

Genomi uracil előfordulás és a dUTPáz szerepe transzgénikus modellekben

Tézisfüzet

Pálinkás Hajnalka Laura

Genom Metabolizmus és Hibajavítás Kutatócsoport

Enzimológiai Intézet

Természettudományi Kutatóközpont

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Általános Orvostudományi Kar

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető: Prof. Dr. Vértessy G. Beáta



Szeged

2020

Közlemények listája

A disszertáció témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények listája:

- I. Róna G, Scheer I, Nagy K, Pálincás HL, Tihanyi G, Borsos M, Békési A, Vértessy BG. Detection of uracil within DNA using a sensitive labeling method for *in vitro* and cellular applications. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(3):e28. doi: 10.1093/nar/gkv977. **IF: 9.202**
- II. Pálincás HL, Rác GA, Gál Z, Hoffmann OI, Tihanyi G, Róna G, Gócsa E, Hiripi L, Vértessy BG. CRISPR/Cas9-Mediated Knock-Out of dUTPase in Mice Leads to Early Embryonic Lethality. *Biomolecules.* 2019; 9(4). pii: E136. doi: 10.3390/biom9040136. **IF: 4.694**

A disszertációhoz közvetlenül kapcsolódó közlemények kumulatív hatástényezője: 13.896

A disszertáció témájához közvetlenül kapcsolódó, publikálás előtt álló kézirat:

- III. Pálincás HL, Békési A, Róna G, Pongor L, Tihanyi G, Holub E, Póti Á, Gemma C, *et al.* Genome-wide alterations of uracil distribution patterns in human DNA upon chemotherapeutic treatments. *bioRxiv preprint server*, 2020.
doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.04.976977>

A disszertációhoz közvetve kapcsolódó közlemények listája:

- IV. Szabó JE, Németh V, Papp-Kádár V, Nyíri K, Leveles I, Bendes AA, Zagyva I, Róna G, Pálincás HL, *et al.* Highly potent dUTPase inhibition by a bacterial repressor protein reveals a novel mechanism for gene expression control. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(19):11912-20. doi: 10.1093/nar/gku882. **IF: 9.112**
- V. Róna G, Pálincás HL, Borsos M, Horváth A, Scheer I, Benedek A, Nagy GN, Zagyva I, Vértessy BG. NLS copy-number variation governs efficiency of nuclear import--case study on dUTPases. *FEBS J.* 2014; 281(24):5463-78. doi: 10.1111/febs.13086. **IF: 4.001**
- VI. Periyasamy M, Singh AK, Gemma C, Kranjec C, Farzan R, Leach DA, Navaratnam N, Pálincás HL, Vértessy BG, *et al.* p53 controls expression of the DNA deaminase APOBEC3B to limit its potential mutagenic activity in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(19):11056-11069. doi: 10.1093/nar/gkx721. **IF: 11.561**
- VII. Molnár P, Marton L, Izrael R, Pálincás HL, Vértessy BG. Uracil moieties in *Plasmodium falciparum* genomic DNA. *FEBS Open Bio.* 2018; 8(11):1763-1772. doi: 10.1002/2211-5463.12458. **IF: 1.05**

A disszertációhoz közvetve kapcsolódó közlemények kumulatív hatástényezője: 25.724

1. Bevezetés

A genetikai információ megőrzése és változatlan továbbadása létfontosságú feladat minden élőlény számára. Ennek ellenére a DNS szekvencia számos módosult bázist és hibás építőelemet tartalmaz az ismert Watson-Crick bázispárok mellett. Kutatómunkám középpontjában az uracil áll, mely az egyik leggyakrabban előforduló nem konvencionális DNS alkotó bázis. A DNS-beli uracil megjelenése két, egymástól független úton valósulhat meg, melyek a timinhelyettesítő beépülés és a citozin dezaminálódása. A timin helyett történő uracil beépülés nem okoz mutációt, hiszen az uracil változatlanul adeninnel párosul. Az uracil beépülése a sejtbeli deoxiuridin trifoszfát / deoxitimidin trifoszfát (dUTP/dTTP) aránytól függ, melynek extrém alacsonyan tartásáról két enzim gondoskodik: a timidilát szintáz (TS) és a deoxiuridin trifoszfátáz (dUTPáz) ^{1,2}. A dUTPáz végzi a dUTP hidrolízisét deoxiuridin monofoszfáttá (dUMP-vé), így képes hatékonyan csökkenteni a dUTP szintet. A dUMP-ból a TS szintetizál deoxitimidin monofoszfátot (dTMP-t), mely a dTTP előanyaga. A DNS kettős hélixében lévő citozin oxidatív dezaminációja az egyik leggyakoribb spontán bekövetkező DNS károsító folyamat. A kialakuló uracil:guanin hibaspár stabil pontmutációt eredményezhet, mivel a DNS-be adenin fog beépülni guanin helyett (C:G → T:A tranzíció), amennyiben a hibaspár nem kerül javításra a következő replikációs ciklusig ³.

A timidilát (dTMP) bioszintézis a DNS szintéziséhez szükséges dTTP egyetlen forrása, ezért kulcsfontosságú az osztódó sejtek számára. A timidilát szintézis szűk keresztmetszete pedig a dUMP, melynek metilációját a TS katalizálja dTMP-vé. A megfelelő dNTP készlet és ezáltal a genomi integritás fenntartása elengedhetetlen a sejtek működéséhez, különösen az olyan aktívan replikálódó sejtekben, mint a rákos sejtek, ezért a TS a kemoterápiás szerek általános célpontjává vált ¹. A fluoropirimidinek (5-fluorouracil (5FU) és 5-fluoro-2'-deoxiuridin (5FdUR)) a legrégebbi és leghatékonyabb rákellenes szerek közé tartoznak, azonban pontos hatásmechanizmusuk még nem teljesen ismert. Egyrészt metabolitjuk, az 5-fluoro-dUMP (5FdUMP) a TS enzim irreverzibilis gátlószere, mely a nukleotid készlet egyensúlyának felborulásához vezet (csökkent dTTP szint és megnövekedett dUTP / dTTP arány). Másrészt a DNS polimerázok a dUMP és az 5FdUMP molekulákat is képesek beépíteni a DNS-be ⁴. Az antifolat származékok a folát ciklust gátolva hatnak, vagy közvetlenül komplexet képezhetnek a TS enzimmel (pl.: raltitrexed (RTX)), ami csökkenti a dTTP és megnöveli a dUTP szintet ⁴.

Mivel a timidilát bioszintézis kulcsfontosságú köztiterméke a dUMP, a TS mellett a dUTPáz enzim szerepe szintén jelentős a folyamatban. A legtöbb eukarióta szervezet két dUTPáz

izoformával rendelkezik, amely a mRNS alternatív splicing-ja során, az eltérő promóter és 5' exon használatból adódik⁵. A gerincesekben lévő dUTPáz izoformák a sejtmagba (nDut) vagy a mitokondriumba (mDut) transzlokálódnak. A fehérje esszenciálisnak bizonyult *Escherichia coli*-ban (*E. coli*)⁶, *Saccharomyces cerevisiae*-ben (*S. cerevisiae*)⁷, *Caenorhabditis elegans*-ban (*C. elegans*)⁸, *Trypanosoma brucei*-ben⁹, *Arabidopsis thaliana*-ban¹⁰ és *Mycobacterium smegmatis*-ban¹¹, ahol a dUTPáz hiánya sejthalálhoz vezetett. Ezenkívül a dUTPáz csendesítése halálos fenotípust eredményezett a *Drosophila melanogaster* korai báb stádiumában, míg fiziológiai körülmények között a lárva, báb és imágó formák emelkedett DNS-beli uracil tartalommal rendelkeznek^{12,13}. A dUTPáz hiányát menekítette az uracil-DNS N-glikoziláz, Ung1 egyidejű megvonása *E. coli*-ban¹⁴, *S. cerevisiae*-ben¹⁵ és *C. elegans*-ban¹⁶, ahol a kettős mutáns organizmusok DNS-ében nagy mértékű uracil beépülést figyeltek meg. Emlős sejtvonalakban eddig géncsökkentéssel vizsgálták a dUTPáz hiányos állapotot, melyből kiderült, hogy a dUTPáz expressziós szintje jelentősen befolyásolja a TS-ra irányuló kemoterápiás szerek hatását. Egyrészt a dUTPáz megnövelt expressziója rezisztenciát indukált 5FdUR-nal kezelt humán rákos sejtekben^{17,18}. Másrészt a dUTPáz csendesítése vagy inhibíciója fokozta a sejtek TS gátlókra adott választát, ami a dUTP szint növekedéséhez, replikációs hibákhoz és citotoxicitáshoz vezetett^{19,20,21,22}. Eddig egyetlen tanulmányban írtak le humán megbetegedéssel összefüggésbe hozható dUTPáz missense mutációt, melyben egy cukorbetegséggel és csontvelő elégtelenséggel járó monogénes szindrómát vizsgáltak²³. A dUTPáz genetikai polimorfizmusának hiánya az emberi populációban arra enged következtetni, hogy a fehérje hiánya olyan súlyos következményekkel jár, amelyek az élettel összeegyeztethetetlenek.

A DNS-ben megjelenő léziók eltávolításáról elsősorban a báziskivágó (base excision repair (BER)), illetve a hibaspár (mismatch repair (MMR)) javító mechanizmusok gondoskodnak. Az uracil-DNS glikozilázok (UDG-k) felelősek a nem kanonikus dezoxinukleotidok, például a DNS-beli uracil, specifikus felismeréséért, majd elhasítják a β -N-glikozidos kötést a dezoxiribóz és a hibás bázis között^{24,25}. Az emlősök számos UDG enzime közül az UNG, SMUG1, TDG és MBD4 fehérjék jól karakterizáltak az irodalomban. Humán sejtekben az uracil-DNS N-glikoziláz (UNG) a legaktívabb enzim a DNS-beli uracil eltávolításában^{25,26,27}. Az UNG izoformák képesek kivágni az uracilt egyes és kettős szálú DNS szubsztrátokból is, ráadásul az uracil keletkezési módjától függetlenül. A keletkező abázikus helyet az AP-endonukleáz ismeri fel, majd a fennmaradó cukor rész eltávolítása után az egyes szálú DNS kiegészül a DNS polimeráz és ligáz segítségével. Azonban magas dUTP/dTTP arány vagy timin

megvonás esetén az uracilok újra beépülhetnek a javítási szintézis során. Az uracil-kivágó javítás hiperaktív, hiábavaló ciklusa abázikus helyekhez, egyes- és kettősszáltörésekhez, megakadt replikációs villákhoz és egyéb eddig ismeretlen következményekhez vezethet, mely az ún. timin-mentes sejthalálban végződhet ^{28,29,30}.

A kutatások kimutatták, hogy az uracil genomi megjelenése meghatározó hatást gyakorol több fiziológiai körülmények között lejátszódó folyamatban. Az uracil tartalmú DNS hosszú távú fenntartása az uracil kivágó javító mechanizmusban részt vevő UDG enzimek hatékony inaktiválásával vagy teljes hiányával érhető el. Számos prokarióta szervezetet találtak, melyek nem kódolják a dUTPáz és az UNG génjét (*dut-*, *ung-* genotípus) ³¹, így feltételezhetően uracil tartalmú DNS-sel (U-DNS) rendelkeznek. Ugyanakkor még több genomból hiányzik csupán a dUTPáz génje (*dut-*, *ung+* genotípus), mely veszélyeztetné a genetikai stabilitást ³¹. Bakteriofágokban specifikus UNG inhibitorokat azonosítottak, például a *Bacillus subtilis* PBS1/PBS2-ben az UGI ³² és a Φ 29-ben a p56 ³³ fehérjét. Érdekes módon ezen speciális bakteriofágok genomja majdnem teljes mértékben uracilt tartalmaz timin helyett, hasonlóan a *Yersinia enterocolitica* Φ R1–37 ³⁴ és a *Staphylococcace* S6 ³⁵ fágokhoz, melyekben ezidáig nem írtak le UNG-gátló molekulákat. Nemcsak fágok birtokolnak UNG inhibitorokat, a *Staphylococcus aureus* baktériumban is találtak egy DNS mimikáló fehérjét, a SAUGI ³⁶-t, mely mobilis genetikai elemén kódolt. Egy másik példa a humán immundeficiencia-vírus (HIV), amely nem kódol saját dUTPázt vagy UNG-t. Feltételezhetően a HIV emelkedett uracil tartalma képes megelőzni a vírusgenom autointegrációját, elősegítve ezáltal a kromoszómális DNS-be történő kedvező integrációs folyamatot, így növelve a vírus fertőzőképességét ³⁷. Meglepő módon az eukarióták között is vannak olyan szervezetek vagy szövetek, amelyekben nincs dUTPáz vagy UNG enzim. Magas genomi uracilszintet (200–2000 uracil / millió bázis) találtak a *Drosophila melanogaster* lárva, báb és imágó stádiumában ¹². Az uracil eltávolító javítás indukálása bizonyos szekvencia helyeken szintén fontos szerepet tölthet be a sejt működésében. A citozin-dezamináz (AID) által keletkező uracil természetes intermedier az immunoglobulin (Ig) gének variábilis régióiban, mely a szomatikus hipermutáció (SHM), a génkonverzió (GC) és az osztályváltó rekombináció (CSR) folyamataiban jelenik meg az adaptív immunitás részeként ^{25,38}. Mivel az uracil genomi előfordulása kulcsfontosságú szabályozó funkcióval bír a biológia számos területén, különféle módszereket fejlesztettek ki, hogy kvalitatív és kvantitatív információkat szerezzenek az uracilszintek alakulásáról. A korábbi módszerek (pl.: tömegspektrometria (MS); UNG-ARP assay; valós idejű polimeráz

láncreakció (PCR) alapú technikák) alkalmazását különböző korlátozó tényezők nehezítik, és egyik sem alkalmas a genomi uracil molekulák *in situ*, sejten belüli kimutatására.

Ellentétben más nem konvencionális DNS-bázisokkal, uracilt felismerő antitest nem áll a rendelkezésünkre. Az általánosan elterjedt szekvenálási módszerek sem használhatóak uracilt tartalmazó szekvencia jellemzésére, ezért új módszerek kifejlesztése szükséges.

2. Célkritizések

Figyelembe véve a fiziológiai és kóros állapotok széles skáláját, amelyben a DNS uracil szintje megváltozik, rendkívüli jelentőséggel bír az uracil genomi előfordulásával kapcsolatos ismeretek bővítése, melyek feltárhatják az eltérő okokat és következményeket.

Ennek érdekében elengedhetetlen új, megbízható detektálási módszerek kifejlesztése, amelyek kvalitatív és kvantitatív ismeretekkel szolgálhatnak az U-DNS metabolizmusról. Munkánk során célul tűztük ki egy dot-blot alapú U-DNS mérési módszer kidolgozását. Egy katalitikusan inaktív UNG2 (Δ UNG) szenzorfehérje felhasználásával számszerűsíteni kívántuk a genomi uracilszintet különféle biológiai mintákban. Doktori munkám során bizonyítani kívántam, hogy az általunk kifejlesztett U-DNS szenzor alapú módszer lehetővé teszi az uracilok *in situ*, sejtbeli detektálását, melyhez immuncitokémiai megközelítést alkalmaztam.

Ezután a specifikus U-DNS érzékelő konstrukció továbbfejlesztését kíséreltem meg, hogy lehetővé váljon a genomi uracil molekulák mikroszkópos vizsgálata eukarióta sejtekben. Ehhez először kísérletesen validáltam az optimalizált Δ UNG-alapú szenzort és U-DNS jelölési módszert, majd az uracil DNS-beli eloszlását konfokális és szuperrezolúciós mikroszkópia segítségével tanulmányoztam. További célom volt egy megfelelő U-DNS immunprecipitációs módszer kifejlesztése, hogy szekvencia-specifikus információkat szerezzünk az uracil genomi elhelyezkedéséről újgenerációs szekvenálással.

Más szempontból nézve az uracil DNS-beli felhalmozódása nagymértékben függ a dUTPáz enzim preventív működésétől, amely alacsony sejtbeli dUTP/dTTP arányt tart fenn, így egyfajta immunitásként szolgál az uracil DNS-be történő beépülése ellen. Eddig a dUTPáz funkcióját csupán géncsendesítéssel vizsgálták sejtenyészetekben, azonban génkiütést nem publikáltak. Ezért célul tűztük ki a dUTPáz élettani szerepének *in vivo* vizsgálatát, melyet a CRISPR/Cas9-mediált génkiütési eljárással kíséreltünk meg egérmodellben. Mindenekelőtt szerettük volna kideríteni, hogy a dUTPáz génjének kiütése után születhetnek-e életképes emlős utódok, vagy a dUTPáz hiányos állapot összeegyeztethetetlen az étellel.

3. Anyagok és módszerek

HCT116, MEF és 293T sejteket McCoy's 5A (Gibco, Life Technologies), DMEM/F12 HAM (Sigma), illetve DMEM (Gibco) tápoldatban tartottam, melyet 50 µg/ml penicillin-sztreptomycin (Gibco) oldattal és 10% szérummal (FBS) (Gibco) egészítettem ki. A sejteket 37°C-os termosztátban inkubáltam 5% CO₂ tartalom mellett. A Schneider S2 sejteket Schneider Insect (Sigma) tápoldatban tartottuk, 26°C-os termosztátban.

A dot-blot alapú U-DNS mérésekhez CJ236 (*dut*⁻, *ung*⁻) *E. coli* törzsből izolált genomi DNS szolgált standardként. Az inert hordozó DNS (lazac sperma DNS (Invitrogen)) mennyiségét állandó értéken tartottuk a kétharmadoló hígítási sorokban. A DNS mintákat előnedvesített, pozitívan töltött nylon membránra (Amersham Hybond-Ny+; GE Healthcare) vittük fel vákuumvezérelt mikroszűrő készülékkel (Bio-Dot, BioRad). A membránra való rögzítés 80°C-os inkubálással történt 2 órán keresztül. A membrán blokkolása ETBS-T (25 mM Tris-HCl, pH = 7.4, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% Tween-20) blokkoló pufferben történt, mely 100 µg/ml lazac sperma DNS-t, 5% sovány tejport és 10 mM β-mercaptoetanol tartalmazott. Ezután a membránt a 3xFlag-ΔUNG fehérje (18.1 µg/ml) jelenlétében inkubáltuk blokkoló pufferben, 4°C-on 16 órán át. Mosási lépések után (ETBS-T) anti-Flag M2 antitestet (Sigma) adtunk hozzá 1 órára (1:2000, ETBS-T-ben 5% tejporral). A membrán mosása után torma peroxidáz kapcsolt másodlagos antitestet alkalmaztunk. A membrán előhívása kemilumineszcens reagenssel (GE Healthcare) történt, majd képalkotáshoz a BioRad ChemiDocTM MP Imaging készüléket használtuk. A képek denzitometrálását ImageJ szoftverrel végeztük.

Bakteriális DNS-ben található uracil molekulák immunfluoreszcens festését XL1-Blue (*dut*⁺, *ung*⁺) *E. coli* és CJ236 (*dut*⁻, *ung*⁻) *E. coli* sejteken végeztük el. A sejteket Carnoy oldattal (etanol:ecetsav:kloroform = 6:3:1) fixáltuk 20 percen keresztül 4°C-on. A rehidratáció a következő, 5 perces mosásokkal történt: 1:1 etanol:PBS, 3:7 etanol:PBS és 0.05% Triton X-100-et tartalmazó PBS (PBST). A sejteket egyszer mostuk GTE pufferrel (50 mM glucose, 20 mM Tris, pH = 7.5, 10 mM EDTA), és 10 mg/ml lizozimet (Sigma) tartalmazó GTE pufferben szuszpendáltuk fel őket. A szuszpenziót poli-L-lizinnel kezelt óraüvegre szárítottuk. A sejteket PBST-vel mostuk, majd blokkoltuk őket blokkoló pufferben (5% BSA PBST-ben) 15 percen keresztül. Az uracil jelölés 4.64 µg/ml Flag-ΔUNG-DsRed konstrukcióval való inkubálással történt blokkoló pufferben, 4°C-on, 16 órán keresztül. Mosási lépések (PBST) után anti-FLAG M2 antitestet alkalmaztunk (1:2000) 1 órán át. A FLAG epitóp vizualizációjához Alexa 488 konjugált másodlagos antitestet adtunk (1:1000, Molecular

Probes). A sejtek DNS-t tartalmazó sejtmagját 1 µg/ml DAPI-val (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma) festettük meg.

Az uracil festési eljárás emlős sejteken való teszteléséhez, MEF sejteket transzfektáltam 6-lyukú pléten 4 µg normál pEGFP-N1 (XL1-Blue sejtekből nyert) vagy uracil-tartalmú pEGFP-N1 vektorral (CJ236 sejtekből nyert), és 12 µl FuGENE HD (Promega) reagenssel a gyártó javaslatait követve. Az extrakromoszomális plazmid DNS festése MEF sejtekben a már ismertetett módon történt kisebb módosításokkal. Fixálás és rehidratálás után, az epitóp feltárás 1 M HCl, 0.5% Triton X-100 jelenlétében ment végbe 15 percen át. Semlegesítés (0.1 M Na₂B₄O₇ (pH = 8.5), 5 perc) után, a blokkolás 1 órán keresztül zajlott le blokkoló pufferben: 200 µg/ml lazac sperma DNS, 5% kecske magzati szérum (FGS), 3% magzati bovine szérum albumin (BSA) és 0.05% Triton X-100 PBS-ben. A jelölés FLAG-ΔUNG-DsRed, majd anti-FLAG M2 elsődleges és másodlagos antitestek alkalmazásával történt meg.

A FLAG-ΔUNG-SNAP konstrukció kialakításához a SNAP-et kódoló szekvenciát PCR-rel sokszorozítottam fel pSNAPf plazmidról. A KpnI és XhoI enzimekkel emésztett fragmenseket a FLAG-ΔUNG-DsRed (pET-20b háttérű) plazmid KpnI/XhoI helyébe ligáltam. A primereket a Sigma-Aldrich szintetizálta le, a konstrukciókat pedig szekvenálással ellenőriztük le (Microsynth Seqlab GmbH). Az UNG konstrukciókat *E. coli* BL21(DE3) *ung*-151 törzsben expresszáltam és Ni-NTA affinitás oszlopon (Qiagen) tisztítottam. A FLAG-ΔUNG-DsRed és FLAG-ΔUNG-SNAP szenzor konstrukciók összehasonlítását plazmid aggregátum festéssel végeztük el.

Az UGI-t stabilan kifejező HCT116 sejtvonal létrehozása retrovirális transzdukcióval történt. 293T sejteket (1.5×10^6 db T25 flakóban) 1.5 µg pLGC-hUGI/EGFP, 0.5 µg pCMV-VSV-G pakoló és 0.5 µg pGP csomagoló plazmiddal transzfektáltam Lipofectamine 3000 reagenssel (Invitrogen) a gyártó javaslatait követve. A transzfekció után 36 órával 0.45 µm-es szűrőn (Merck Millipore) leszűrtem a lentivirális részecskéket. A sikeresen transzdukált GFP-pozitív HCT116 sejteket fluoreszcencia aktivált sejtsszortírozó (FACS) berendezéssel (BD FACSAria III Cell sorter (BD Biosciences)) válogattam le. Összehasonlítás-ként HCT116 sejteket tranziensen is transzfektáltam FuGENE HD-vel. Az UGI-expresszázó sejteket 20 µM 5FdUR-rel (Sigma) vagy 100 nM RTX-szel (Sigma) kezeltem 48 órán keresztül immuncitokémiához szükséges fixálást vagy genomi DNS (gDNS) izolálást megelőzően. Dot-blot mérésekhez vagy U-DNA-Seq-hez, az eukaryotic HCT116 sejtek (és bakteriális minták) DNS-ét a Quick-DNATM Miniprep Plus Kittel (Zymo Research) tisztítottam ki a gyártó utasításait követve és nukleáz mentes vízbe eluáltam.

A genomi uracil immunfluoreszcens festéséhez, UGI-t expresszáló HCT116 sejteket fedőlemezt tartalmazó 24-lyukú plétre vagy μ -Slides-ra (ibidi GmbH) raktam ki. dSTORM képalkotásnál a fedőlemezeket poli-D-lizinnel előkezeltük. A sejt kultúrákat 4% paraformaldehiddel (PFA, pH = 7.4, PBS-ben) vagy Carnoy oldattal fixáltuk 15 percen keresztül. Mosási és rehidratációs lépések után az epitóp feltárás 2 M HCl, 0.5% Triton X-100 jelenlétében történt meg (30 perc). Semlegesítés után a sejteket az I. blokkoló oldatban 15 percen keresztül inkubáltuk (TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH = 7.4, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 0.05% Triton X-100), melyet 5% sovány tejpörrel egészítettünk ki, majd ehhez 200 μ g/ml lazac sperma DNS-t adtunk és 45 percig inkubáltuk. Az uracil jelölés 4 μ g/ml FLAG- Δ UNG-SNAP fehérjével történt meg 1 órán keresztül az I. blokkoló pufferben, melyet 200 μ g/ml lazac sperma DNS-sel egészítettünk ki. Mosási lépések után a sejtekhez adtam 2.5 μ M SNAP-Surface Alexa Fluor 546 vagy 647 (NEB) szubsztrátot és 20 percen át inkubáltam a II. blokkoló pufferben (5% FGS, 3% BSA, 0.05% Triton X-100 PBS-ben), majd opcionálisan festettem 1 μ g/ml DAPI-val. A konfokális képek a Zeiss LSCM 710 vagy a Leica TCS SP8 STED 3X mikroszkóppal készültek. A STED képekhez 660 nm STED depletáló lézert használtunk. Azonos beállításokat alkalmaztunk a minták összehasonlíthatósága érdekében. A fluoreszcens képek megjelenítéséhez a ZEN szoftvert használtuk.

Az U-DNS immunprecipitálásához 12 μ g gDNS-t szonikáltunk BioRuptor (Diagenode) készülékkel úgy, hogy a fragmens méret 100 és 500 bázispár közé essen. A minta 25%-át inputként eltettük, a többit a következő IP pufferben szuszpendáltuk fel: 30 mM Tris-HCl, pH = 7.4, 140 mM NaCl, 0.01% Tween-20, 1 mM 0.5 mM EDTA, 15 mM β -merkaptoetanol, 1 mM fenilmetilszulfonil fluorid, 5 mM benzamidin. Az immunprecipitációt 15 μ g 1xFLAG- Δ UNG konstrukcióval végeztem 2.5 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az anti-FLAG M2 agaróz gyöngyöket (Sigma) IP pufferben ekvibráltam, és hozzáadtam az IP keveréket 16 órás 4°C-os inkubációhoz. A gyöngyöket elúció pufferben vettem fel, mely 1% nátrium dodecil szulfátot (SDS) és 0.1 M NaHCO₃-t tartalmazott. Az U-DNS kötött uracil szenzor elúciója 5 perces vortex-szel történt, melyet további 20 perc inkubáció követett. Centrifugálás (13000 rpm, 3 min) után a felülúszót 150 μ g/ml RNase A-val (Epicentre) 30 percen keresztül, majd 500 μ g/ml Proteinase K-val (Sigma) 1 órán keresztül inkubáltam 37°C-on. Az immunprecipitált DNS-t NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kittel (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) tisztítottam ki a gyártó javaslatai szerint. Az uracil tartalmú DNS dúsulását dot-blot méréssel ellenőriztem le, majd az input és a dúsult U-DNS mintákat újgenerációs szekvenálásra küldtem (NGS).

A dUTPáz génkiütésére irányuló kísérletekhez a T7 single-guide RNS-t (sgRNS) és a Cas9 mRNS-t a Sigma-Aldrich cégtől rendeltük. A CRISPR/Cas9 hatékonyságát MEF sejteken teszteltem 2.5 µg Cas9 mRNS, 250 ng target sgRNS és Lipofectamine™ 3000 reagens (ThermoFisher Scientific) transzfektálásával 6-lyukú pléten. 24 órával a transzfekciót követően a sejtekhez friss tápoldatot adtam további 24 órára, majd genomi DNS-t izoláltam a MasterPure™ DNA Purification Kittel (Epicentre). PCR amplifikáciú után, Cel 1 emésztési tesztet készítettem a Transgenomic SURVEYOR Mutation Detection Kittel.

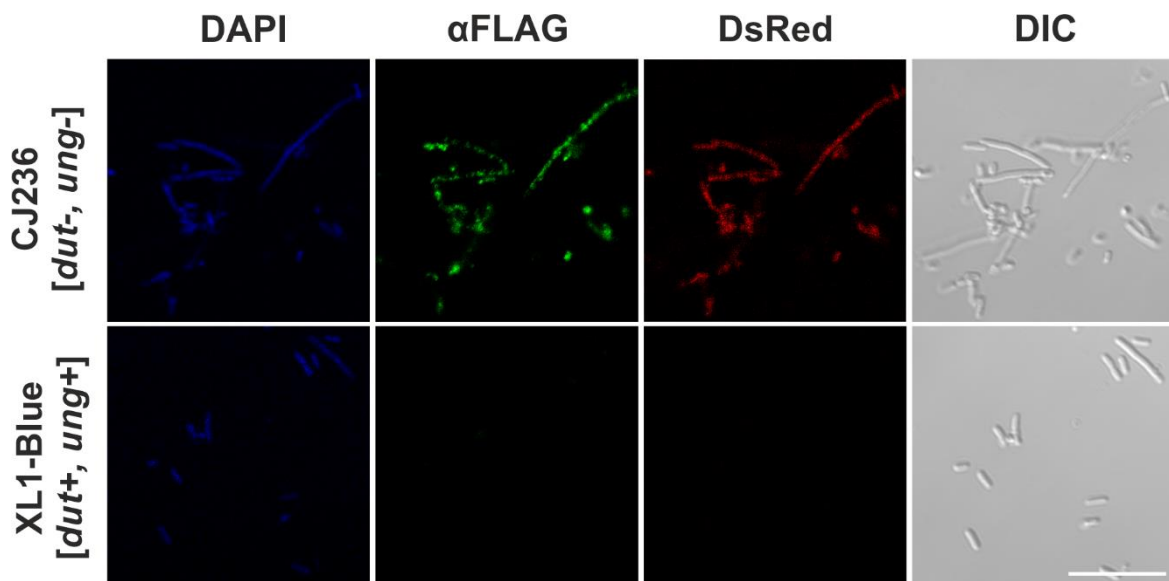
A kísérleteinkhez használt FVB/N egerek szaporítása és fenntartása a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ (NAIK), Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetében valósult meg. A heterozigóta alapító egerek genotipizálása során felsokszorosítottam a CRISPR target helyet a gDNS-ről, és a fragmenseket a pBluescript SK (+) vektor Sall/EcoRI helyek közé klónoztam. Egyedi baktérium kolóniákból izoláltam DNS-t a NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kittel, majd szekvenálásra küldtem őket. Az off-target analízist az online, predikciós CCTop programmal készítettem elő. Az egerek genotípusát PCR-rel állapítottuk meg teljes gDNS-ből, mely egérfarokból vagy embrióból származott. A mintákat DNS lízis pufferben (0.1 M Tris-HCl, pH = 7.4, 0.2 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.2% SDS) homogenizáltuk el és fenol-kloroformos DNS kicsapást végeztünk. A blasztociszták genotípusát ún. semi-nested PCR-rel állapítottuk meg a DNS fragmenseket 1%-os agaróz gélen megfuttatva.

A blasztociszták *in vitro* tenyésztéséhez, az embriókat M2 médiummal mosták ki a vemhes egerből 3.5 dpc-nél. A blasztocisztákat egyesével növesztették 0.1%-os zselatin-rétegen, 12-lyukú edényben, KO-DMEM ES sejtenyésztő tápoldatban (1000 U/mL LIF-fel és 20% FBS-sel kiegészítve), 5% CO₂ mellett 37°C-on, 4 napon keresztül. A szaporodást minden nap lefényképezték, és a negyedik napon PCR-rel genotipizáltuk őket. Western blot analízishez 10.5 dpc korban lévő embriókat távolítottak el a vemhes egerből, utána PBS-sel mostuk és lízis pufferben (20 mM HEPES, pH = 7.5, 420 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM ditiotreitol, 25% glicerin) szuszpendáltuk fel őket. A homogenizálást vortex-szel segítettük. Centrifugálás után a felülúszókat SDS mintakóktélban forraltuk ki (95°C, 5 min). A teljes fehérjét megfuttattuk 12%-os poliakrilamid gélen és PVDF membránra (Immobilon-P, Merck Millipore) blottoltuk át. A membránt 5% tejport tartalmazó TBS-T-ben (25 mM Tris-HCl, pH = 7.4, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.05% Tween-20) blokkoltuk 1 órán keresztül 4°C-on, majd dUTPázra (1:2000, Sigma) vagy α-aktinra (1:1000, Sigma), mint bemérési kontrollra hívtuk elő. A következő lépések megegyeztek a dot-blot előhívásnál ismertetett lépésekkel. A denzitometrálast a BioRad Image Lab™ 6.0 szoftverrel végeztem.

4. Eredmények

4.1. DNS-beli uracil kimutatása katalitikusan inaktív UNG konstrukciók alkalmazásával *in vitro* és sejtes vizsgálatokban

Egy új dot-blot alapú módszert dolgoztunk ki a genomi uracil tartalom relatív mennyiségi meghatározására, melyhez egy katalitikusan inaktív, Flag-címkével jelölt Δ UNG konstrukciót alkalmaztunk. Az elsődleges és másodlagos ellenanyagokkal végzett jelölés után, a minta DNS-ének uracil tartalma egy standard kalibrációs görbéhez történő interpolációval számítható ki, amelyhez (*dut*⁻, *ung*⁻) *E. coli* sejtekből izolált uracilos DNS-t használtunk fel. Az *ung*⁻ genetikai háttér (különböző baktériumtörzsek vagy *Drosophila* S2 sejtvonala) és a *de novo* timidilát bioszintézis útvonalakat célzó drogkezelések (MTX, RTX, 5FdUR) kombinációja szignifikánsan emelkedett genomi uracilszintet eredményezett a nem kezelt sejtekhez képest. Ezután az U-DNS szint változását egy humán vastagbél carcinoma sejtvonalon (HCT116) mértük meg, melyből megállapítottuk, hogy hasonló drogkezelések önmagukban nem vezetnek az U-DNS szint növekedéséhez. Annak érdekében, hogy a DNS-ben újonnan megjelenő uracilokat vizsgálhassuk, az uracilt felismerő kulcsfontosságú faktor, az UNG gátlása elengedhetetlen volt. Kettős kezelésem (UGI expresszió és 5FdUR hozzáadása) átesett sejtekben már jelentősen megnövekedett genomi uracil tartalmat detektálhattunk a kezeletlen sejtekhez képest. A genomi uracilok „festése” közvetett módon, a Flag epitóp immuncitokémiai jelölésén keresztül, vagy közvetlenül, a fluoreszcens DsRed szignálon keresztül történt CJ236 (*dut*⁻, *ung*⁻) sejtekben. Várakozásainknak megfelelően ugyanezen festési eljárás az uracilmentes XL1-Blue (*dut*⁺, *ung*⁺) *E. coli* sejtekben nem eredményezett látható jelet (1. ábra). Az uracilban gazdag sejtekben az U-DNS jel kolokalizált a DNS festésre használt DAPI jelével.



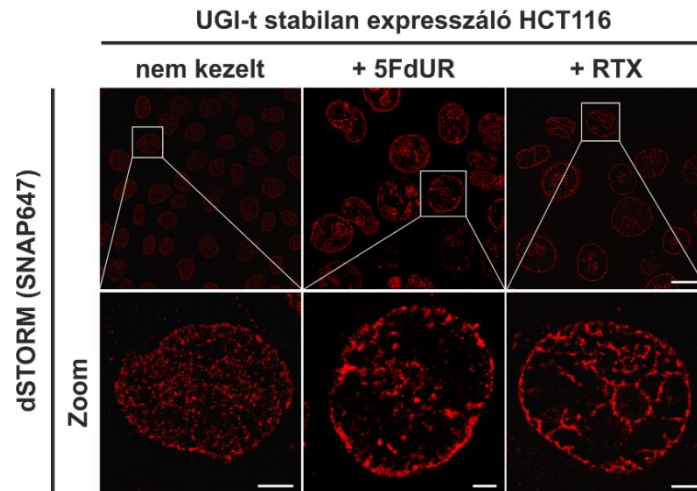
1. ábra³⁹ A genomi uracil láthatóvá tétele a Flag- Δ UNG-DsRed szenzor konstrukció felhasználásával uracil tartalmú CJ236 (*dut*⁻, *ung*⁻) *E. coli* és uracil-mentes XL1-Blue (*dut*⁺, *ung*⁺) *E. coli* sejtekben. Differenciális interferencia kontraszt (DIC) kép is készült, mellyel kirajzolódnak a sejthatarok. A skála 10 μ m-t jelöl.

Ezután uracil tartalmú vagy normál összetételű plazmiddal *ung*^{-/-} MEF sejteket transzfektáltunk, melyekben a bemutatott U-DNS szenzor fehérjével sikeresen detektáltuk a sejtbeli, DAPI festéssel kolokalizáló, uracilos plazmid aggregátumokat.

4.2. A Δ UNG-alapú U-DNS jelölési technikák alkalmazási lehetőségei az uracil eloszlási mintázatának elemzésére humán genomi DNS-ben

A továbbiakban megkíséreltük a Δ UNG-alapú U-DNS jelölési módszer adaptálását a genomi uracil kimutatására komplex, eukarióta sejtekben. Ehhez egy új konstrukciót (Flag- Δ UNG-SNAP) hoztam létre a Δ UNG C-terminálisára történő SNAP címke klónozásával, mellyel egy sokoldalú jelölési technikához jutottunk. A Flag- Δ UNG-SNAP és Flag- Δ UNG-DsRed konstrukciók összehasonlításával bebizonyosodott, hogy az új szenzor U-DNS detektálásra alkalmas. Ezután egy UNG-gátolt HCT116 modellsejtvonalat hoztam létre a humán kodon optimalizált UGI retrovirális transzdukciójával. Drogkezelés (5FdUR vagy RTX) hatására megemelkedett az U-DNS szint az UGI-t stabilan expresszáló sejtekben, melyet a Flag- Δ UNG-SNAP fehérjével is sikerült kimutatnom *in situ* festési eljárásban. Az U-DNS-festést sikerrel végeztük nemcsak Carnoy, de keresztkötő PFA fixálással is, ezért festési technikánk megfelelő lehet kolokalizációs tanulmányokhoz a jövőben. A genomi uracil eloszlási mintázatát szintén megvizsgáltuk szuperrezolúciós mikroszkópia segítségével, ahol különböző SNAP szubsztrátokat alkalmaztunk STED, illetve dSTORM képalkotásnál. Jellegzetes mintázat volt megfigyelhető a droggal (5FdUR vagy RTX) kezelt sejtekben, mely különbözött a kezeletlen, UGI-t expresszáló sejtek U-DNS jelétől, ahogy azt a dSTORM-mal készített felvételek mutatják (2. ábra). Az uracil festődés jellemző a sejtmagmembránra és a sejtmagvacska körüli területekre a drogkezelt sejtek esetén.

A genomi uracil eloszlás szekvencia-szintű elemzéséhez kifejlesztettem az ún. U-DNA-Seq módszert. Ennek során U-DNS immunprecipitációt hajtottunk végre Flag-címkével ellátott, katalitikusan inaktív Δ UNG szenzorfehérjével, tisztított és fragmentált gDNS-en, majd a komplexet anti-FLAG gyöngyökkel húztuk ki szekvenálás előtt. Az uracilos DNS sikeres dúsulását dot-blot módszerrel igazoltuk 5FdUR vagy RTX kezelt, UGI-t expresszáló sejtekből származó minták esetén. Végül a kezdeti input és U-DNS dúsított DNS mintákat könyvtár készítésre és újgenerációs szekvenálásra (NGS) küldtük.



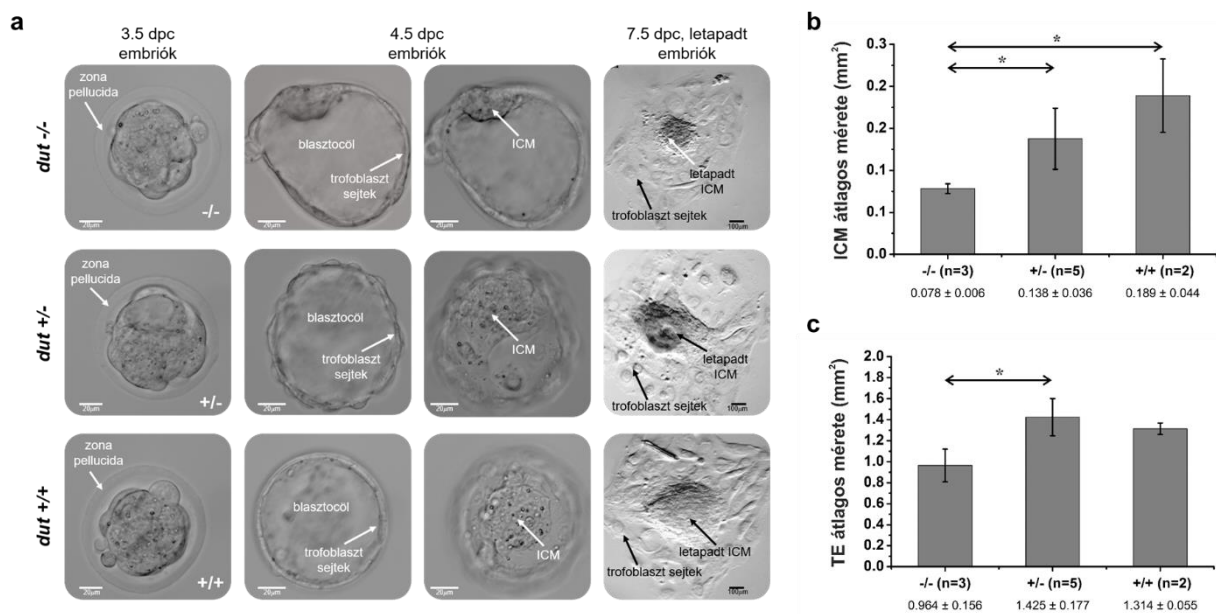
2. ábra A Flag- Δ UNG-SNAP szenzor lehetővé teszi a genomi uracil szuperrezolúciós mikroszkópiával történő kimutatását. dSTORM képalkotással vizsgáltuk meg a kezeletlen és a droggal (5FdUR vagy RTX) kezelt, UGI-t stabilan kifejező HCT116 sejtekben lévő uracil tartalmat. A skála 10 μ m-t jelöl a felső sorban, míg 2 μ m-t az alsó, nagyított képeken.

4.3. A dUTPáz fiziológiai szerepének vizsgálata emlős modellben, CRISPR/Cas9-mediált génszerkesztéssel

A dUTPáz hiány *in vivo* hatásának vizsgálatához megkíséreltük a *dut* gén specifikus kiütését a CRISPR/Cas9 génszerkesztéssel. A kiválasztott sgRNS-t és Cas9 mRNS-t MEF sejteken validáltam, majd kezdődhetett a CRISPR/Cas9 rendszer alkalmazása dUTPáz knock-out egerek előállításához. Két alapító egeret (#2 és #4 számú) azonosítottunk bekövetkezett CRISPR/Cas9 eseménnyel. Hat bázispáros deléció és egy bázis szubsztitúció (D6, M1) történt a #2-es egérben, míg 47 bázispáros deléció (D47) történt a #4-es egérben. Az indukált D47 mutáció kereteltolódással járó mutációt eredményezett a *dut* génben, mely korai stop kodonokhoz vezet. A további kísérleteket a D47 mutációt hordozó #4-es egér leszármazottain végeztük. A heterozigóta D47 keresztezésekből származó nemzedékek PCR-rel végzett genotipizálása során arra derült fény, hogy a dUTPáz hiánya embrionális letalitáshoz vezet. Különböző fejlődési stádiumban lévő embriók vizsgálatával *dut* $-/-$ mutánsokat hólyagcsíra (3.5 dpc) állapotban tudtunk azonosítani, azonban később ezek nem voltak kimutathatóak (1. táblázat). A különböző dUTPáz genotípust hordozó blasztocisztákat *in vitro* kultúrákban tanulmányoztuk. A homozigóta *dut* $-/-$ embriókban mind a belső sejtsomó (ICM), mind a trofektoderma (TE) mérete szignifikánsan kisebb volt a *dut* $+/+$ WT vagy a *dut* $+/-$ variánsokhoz képest (3. ábra), mely a dUTPáz hiányában bekövetkező fejlődési rendellenességre utal. Ezzel ellentétben nem volt jelentős különbség a *dut* $+/-$ és a *dut* $+/+$ embriók között, sem a blasztociszta tenyésztési kísérletben, sem a fejlettebb embriók boncolásakor (8.5 dpc, 9.5 dpc, 10.5 dpc).

DNS minta	Genotípus			Felszívódás	Összesen
	+/+	+/-	-/-		
Újszülött	21	42	0	-	63
10.5 dpc	3	5	0	3	11
9.5 dpc	5	5	0	0	10
8.5 dpc	10	5	0	5	20
3.5 dpc	11	13	7	NA	31

1. táblázat⁴⁰ A heterozigóta D47 keresztezésekből származó utódok genotipizálásának eredménye. A táblázatban megtalálhatóak az általunk vizsgált, *dut* +/+; *dut* +/- vagy *dut* -/- genotípussal rendelkező állatok és embriók, illetve az azonosítatlan felszívódások száma is. NA, nem meghatározható.



3. ábra⁴⁰ A heterozigóta D47 keresztezésekből származó blasztociszták *in vitro* tenyésztése. **(A)** A *dut* -/-; *dut* +/-; *dut* +/+ embriók fázis kontraszt képe. Az első oszlopban láthatóak az izolált embriók (3.5 dpc). A második és harmadik oszlopban láthatóak a letapadt embriók (4.5 dpc), melyeknél a fókusz a trofoblaszt sejtekre vagy a blasztoölben elhelyezkedő ICM sejtekre van beállítva. Az utolsó oszlopban a sejtszaporodás figyelhető meg (7.5 dpc). A skála 20 µm-et, vagy 100 µm-t (az utolsó oszlopban) jelöl. Az ICM **(B)** és a trofektoderma (TE) **(C)** mérete 7.5 dpc-nél került kiszámításra. A hiba a szórást mutatja. A mintaszámot az n szám jelöli genotípusonként. * $p < 0.05$.

A Western blot vizsgálatok kimutatták, hogy a *dut* +/- embriókban szignifikánsan csökkent a dUTPáz fehérje szintje, a WT embriókhoz képest. Ez a különbség felnőtt állatokra is érvényes lehet, de ehhez további szerv-specifikus kísérletes bizonyítékokra van szükség. Vizsgálatunk során a D47 utódok nem mutattak növekedési vagy termékenységi rendellenességet, vagy felnőttkori szisztémás betegséget. Ez alapján a *dut* +/- heterozigótákban potenciálisan fennálló szuboptimális dUTPáz fehérjeszint nem eredményez látható fenotípusos változást egerekben.

5. Értekezés

A doktori értekezésemben bemutatott új, megbízható detektálási módszerek hozzájárulhatnak az U-DNS metabolizmusról rendelkezésre álló kvalitatív és kvantitatív ismereteink bővítéséhez. Dot-blot alapú U-DNS mérési módszerünk, amely egy katalitikusan inaktív UNG2 (Δ UNG) szenzorfehérjén alapul, lehetővé teszi a genomi uracilszint számszerűsítését különböző biológiai mintákban. Eredményeim továbbá igazolták, hogy az U-DNS szenzoron alapuló immuncitokémiai eljárás alkalmas az uracil *in situ*, sejtbeli kimutatására bakteriális vagy extrakromoszómális DNS-ben.

Az U-DNS szenzor konstrukció és festési módszert sikeres továbbfejlesztésével lehetővé vált a genomi uracil molekulák képalkotó vizsgálata komplex, eukarióta sejtekben konfokális, valamint szuperrezolúciós mikroszkópiával. Az eljárás optimalizálásához egy új HCT116 sejtvonalat alapítottam, amely stabilan képes expresszálni az UNG-gátló UGI fehérjét. Az UNG-gátolt sejtek drog (5FdUR vagy RTX) kezelése szignifikánsan megnövekedett U-DNS-szintet eredményezett, mely megfelelő modellrendszernek bizonyult a genomban megjelenő uracil vizsgálatához. Korábban nem volt példa olyan technikára, mely alkalmas lenne az uracil humán genomban megvalósuló *in situ* mikroszkópos detektálására. Szuperrezolúciós képalkotással vizsgálva az uracil lokalizációját eltérő mintázatot találtunk drogkezelt és kezeletlen sejtekben. Nevezetesen, a droggal kezelt sejteknél az U-DNS jel a sejtmagmembránon és a sejtmagvacskát körülvevő területeken volt jellemzőbb. A jövőben kolokalizációs tanulmányokkal lehetne összefüggéseket feltárni az U-DNS eloszlás és hisztonmarkerek vagy más genomi tulajdonságok lokalizációja között. Ebben fontos szerepet játszhat az általam kifejlesztett U-DNS immunprecipitációs módszer (U-DNA-Seq), mellyel szekvencia-specifikus információ nyerhető az uracil eloszlásról újgenerációs szekvenálással.

A dUTPáz fiziológiai szerepét *in vivo*, CRISPR/Cas9-indukált génszerkesztéssel vizsgáltuk meg egérmodellben. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a dUTPáz hiánya korai embrionális letalitást okoz egerekben. Homozigóta *dut* $-/-$ mutáns embriók kizárólag blasztociszta stádiumban voltak megtalálhatóak, így feltételezhetően korai embrionális fejlődési rendellenességek vezethetnek az embrió beágyazódás körül bekövetkező halálához. Figyelembe véve az anyai hatás korai lecsengését egerekben, az embriogenezis első néhány osztódási ciklusa a dUTPáz expressziójától függetlenül játszódhat le. Mivel az uracil genomi előfordulása számos fiziológiai és kóros folyamatban szerepet játszik, az itt bemutatott *dut* $+/-$ egerek és korai *dut* $-/-$ embriók hasznos modellek lehetnek további, az U-DNS metabolizmust célzó kutatásokban.

6. A doktori disszertáció tézisei

A doktori disszertáció téziseit a következőképpen lehet összefoglalni:

1. Az általunk kifejlesztett katalitikusan inaktív, Flag-ΔUNG-DsRed konstrukció alkalmazása lehetővé teszi az uracil molekulák *in situ*, sejten belüli detektálását baktériumokban. A detekció történhet immuncitokémiai úton a Flag-címkén keresztül, vagy akár közvetlenül is a fluoreszcens DsRed jelén keresztül. Jelölési módszerünk továbbfejleszhető a humán sejtek rendkívül összetett kromatinjában lévő uracilok kimutatására.
2. A dUTPáz kódoló *dut* gén a CRISPR/Cas9-mediált génszerkesztési technika ígéretes célpontja, mellyel *in vivo* tanulmányozhatóak a dUTPáz hiányos állapot élettani hatásai egérmodellekben.
3. CRISPR/Cas9 általi génkiütéssel csupán heterozigóta *dut* +/- utódok érhetők el egérben. Az életképes homozigóta *dut* -/- utódok hiánya arra utal, hogy a dUTPáz deficiencia prenatálisan halálos fenotípushoz vezet.
4. Különböző fejlődési stádiumban lévő embriók vizsgálata során homozigóta *dut* -/- mutáns embriókat hólyagsíra állapotban sikeresen azonosítottunk, azonban későbbi fejlődési szakaszokban már nem voltak kimutathatóak. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a dUTPáz hiánya korai embrionális letalitáshoz vezet egerekben.
5. Blasztociszták *in vitro* vizsgálata kimutatta, hogy mind a belső sejtsomó (ICM), mind a külső trofektoderma (TE) mérete szignifikánsan alacsonyabb a *dut* -/- embriókban. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a dUTPáz hiány olyan súlyos fejlődési rendellenességet okoz, mely halálos kimenetelű az embrió számára a méhbe történő beágyazódás idejében.
6. Western blot kísérletekkel igazoltam, hogy a heterozigóta *dut* +/- embriók szignifikánsan alacsonyabb dUTPáz fehérjeszinttel rendelkeznek a vad típusú embriókhoz képest, amely különbség a felnőtt állatokra is érvényes lehet.

7. Referenciák

1. Grafstrom, R. H., Tseng, B. Y. & Goulian, M. The incorporation of uracil into animal cell DNA in vitro. *Cell* **15**, 131–40 (1978).
2. Vértessy, B. G. & Tóth, J. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc. Chem. Res.* **42**, 97–106 (2009).
3. Vértessy, B. G. & Tóth, J. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc. Chem. Res.* **42**, 97–106 (2009).
4. Grogan, B. C., Parker, J. B., Guminski, A. F. & Stivers, J. T. Effect of the thymidylate synthase inhibitors on dUTP and TTP pool levels and the activities of DNA repair glycosylases on uracil and 5-fluorouracil in DNA. *Biochemistry* **50**, 618–27 (2011).
5. Ladner, R. D., McNulty, D. E., Carr, S. A., Roberts, G. D. & Caradonna, S. J. Characterization of distinct nuclear and mitochondrial forms of human deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase. *J. Biol. Chem.* **271**, 7745–51 (1996).
6. el-Hajj, H. H., Zhang, H. & Weiss, B. Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 1069–75 (1988).
7. Gadsden, M. H., McIntosh, E. M., Game, J. C., Wilson, P. J. & Haynes, R. H. dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **12**, 4425–31 (1993).
8. Erdélyi, P. *et al.* Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Sci.* **124**, 1510–8 (2011).
9. Castillo-Acosta, V. M., Estévez, A. M., Vidal, A. E., Ruiz-Perez, L. M. & González-Pacanowska, D. Depletion of dimeric all- α dUTPase induces DNA strand breaks and impairs cell cycle progression in *Trypanosoma brucei*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 2901–13 (2008).
10. Dubois, E. *et al.* Homologous recombination is stimulated by a decrease in dUTPase in *Arabidopsis*. *PLoS One* **6**, e18658 (2011).
11. Pecsí, I. *et al.* The dUTPase enzyme is essential in *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS One* **7**, e37461 (2012).
12. Muha, V. *et al.* Uracil-containing DNA in *Drosophila*: stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement. *PLoS Genet.* **8**, e1002738 (2012).
13. Horváth, A., Békési, A., Muha, V., Erdélyi, M. & Vértessy, B. G. Expanding the DNA alphabet in the fruit fly: uracil enrichment in genomic DNA. *Fly (Austin)*. **7**, 23–7 (2013).
14. Tye, B. K., Chien, J., Lehman, I. R., Duncan, B. K. & Warner, H. R. Uracil incorporation: a source of pulse-labeled DNA fragments in the replication of the *Escherichia coli* chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 233–7 (1978).
15. Guillet, M., Van Der Kemp, P. A. & Boiteux, S. dUTPase activity is critical to maintain genetic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2056–66 (2006).
16. Dengg, M. *et al.* Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates. *EMBO Rep.* **7**, 1046–51 (2006).
17. Canman, C. E. *et al.* Induction of resistance to fluorodeoxyuridine cytotoxicity and DNA damage in human tumor cells by expression of *Escherichia coli* deoxyuridinetriphosphatase. *Cancer Res.* **54**, 2296–8 (1994).
18. Canman, C. E., Lawrence, T. S., Shewach, D. S., Tang, H. Y. & Maybaum, J. Resistance to fluorodeoxyuridine-induced DNA damage and cytotoxicity correlates with an elevation of deoxyuridine triphosphatase activity and failure to accumulate deoxyuridine triphosphate. *Cancer Res.* **53**, 5219–24 (1993).
19. Koehler, S. E. & Ladner, R. D. Small interfering RNA-mediated suppression of dUTPase sensitizes cancer cell lines to thymidylate synthase inhibition. *Mol Pharmacol* **66**, 620–626 (2004).

20. Wilson, P. M., LaBonte, M. J., Lenz, H.-J., Mack, P. C. & Ladner, R. D. Inhibition of dUTPase induces synthetic lethality with thymidylate synthase-targeted therapies in non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 616–28 (2012).
21. Merényi, G. *et al.* Cellular response to efficient dUTPase RNAi silencing in stable HeLa cell lines perturbs expression levels of genes involved in thymidylate metabolism. *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids* **30**, 369–90 (2011).
22. Hagenkort, A. *et al.* dUTPase inhibition augments replication defects of 5-Fluorouracil. *Oncotarget* **8**, 23713–23726 (2017).
23. Dos Santos, R. S. *et al.* dUTPase (DUT) Is Mutated in a Novel Monogenic Syndrome With Diabetes and Bone Marrow Failure. *Diabetes* **66**, 1086–1096 (2017).
24. Kim, Y.-J. & Wilson, D. M. Overview of base excision repair biochemistry. *Curr. Mol. Pharmacol.* **5**, 3–13 (2012).
25. Krokan, H. E., Drabløs, F. & Slupphaug, G. Uracil in DNA--occurrence, consequences and repair. *Oncogene* **21**, 8935–48 (2002).
26. Pettersen, H. S. *et al.* UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8430–44 (2011).
27. Slupphaug, G. *et al.* Properties of a recombinant human uracil-DNA glycosylase from the UNG gene and evidence that UNG encodes the major uracil-DNA glycosylase. *Biochemistry* **34**, 128–38 (1995).
28. Khodursky, A., Guzmán, E. C. & Hanawalt, P. C. Thymineless Death Lives On: New Insights into a Classic Phenomenon. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 247–63 (2015).
29. Kunz, C. *et al.* Base excision by thymine DNA glycosylase mediates DNA-directed cytotoxicity of 5-fluorouracil. *PLoS Biol.* **7**, e91 (2009).
30. Wilson, P. M., Danenberg, P. V., Johnston, P. G., Lenz, H.-J. & Ladner, R. D. Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11**, 282–98 (2014).
31. Kerepesi, C. *et al.* Life without dUTPase. *Front. Microbiol.* **7**, 1768 (2016).
32. Wang, Z. & Mosbaugh, D. W. Uracil-DNA glycosylase inhibitor gene of bacteriophage PBS2 encodes a binding protein specific for uracil-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* **264**, 1163–71 (1989).
33. Serrano-Heras, G., Bravo, A. & Salas, M. Phage phi29 protein p56 prevents viral DNA replication impairment caused by uracil excision activity of uracil-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19044–9 (2008).
34. Kiljunen, S. *et al.* Yersiniophage phiR1-37 is a tailed bacteriophage having a 270 kb DNA genome with thymidine replaced by deoxyuridine. *Microbiology* **151**, 4093–102 (2005).
35. Uchiyama, J. *et al.* Intragenus generalized transduction in *Staphylococcus* spp. by a novel giant phage. *ISME J.* **8**, 1949–52 (2014).
36. Wang, H.-C. *et al.* *Staphylococcus aureus* protein SAUGI acts as a uracil-DNA glycosylase inhibitor. *Nucleic Acids Res.* **42**, 1354–64 (2014).
37. Yan, N., O'Day, E., Wheeler, L. A., Engelman, A. & Lieberman, J. HIV DNA is heavily uracilated, which protects it from autointegration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 9244–9 (2011).
38. Kavli, B., Otterlei, M., Slupphaug, G. & Krokan, H. E. Uracil in DNA--general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair (Amst.)* **6**, 505–16 (2007).
39. Róna, G. *et al.* Detection of uracil within DNA using a sensitive labeling method for in vitro and cellular applications. *Nucleic Acids Res.* **44**, e28 (2016).
40. Pálincás, H. L. *et al.* CRISPR/Cas9-Mediated Knock-Out of dUTPase in Mice Leads to Early Embryonic Lethality. *Biomolecules* **9**, (2019).

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Dr. Róna Gergely kijelentem, hogy Pálincás Hajnalka Laura PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

2020.02.28.



.....

szerző

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

Róna G, Scheer I, Nagy K, Pálincás HL, Tihanyi G, Borsos M, Békési A, Vértessy BG. Detection of uracil within DNA using a sensitive labeling method for in vitro and cellular applications. Nucleic Acids Res. 2016; 44(3):e28.

doi: 10.1093/nar/gkv977

