről és egyben erősségéről is információt szolgáltatott az izotermális titráló kalorimetriás (ITC) mérések. Az *E. coli* dUTPáz

az StI fehérje által gátolhatóvá változtató pontmutáció helyét többszörös szekvencia illesztéssel találtam meg. A pontmutációnak a dUTPáz szerkezetére gyakorolt hatásáról a fehérje kristályosítását követő röntgendiffrakciós méréssel, majd molekuláris helyettesítéssel végzett szerkezet megoldással győződünk meg.

4. Eredmények

4.1. A háromszoros kópiában jelenlévő *dut* gén valóban kovalens pszeudo-heterotrimer dUTPázokat kódol

Egy referenciaként szolgáló homotrimer (*D. melanogaster*) és három, a triplikálódott genetikai kód alapján feltehetően kovalens pszeudo-trimer dUTPáz kódoló faj (*C. elegans*, *D. virilis* és *Trichinella spiralis*) homogenizált szövetmintájának fehérje tartalmát gélelektroforézis segítségével méret szerint elválasztottuk, majd western-blot technikával, a dUTPázra specifikus antitest segítségével láthatóvá tettük. A puffer és a gél nátrium-dodecil szulfát (SDS) tartalma felbontotta a nem kovalens alegység-alegység kölcsönhatásokat, így a homotrimer referencia dUTPáz monomerek formájában került elválasztásra a gélen. Ugyanakkor a másik három dUTPáz a trimer molekulaméretnek megfelelő pozícióban vált láthatóvá. Ezzel kísérletesen igazoltuk, hogy valóban kovalens trimerként íródik át a háromszoros *dut* gén kópiával rendelkező fajok dUTPáza.

4.2. A kovalens dimerként átírt feltételezett evolúciós láncszem megfelelő stabilitással és katalitikus hatékonysággal rendelkezik a dUTP hatékony *in vitro* hidrolíziséhez

A fejlődéstörténeti elemzéssel rekonstruált ősi homotrimer és kovalens dimer dUTPázok alegységeit csak 3 aminosavban találtam eltérőnek a vad típusú kovalens pszeudo-heterotrimer „ABC” dUTPáz „B” alegységétől, ezért ezek a fehérjék a B*₃ és a B*B*

jelölést kapták. Mindkét mesterségesen előállított feltételezett evolúciós ős dUTPáz képesnek találtam a dUTP hatékony hidrolízisére, hőstabilitásuk pedig az „ABC” enzimével szinte teljesen azonosnak bizonyult (1. táblázat).

dUTPáz	k_{cat} (s^{-1})	Olvadáspont ($^{\circ}C$)
ABC	4.7 ± 0.1	65.0 ± 0.5
B^*_3	4.6 ± 0.3	65.9 ± 0.3
B^*B^*	3.4 ± 0.3	66.2 ± 0.4

1. táblázat. A jelenlegi kovalens pszeudo-heterotrimer (ABC), a feltételezett ősi homotrimer (B^*_3) és a feltételezett kovalens pszeudo-homodimer (B^*B^*) evolúciós átmeneti állapotok reakciósebességi állandójának (k_{cat}) és olvadáspontjának összehasonlítása.

Mérési eredményeim alapján a B^*B^* dUTPáz alkalmas volt katalitikus feladatának betöltésére, ha valóban létezett, mint evolúciós köztes láncszem.

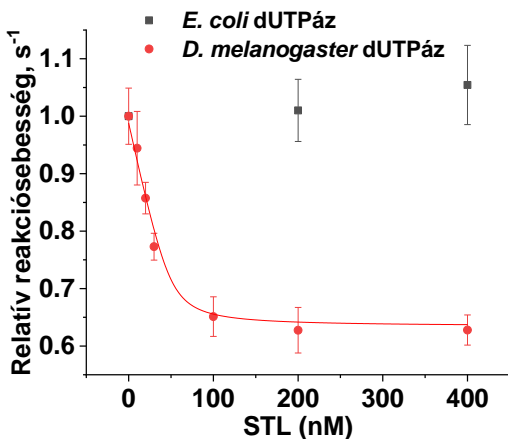
4.3. A *Drosophila virilis* kovalens pszeudo-heterotrimer dUTPázának alegységei között fennálló pontmutációk nem függetlenek egymástól

Az alegységek kölcsönhatásainak vizsgálatához a három alegységet kódoló három gén szakaszt külön leolvasási keretbe helyezve az alegységeket különálló polipeptid láncként írtam át. Feltételeztem, hogy ezekből spontán folyamatban mesterséges homotrimer dUTPázok jönnek létre a fehérjeszerkezet felépülése során. Ezt a feltételezést egyrészt tömegspektrometriás méréssel, másrészt közvetett módon, az A alegységből kialakuló A_3 dUTPáz és a vad típusú „ABC” dUTPáz importin- α kötési sztöchiometriájának összehasonlításával sikerült kimutatnunk. (Az A alegység szekvenciájában található nukleáris lokalizációs szignál képes az importin- α fehérjével kölcsönhatásba lépni.)

Az alegységek között fennálló pontmutációk ugyan nem akadályozták meg az alegységek összeállását homotrimerré, de a katalitikus hatékonyságot drasztikusan, egy nagyságrenddel csökkentik a vad típusú „ABC” dUTPáz által katalizált dUTP hidrolízis sebességéhez képest. Hőstabilitásuk 20-30 %-kal bizonyult alacsonyabbnak, az „ABC” kovalens pszeudo-heterotrimer vagy az ősi homotrimer B₃* dUTPázé. Mérési eredményeim erős közvetett bizonyítékkal szolgálnak az egyes alegységekben bekövetkezett pontmutációk összehangoltságára, komplementer voltára.

4.4. Az *Stl* fehérje a *Drosophila melanogaster* dUTPázát csak 40%-ban képes gátolni, az *Escherichia coli* dUTPázát pedig nem gátolja

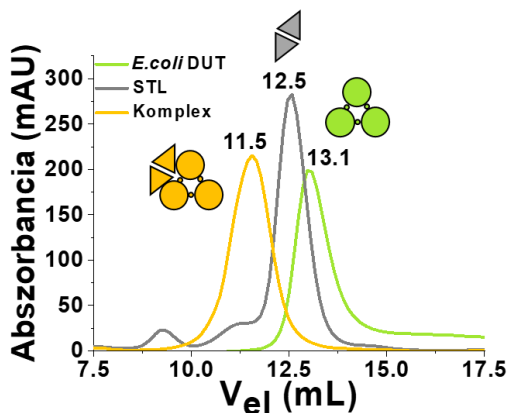
Mivel azt szerettem volna megvizsgálni, hogy az *Stl* fehérje lehet-e univerzális dUTPáz inhibitor, két, egymástól rendszertanilag távol álló laboratóriumi modell organizmus, a *D. melanogaster* és az *E. coli* dUTPázán is meg kívántam vizsgálni az *Stl* fehérje gátló hatását. Arra a kísérletes eredményre jutottam, hogy az *Stl* a *D. melanogaster* dUTPázát csak 40%-ban képes gátolni, az *E. coli* dUTPázát pedig egyáltalán nem (1. ábra).



1. ábra. Az *Stl* fehérje nem gátolja az *E. coli* dUTPázát, a *D. melanogaster* dUTPázát pedig mindössze 40%-ban.

4.5 A gátlás elmaradása ellenére is létrejön kölcsönhatás az *E. coli* dUTPáz és az Stl fehérje között

A komplex képződés tényét igazoló vizsgálatokat nemcsak a *D. melanogaster* dUTPáz-Stl fehérje, hanem az *E. coli* dUTPáz-Stl fehérje elegyére is elvégeztem. Meglepő módon az utóbbi esetben is sikerült komplex képződést kimutatnom három, egymástól független mérési módszerrel is. Tehát az *E. coli* dUTPáz is kölcsönható partnere az Stl fehérjének, annak ellenére, hogy a kölcsönhatás kialakulása nem jár a dUTPáz gátlásával (2. ábra).



2. ábra. Az *E. coli* dUTPáz – Stl közötti komplex képződés kimutatása méretkizárásos kromatográfiával

4.6. Az *Escherichia coli* dUTPázának 93. glutamin oldalláncát hisztidinre vagy argininre cserélve az Stl fehérjével gátolható pontmutáns enzimek keletkeznek

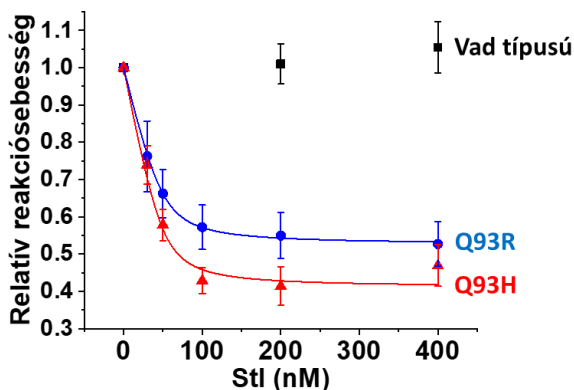
A komplex kialakulása, de a gátlás elmaradása feltételezésem szerint egy kisebb, akár egy-egy aminosavat érintő eltérésnek is lehet köszönhető, amennyiben az aktív helyet felépítő konzervált szekvencia motívumok a kölcsönhatás kialakulásában érintettek. Ezért egy többszörös szekvencia illesztés elvégzésével olyan aminosavakat kerestem az *E. coli* dUTPáz szekvenciájában, amelyek oldallánc karaktere markánsan eltér az Stl-lel biztosan gátolható

dUTPázok adott pontban fellelhető oldalláncának típusától (3. ábra).

<u>III.</u>		
E. coli	VLGNLVGLIDSDYQG	QQLMISVWN 102
Ø11 phage	--VIETGKIDAGYHG	NLGINIKN 94
M. tub.	SIVNSPGTIDAGYR	GEIKVALIN 96
D. mel.	--DVGAGVVDEDEYR	GNLGVVLFN 97
Human	--DVGAGVIDEDYR	GNVGVVLFN 115
	* : * . * : * : : : *	

3. ábra. Az *E. coli* dUTPáz III. konzervált szekvencia motívumon (szürke háttéren) belül található glutamin 93-as aminosava (Q93) amid oldallánccal rendelkezik, ellentétben az *Stl*-lél gátolható enzimek pozitívan töltött, kation- π kölcsönhatások kialakítására is képes hisztidin vagy arginin oldalláncával.

Több ilyen pozíciót azonosítottam, majd irányított mutagenézissel megkezdtem ezek célzott megváltoztatását az *Stl*-lél gátolható enzimekben megtalálható aminosavakká. Az *E. coli* dUTPáz Q93-as oldalláncát hisztidinre (Q93H) vagy argininre (Q93R) cserélve az *Stl* fehérjével gátolható pontmutáns enzimeket sikerült létrehoznom (4. ábra).



4. ábra. A vad típusú *E. coli* dUTPázzal ellentétben a Q93H és a Q93R pontmutáns enzimek gátolhatóvá válnak az *Stl* fehérjével

4.7 A Q93H pontmutáns *E. coli* dUTPáz kristályszerkezetében láthatóvá válnak a C-terminális karok

Mivel magyarázatot kívántam adni a két pontmutáns enzim gátolhatóvá válásának szerkezeti okaira, az *E. coli* Q93H dUTPáz kristályosítása és röntgendiffrakciós vizsgálata mellett döntöttem. Ennek sikeres megvalósítását követően az 1.82 Å felbontással megoldott szerkezetben láthatóvá váltak az enzim C-terminális „karjai”, amelyek fontos szerepet töltenek be az aktív hely lezárásában. Ezek a Fehérje Adatbankban eddig letétbe helyezett 19 *E. coli* dUTPáz szerkezet egyikében sem látszanak, ami nagy konformációs szabadságukkal magyarázható. Rámutattam, hogy az általunk megoldott 6HDE azonosítójú szerkezetben a Q93H mutációnak köszönhetően a C-terminális kar „elejének” fenilalanin oldallánca aromás átlapolásba kerül a hisztidin gyűrűjével, a kar N-terminális láncvéghez közel található glutamát oldallánca pedig egy víz molekulán keresztül kialakuló hidrogén-kötés hálózat révén tart kapcsolatot a hisztidinnel. Megfigyelésemből azt a következtetést vontam le, hogy a Q93H mutáció a C-terminális karok mozgékonyágának csökkenését idézte elő, ami kapcsolatban kell, hogy álljon az S11 fehérjével való gátolhatóság megjelenésével.

4.8 Az *E. coli* Q93H dUTPáz C-terminális karjának oldatbeli mozgékonyága szubsztrát analóg kötés hatására csökken, a vad típusú enzimé viszont nem

A kar mozgékonyágának csökkenését szerettük volna egy oldat fázisban elvégzett kísérlettel is igazolni, ezért egy triptofán oldalláncot vittünk be a vad típusú és a két pontmutáns enzim C-terminális karjába. Így lehetőségünk nyílt a kar mozgását fluorimetriás módszerrel oldatban vizsgálni. Eredményeink azt mutatják, hogy szubsztrát analóg kötés hatására a Q93H mutáns C-terminális karjának oldatbeli kitétsége szignifikánsan csökken, ellentétben a vad típusú dUTPáz C-terminális karjának mozgékonyágával, ami nem csökken jelentős mértékben.

5. Új tudományos eredmények

1. Igazoltuk, hogy a *Drosophila virilis* dUTPáz triplikálódott genetikai kódja valóban egyetlen polipeptid láncként íródik át, kovalens pszeudo-heterotrimer szerkezeti felépítést létrehozva. Ennek ellenére a genetikai kód kópiáit különálló leolvasási keretbe helyezve létrehozhatók az egyes alegységeket reprezentáló homotrimer fehérjék [P1, P4].

2. Bebizonyítottam, hogy a duplikált genetikai kódról átíródhatott egy katalitikusan aktív, a vad típusú *Drosophila virilis* dUTPázhoz hasonló hőstabilitással rendelkező kovalens pszeudo-dimer dUTPáz, ami így alkalmas lehetett funkciójának betöltésére [P1].

3. Megmutattam, hogy a kovalens pszeudo-heterotrimer *D. virilis* dUTPáz alegységeit egymástól megkülönböztető pontmutációk nem függetlenek, hanem komplementerei egymásnak. Az egyes alegységek katalitikus hatékonysága és hőstabilitása eltér egymástól, mi több, inverz viszonyban állnak. Ebből kifolyólag a feltételezett ősi homotrimer enzim formával egyenértékű katalitikus aktivitás fenntartásához mindhárom alegységben bekövetkezett mutációk együttes jelenléte vagy együttes hiánya szükséges [P1].

4. Igazoltam, hogy jelentős eltérés is előfordulhat az Stl által okozott gátló hatás maximális mértékében a trimer dUTPáz homológok között, ami alapján az Stl fehérjével kölcsönható dUTPáz szekvencia részletek csak részben lehetnek konzerváltak [P2, P3].

5. Kísérletesen bizonyítottam, hogy az Stl fehérje a trimer dUTPáz homológoknak lehet ugyan univerzális kölcsönható partnere, de nem univerzális inhibitora. Ez a dUTPáz homológok közötti kisebb szerkezeti eltérésekkel magyarázható, amik alapjául szolgálhatnak fajspecifikus dUTPáz inhibitorok kifejlesztésének [P3].

6. Rámutattam, hogy a vad típusú *E. coli* dUTPázt az Stl fehérje valószínűleg azért nem tudja gátolni, mert a C-terminális

kar mozgékonyága akadályozza ebben [P3].

6. Lehetséges alkalmazások

A dUTPáz enzimek közötti szerkezeti eltérések vizsgálata fajspecifikus dUTPáz inhibitorok kifejlesztésének lehetőségét teremti meg. A fajspecifikusság kiemelten fontos, ha a dUTPáz gátlását antibiotikus céllal kívánjuk felhasználni, hiszen az emberi sejtek is kódolnak dUTPázt.

A kovalens pszeudo-heterotrimer szerveződést kihasználó dUTPáz inhibitor kifejlesztésének létjogosultsága lehet az embert és emlősöket fertőző, húsfogyasztással terjedő *Trichinella spiralis* fonálféreg elleni küzdelemben.

Az Stl fehérje és a dUTPázok közötti kölcsönhatás finomhangolása kézzelfogható eszköznek ígérkezik a dUTPázok fajspecifikus gátlásának megvalósításához.

7. Publikációk

7.1. A dolgozat alapjául szolgáló publikációk

(IF: impakt faktor, FI: független idézetek száma; SzH: Szerzői hányad a megjelenés idején doktori fokozattal nem rendelkező szerzők között.)

P1. **Benedek A**, Horváth A, Hirmondó R, Ozohanics O, Békési A, Módos K, Révész Á, Vékey K, Nagy GN, Vértessy BG. Potential steps in the evolution of a fused trimeric all- β dUTPase involve a catalytically competent fused dimeric intermediate. (2016) FEBS J. 2016 Sep;283(18):3268-86. doi:10.1111/febs.13800. IF (2016): 4.237. FI: 1. SzH: 100%. Editor's choice.

P2. **Benedek A**, Pölöskei I, Ozohanics O, Vékey K, Vértessy BG. The Stl repressor from *Staphylococcus aureus* is an efficient

inhibitor of the eukaryotic fruitfly dUTPase. (2017) FEBS Open Bio. 2017 Dec 27;8(2):158-167. doi:10.1002/2211-5463.12302. IF (2017/2018): 1.782. SzH: 95%. Fig. 1A chosen for FEBS Open Bio cover illustration.

P3. **Benedek A**, Temesváry-Kis F, Khatanbaatar T, Leveles I, Surányi ÉV, Szabó JE, Wunderlich L, Vértessy BG. (2019) The Role of a Key Amino Acid Position in Species-Specific Proteinaceous dUTPase Inhibition. *Biomolecules*. 2019 Jun 6;9(6). doi:10.3390/biom9060221. IF (2019): 4.694. FI: 1. SzH: 70%.

P4. Róna G, Pálincás HL, Borsos M, Horváth A, Scheer I, **Benedek A**, Nagy GN, Zagyva I, Vértessy BG. (2014) NLS copy-number variation governs efficiency of nuclear import--case study on dUTPases. *FEBS J*. 2014 Dec;281(24):5463-78. doi:10.1111/febs.13086. IF (2014): 4.001. FI: 1. SzH: 15%.

7.2. Konferencián tartott szóbeli előadások

1. Benedek A, Temesváry-Kis F, Khatanbaatar T, Leveles I, Surányi ÉV, Szabó JE, Wunderlich L, Vértessy BG. Insights into the structural background and mechanism of inhibition of dUTPases by a proteinaceous inhibitor. *Hungarian Molecular Life Sciences 2019*. Eger, Magyarország.

2. Benedek A, Pölöskei I, Vértessy BG. A comparative study of dUTPase inhibition by Stl, a staphylococcal repressor protein. *PhD Scientific Days 2016*. Budapest, Magyarország.

3. Benedek A, Pölöskei I, Vértessy BG. Az Stl bakteriális represszor dUTPázokra gyakorolt hatásának összehasonlító elemzése. *BME ABÉT Tanszéki Doktoráns Konferencia, 2017. január 31*. Budapest, Magyarország

7.3. Konferencián bemutatott posztterek

1. Benedek A, Temesváry-Kis F, Khatanbaatar T, Leveles I, Surányi ÉV, Szabó JE, Wunderlich L, Vértessy BG. (2019) The Role of a Key Amino Acid Position in Species-Specific dUTPase Inhibition. International School on Biological Crystallization. Granada, Spanyolország, 2019. május 26-31.
2. Benedek A, Temesváry-Kis F, Khatanbaatar T, Leveles I, Surányi ÉV, Vértessy BG. Insights into the structural background and mechanism of inhibition of dUTPases by a proteinaceous inhibitor. 31st European Crystallographic Meeting, Oviedo, Spanyolország, 2018. augusztus 22-27.
3. Benedek A, Ozohanics O, Vékey K, Pölöskei I, Temesváry-Kis F, Khatanbaatar, T, Vértessy BG. A Comparative Study of Protein Stl's Inhibitory Effect on a Eukaryotic and a Prokaryotic dUTPase. Hungarian Molecular Life Sciences 2017, Eger, Magyarország.
4. Benedek A, Pölöskei I, Vértessy BG. A comparative study of protein Stl's inhibitory effect on a eukaryotic and a prokaryotic dUTPase. EMBO Young Scientists' Forum 2016. Lisszabon, Portugália, 2016. szeptember 1-2.
5. Benedek A, Pölöskei I, Vértessy BG. Comparative analysis of dUTPase enzyme - Stl inhibitor protein interaction effect on a prokaryotic and a eukaryotic enzyme model. FEBS Advanced Methods in Macromolecular Crystallization VII. Nové Hradý, Csehország, 2016. június 27. – július 2.
6. Benedek A, Pölöskei I, Vértessy BG. Protein Stl, a *Staphylococcus aureus* related transcription factor inhibits a eukaryotic dUTPase. Hungarian Molecular Life Sciences 2015. Eger, Magyarország.
7. Benedek A, Horváth A, Nagy GN, Vértessy BG. Role of subunit interactions in structural competence of *Drosophila virilis*

dUTPase. Chemistry of Metals in Biological Systems, Louvain-la-neuve, Belgium, 2014. szeptember 7-14.