

MTA doktori értekezés tézisei

A DNS-építőkövek dinamikájának szerepe a genomstabilitásban

Tóth Judit

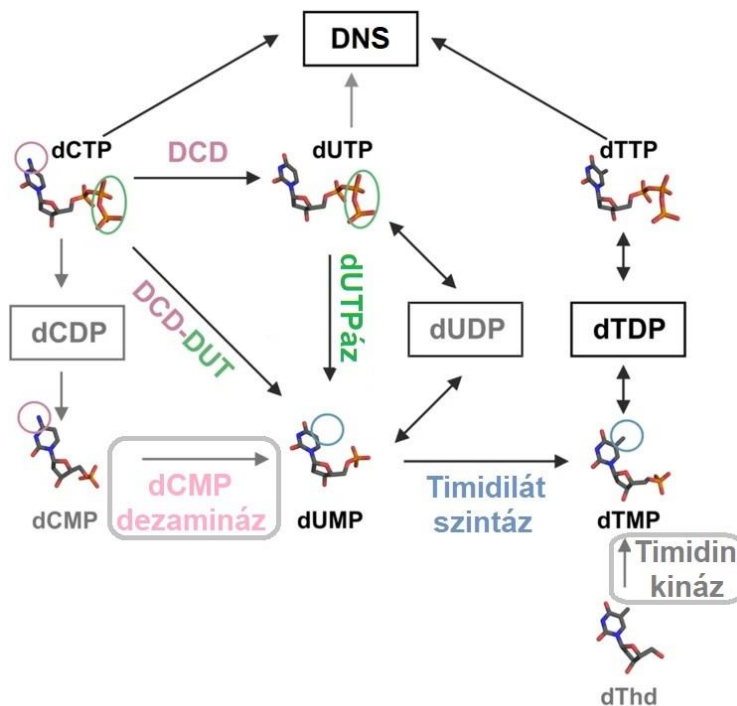


Budapest

2021

I. BEVEZETÉS

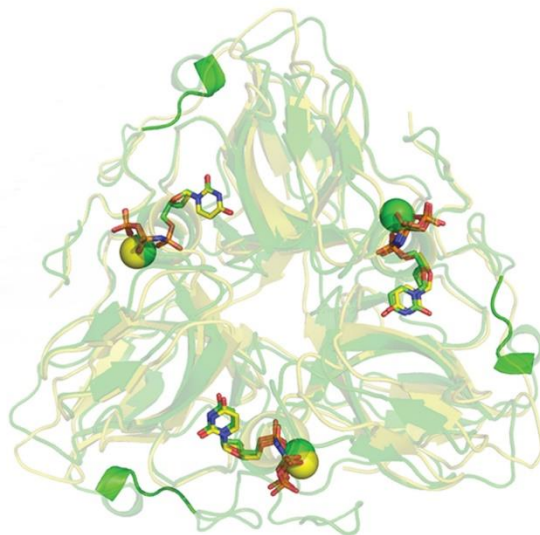
A DNS-t felépítő dezoxiribonukleotidok bioszintézise a megfelelő ribonukleozid-difoszfátból (ADP, GDP, CDP és UDP) a nukleobázisra nem-specifikus enzimek által, azonos kémiai reakciók láncolatában történik. Kivétel ez alól a dTTP, amelynek prekursorai a vele azonos információtartalmat hordozó dezoxiuridin vegyületek. Egy külön enzimszisztéma áll rendelkezésre annak a metilációs reakciónak a katalizálására, amely létrehozza a timint az uracilból. A metiláció a dUMP szintjén megy végbe, a dUMP termelés tehát limitáló lépés (ún. „bottleneck”) a dTTP bioszintetikus folyamatban (1. ábra). dUMP többféle – fajra jellemző – módon keletkezik az élőlényekben: dCMP-ből dezaminálással, dUTP-ből a foszfátlánc hidrolízisével vagy dCTP-ből a két előző reakció egy vagy két enzimen történő kombinálásával (1. ábra). Az élőlények nagy részében (pl. emlősök, *E. coli*) a dUMP keletkezés fő fluxusát a dCMP→dUMP útvonal képviseli. A dCTP→dUMP átalakulást katalizáló bifunkciós dCTP-dezamináz:dUTPáz enzim (Dcd:dut) ritkán fordul elő (pl. *Mycobacterium* sp., archeák), és a dCTP-dezamináz (Dcd) jelenléte sem általános. A dUTP→dUMP hidrolízist katalizáló dUTPáz enzim azonban szinte minden élőlényben megtalálható, sőt a vírusok többségében is^{1,2}.



1. ábra: A timidilát bioszintézis útvonalai. A de novo szintézis útvonal a timidilát szintáz enzimén és obligát dUMP prekursoron keresztül, míg a visszamentő útvonal a timidin kináz enzim segítségével alacsonyabb foszforiláltsági állapotú timidin származékokon keresztül történik. Azt a két reakciót, amely a *Plasmodium* és *Mycobacterium* fajokban hiányzik, szürke négyzettel jelöltem. Ezekben a fajokban mindenképpen dUTP-n keresztül keletkezik a dUMP, és ebből a dTTP.

Érdekes módon az összes felsorolt, a dUMP prekursorhoz vezető útvonalat katalizáló enzim (dUTPáz, Dcd és Dcd:dut) szerkezetileg azonos felépítésű, rafináltan összefűzött homotrimer

(2. ábra), és aktív centrumaik is nagyban konzerváltak egymás közt. Közös jellemzőjük, hogy az átalakítandó pirimidin dezoxinukleotidot specifikusan kötik, és a megfelelő ribonukleotidot kizárják az aktív helyről. Ez a megfigyelés azt sejteti, hogy a dUMP keletkezés alapvető folyamata egy töről származik, amelyből azután eltérő metabolikus stratégiák alakultak ki. A dUMP-t szubsztrátként használó timidilát szintézisnél ismét összeérnek az útvonalak (1. ábra), ez a lépés ugyanis rendkívül konzervált.



2. ábra: A dUTPáz homotrimer. A humán (PDB azonosító: 3EHW) és *M. tuberculosis* dUTPáz (PDB ID: 2PY4) egymásra illesztett szerkezetét sárga, illetve zöld szalagként ábrázoltuk. A mikobakteriális inszert hurokszerkezetet indukál a dUTPáz monomerek felületén (erősebb zöld szalag ábrázolás). Az egyes aktív helyeken kötött szubsztrátokat (pálcika modell) mindhárom alegység konzervált szekvenciamotívumai koordinálják. Bár minden alegység tartalmazza az összes szükséges motívumot a szubsztrát megkötéséhez, a trimerképződés elengedhetetlen ahhoz, hogy ezek a megfelelő pozícióba helyezkedjenek.

Miért szükséges költséges módon timinnel helyettesíteni az uracilt a DNS-ben? A bázispárosodás szempontjából jelentéktelen a különbség e két bázis között és a DNS polimeráz szubsztrátként fogadja el mind a dUTP-t, mind a dTTP-t. A helyettesítés oka ugyanabban a kémiai átalakulásban keresendő, amelyet a fent bemutatott dCTP/dCMP-dezamináz enzimek katalizálnak: a citozin aminocsoportjának elvesztésében, vagyis uracillá történő átalakulásában. A sejtbeli körülmények között a reakció spontán is megtörténik, és ezzel a C→U átalakulással a DNS eredeti C:G bázispárjából a következő osztódásnál javítás hiányában T:A bázispár lesz. Ennek a súlyos, mutagén hibának a javítására létrejött egy uracilt felismerő és eltávolító mechanizmus, amely minden uracilt eltávolít a DNS-ből, az adeninnel szemben lévő, nem-mutagén uracilokat is. A timin metilcsoportja tehát egy megkülönböztető jelzés, használatával a citozin kémiai instabilitása mellett is lehetővé válik a bázispárosodásban rejlő információ hosszú távú megőrzése. Ez a megoldás azonban további következményeket is von maga után: a folyamatosan keletkező dUTP-től meg kell szabadulni. A dUTP/dTTP arányt alacsonyan kell tartani ahhoz, hogy a különben beépülő uracil ne terhelje túl a hibajavító rendszert. A folyamatosan keletkező dUTP eltávolítása a dNTP készletből a dUTPáz enzimes család segítségével történik minden ismert élőlényben. Enzimológiai és alkalmazott kutatási, gyógyászati szempontból is érdeklődésre tartanak számot ezek az enzimek.

A foszfátasítási és -transzferreakciók univerzálisak minden biológiai folyamatban, és számos aspektusuk a megfelelő katalitikus reakciókat végző enzimek többségében közös. Ilyen például a kétértékű Mg^{2+} ionok, illetve a foszfátláncot koordináló motívumok jelenléte és alkalmazása a katalízisben. Alaputatási szempontból szintén érdekes a dUTPáz szupercsaládra jellemző konzervált homotrimer szerkezet és az ebben rejlő allosztérikus lehetőségek (2. ábra). Érdekes az a mechanizmus, amellyel a dUTPázok a hidrolízist a α és a β foszfátcsoportok közé irányítják egy, a DNS polimerázokétól eltérő módon. Jelentős kérdés továbbá, hogy az egyes élőlényekben milyen szerepet játszanak még amellet, hogy egyszerű lebontó anyagcsere-funkciót látnak el. Alkalmazott kutatási szempontból pedig azért tartanak érdeklődésre számot, mert a dUTPáz enzimes család ígéretesnek bizonyul a rákellenes és antimikrobiális terápiák célpontjaként is. A kemoterápiában gyakran alkalmazott fluoropirimidin antimetabolitok a timidilát szintáz enzimet gátolják, és ezzel megakadályozzák a dUMP→dTMP átalakulást, következésképpen a *de novo* dTTP bioszintézist (1. ábra). dTTP azonban a visszamentő útvonalakon is keletkezhet, ezért az antimetabolitok hatására nem fogy el teljesen a DNS szintézisre rendelkezésre álló dTTP készlet, és a közvetített citotoxikus hatásban a dUTP/dTTP arány eltolódása is szerepet játszik³. Az osztódó sejt nem csak a dTTP-hiánnyal küzd, hanem a magas dUTP/dTTP arány következtében uracil épül be a képződő DNS szálba, ami túlhajszolt DNS javítási ciklust indít be, és ez végül sejthalálhoz vezet⁴. Ezért, ha a timidilát szintézis gátlással egyidejűleg a dUTPázt is gátolni lehet, akkor még inkább eltolható a sejtbeli dUTP/dTTP arány, és ezzel a kemoterápiás hatás fokozható⁵⁻⁹.

A rákellenes terápiák mellett a dUTPáz gátlása alkalmas lehet egyes fertőző betegségek, például a retrovirális fertőzések², a malária¹⁰⁻¹² és a tuberkulózis¹³ ellen is. A *Plasmodium falciparum* és a *M. tuberculosis* kórokozókban a dTMP bioszintézise a dUTPáz aktivitására támaszkodik (1. ábra). Mint említettem, a legtöbb szervezetben dCMP dezaminázok állítják elő a dUMP nagy részét, ezért ezekben a szervezetekben a dUTPáz-katalizált reakcióból származó dUMP-ellátás kevésbé fontos. Az enterobaktériumokban, a mikobaktériumokban és a plazmódiumokban azonban a citozin dezamináció kizárólag a dCTP szintjén történik, amelynek eredményeképpen a dUTP-t a dUTPáz segítségével dUMP-vé kell átalakítani (1. ábra), ezért a dUTPáz szerepe ezekben az élőlényekben kiemelt⁴.

Mindezek a nyitott alaputatási és orvosbiológiai kérdések, valamint a jórészt párhuzamosan született fent idézett eredmények folyamatos motivációt nyújtottak arra, hogy minél mélyrehatóbban megértsük a pirimidin dNTP-k egymásba való átalakulásának dinamikáját, különös tekintettel a dUTPázok enzimatis működésére és ennek élettani szerepére.

II. CÉLKITŰZÉSEK

A genomanyagcsere témakörben **levelező szerzőként** közzétett és a doktori műben tárgyalt publikációk célkitűzései:

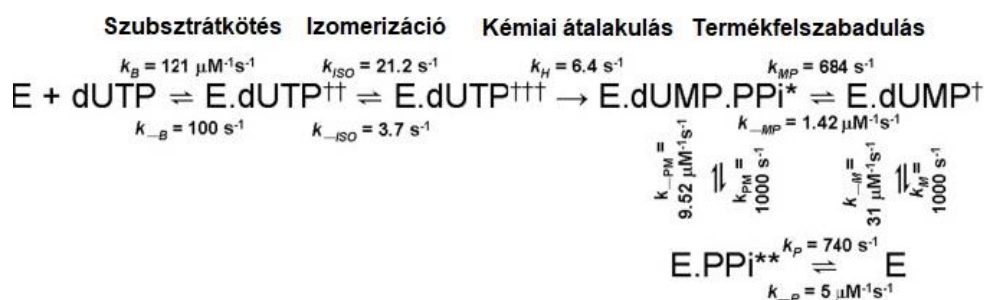
1. A trimer dUTPáz kvantitatív enzimkinetikai modelljének megalkotása, az enzimciklus részleteinek feltárása (Tóth *et al*, JBC 2007). Ez a munka szolgáltatta az alapot a további célok megfogalmazására, és azok kutatásának módszertani megvalósíthatóságára. A következő munkákban mindvégig a vizsgált enzimen túlmutató tágabb, alapvető enzimológiai összefüggések feltárására törekedtünk.
2. Az aktív helyen minden dUTPázban, illetve a legtöbb nukleotid hidrolázban megtalálható szubsztrát és enzim közötti aromás kölcsönhatás szerepének és jelentőségének feltárása az enzimkatalízisben (Pécsi *et al*, NAR 2010).
3. A P-hurok NTPázok enzimsaládjának nevet adó motívum azonosítása és különös szerepének felderítése a dUTPázban, a hasonló módon kötődő dUTP (szubsztrát) és dUDP (nem-szubsztrát) megkülönböztetésének mechanizmusa (Pécsi *et al*, PNAS 2011, Lopata *et al*, ACS Catalysis 2015).
4. A dUTPázok fehérjeszerkezetében rejlő allosztérikus szabályozási lehetőségek vizsgálata (Szabó *et al*, SciRep 2016).
5. A spektroszkópiailag látszólag zárt nukleotidkötő zsebbe történő nukleotidkötés és az onnan történő termékfelszabadulás mechanizmusának vizsgálata (Lopata *et al*, JBC 2016)
6. A Mg²⁺-mentes enzimaktivitás kivizsgálása (Lopata *et al*, Biomolecules 2019)
7. A mikobakteriális dUTPáz élettani szerepének vizsgálata (Pécsi *et al*, PLoS One 2012, Hirmondó *et al*, SciRep 2017)
8. A dUTPáz, mint génexpresszió-szabályozó fehérje kapcsolómechanizmusának felderítése (Szabó *et al*, 2014 NAR)
9. Megbízható és elérhető dNTP mérési módszer kifejlesztése (Szabó *et al*, NAR 2020)
10. Az irodalomban fellelhető dNTP mérések összegyűjtése és rendszerezése, mennyiségi dNTP-adatok előkészítése átfogó bioinformatikai analízishez (Pancsa *et al*, NAR 2021)

III. EREDMÉNYEK

III.1 A DUTPÁZ ENZIMATIKUS MECHANIZMUSA

III.1.1 A hidrolízis ciklus kvantitatív kinetikai modellje

A modern farmakológia megköveteli a célenzimek pontos hatásmechanizmusának ismeretét, ezért a rendelkezésre álló nagyfelbontású szerkezeti adatokat a humán dUTPáz oldatkinetikai vizsgálataival kívántuk kiegészíteni. Ehhez az aktív helyre ráhajló C-terminális karba egy belső triptofán-érzékelőt terveztünk, amely a továbbiakban nagyon hasznosnak bizonyult. A W158 fluoreszcens jele az enzimciklus minden lehetséges ligandum-kötött állapotát képes fluoreszcencia jelintenzitás és hullámhossz maximum (λ_{\max}) alapján megkülönböztetni. E jelváltozások segítségével tranziens kinetikai módszerekkel vizsgáltuk tovább az enzimreakciót és megmutattuk, hogy a dUTPáz hidrolízis ciklusa legalább négy különböző enzimatomikus lépésből áll: (i) gyors és reverzibilis szubsztrátkötés, (ii) az enzim-szubsztrát komplex izomerizációja a katalitikusan kompetens konformációvá, (iii) hidrolízis (kémiai) lépés, és (iv) a termékek gyors, random sorrendben történő felszabadulása (3. ábra). A kémiai lépés sebességét a radioaktív quench-flow technikával határoztuk meg, az erre alkalmas $\gamma^{32}\text{P}$ -jelzett dUTP előállítására új enzimatomikus módszert dolgoztam ki.



3. ábra: A humán dUTPáz enzimatomikus mechanizmusa

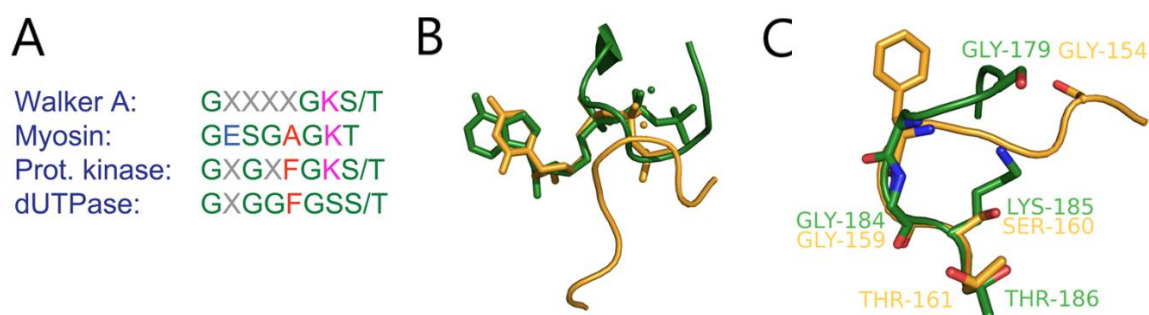
III.1.2 Az enzim és szubsztrát közötti aromás kölcsönhatás hozzájárulása a katalízishez

Az aromás kölcsönhatások jelentősége a makromolekulák konformáció-szabályozásában széles körben elfogadott¹⁴ és tanulmányozott számos biológiai rendszerben, az enzimatomikus katalízisben betöltött szerepe azonban kevesebb figyelmet kap. Az előző enzimatomikus mechanizmusról és a fehérjeszerkezetről szerzett ismereteink alapján azonban azt feltételeztük, hogy a dUTPáz enzim C-terminális karjában lévő konzervált aromás aminosav (az a F158 a humán dUTPázban, amelyet triptofán szenzorra cseréltünk) és a nukleotid bázis közötti π - π kölcsönhatásnak katalitikus szerepe lehet az α - és β -foszfátcsoportok közötti hidrolízisreakcióban. Ennek az aromás kölcsönhatásnak korábban a szubsztrát megkötésében és esetleg a termék felszabadításában tulajdonítottak szerepet szerkezeti megfontolások alapján¹⁵. Hipotézisünk tesztelésére mutáns fehérjéket állítottunk elő és kristályosítottuk őket, kinetikai és spektroszkópiás kísérleteket végeztünk rajtuk a változás hatásának feltárására.

Az irodalomban megfogalmazott várakozásokkal ellentétben azt mutattuk ki, hogy az aromás kölcsönhatás megszüntetése csak kis mértékben befolyásolta a szubsztrát kötődését, miközben kifejezetten csökkentette a kémiai lépés sebességi állandóját, ami a katalitikus hatékonyság összességében 100-szoros csökkenését eredményezte. Kristályszerkezeti, kinetikai, optikai spektroszkópai és termodinamikai számítási módszereket is alkalmazva javasoltuk a következő lehetséges mechanizmust, amellyel a sebesség-gyorsulás elérhető ezzel a távoli π - π kölcsönhatással: mivel a dUTPáz az enzimciklusa során kísérleteink szerint nem megy át nagy konformációs változásokon, katalitikus hatása valószínűleg a nagy hatótávolságú elektrosztatikus stabilizációnak és/vagy az átmeneti állapot geometriai optimalizálásának köszönhető. Tanulmányunk azt mutatja, hogy a katalitikus elektrosztatikus hatás egyik fontos komponense a vizsgált aromás kölcsönhatásból származik, amely a reaktánsok komplexét gyengén, míg az átmeneti állapotot fokozottan stabilizálja. Ez a hatás a katalízisre azért sajátos, mivel az aromás kölcsönhatás által befolyásolt uracil viszonylag távol van az α -foszfátcsoport hidrolízisének helyétől. A különböző nukleotid-hidrolizáló enzimekben (például az ATPázok legtöbb családjában) található hasonló aromás kölcsönhatások sokasága felveti annak lehetőségét, hogy az általunk leírt jelenség a foszfoanhidrid hidrolízis enzimatis katalízisének általános összetevője.

III.1.3 A dUTPáz P-hurokszerű motívumot alkalmaz a katalitikus hatékonyság fokozására és a nukleotid foszforiláltsági állapotának megkülönböztetésére

A dUTPáz sok más nukleotidkötő fehérjéhez hasonlóan egy konzervált hurok motívumot (V. motívum) tartalmaz a nukleotid foszfátláncának koordinálására. A népes, P-hurok NTPáz néven ismert, ATPáz és GTPáz enzimcsaládba tartozó kinázok, citoskeleton és DNS motorok, membrán pumpák és transzporterek a nukleotidban a β - γ -foszfátok közötti hidrolízist katalizálják, míg a dUTPáz az α - β -foszfátok közötti foszfoanhidrid kötés hasadását segíti elő. A hurokszekvenciák összehasonlítása alapján a dUTPáz V. motívuma is egy kvázi P-hurok (4. ábra).



4. ábra: (A) Konszenzus P-hurok motívumok jól ismert P-hurok NTPázokból, összehasonlítva a dUTPázok P-hurokszerű szekvenciájával. A színezés a következő, poláris oldalláncok, zöld; apoláris, piros; negatív töltésű, kék; pozitív töltésű, magenta. (B) P-hurok konformációk összehasonlítása egy reprezentatív ATPázban (miozin) és a dUTPázban. A hurok és a szubsztrát foszfátláncának relatív helyzete. (C) A két fehérjében található P-hurokok lehető legjobb egymásra illeszkedése.

Annak érdekében, hogy betekintést nyerjünk a P-hurokszerű szekvencia dUTPáz-béli szerepébe, olyan P-hurok mutánsokat terveztünk, amelyek teljesen vagy részben elvesztették a kapcsolatot a szubsztrát nukleotid γ -foszfátjával. Ezeket a mutáns enzimeket kinetikai és ligandumkötési kísérleteknek vetettük alá két alapvető kérdést vizsgálva: egy P-hurokszerű motívum lehetséges hozzájárulása 1) a nukleozid-di- és trifoszfát ligandumok megkülönböztetéséhez; 2) és a katalitikus hatékonysághoz. Eredményeink azt mutatták, hogy a P-hurokszerű motívum mutánsai elvesztették a dUDP/dUTP diszkriminációs képességüket, ugyanakkor a katalitikus hatékonyságuk a H-kötési hálózatba való beavatkozás mértékében csökkent, mégpedig a kémiai lépés sebességi állandójának csökkenésével, nem pedig a szubsztrátkötés akadályoztatása által. A kinetikai paraméterek meghatározása mellett QM/MM (kvantummechanika és molekuláris mechanika kombinációja) módszertan segítségével is tanulmányoztuk a protonátvitel és a foszfátasítás reakciómechanizmusát az általunk meghatározott nagyfelbontású kristályszerkezeteken. Azt a következtetést vontuk le, hogy a γ -foszfát és a P-hurokszerű motívum közötti H-kötés kölcsönhatások elősegítik az α -foszfát körüli reakcióközpont katalitikusan kompetens konformációját, és ezzel felgyorsítják a kinetikai ciklus kémiai lépését. Megmutattuk, hogy a P-hurok-szerű motívum hiányának fő mechanisztikus hatása az, hogy leválasztja a foszfátasítást az azt következő protonátviteli lépésről, ami egy magas aktiválási energiagáttal jellemezhető megváltozott reakcióutat eredményez. Emiatt a hidrolízis nagyon lassan vagy egyáltalán nem megy végbe a γ -foszfát és az V. motívum közötti kölcsönhatás hiányában, azaz dUDP, dUDP.BeFx típusú szubsztrát, vagy P-hurkot nem tartalmazó mutáns esetében.

E hurkok teljesen eltérő topológiája és részben hasonló funkciója a foszfátkötő motívumok konvergens fejlődését jelzi a nukleotid-hidrolázok nagyobb csoportjában, beleértve a P_i-t termelő difoszfátázokat. A hasonlóságok és különbségek a dUTPáz V. motívum és az ATP- és GTPázok által gyakran használt P-hurok (vagy Walker A szekvencia) között (4. ábra) jó példát szolgáltatnak a különböző nukleotid-hidrolízis feladatokhoz való kifinomult funkcionális adaptáció megértéséhez.

III.1.4 Csereviszony a kooperativitás és a specificitás között az uracil-mentes DNS fenntartáséért

A közelmúlt eredményei alapján nézetváltás következett be az allosztérikus viselkedés egy adott fehérje-architektúrán belüli megnyilvánulásának megértésében. A klasszikus értelmezés mellett megjelent az allosztéria finomabb, dinamikus értelmezése, amely nem feltételezi kinetikailag markánsan megkülönböztethető konformációk létezését. Ebben a tanulmányunkban a dUTPázok szupercsaládján belül kívántuk megvizsgálni az allosztéria megnyilvánulását és ennek funkcionális következményeit. A szupercsaládba tartoznak az 1. ábrán látható dUTPáz, dCTP dezamináz (Dcd) és a bifunkciós dCTP dezamináz-dUTPáz (Dcd:dut) enzimek, amelyek a *de novo* dTTP szintézis obligát prekursorát, a dUMP-t termelik dUTP-ből vagy dCTP-ből (1. ábra). A dUTPáz szupercsalád tagjai fontos szerepet játszanak a pirimidin nukleotid egyensúly és a genom integritásának fenntartásában. A Dcd és Dcd-dut enzimeket a dTTP allosztérikusan szabályozza. Ezek az enzimek tehát mindhárom pirimidin

nukleotidot képesek kötni (dCTP, dUTP, dTTP). Azonban az allosztérikus viselkedés megnyilvánulása a dUTPázok, a szupercsalád harmadik tagjának az előzőkkel azonos fehérje architektúráján belül évtizedekig vita tárgyát képezte. A kérdés vizsgálatára olyan kísérleti elrendezést terveztünk, amely a dinamikus allosztéria kimutatására is alkalmas. Kovalens hibrid dUTPázt hoztunk létre, amelyben mindhárom alegység kicserélhető, hogy szelektíven tartalmazza a kívánt mutációt. Ezáltal megfigyelhető egy fehérjén belül az eltérő aktívhely-konformációk egymásra gyakorolt hatása.

Kimutattuk, hogy a reakciósebesség arányosan csökkent az inaktív helyek számával, ami azt jelzi, hogy a működő alegységre jutó aktivitás változatlan a hibrid enzimekben. Azaz megkérdőjelezhetetlen megállapítást nyert, hogy az alegységek önállóan működnek a dUTPázban. A dUTPáz szupercsalád enzimek összehasonlító szerkezeti elemzésével kimutattuk, hogy egy néhány aminosavból álló allosztérikus hurok és ezen enzimek központi csatornájának csekély szerkezeti különbségei drámaian eltérő allosztérikus viselkedést eredményeznek. Bemutattuk, hogy az allosztérikus szabályozás hiánya a dUTPázban a hatékonyabb dUTP-hidrolízishez való funkcionális alkalmazkodással függ össze. Szintézisként azt javasoljuk, hogy a kooperatív allosztéria és a szubsztrátspecifitás közötti csereviszony a dUTPáz szupercsaládban a dTTP-szintézishez szükséges negatív visszacsatolással szabályozható dUMP-termelés, és a DNS-beli uracil elkerüléséhez szükséges hatékony dUTP-eltávolítás szerepeihez való alkalmazkodás eseteit testesítik meg.

III.1.5 A dUTPáz rejtett aktív helye kis amplitúdójú fehérje konformációs változásokon keresztül érhető el

A nukleotidot hidrolizáló enzimek interdomén hasadékokban vagy alegységek között elhelyezkedő kötősebei többek között a katalizált reakció oldószertől való „árnyékolását” is szolgálják. Általában a nukleotidkötéshez kapcsolódó konformációs változások eredményezik az aktív hely bezárását, lehetővé téve a kötést követő reakciólépéseket¹⁶⁻²⁰. A különböző apo és nukleotidokhoz kötött állapotokban mért oldószer-hozzáférhetőség szerint a dUTPáz aktív helye azonban viszonylag zárt konformációt vesz fel a reakcióciklus-idő legnagyobb részében²¹. A „zárt” aktív hely és az oldószer közötti ligandum transzfer vizsgálatára a RAMD módszert alkalmaztuk (Random Acceleration Molecular Dynamics). A RAMD módszer a ligandumra ható mesterséges és random irányú erőt alkalmaz, amely felgyorsítja az enzimről történő disszociációs folyamatot, ezzel ésszerű időkeretet biztosítva a számítási szimulációkhoz²². A nagyfelbontású *M. tuberculosis* dUTPáz szerkezeteinket használtuk fel az RAMD szimulációk kivitelezésére.

A RAMD futások során egyszer sem figyeltük meg a korábban feltételezett csapóajtószerű mechanizmust, amelyben a C-terminális kar teljesen kinyílik egy konzervált prolin sarokpontjánál²³. Ehelyett a C-terminális kar kis nyílásain keresztül hagyta el a nukleotid az aktív helyet. A kar, amely mindkét végén az enzim felszínéhez rögzítve maradt másodlagos kölcsönhatásai révén, csak az enzim felületéhez közel mozdult el, vagy részben és lokálisan nyílt fel. Ez a megfigyelés konzisztens minden eddigi eredménnyel, és egyaránt magyarázza a spektroszkópiában megfigyelt predominánsan zárt, illetve a kristályszerkezetekben nem

látszó, tehát dinamikus C-terminális kar konformációt. Összefoglalva, molekuladinamikai számításaink és spektroszkópai eredményeink alátámasztják azt az elképzelést, hogy a kis hurokmozgások lehetővé teszik a nukleotidok átjárását a kötőzseb és az oldószér között anélkül, hogy a kötőzseb markáns nyitott-zárt konformációváltáson menne át.

III.1.6 Az EDTA szorosan köti a dUTPáz, Taq DNS polimerázt és a MutT enzimet, és gátolja a dUTPáz aktivitást

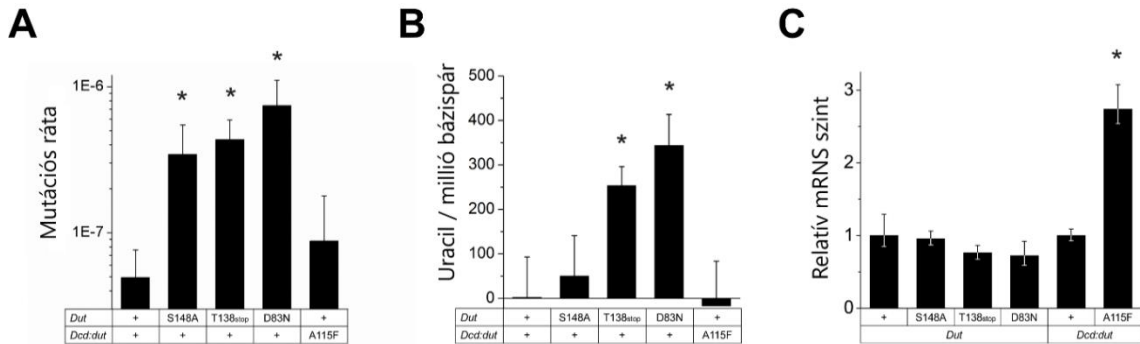
A kis szerves vegyület etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) jól oldódó, optikailag inaktív, és nem reagál a legtöbb pufferben használt vegyszerrel, így előnyös választásnak tűnik a fémmentes körülmények biztosítására a biokémiai és biofizikai vizsgálatokhoz. A dUTPáz fém (II) ionok hiányában mért aktivitása körül tapasztalt ellentmondások azonban felhívták a figyelmünket az EDTA kelátképzésen túli feltételezett egyéb hatására. Ezért kezdtük tanulmányozni az EDTA kölcsönhatását két különböző, általunk már jól ismert dUTPázzal (humán és *M. tuberculosis*) Mg^{2+} -mentes körülmények között. Kimértük, hogy a Mg^{2+} hiánya csak felére csökkenti a katalízis sebességét EDTA nélkül, az EDTA viszont szorosan köt a dUTPázok aktív helyéhez, és kompetitíven gátolja azok aktivitását. *In silico* dokkolással azt találtuk, hogy az EDTA hasonló kölcsönhatási hálózatot képez a fehérjével, mint maga a szubsztrát. E megfigyelés nyomán feltételeztük, hogy más dNTP-kötő fehérjék aktív helyére is beköthet, és valóban, kimértük, hogy a Taq polimeráz és a MutT erősebben köti az EDTA-t, mint a saját szubsztrátjait. Nem-dNTPáz kontrollfehérjék, köztük egy ATPáz, nem léptek kölcsönhatásba az EDTA-val. Eredményeink azt mutatják, hogy az EDTA a dNTP hidrolizáló enzimek szelektív gátlószere lehet. Ez egyrészt arra figyelmeztet, hogy az EDTA használatát újra kell gondolni az enzimreakciókat vizsgáló kísérletekben. Másrészt viszont érdemes megfontolni EDTA alapú szelektív gátlószerek kifejlesztését, mint ahogyan arra más enzimeknél már van példa^{24,25}.

III.2 A DUTPÁZ ÉLETTANI SZEREPE

III.2.1 A dUTPáz szupercsalád tagjainak specializációja a dTTP bioszintézisére és a genomi integritás fenntartására *Mycobacterium smegmatis*ban

Mivel a dTTP bioszintézis alapvető folyamat és számos jelenlegi gyógyszeres terápia és gyógyszerfejlesztés fő célpontja, fontos meghatározni azokat az útvonalakat, amelyekben a dUTPáz kulcsfontosságú hozzájárulással bír. A dUTPázok dTTP bioszintéziséhez és a DNS uraciláció megelőzéséhez való hozzájárulásának vizsgálatához a mikobaktériumot kiváló modellnek találtuk, mivel ebben az élőlénycsoportban a dTTP bioszintetikus utak a dUTPáz aktivitástól függő utakra korlátozódnak^{26,27} (1. ábra). A jól ismert monofunkciós dUTPáz (a *dut* gén terméke) mellett egy bifunkciós dCTP-dezamináz-dUTPáz (Dcd:dut) (1. ábra) is azonosítottak a *M. tuberculosis* genomjában²⁸. Miután részletesen tanulmányoztuk a mikobakteriális dUTPáz szerkezetét és enzimmechanizmusát²⁹⁻³¹, az enzim élettani hatását is elkezdtek behatóan vizsgálni. Ehhez egy új modellrendszert honosítottunk meg: a gyorsan növekvő és veszélytelen *M. smegmatis*, a *M. tuberculosis* nem-fertőző közeli rokonát, miután

a *M. tuberculosis* és a *M. smegmatis* dTTP bioszintézis útvonalában szerepet játszó enzimek között azonosnak találtuk. Kétlépcsős rekombinációs géniükészlettel kimutattuk, hogy a monofunkciós dUTPáz elvesztése letális a *M. smegmatis* számára. Kimutattuk, hogy egy 5 aminosavból álló mikobaktérium-specifikus dUTPáz szekvencia eltávolítása letalitást okoz annak ellenére, hogy e fehérjeszakasz hiánya nem okoz jelentős aktivitáscsökkenést. A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy mi az összefüggés a letalitás és a dUTPáz-aktivitás között. Fokozatosan csökkentett enzimaktivitású és inaktív monofunkciós dUTPáz és inaktív bifunkciós Dcd:dut *M. smegmatis* mutáns törzseket hoztunk létre. Azt találtuk, hogy akár a monofunkciós dUTPáz, akár a bifunkciós Dcd:dut aktivitása önállóan is képes támogatni a sejtnövekedést. A dUTPáz aktivitással nem rendelkező kettős inaktív mutáns *M. smegmatis* törzs azonban életképtelennek bizonyult. Az aktivitás-csökkentett monofunkciós dUTPáz mutáns *M. smegmatis* törzsek megnövekedett mutációs rátát mutattak, ami a genomi uraciltartalom növekedésével járt együtt (5. ábra).



5. ábra: A monofunkciós és bifunkciós dUTPáz aktivitáscsökkentésének hatása a *M. smegmatis* mutációs rátájára (A) és DNS-ének uraciltartalmára (B). A D83N és A115F mutánsok inaktívnak tekinthetők, a S148A mutáns egy, a T138stop pedig két nagyságrenddel csökkent enzimaktivitással rendelkezik. A „+” a vad típusú enzimet jelöli. (A) Szignifikanciaszintek: $P = 0,000115$ S148A esetén, $P = 0,000034$ T138stop és $P = 0,000004$ D83N esetén. (B) Szignifikanciaszintek: $P = 0,074$ a T138stop esetében, $P = 0,018$ a D83N esetében. (C) A Dut és Dcd:dut expressziós szintek mennyiségi meghatározása a vad típusú és mutáns *M. smegmatis* törzsekben. Ez a kontroll annak kizárására szolgál, hogy a megfigyelt fenotípus nem a mutáció hatásával, hanem az expressziós szinttel korrelál. Szignifikanciaszint: $P = 0,029$ az A115F mutáns esetében. Az átlag \pm SE értékek mindenütt 3 biológiai párhuzamot és 3 technikai replikátumot (3*3) reprezentálnak.

A dNTP-készlet sejtbéli koncentrációjának differenciálatlan megemelkedését is tapasztaltuk, amelyet egy általános stresszválasz részeként értelmeztünk. Érdekes módon, bár a dTTP:dCTP arány erősen kiegyensúlyozatlan volt az inaktív Dcd:dut mutáns törzsben, a mutációs ráta csak kétszeresére nőtt. Eredményeink alapján azt javasoljuk, hogy a monofunkciós dUTPáz felelős a DNS-be való dUTP-beépülés hatékony kiküszöböléséért, míg a bifunkciós dUTPáz szerepe a megfelelő dCTP:dTTP arány fenntartása. Az irodalmi adatok rendszerezésének eredménye is alátámasztotta a monofunkciós dUTPáz fontos szerepét a dNTP készlet dUTP-mentésében. A sejtbéli dTTP koncentráció szabályozása azonban úgy tűnik, hogy kizárólag a dCTP-t és/vagy dCMP-t transzformáló enzimekhez kötődik, amelyek ugyan szerkezetileg nem rokonok egymással, de mindegyik allosztérikusan szabályozott^{32–36}. E funkciók szétkapcsolásának további mélyreható vizsgálata rávilágíthat azokra az evolúciós mechanizmusokra, amelyek az információhordozó molekulák, az RNS és DNS, egyik fő különbségeként a timin megjelenését és az uracil DNS-ből való kizárását eredményezték.

Vizsgálatainkból egyértelműen kiderült, hogy a dUTPáz egy eddig ismeretlen, létfontosságú élettani szerepet tölt be a mikobaktériumban, amelyet a mikobaktérium-specifikus felszíni hurok közvetít. Ezirányú kutatásaink jelenleg is folynak.

III.2.2 A dUTPáz génexpresszió-szabályozó szerepének mechanizmusa a *Staphylococcus aureus* horizontális géntranszferében

A mikobakteriális genetikai kísérleteinkből tudjuk, és az irodalomban is számos közvetett kísérleti bizonyíték jelzi, hogy a dUTPázoknak a dNTP-készlet dUTP-mentesítésén túl más, esszenciális funkciója is van. A dUTPáz egy ilyen új funkciójának felfedezése Nature cikként jelent meg 2010-ben³⁷. A szerzők kimutatták, hogy egy helper fágból származó dUTPáz szabályozza a *Staphylococcus aureus* egyik szuperantigént hordozó mobilis genetikai elemének átvitelét. Ezt a hatást úgy fejt ki, hogy a mobilis genetikai elem repressziójáért felelős StI fehérjéhez köt, ezáltal elindítja a mobilis genetikai elem kivágási-replikációs-csomagolási ciklusát. Kíváncsiak voltunk, mi a molekuláris alapja ennek a szabályozási mechanizmusnak, és mi lehet a jelentősége. Ezért előállítottuk az StI fehérjét és a szóban forgó fág dUTPázát, és a már bevált szerkezeti biológiai és enzimkinetikai módszertárunkkal vizsgáltuk a kölcsönhatásukat. Számos független vizsgálat közvetlen kísérleti adatai alapján azt javasoltuk, hogy a dUTP és az StI verseng a dUTPáz kötődésért, és hogy a dUTPáz:dUTP komplex hozzáférhetetlen az StI számára. Az StI a dUTPáz „slow tight-binding” inhibitora. Megfigyeltük, hogy a dUTPáz csak dUTP hiányában gátolja az StI kötődését annak konszenzus DNS szekvenciájához. Ez arra utal, hogy a dUTP ellensúlyozza a de-repressziós eseményt azáltal, hogy megakadályozza a dUTPáz:StI komplex képződését. E kölcsönhatások funkcionális következményeinek magyarázatára a következő modellt állítottuk fel. Mivel számos *S. aureus* törzs nem kódol endogén dUTPázát, valószínű, hogy a helper fág dUTPázok felelősek a *S. aureus* dUTP-szintjének csökkentéséért. Miután a fág genomról kifejeződő dUTPáz a baktériumban lévő dUTP-t elhidrolizálta, funkciót vált, és elérhetővé válik az StI kötésére és DNS-ről való disszociáltatására, ami a virulencia gének horizontális transzferét elindító génexpresszióhoz vezet. A dUTP jelenlétének gátló hatása arra utal, hogy a virulenciagének aktiválása szükségszerűen a dUTP-től megtisztított nukleotidkészlet háttérben történik meg, ezzel biztosítva a mobil genetikai elem uracilmentes replikációját. Az uracil jelenléte a mobil genetikai elemekben valószínűleg kedvezőtlen, mert amint azt a HIV-vel kapcsolatban is kimutatták, ennek uraciltartalma negatívan befolyásolhatja a vírus integrációját az új gazdaszervezet DNS-ébe^{38,39}.

III. 3 A DNTP KÉSZLET MÉRÉSE ÉS ÖSSZEFÜGGÉSEI A SEJT ÉLETFOLYAMATAIVAL

III.3.1 Nagy áteresztőképességű módszer fejlesztése a biológiai mintákból származó dNTP pontos mennyiségi meghatározására

A dNTP homeosztázis szerepét egyre több folyamatban vizsgálják és tárják fel az utóbbi évtizedben: a rákos elváltozások progressziójában^{40–46}, az antivirális védekezésben⁴⁷, az

öregedésben^{48–50}, a sejtciklus szabályozásában^{42,43,51,52} és az antitest-hipermutációk létrejöttében⁵³. A sejtbeli dNTP koncentráció precíz mennyiségi meghatározására fennálló igény ellenére a meglévő módszerek egyike sem vált rutin analitikai eljárássá. Egy 2011-ben közölt, DNS polimerizáción alapuló fluoreszcenciás módszer forradalmasítani látszott a dNTP koncentráció mérését⁵⁴. Ez azonban a kezünkben nem eredményezett értékelhető eredményt, és a tanulmányra hivatkozó 29 publikáció elemzéséből az derült ki számunkra, hogy mások kezében sem. Ezért, mivel ezt tartottuk a legígéretesebb módszernek, kiderítettük, milyen akadályok nehezítik a használatát, és hogyan lehet ezeken túljutni. Kiderítettük, hogy a fluoreszcens próba Taq polimeráz általi lassú, nem specifikus hasítása miatt a dNTP beépülési reakció végpontja nem mutatható ki megbízhatóan. Kimutattuk, hogy a különböző nukleotidok beépülési sebessége nagyon változó, és hogy a biológiai mintában lévő egyéb komponensek kiszámíthatatlan és reprodukálhatatlan módon lassítják a reakciót, ezért sem lehet végpontot mérni. Ezeket a tényezőket a reakció körülményeinek optimalizálásával és a DNS-polimerizáció fluoreszcencia-időgörbéinek kinetikai elemzésével kiküszöböltük. A kinetikailag elkülönített dNTP-beépülési folyamat amplitúdója már korrelál a reakcióelegyben elérhető dNTP mennyiségével. Kifejlesztettünk egy olyan szoftvert is, amely egyszerűsített adatelemzést kínál a kinetikában tapasztalatlan kutatók számára (<http://nucleotidy.enzim.ttk.mta.hu/>). Az általunk továbbfejlesztett módszerrel a pontos mennyiségi meghatározás alsó határa 1-3 pmol dNTP / minta, amelyet a sejt mérettől, a sejt dNTP-tartalmától függően körülbelül 10^6 sejtből vagy 10^8 baktériumból lehet hatékonyan kinyerni. Ezek a fejlesztések a dNTP mennyiségi meghatározását széles körben elérhetővé teszik a tudományos közösség számára tetszőleges biológiai mintában.

III.3.2 A biológiai mintákban mért dNTP készletek és készletváltozások adatbázisa

A dNTP anyagcserét több mint 50 éve kutatják. Annak ellenére, hogy rendkívül nagy mennyiségű mért dNTP adat halmozódott fel az irodalomban, ezek nehezen átláthatóak és összehasonlíthatóak az alkalmazott módszertan, az adatminőség és a megjelenítés nagy változatossága miatt. A dNTP készlet változásainak élettani és rosszindulatú folyamatokban betöltött, az előzőekben referenciákkal is alátámasztott, szerepe iránti növekvő érdeklődés ösztönözte azt az erőfeszítésünket, hogy az eddig mért sejtbeli dNTP mennyiségeket biokémikus szemlélettel rendszerezzük és létrehozunk a dNTPpoolDB nevű adatbázist, amely egyértelműen megfeleltethető információkat biztosít a biológiai mintákban végzett dNTP-mérésekről (<https://dntppool.org/>). A dNTPpoolDB olyan információforrás, amely remélhetőleg a genomanyagcsere, a DNS-replikáció és -javítás, a rákkutatás, az öregedés, a vírusos és bakteriális fertőzések kutatásának területén segít megválaszolni a dNTP homeosztázis szerteágazó szerepeivel kapcsolatos alapvető kérdéseket. Bőséges adatot szolgáltat a dNTP készletek fajspecifikus jellemzőinek azonosításához és megértéséhez, a különböző kezelések hatására bekövetkező változásokhoz és a kóros állapotok kialakulásában betöltött szerepükhöz, valamint támpontokat ad a dNTP-k lehetséges nem-kanonikus funkcióinak feltárásához, beleértve a dNTP-k lehetséges jelátviteli és epigenetikai szerepét.

IV. ÚJ TUDOMÁNYOS TÉZISEK

1. Feltártuk a humán és *Mycobacterium tuberculosis* dUTPáz enzimek kinetikai mechanizmusát és a nukleotidhidrolízis katalíziséhez hozzájáruló szerkezeti elemek szerepét. Meghatároztuk, hogy a szubsztrátkötés gyors és reverzibilis; a kémiai lépés, tehát az α - β -foszfátcsoportok közötti kötés felhasadása a sebességmeghatározó lépés; és a termékek gyorsan és random módon szabadulnak fel. Kimutattuk, hogy a hidrolízissel egyidejű protontranszfer következik be.
2. Kidolgoztunk egy enzimátikus eljárást a dNTP-k γ -foszfát csoportján való radioaktív jelölésére.
3. Több olyan mechanizmust javasoltunk a nukleotidhidrolízis enzimátikus katalízisével kapcsolatban, amelyek túlmutatnak a dUTPáz példáján. Megmutattuk, hogy a nukleotidhidrolízis helyétől kémiaileg viszonylag távoli kölcsönhatások hogyan segíthetik elő a katalízist az átmeneti állapot komplex elektrosztatikus és/vagy geometriai stabilizálásával. Megmutattuk, hogy az enzimekben gyakran megtalálható és sokszor konzervált, az enzim és szubsztrát közötti aromás átlapolás (π - π kölcsönhatás) elektrosztatikusan hozzájárulhat a katalitikus hatáshoz.
4. Kinetikai, spektroszkópiai és szerkezeti vizsgálatok, valamint kvantumkémiai számítások kombinálásával képet alkottunk arról, hogy az ATP- és GTPázokban általánosan jelenlévő P-hurok vagy Walker A szekvencia hogyan járul hozzá a katalízisben résztvevő elemek orientálásához és az asszociatív típusú átmeneti állapot stabilizálásához egy olyan enzimben, amely a nukleotidban nem a β - γ -foszfátcsoportok közötti, hanem az α - β -foszfátcsoportok közötti hasítást katalizálja. A szerkezeti és mechanisztikus összehasonlításokkal e foszfátkötő motívum konvergens fejlődésére, és a különböző nukleotidhidrolízis feladatokhoz való kifinomult funkcionális adaptációra mutattunk példát.
5. Megmutattuk, hogy kis peptidszakaszok kis amplitúdójú mozgásai elegendőek ahhoz, hogy egy zártan tűnő aktív helyen gyors ligandumkötés és -disszociáció menjen végbe. Ezzel a modellel az irodalomban ellentmondásosnak tűnő összes eddigi, a dUTPáz aktív hely konformációs dinamikájára vonatkozó kísérleti adatot egységes értelmezési keretbe tudtuk foglalni. Kísérletes bizonyítékot szolgáltatunk a RAMD módszer prediktív erejére.
6. Kimutattuk, hogy az EDTA szelektíven, és a fiziológiás szubsztrátnál szorosabban kötődik egyes dNTP hidrolázok (dUTPáz, Taq polimeráz, MutT) aktív helyére. Megmutattuk, hogy a dUTPáz aktivitást kompetitíven gátolja, és hogy ez a gátlás független a Mg^{2+} -ot komplexáló hatásától.
7. Meghatároztuk a dUTPáz eddigi egyetlen ismert fehérjetermészetű kölcsönható partnere, az StI és a dUTPáz közötti kölcsönhatás kinetikai mechanizmusát. Kimutattuk, hogy az StI a dUTPáz „slow tight-binding” inhibitora. Megdöntöttük azt a modellt, miszerint a dUTPáz egy G-fehérjeszerű kapcsoló lenne. Kidolgoztunk egy másik modellt, amelyben a dUTPáz génexpresszió-szabályozásban betöltött szerepe abban áll, hogy a

Staphylococcus aureus virulenciagénjeinek replikációja dUTP-mentes sejtes környezetben történjen meg. Ez az uracilmentes mobilis genetikai elem hatékony horizontális transzferét szolgálja. Az uraciltartalom ugyanis negatívan befolyásolhatja a fág DNS-nek az új gazdaszervezet DNS-ébe történő integrációját.

8. Meghonosítottuk a mikobakteriális géntechnológiát a laboratóriumban, amely lehetővé teszi a sok szempontból speciális és gyakorlati érdeklődésre számot tartó mikobakteriális modellszervezet, a *M. smegmatis* manipulációját. Kimutattuk, hogy a dUTPáz fehérje szükséges a sejtek túléléséhez. Kiderítettük, hogy egy mikobaktérium-specifikus felszíni hurok jelenléte szükséges az életképesség fenntartásához, ugyanakkor az enzimaktivitás elrontható különösebb rövidtávú következmények nélkül. Kimutattuk, hogy a mikobaktérium két dUTPáz aktivitással rendelkező enzime közül legalább az egyik aktivitása szükséges a túléléshez, tehát a dUTPáz-aktivitás esszenciális a mikobaktériumban.
9. A dUTPáz enzimsalád tagjainak enzimológiai, szerkezeti és a *M. smegmatis*-on belüli funkcionális vizsgálatával kimutattuk, hogy az ezen enzimek között csak apró különbségeket tartalmazó háromdimenziós fehérjeszerkezetben rejlő allosztérikus szabályozás lehetősége csak a fiziológiás funkciótól függően valósul meg. A kooperatív allosztéria és a szubsztrátspecificitás között csereviszonyt fedeztünk fel, amely összefügg a negatív visszacsatolással szabályozható dTTP bioszintézis és a hatékony, de szabályozatlan dUTP elbontás funkcióinak szétválásával. Kimutattuk, hogy az intramolekuláris szabályozó képesség a katalitikus hatékonyság csökkenésével jár egy, a teljes konzervált fehérjéhez képest apró, szerkezeti elemnek köszönhetően, amely a kétféle funkció közötti váltást közvetíti. Rámutattunk a funkcionális szétválás előnyeire, és arra, hogy a rendelkezésre álló irodalmi adatokban is felfedezhető ez az addig explicit módon le nem írt jelenség.
10. Továbbfejlesztettünk egy enzimatis analitikai eljárást a dNTP-k mennyiségi meghatározására, amely így széles körben hozzáférhetővé teszi a nagyátersztőképességű dNTP koncentráció méréseket.
11. Létrehoztuk az irodalomban található, kísérletesen meghatározott dNTP mennyiségek és ezek különböző hatásokra történt változásainak adatbázisát. A dNTPpoolDB bőséges adatot szolgáltat a dNTP készletek fajspecifikus jellemzőinek azonosításához és megértéséhez, a különböző kezelések hatására bekövetkező változásokhoz és ezek a kóros állapotok kialakulásában betöltött szerepéhez, és támpontokat ad a dNTP-k lehetséges nem-kanonikus funkcióinak megismeréséhez.

V. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ LEVELEZŐ SZERZŐS KÖZLEMÉNYEK

1. Pancsa, R; Fichó, E; Molnár, D; Surányi, ÉV; Trombitás, T; Füzesi, D; Lóczi, H; Szijjártó, P; Hirmondó, R; Szabó, JE; **Tóth, J**: dNTPpoolDB: a manually curated database of experimentally determined dNTP pools and pool changes in biological samples. NUCLEIC ACIDS RESEARCH (2021), IF: 16,971
2. Szabó, JE; Suranyi, ÉV; Mébold, B; Trombitás, T; Cserepes, M; **Tóth, J**: A user-friendly, high-throughput tool for the precise fluorescent quantification of deoxyribonucleoside triphosphates from biological samples. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 48 : 8 p. e45 , 17 p. (2020), IF: 16,971
3. Lopata, A; Jójárt, B; Surányi, ÉV; Takács, E; Bezúr, L; Leveles, I; Bendes, Á; Viskolcz, B; Vértessy, BG; **Tóth, J**: Beyond Chelation: EDTA Tightly Binds Taq DNA Polymerase, MutT and dUTPase and Directly Inhibits dNTPase Activity. BIOMOLECULES 9 : 10 Paper: 621, 19 p. (2019), IF: 4,082
4. Hirmondo, R; Lopata, A; Surányi, ÉV; Vértessy, BG; **Tóth, J**: Differential control of dNTP biosynthesis and genome integrity maintenance by the dUTPase superfamily enzymes. SCIENTIFIC REPORTS 7 : 1 Paper: 6043 , 12 p. (2017), IF: 4,122
5. Lopata, A; Leveles, I; Bendes, AA; Viskolcz, B; Vértessy, BG; Jójart, B; **Tóth, J**: A Hidden Active Site in the Potential Drug Target Mycobacterium tuberculosis dUTPase Is Accessible through Small Amplitude Protein Conformational Changes. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 291 : 51 pp. 26320-26331. , 12 p. (2016), IF: 4,125
6. Szabó, JE; Takács, E; Merényi, G; Vértessy, BG; **Tóth, J**: Trading in cooperativity for specificity to maintain uracil-free DNA. SCIENTIFIC REPORTS 6 Paper: 24219 (2016), IF: 4,259
7. Lopata, A; Jambrina, PG; Sharma, PK; Brooks, BR; **Tóth, J**; Vértessy, BG; Rosta, E: Mutations Decouple Proton Transfer from Phosphate Cleavage in the dUTPase Catalytic Reaction. ACS CATALYSIS 5 : 6 pp. 3225-3237. , 13 p. (2015), IF: 9.307
8. Szabó, JE; Németh, V; Papp-Kádár, V ; Nyíri, K; Leveles, I; Bendes, Á; Zagyva, I; Róna, G; Pálinkás, H; Besztercei, B ; Ozohanics, O; Vékey, K; Liliom, K; **Tóth, J**; Vértessy, BG: Highly potent dUTPase inhibition by a bacterial repressor protein reveals a novel mechanism for gene expression control. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 42 : 19 pp. 11912-11920. , 9 p. (2014), IF: 9,112
9. Pécsi, I; Hirmondo, R; Brown, AC; Lopata, A; Parish, T; Vértessy, BG; **Tóth, J**: The dUTPase Enzyme Is Essential in Mycobacterium smegmatis. PLOS ONE 7 : 5 Paper: e37461 (2012), IF: 3,73
10. Pécsi, I; Szabó, JE; Adams, SD; Simon, I; Sellers, JR; Vértessy, BG; **Tóth, J**: Nucleotide pyrophosphatase employs a P-loop-like motif to enhance catalytic power and NDP/NTP discrimination. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 108 : 35 pp. 14437-14442. , 6 p. (2011), IF: 9,681
11. Pécsi, I; Leveles, I; Harmat, V; Vértessy, BG; **Tóth, J**: Aromatic stacking between nucleobase and enzyme promotes phosphate ester hydrolysis in dUTPase. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 38 : 20 pp. 7179-7186. , 8 p. (2010), IF: 7,836

12. **Tóth, J**; Varga, B; Kovács, M; Málnási-Csizmadia, A; Vértessy, BG: Kinetic mechanism of human dUTPase, an essential nucleotide pyrophosphatase enzyme. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 282 : 46 pp. 33572-33582. , 11 p. (2007), IF: 5,581

VI. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FEL NEM HASZNÁLT, DE ANNAK TÉMÁJÁHOZ KÖTŐDŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

13. Surányi, ÉV; Hírmondó, R; Nyíri, K; Tarjányi, S; Kőhegyi, B; **Tóth, J**; Vértessy, BG: Exploiting a phage-bacterium interaction system as a molecular switch to decipher macromolecular interactions in the living cell. VIRUSES 10 : 4 Paper: 168 , 13 p. (2018), IF: 3,811
14. Nagy, GN; Suardiaz, R; Lopata, A; Ozohanics, O; Vékey, K; Brooks, BR; Leveles, I; **Tóth, J**; Vértessy, BG; Rosta, E: Structural Characterization of Arginine Fingers: Identification of an Arginine Finger for the Pyrophosphatase dUTPases. JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 138 : 45 pp. 15035-15045. , 11 p. (2016), IF: 13.858
15. Hirmondó, R; Szabó, JE; Nyíri, K; Tarjányi, S; Dobrotka, P; **Tóth, J**; Vértessy, BG: Cross-species inhibition of dUTPase via the Staphylococcal StI protein perturbs dNTP pool and colony formation in Mycobacterium. DNA REPAIR 30 pp. 21-27. , 7 p. (2015), IF: 3.929
16. Róna, G; Borsos, M; Ellis, JJ; Mehdi, AM; Christie, M; Környei, Z; Neubrandt, M; **Tóth, J**; Bozóky, Z; Buday, L; Madarász, E; Bodén, M; Kobe, B; Vértessy BG: Dynamics of re-constitution of the human nuclear proteome after cell division is regulated by NLS-adjacent phosphorylation. CELL CYCLE 13 : 22 pp. 3551-3564. , 14 p. (2014), IF: 4,565
17. Leveles, I; Németh, V; Szabó, JE; Harmat, V; Nyíri, K; Bendes, Á; Papp-Kádár, V; Zagyva, I; Róna, G; Ozohanics, O; Vékey, K; **Tóth, J**; Vértessy, BG: Structure and enzymatic mechanism of a moonlighting dUTPase: ACTA CRYSTALLOGRAPHICA SECTION D-BIOLOGICAL CRYSTALLOGRAPHY 69 : 12 pp. 2298-2308. , 11 p. (2013), IF: 7,232
18. Róna, G; Marfori, M; Borsos, M; Scheer, I; Takács, E; **Tóth, J**; Babos, F; Magyar, A; Erdei, A; Bozóky, Z; Buday, L; Kobe, B; Vértessy, BG: Phosphorylation adjacent to the nuclear localization signal of human dUTPase abolishes nuclear import: structural and mechanistic insights. ACTA CRYSTALLOGRAPHICA SECTION D-BIOLOGICAL CRYSTALLOGRAPHY 69 : 12 pp. 2495-2505. , 11 p. (2013), IF: 7,232
19. Erdélyi, P; Borsos, É; Takács-Vellai, K; Kovács, T; Kovács, AL , Sigmond, T; Hargitai, B; Pásztor, L; Sengupta, T; Dengg, M; Pécsi, I; **Tóth, J**; Nilsen, H; Vértessy, BG, Vellai T: Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in Caenorhabditis elegans. JOURNAL OF CELL SCIENCE 124 : 9 pp. 1510-1518. , 9 p. (2011), IF: 6,111
20. Merenyi, G; Kovári, J; **Tóth, J**; Takacs, E; Zagyva, I; Erdei, A; Vértessy, BG: 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 : 6 pp. 369-390. , 22 p. (2011), IF: 0,899

21. Mészáros, B; **Tóth, J**; Vértessy, BG; Dosztányi, Zs; Simon, I: Proteins with Complex Architecture as Potential Targets for Drug Design: A Case Study of Mycobacterium tuberculosis. PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY 7 : 7 Paper: e1002118 , 14 p. (2011), IF: 5,215
22. Takács, E; Nagy, G; Leveles, I; Harmat, V; Lopata, A; **Tóth, J**; Vértessy, BG: Direct contacts between conserved motifs of different subunits provide major contribution to active site organization in human and mycobacterial dUTPases. FEBS LETTERS 584 : 14 pp. 3047-3054. , 8 p. (2010), IF: 3,601
23. Vértessy, BG; **Tóth, J**: Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH 42 : 1 pp. 97-106. , 10 p. (2009), IF: 18,203
24. Varga, B; Barabás, O; Kovári, J; **Tóth, J**; Hunyadi, Gulyas E; Klement, E; Medzihradsky, KF; Tölgyesi, F; Fidy, J; Vértessy, BG: Active site closure facilitates juxtaposition of reactant atoms for initiation of catalysis by human dUTPase. FEBS LETTERS 581 : 24 pp. 4783-4788., 6 p. (2007), IF: 3,263

VII. FELHASZNÁLT IRODALOM

- (1) Kerepesi, C., Szabó, J. E., Papp-Kádár, V., Dobay, O., Szabó, D., Grolmusz, V., and Vértessy, B. G. (2016) Life without dUTPase. *Front. Microbiol.* 7, 1768.
- (2) Hizi, A., and Herzig, E. (2015) dUTPase: the frequently overlooked enzyme encoded by many retroviruses. *Retrovirology* 12, 70.
- (3) Curtin, N. J., Harris, A. L., and Aherne, G. W. (1991) Mechanism of Cell Death following Thymidylate Synthase Inhibition: 2'-Deoxyuridine-5'-triphosphate Accumulation, DNA Damage, and Growth Inhibition following Exposure to CB3717 and Dipyridamole. *Cancer Res.* 51, 2346–2352.
- (4) Vértessy, B. G., and Tóth, J. (2009) Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc. Chem. Res.* 42, 97–106.
- (5) Koehler, S. E., and Ladner, R. D. (2004) Small interfering RNA-mediated suppression of dUTPase sensitizes cancer cell lines to thymidylate synthase inhibition. *Mol. Pharmacol.* 66, 620–6.
- (6) Yokogawa, T., Yano, W., Tsukioka, S., Osada, A., Wakasa, T., Ueno, H., Hoshino, T., Yamamura, K., Fujioka, A., Fukuoka, M., Ohkubo, S., and Matsuo, K. (2021) dUTPase inhibition confers susceptibility to a thymidylate synthase inhibitor in DNA-repair-defective human cancer cells. *Cancer Sci.* 112, 422–432.
- (7) Wilson, P. M., LaBonte, M. J., Lenz, H.-J., Mack, P. C., and Ladner, R. D. (2012) Inhibition of dUTPase induces synthetic lethality with thymidylate synthase-targeted therapies in non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer Ther.* 11, 616–28.
- (8) Hagenkort, A., Paulin, C. B. J., Desroses, M., Sarno, A., Wiita, E., Mortusewicz, O., Koolmeister, T., Loseva, O., Jemth, A.-S., Almlöf, I., Homan, E., Lundbäck, T., Gustavsson, A.-L., Scobie, M., Helleday, T., Hagenkort, A., Paulin, C. B. J., Desroses, M., Sarno, A., Wiita, E., Mortusewicz, O., Koolmeister, T., Loseva, O., Jemth, A.-S., Almlöf, I., Homan, E., Lundbäck, T., Gustavsson, A.-L., Scobie, M., and Helleday, T. (2017) dUTPase inhibition augments replication defects of 5-Fluorouracil. *Oncotarget* 8, 23713–23726.
- (9) Davison, C., Morelli, R., Knowlson, C., McKechnie, M., Carson, R., Stachtea, X., McLaughlin, K. A., Prise, V. E., Savage, K., Wilson, R. H., Mulligan, K. A., Wilson, P. M., Ladner, R. D., and LaBonte, M. J. (2021) Targeting nucleotide metabolism enhances the efficacy of anthracyclines and anti-metabolites in triple-negative breast cancer. *npj Breast Cancer* 2021 71 7, 1–13.
- (10) Pérez-Moreno, G., Sánchez-Carrasco, P., Ruiz-Pérez, L., Johansson, N., Müller, S., Baragaña, B., Hampton, S., Gilbert, I., Kaiser, M., Sarkar, S., Pandurangan, T., Kumar, V., and González-Pacanowska, D. (2019) Validation of Plasmodium falciparum dUTPase as the target of 5'-tritylated deoxyuridine analogues with anti-malarial activity. *Malar. J.* 18, 392.
- (11) Whittingham, J. L., Leal, I., Nguyen, C., Kasinathan, G., Bell, E., Jones, A. F., Berry, C., Benito, A., Turkenburg, J. P., Dodson, E. J., Perez, L. M. R., Wilkinson, A. J., Johansson, N. G., Brun, R., Gilbert, I. H., Pacanowska, D. G., and Wilson, K. S. (2005) dUTPase as a Platform for Antimalarial Drug Design: Structural Basis for the

- Selectivity of a Class of Nucleoside Inhibitors. *Structure* 13, 329–338.
- (12) Guda, G., Nguyen, C., Ziemkowski, P., Felczak, K., Kasinathan, G., Musso-Buendia, A., Sund, C., Zhou, X., Kaiser, M., Ruiz-Pérez, L., Brun, R., Kulikowski, T., Johansson, N., González-Pacanoska, D., and Gilbert, I. (2011) Modified 5'-trityl nucleosides as inhibitors of *Plasmodium falciparum* dUTPase. *ChemMedChem* 6, 309–320.
 - (13) Zhang, Y., Zhang, H., Chen, Y., Qiao, L., Han, Y., Lin, Y., Si, S., and Jiang, J.-D. (2021) Screening and Identification of a Novel Anti-tuberculosis Compound That Targets Deoxyuridine 5'-Triphosphate Nucleotidohydrolase. *Front. Microbiol.* 12.
 - (14) Meyer, E., Castellano, R., and Diederich, F. (2003) Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42, 1210–1250.
 - (15) Mol, C. D., Harris, J. M., McIntosh, E. M., and Tainer, J. A. (1996) Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a β hairpin and active sites formed by three separate subunits. *Structure* 4, 1077–1092.
 - (16) Lee, J. Y., and Yang, W. (2006) UvrD helicase unwinds DNA one base pair at a time by a two-part power stroke. *Cell* 127, 1349–1360.
 - (17) Gai, D., Zhao, R., Li, D., Finkelstein, C. V., and Chen, X. S. (2004) Mechanisms of conformational change for a replicative hexameric helicase of SV40 large tumor antigen. *Cell* 119, 47–60.
 - (18) Velankar, S. S., Soultanas, P., Dillingham, M. S., Subramanya, H. S., and Wigley, D. B. (1999) Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell* 97, 75–84.
 - (19) Sablin, E. P., and Fletterick, R. J. (2001) Nucleotide switches in molecular motors: structural analysis of kinesins and myosins. *Curr Opin Struct Biol* 11, 716–724.
 - (20) Shuman, S., and Lima, C. D. (2004) The polynucleotide ligase and RNA capping enzyme superfamily of covalent nucleotidyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* 14, 757–764.
 - (21) Tóth, J., Varga, B., Kovács, M., Málnási-Csizmadia, A., Vértessy, B. G., Toth, J., Varga, B., Kovacs, M., Malnasi-Csizmadia, A., and Vertessy, B. G. (2007) Kinetic mechanism of human dUTPase, an essential nucleotide pyrophosphatase enzyme. *J. Biol. Chem.* 282, 33572–82.
 - (22) Ludemann, S. K., Lounnas, V., and Wade, R. C. (2000) How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 1. Random expulsion molecular dynamics investigation of ligand access channels and mechanisms. *J Mol Biol* 303, 797–811.
 - (23) Takacs, E., Barabas, O., Petoukhov, M. V., Svergun, D. I., Vertessy, B. G., Takács, E., Barabás, O., Petoukhov, M. V., Svergun, D. I., and Vértessy, B. G. (2009) Molecular shape and prominent role of beta-strand swapping in organization of dUTPase oligomers. *FEBS Lett.* 583, 865–71.
 - (24) Fletcher, S., Keane, E. P., Cummings, C. G., Blaskovich, M. A., Hast, M. A., Glenn, M. P., Chang, S. Y., Bucher, C. J., Floyd, R. J., Katt, W. P., Gelb, M. H., Van Voorhis, W. C., Beese, L. S., Sebt, S. M., and Hamilton, A. D. (2010) Structure-based design and synthesis of potent, ethylenediamine-based, mammalian farnesyltransferase inhibitors as anticancer agents. *J. Med. Chem.* 53, 6867–6888.
 - (25) Hast, M. A., Fletcher, S., Cummings, C. G., Pusateri, E. E., Blaskovich, M. A., Rivas, K., Gelb, M. H., Van Voorhis, W. C., Sebt, S. M., Hamilton, A. D., and Beese, L. S. (2009) Structural basis for binding and selectivity of antimalarial and anticancer ethylenediamine inhibitors to protein farnesyltransferase. *Chem. Biol.* 16, 181–192.
 - (26) Helt, S. S., Thymark, M., Harris, P., Aagaard, C., Dietrich, J., Larsen, S., and Willemoes, M. (2008) Mechanism of dTTP inhibition of the bifunctional dCTP deaminase:dUTPase encoded by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Biol.* 376, 554–69.
 - (27) Pecs, I., Hirmondo, R., Brown, A. C., Lopata, A., Parish, T., Vertessy, B. G., Toth, J., and Tóth, J. (2012) The dUTPase enzyme is essential in *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS One* 7, e37461.
 - (28) Johansson, E., Bjornberg, O., Nyman, P. O., and Larsen, S. (2003) Structure of the bifunctional dCTP deaminase-dUTPase from *Methanocaldococcus jannaschii* and its relation to other homotrimeric dUTPases. *J. Biol. Chem.* 278, 27916–22.
 - (29) Varga, B., Barabas, O., Takacs, E., Nagy, N., Nagy, P., and Vertessy, B. G. (2008) Active site of mycobacterial dUTPase: structural characteristics and a built-in sensor. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 8–13.
 - (30) Takács, E., Nagy, G., Leveles, I., Harmat, V., Lopata, A., Tóth, J., Vértessy, B. G., Takacs, E., Nagy, G., Leveles, I., Harmat, V., Lopata, A., Toth, J., and Vertessy, B. G. (2010) Direct contacts between conserved motifs of different subunits provide major contribution to active site organization in human and mycobacterial dUTPases. *FEBS Lett.* 584, 3047–54.
 - (31) Pecs, I., Leveles, I., Harmat, V., Vertessy, B. G., and Toth, J. (2010) Aromatic stacking between nucleobase and enzyme promotes phosphate ester hydrolysis in dUTPase. *Nucleic Acids Res.* 38, 7179–86.
 - (32) Hou, H. F., Liang, Y. H., Li, L. F., Su, X. D., and Dong, Y. H. (2008) Crystal structures of *Streptococcus mutans* 2'-deoxycytidylate deaminase and its complex with substrate analog and allosteric regulator dCTP x Mg²⁺.

- J. Mol. Biol.* 377, 220–231.
- (33) Marx, A., and Alian, A. (2015) The First Crystal Structure of a dTTP-bound Deoxycytidylate Deaminase Validates and Details the Allosteric-Inhibitor Binding Site. *J. Biol. Chem.* 290, 682–90.
 - (34) Kadirvelraj, R., Sennett, N. C., Polizzi, S. J., Weitzel, S., and Wood, Z. A. (2011) Role of packing defects in the evolution of allostery and induced fit in human UDP-glucose dehydrogenase. *Biochemistry* 50, 5780–5789.
 - (35) Siggaard, J. H. B., Johansson, E., Vognsen, T., Helt, S. S., Harris, P., Larsen, S., and Willemoës, M. (2009) Concerted bifunctionality of the dCTP deaminase-dUTPase from *Methanocaldococcus jannaschii*: a structural and pre-steady state kinetic analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 490, 42–9.
 - (36) Johansson, E., Thymark, M., Bynck, J. H., Fanø, M., Larsen, S., and Willemoës, M. (2007) Regulation of dCTP deaminase from *Escherichia coli* by nonallosteric dTTP binding to an inactive form of the enzyme. *FEBS J.* 274, 4188–98.
 - (37) Tormo-Mas, M. A., Mir, I., Shrestha, A., Tallent, S. M., Campoy, S., Lasa, I., Barbe, J., Novick, R. P., Christie, G. E., Penades, J. R., Tormo-Más, M. A., Mir, I., Shrestha, A., Tallent, S. M., Campoy, S., Lasa, I., Barbé, J., Novick, R. P., Christie, G. E., and Penadés, J. R. (2010) Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. *Nature* 465, 779–82.
 - (38) Weil, A. F., Ghosh, D., Zhou, Y., Seiple, L., McMahon, M. A., Spivak, A. M., Siliciano, R. F., and Stivers, J. T. (2013) Uracil DNA glycosylase initiates degradation of HIV-1 cDNA containing misincorporated dUTP and prevents viral integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E448-57.
 - (39) Yan, N., O'Day, E., Wheeler, L. A., Engelman, A., and Lieberman, J. (2011) HIV DNA is heavily uracilated, which protects it from autointegration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9244–9.
 - (40) Saxena, S., Somyajit, K., and Nagaraju, G. (2018) XRCC2 Regulates Replication Fork Progression during dNTP Alterations. *Cell Rep.* 25, 3273-3282.e6.
 - (41) Somyajit, K., Gupta, R., Sedlackova, H., Neelsen, K. J., Ochs, F., Rask, M., Choudhary, C., and Lukas, J. (2017) Redox-sensitive alteration of replisome architecture safeguards genome integrity. *Science* 358, 797–802.
 - (42) Garzón, J., Rodríguez, R., Kong, Z., Chabes, A., Rodríguez-Acebes, S., Méndez, J., Moreno, S., and García-Higuera, I. (2017) Shortage of dNTPs underlies altered replication dynamics and DNA breakage in the absence of the APC/C cofactor Cdh1. *Oncogene* 36, 5808–5818.
 - (43) Santinon, G., Brian, I., Pocaterra, A., Romani, P., Franzolin, E., Rampazzo, C., Bicciato, S., and Dupont, S. (2018) dNTP metabolism links mechanical cues and YAP/TAZ to cell growth and oncogene-induced senescence. *EMBO J.* 37, e97780.
 - (44) Mathews, C. K. (2014) Deoxyribonucleotides as genetic and metabolic regulators. *FASEB J.* 1–9.
 - (45) Pai, C., and Kearsley, S. (2017) A Critical Balance: dNTPs and the Maintenance of Genome Stability. *Genes (Basel)*. 8, 57.
 - (46) Wang, Q., Liu, X., Zhou, J., Huang, Y., Zhang, S., Shen, J., Loera, S., Yuan, X., Chen, W., Jin, M., Shibata, S., Liu, Y., Chu, P., Wang, L., and Yen, Y. (2013) Ribonucleotide Reductase Large Subunit M1 Predicts Poor Survival Due to Modulation of Proliferative and Invasive Ability of Gastric Cancer. *PLoS One* 8, e70191.
 - (47) Chen, S., Bonifati, S., Qin, Z., St Gelais, C., and Wu, L. (2019) SAMHD1 Suppression of Antiviral Immune Responses. *Trends Microbiol.* 27, 254–267.
 - (48) Rotskaya, U. N., Rogozin, I. B., Vasyunina, E. a, Malyarchuk, B. a, Nevinsky, G. a, and Sinitsyna, O. I. (2010) High frequency of somatic mutations in rat liver mitochondrial DNA. *Mutat. Res.* 685, 97–102.
 - (49) Maine, I. P., Chen, S. F., and Windle, B. (1999) Effect of dGTP concentration on human and CHO telomerase. *Biochemistry* 38, 15325–32.
 - (50) Gupta, A., Sharma, S., Reichenbach, P., Marjavaara, L., Nilsson, A. K., Lingner, J., Chabes, A., Rothstein, R., and Chang, M. (2013) Telomere Length Homeostasis Responds to Changes in Intracellular dNTP Pools. *Genetics* 193, 1095–1105.
 - (51) Ke, P. Y., Kuo, Y. Y., Hu, C. M., and Chang, Z. F. (2005) Control of dTTP pool size by anaphase promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability. *Genes Dev.* 19, 1920–1933.
 - (52) Hu, C. M., and Chang, Z. F. (2007) Mitotic control of dTTP pool: A necessity or coincidence?, in *Journal of Biomedical Science*, pp 491–497.
 - (53) Thientosapol, E. S., Bosnjak, D., Durack, T., Stevanovski, I., van Geldermalsen, M., Holst, J., Jahan, Z., Shepard, C., Weninger, W., Kim, B., Brink, R., and Jolly, C. J. (2018) SAMHD1 enhances immunoglobulin hypermutation by promoting transversion mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 4921–4926.
 - (54) Wilson, P. M., LaBonte, M. J., Russell, J., Louie, S., Ghobrial, A. A., and Ladner, R. D. (2011) A novel fluorescence-based assay for the rapid detection and quantification of cellular deoxyribonucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res.* 39, e112–e112.