

## Válasz Dr. Várallyay Éva opponensi bírálatára

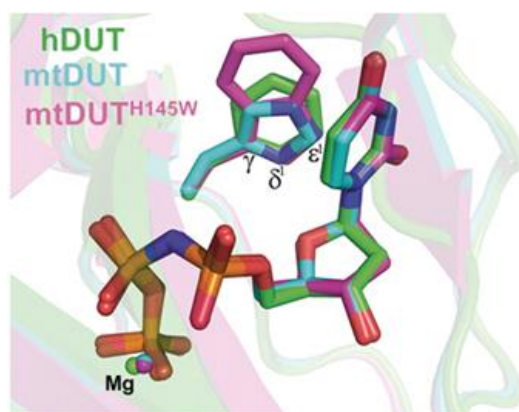
Köszönöm Bírálóm kritikai észrevételeit és a téma iránt mutatott érdeklődését. A fejezetek ismertetése és értékelése végén megfogalmazott kérdései segítettek fókuszálni azok megválaszolására. Kérem, fogadja alábbi válaszaimat.

1. A létrehozott kinetikai módszerrel azt is tisztázni lehetett, hogy a kemoterápiában használt 5'-fluor-dezoxiuridin származékokat a dUTPáz hidrolizálni tudja, így a terápia hatékonyságát növelné, ha egyidejűleg a dUTPáz aktivitását is gátolni lehetne. Vajon a cikket hivatkozó munkák között van olyan, ami ez utóbbi felhasználás során használta a csoport által tisztázott mechanizmust?

Igen, egy az Oncotargetben megjelent tanulmány, amely a dUTPáz inhibíció/csendesítés hatását vizsgálja az 5-FU kezelés által kiváltott DNS replikációs hibák felhalmozódására vastagbélrák sejtvonalon, részletesen idézi a kinetikai eredményeinket (1). Más cikkekben, amelyek a dUTPáz gátláson keresztül megvalósítható terápiás hatékonyságnövelésre összpontosítanak, és a mi cikkünket követően jelentek meg, nem merül fel a dUTPáz olyan lehetséges hozzájárulása a terápiás hatáshoz, hogy az a timidilát-szintáz inhibitorát is elhidrolizálja (2,3).

2. A dUTPáz mutánsok térszerkezetének vizsgálatával arra a következtetésre jutottak, hogy az aromás oldalláncoknak nem a szubsztrát kötésére, hanem a kémiai lépés sebességi állandójára voltak hatással. Az előző kísérletekben humán dUTPázban pont ezt a F158 pozíciót mutálták W-re. Mivel magyarázták, hogy ennek a mutációnak magára a katalízisre nem volt hatása?

Szerkezeti és elméleti kémiai eredményeink azt mutatták, hogy ebben a pozícióban az oldallánc aromás jellege a fontos a katalízis elősegítésében, az aromás oldallánc további tulajdonságai viszont másodlagosak. Azt találtuk, hogy az aromás oldallánc és a szubsztrát közötti  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatás geometriája fontos a megfelelő elektrosztatikus hatás létrejöttéhez, és ezáltal az átmeneti állapot energiájának csökkentéséhez. Ez a geometria pedig a rendelkezésre álló szerkezetekben hajszálpontosan megegyezik (1. ábra). Az, hogy a legelterjedtebb Phe mellett His és Tyr is előfordul egyes dUTPázokban ebben a pozícióban, szintén azt támasztja alá, hogy ezek az aromás oldalláncok felcserélhetők.



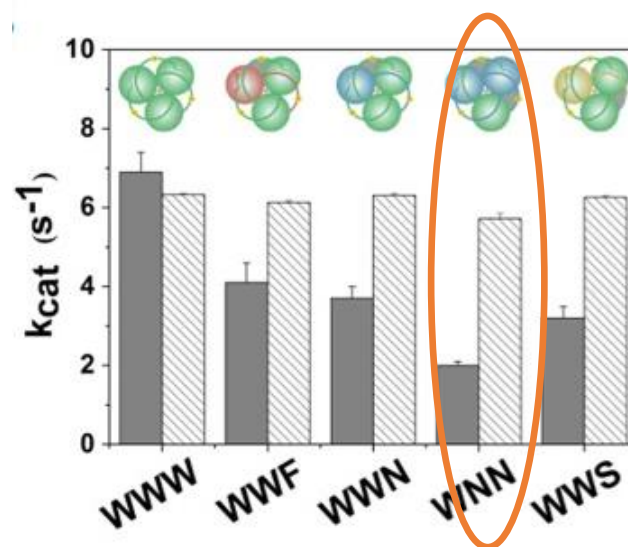
1. ábra. A különböző aromás aminosavakat tartalmazó dUTPáz aktív hely szerkezetek egymásra illesztése (Phe, His, Trp rendre a 2HQU, 2PY4 és a 3HZA PDB azonosítójú szerkezetekben)

3. Felhasználták-e, illetve tervezik-e felhasználni a P-hurokszerű motívum mutánsait más kísérletekben?

Igen, ezeket a jól megismert és graduális aktivitáscsökkentésre lehetőséget adó mutánsokat számos további *in vitro* és *in vivo* kísérletünkben használtuk (4–6) és használjuk. Használjuk őket a *Mycobacterium smegmatis*, egér és zebrahal modelljeinkben, amelyekben a dUTPáz fiziológiai funkcióját vizsgáljuk, illetve a dUTPáz ismert és potenciális kölcsönható partnereivel történő kölcsönhatás vizsgálatára is.

4. A kovalensen összekapcsolt kiméra mutánsok mindegyikében legalább két aktívan működő alegység volt jelen. Vajon működőképes lenne-e csupán egy funkcionálisan aktív monomert tartalmazó dUTPáz trimer?

Létrehoztunk egyetlen funkcionálisan aktív monomert tartalmazó trimert is, amelyben az aktív monomert két olyan monomert követte, amelyekben a katalitikus Asp Asn-ra történő cseréje gyakorlatilag inaktívvá teszi az azt tartalmazó aktív helyet (2. ábra). Ez a WNN konstrukció egy monomertnek, azaz 1/3 aktivitásnak megfelelő steady-state aktivitást mutatott változatlan egyszeri átviteli sebességi állandó mellett (2. ábra), tehát ugyanúgy működött a trimerben, mint amikor két másik aktív monomert veszi közre.



2. ábra A különböző összetételű kiméra enzimek katalitikus állandói (csíkos oszlop, egyszeri átvitel transziens kinetikai mérésben) és látszólagos katalitikus állandói (szürke sáv, steady-state mérés). Az aktív helyek egymástól független működését jelzi az aktív helyek számával egyenesen arányos enzimaktivitás. W: F158W, F: A98F, N: D102N és S: T148STOP mutánst tartalmazó aktív hely.

5. A *Mycobacterium tuberculosis*-ban a dUTPáz mellett a DCD-DUT is jelen van. Vajon az, hogy van egy másik, a dCTP-dUMP átalakítást végző enzim ebben a fajban hatással van-e a dUTPázának működésére?

Közvetlen kölcsönhatásra az enzimek között eddig nincs bizonyíték. Transzkripció szinten nem vizsgáltuk a két enzim egymásra való hatását. A potenciális hatást a közös metabolitok felől megközelítve a következőt mondhatjuk. A DCD-DUT a működése során keletkező dUTP-t nem, csak a

végző terméket, a dUMP-t engedi el, amely a dUTPáz reakcióterméke is. Ezért itt a termékátadás jöhet szóba, mint a dUTPázra gyakorolt hatás, amennyiben a dUMP koncentráció jelentősen megnő a DCD-DUT aktivitás következtében. Ez rendkívül valószínűtlen figyelembe véve, hogy a DCD-DUT két nagyságrenddel kevésbé hatékony enzim, mint a dUTPáz, illetve mivel a dUTPáz-dUMP komplex Kd-ja 30-szor nagyobb, mint a dUTPáz-dUTP komplexé.

6. Megfelelőnek találták a dialízist az EDTA helyettesítésére a kétértékű kationok eltávolítására? Nem okozta-e ez a módszer a vizsgálandó oldat nagymértékű hígítását? Van-e esetleg valami más módszer, ami ennek a gyors, egyszerű szernek a kelátképző hatását kiválthatja?

A dialízist megfelelőnek találtuk a  $Mg^{2+}$  ionok eltávolítására, mert a fehérje a hosszadalmas dialízis során szerencsére nem veszítette el a stabilitását, és végeredményként nem detektáltunk maradék  $Mg^{2+}$  ionot atomemissziós spektrometriával. A hígulás nem okozott problémát, még a relatív tömény fehérjét igénylő ITC méréseket is el tudtuk végezni a dializált fehérjével. Más módszert nem találtunk az EDTA biztonságos helyettesítésére. Szeretném hangsúlyozni, hogy a dUTPáz esetében egyértelműen azonosítható diszkrépancia volt az irodalomban a  $Mg^{2+}$  katalitikus hatását illetően, ezért kezdtünk gyanakodni az EDTA-ra, mint önálló hatást kiváltó ágensre. Amennyiben nincs indikáció hasonlóra, az EDTA egy kiemelkedően hasznos kelátor a Bíráló által is megfogalmazott egyszerűsége miatt (kicsi, optikailag nem aktív, olcsó).

7. A mikobaktériumok bifunkciós DCD-DUT enzimében is jelen van a loop-specifikus inszert, amely gyógyszer-célpont lehet?

A bifunkciós dUTPázok a monofunkciós dUTPázoktól és a dCTP-dezaminázoktól (DCD) is „örökölték” szerkezeti tulajdonságokat. C-terminális régiójuk, amely dUTPázban az említett szelektív megcélzásra alkalmas hurkot tartalmazza, pont a DCD enzimekére hasonlít. Szekvenciálisan a kérdéses hurok a DCD-DUT-ban nem azonosítható. A dUTPázokhoz képest a DCD-kben és DCD-DUT-okban a C-terminális szakasz topológiája eltérő, és a P-hurokszerű motívumot sem tartalmazzák (5). Ez valószínűleg hozzájárul ahhoz, hogy a DCD-DUT nagyon alacsony dUTPáz aktivitással rendelkezik. Az előzőek miatt a dUTPáz és a DCD-DUT C-terminális szerkezetileg nem fektethető egymásra, és így a hurok megléte szerkezetileg sem azonosítható.

8. Ha a bifunkciós enzim csak az Archeákra jellemző, akkor vajon milyen más enzim veszi át a finomhangolás feladatát emberben és más fajokban? Erről van egy táblázat az eredeti közleményben, de annak a jelmagyarázatában nem találtam meg a hogy vajon a Dctd milyen enzimet jelöl.

A Bíráló éles szemmel meglátta, hogy ez a Dctd-vel jelölt enzim a kérdésre adandó válasz kulcsa. Elnézést kérek, amiért sehol nem szerepelt ennek a rövidítésnek a magyarázata. A Dctd a dCMP-dezamináz jelöli. A legtöbb organizmusban a dUMP előállításának fő fluxusa az allostérikus szabályozás alatt álló dCMP-dezamináz aktivitásán keresztül valósul meg. Ezekben a fajokban a két funkció, azaz a finomhangolt dUMP (és ebből dTMP majd végül dTTP) termelés és a dUTP-től való hatékony megszabadulás két teljesen különálló útvonalra vált szét.

9. Az irányok, tervek fejezetben az derül ki, hogy a 2014-es cikk óta nem nagyon találtak további kölcsönható partnert, így azt célzottan kezdték két-hibrid módszerrel keresni. Milyen szervezetben végezték esetleg ezeket a kísérleteket, és a homológ rekombinációban résztvevő nukleáz/helikáz jelöltön kívül esetleg találtak-e még további potenciális dUTPáz kölcsönható partnert?

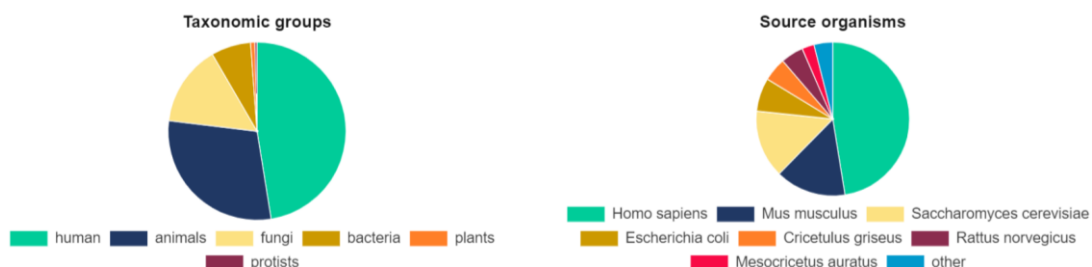
Élesztő két-hibrid rendszerben kerestük a humán és a *Mycobacterium tuberculosis* dUTPáz kölcsönható partnereit, valamint most állítunk be egy, az élesztő két-hibridhez hasonló kísérleti rendszert *Mycobacterium smegmatis*-ban. A humán enzim potenciális kölcsönható partnerei között több olyan is szerepel, amely a dUTPáz mitózisban való szerepére utal. Ez számunkra meglepetés volt, ugyanakkor az eddigi sejtbiológiai eredményeinknek nem mond ellent. Ezen a vonalon történtek előrelépések, amelyek egyelőre nem jelentek meg írásban. A mikobakteriális dUTPáz esetében az említett nukleáz/helikáz fehérje melletti egyéb találatok sokkal kevésbé megbízhatók és jórészt ismeretlen fehérjéket jelölnek. Mivel a nukleáz/helikáz egy olyan megbízható találat, amely a korábbi sejttani megfigyeléseinkkel is teljes összhangban van, egyelőre csak erre koncentrálnak erőforrásainkat.

10. (a dNTP mérő módszerrel kapcsolatos kérdés) Ugyan a leírásnál azt megtudjuk, hogy a nem megbízható adatok a Taq lassú, nem specifikus exonukleáz aktivitása, a nukleotidok eltérő beépülési sebessége és a mintában jelenlévő egyéb, a Taq aktivitását befolyásoló tényezők voltak. Arra azonban nem kapunk közvetlen választ, hogy ezeket a problémákat hogyan sikerült megoldani. A Taq mellett rengeteg más, rekombináns DNS polimeráz hozzáférhető. Esetleg nem próbálták a teszthez más, pl. exonukleáz aktivitásban mutáns polimerázt használni?

A közvetlen válasz a felmerült szinte összes probléma megoldására a fluoreszcens időgörbék kinetikai elemzése volt. Az eredeti módszerben a fluoreszcencianövekedés végpontját kívánták detektálni. Ez a feltételezett végpont detekció tartalmazta az összes fent említett hibát, és a detektálás időpontja valójában nem végpont volt. A fluoreszcens időgörbék kinetikai elemzésével szét tudtuk választani a beépült dNTP-vel arányos, és az attól független folyamatokat. A dNTP-beépülést jelző folyamat amplitúdójából pedig következtetni tudunk a beépült dNTP mennyiségére. A kifejlesztett szoftvernek azért van jelentősége, mert ezt a relatíve bonyolult analízist automatizálja.

Sokféle polimerázt kipróbáltunk, de csak exonukleáz aktivitással rendelkező enzimet használhattunk, mert a próbáról a fluorofórt exonukleáz aktivitással lehet eltávolítani. Az összes kipróbált polimeráz közül az a kettő vált be leginkább, amelyeket leközlöttünk (AmpliTaq Gold™ és TEMPase Hot Start).

11. Sajnos a 30. ábráról lemaradt a beosztás az y tengelyen így nem tudni, hogy vajon végül hány cikk alapján készült az adatbázis, és azt sem tudjuk meg pontosan, hogy milyen adatokat (timidin anyagcserét kódoló enzimek aktivitás az adott mintában, mutációk a genom ezen enzimeket kódoló részen, stb) sikerült a dNTP szintekkel együtt rögzíteni? Hány fajra vonatkozóan sikerült adatokat találni és rögzíteni az adatbázisban? A dNTP szintek mérési adatainak mennyisége folyamatosan nő. Van-e arra lehetőség, illetve tervezik-e a létrehozott adatbázist naprakészen tartani?



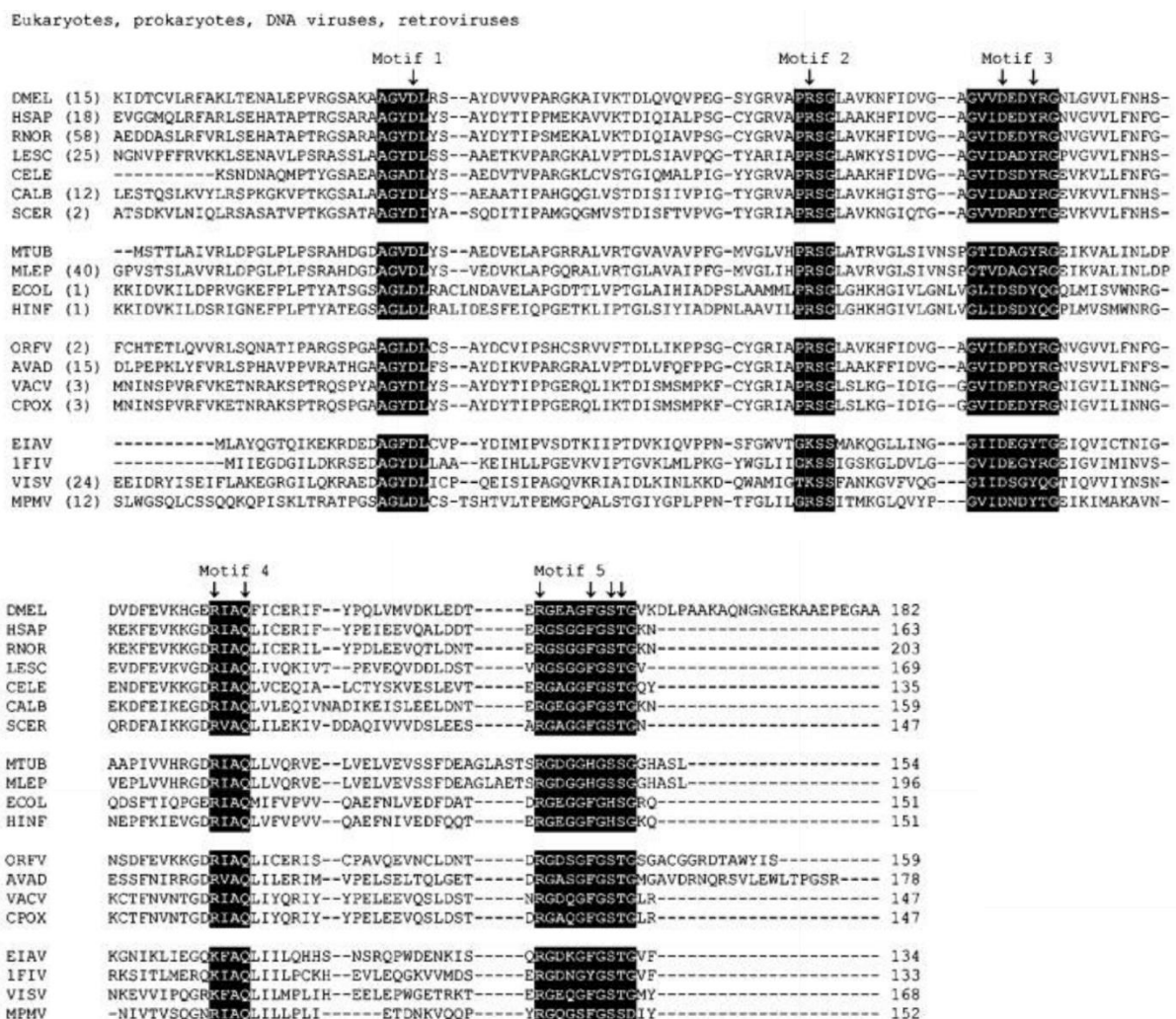
3. ábra A dNTPpoolDB adatbázisban található adatok taxonómiai eredetének megoszlása (screenshot a [www.dntppooldb.org](http://www.dntppooldb.org) statisztika oldaláról)

Az 1200 publikációból, amelyeket releváns hívószavakra történő szűréssel találtunk és részletesen megvizsgáltunk, mintegy 500-ban volt ténylegesen mért dNTP adat. Ezekből egyelőre 283 publikációt

dolgoztunk fel manuálisan, amelyek 11895 különböző mért adatot tartalmaztak. A további kiválasztott, de fel nem dolgozott cikkek annotálását folytatjuk. A dNTP szintekkel együtt minden olyan adatot rögzítettünk, amely a cikkben található volt a minta genetikai hátterére vagy bármely kezelésre nézve. Az adatbázis 19 fajból tartalmaz adatokat, az adatok közel fele humán eredetű (3. ábra). Tervezzük a létrehozott adatbázist naprakészen tartani, már úgy is alkottuk meg, hogy az új annotációk bevétele egyszerű legyen. Évente egyszeri frissítésre valós. Egyelőre azonban még a régebbi cikkek maradékát igyekszünk feldolgozni.

12. A dUTPázok maximalizálták a szubsztrát kötést és a hidrolízis hatékonyságát. Látszódnak-e ez a dUTPázok konzervált szerkezetében? Inkább a dUTPázok aminosav sorrendje, aktív centruma, vagy inkább az ezt kialakító szerkezet konzervált a különböző fajokban?

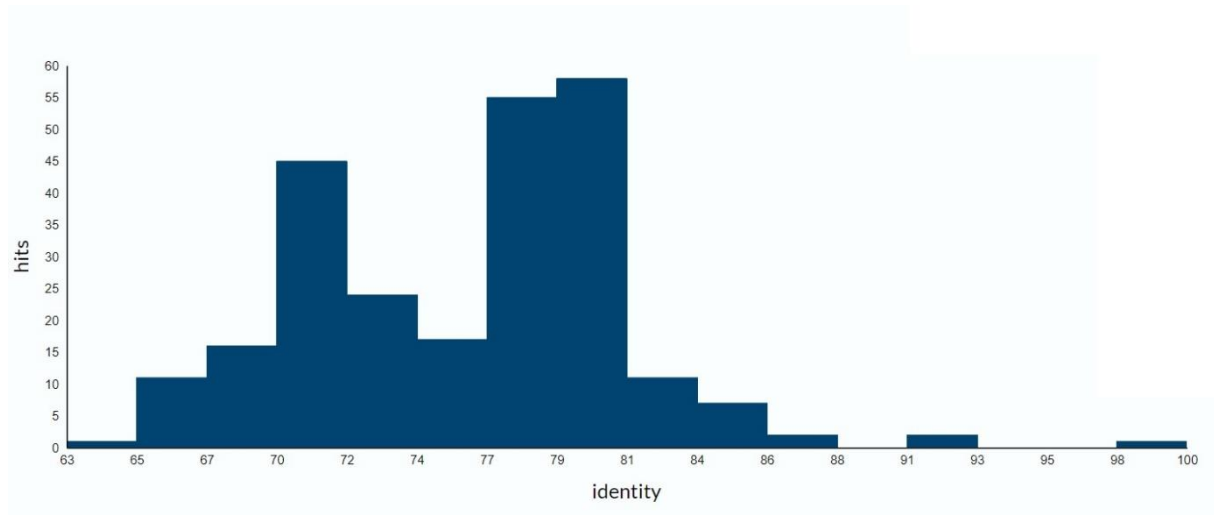
A dUTPázok maximalizált hatékonysága és dUTP-re való specificitása erőteljesen tükröződik konzervált szerkezetükben. Aminosav sorrendjük még a taxonómiaiag egymástól távol álló csoportok között is jól konzervált (4. ábra). Ennek az a következménye, hogy a dUTPáz trimer „core” szerkezete minden ismert esetben azonos. Az előforduló kisebb taxonómiai kategóriákra specifikus hurkok, N-terminális szignál szekvenciák ebből a „core” szerkezetből nyúlnak ki. A dUTPáz öt jellegzetes konzervált szekvencia motívumot tartalmaz (4. ábra), amelyek az aktív helyet alkotják. Ezek nagyfokú konzerváltsága biztosítja, hogy az aktív hely szerkezete gyakorlatilag azonos minden eddig szerkezetileg leírt dUTPázban.



4. ábra Egymástól taxonómiailag távol álló dUTPázok szekvencia összeillesztése(7). A konzervált motívumok fekete alapon fehér betűkkel jelennek meg. Ezeken túl további kiterjedtebb konzervációs mintázatok is felismerhetők több különböző evolúciós ágban. DMEL, *Drosophila melanogaster*; HSAP, *Homo sapiens*; RNOR, *Rattus norvegica*; LESC, *Lycopersion esculentum*; CELE, *Caenorhabditis elegans*; CALB, *Candida albicans*; SCER, *Saccharomyces cerevisiae*; MTUB, *Mycobacterium tuberculosis*; MLEP, *Mycobacterium leprae*; ECOL, *Escherichia coli*; HINF, Human influenza virus; AVAD, avian adenovirus; VACV, Vaccinia virus; CPOX, cowpox virus; EIAV, equine infectious anemia virus; 1FIV, feline immunodeficiency virus; VISV, vesicular stomatitis Indiana virus; MPMV, Mason-Pfizer monkey virus

13. Tudunk-e valamit arról, hogy a növényekben mennyire konzervált, vagy változó a dUMP keletkezéséhez vezető út?

A rendelkezésre álló adatok alapján a növényekben konzervált az a szabályozott bioszintetikus útvonal, amely dCTP-ből dCMP-n keresztül állítja elő a dUMP-t. A KEGG anyagcsere adatbázisban a növényi modellszervezetek dUMP felé mutató útvonalai megegyeznek. Elvégeztem egy szekvenciakeresést és -összeillesztést is, amely azt mutatja, hogy a dCTP-pirofoszfatáz (5. ábra), a dCMP-dezamináz és a dUTPáz is konzervált a növényekben. (8)



5. ábra Az *Arabidopsis thaliana* dCTP-dezaminázának konzerváltsága a növények között. A hozzá leghasonlóbb 250 találat (250 növényi faj) szekvenciaazonosságának eloszlása látható.

14. A genomban lévő információt meghatározó nagy áteresztőképességű szekvenálások kémiaja jórészt változatlan, az eredeti szintézis alapú Sanger szekvenáláson alapul. Vajon a nem szintézisen alapuló nanopore szekvenálás azonosítani tudja-e a genomban lévő U-t, és ha nem, vajon lehet-e majd a jövőben olyan szekvenálást várnunk, ami ezt az információt is azonosítani tudja?

A nanopore módszer egyelőre nem tudja megkülönböztetni az U-t a T-től a natív DNS-ben, mint ahogyan egyetlen más szekvenáló módszer sem. Úgy tűnik, egyelőre a természet által „kifejlesztett” uracil-DNS glikoziláz enzimek tudják ezt egyedül megtenni. Ezen enzimek specificitását kihasználva azonban a DNS uracil-specifikus módosításával az uracil helyét meg lehet jelölni, és ezt a jelölést azután visszamérni nanopore vagy egyéb NGS szekvenálási módszerrel. Ezek igen bonyolult, sok hibalehetőséggel terhelt kísérletek. Egyelőre egy olyan módszer sem terjedt el, amely egy bázispár felbontással tudná az uracilt könnyedén detektálni. Kolléganőm, Békési Angéla, aki többedmagával

kifejlesztette az U-DNA-Seq módszert (9), nemrég írt az uracil DNS-beli detektálásáról egy összefoglaló közleményt, amely minden információt tartalmaz a témakörben (10).

A kérdésnél maradva és előretekintve, a nanopore módszer és az uracil biológiai felismerésének kombinációjában látok lehetőséget jelentős előrelépésre. A nanopore-ban a DNS léptetését egy DNS polimeráz motorfehérje végzi annak érdekében, hogy a bázistranszlokáció szabályozott legyen, és a kimeneti jel leolvasását szabályos időközönként lehessen végezni. Máskülönben az összetett elektromos jelet nem lehetne értelmezni. Olyan DNS polimeráz mutáns alkalmazásával, amely eltérő kinetikával továbbítaná az uracilt, mint a többi bázist, a kimeneti jelben specifikus mintázatot lehetne generálni, és az uracil helyét azonosítani. Egy másik lehetőség esetleg egy olyan U-felismerő segédfehérje beépítése a nanopore-ba, amely gátolja az uracil bázis áthaladását, azonban meg nem akadályozza azt. Így szintén az elektromos időgörbe, mint kimeneti jel, analízisével lehetne az uracil jelenlétére következtetni.

Kedves Bírálóm, köszönöm a bemutatott munkát pontosító és szélesebb kontextusba helyező kérdéseit és pozitív értékelését! Kérem fenti válaszaim szíves elfogadását, és az MTA doktora cím odaítélésének támogatását!

Budapest, 2022. augusztus 31.



Tóth Judit

## Referenciák

1. Hagenkort A, Paulin CBJ, Desroses M, Sarno A, Wiita E, Mortusewicz O, et al. dUTPase inhibition augments replication defects of 5-Fluorouracil. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Feb 28 [cited 2021 Nov 5];8(14):23713–26. Available from: <https://www.oncotarget.com/article/15785/text/>
2. Yokogawa T, Yano W, Tsukioka S, Osada A, Wakasa T, Ueno H, et al. dUTPase inhibition confers susceptibility to a thymidylate synthase inhibitor in DNA-repair-defective human cancer cells. *Cancer Sci* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Oct 1];112(1):422–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33140501/>
3. Wilson PM, LaBonte MJ, Lenz H-J, Mack PC, Ladner RD. Inhibition of dUTPase induces synthetic lethality with thymidylate synthase-targeted therapies in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther*. 2012 Mar;11(3):616–28.
4. Szabó JE, Németh V, Papp-Kádár V, Nyíri K, Leveles I, Bendes AÁ, et al. Highly potent dUTPase inhibition by a bacterial repressor protein reveals a novel mechanism for gene expression control. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Oct 29 [cited 2015 Jan 15];42(19):11912–20. Available from: <http://nar.oxfordjournals.org/content/42/19/11912.long>
5. Szabó JE, Takács E, Merényi G, Vértessy BG, Tóth J. Trading in cooperativity for specificity to maintain uracil-free DNA. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Apr 11 [cited 2017 Mar 21];6:24219. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27063406>
6. Hirmondo R, Lopata A, Suranyi EV, Vertessy BG, Toth J. Differential control of dNTP biosynthesis and genome integrity maintenance by the dUTPase superfamily enzymes. *Sci Rep*. 2017 Dec;7(1):6043.
7. Vertessy BG, Toth J, Vértessy BG, Tóth J. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res* [Internet]. 2008/10/08. 2009 Jan 20;42(1):97–106. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2732909&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. Niu M, Wang Y, Wang C, Lyu J, Wang Y, Dong H, et al. ALR encoding dCMP deaminase is critical for DNA damage repair, cell cycle progression and plant development in rice. *J Exp Bot* [Internet]. 2017 Dec 16 [cited 2022 Sep 4];68(21–22):5773–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29186482/>
9. Pálinkás HL, Békési A, Róna G, Pongor L, Papp G, Tihanyi G, et al. Genome-wide alterations of uracil distribution patterns in human DNA upon chemotherapeutic treatments. *Elife* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Feb 16];9:1–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32956035/>
10. Békési A, Holub E, Pálinkás HL, Vértessy BG. Detection of Genomic Uracil Patterns. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Apr 2 [cited 2022 Sep 4];22(8):3902. Available from: </pmc/articles/PMC8070346/>