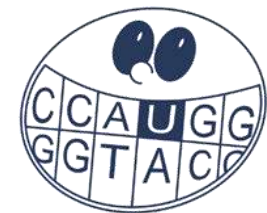




A DNS kémiája a bölcsőtől a sírig



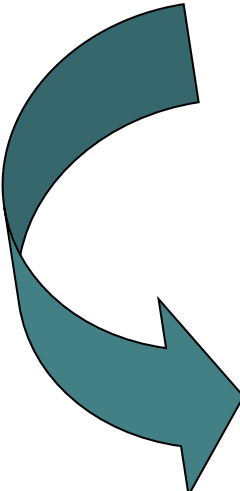
**Vértessy
Beáta**



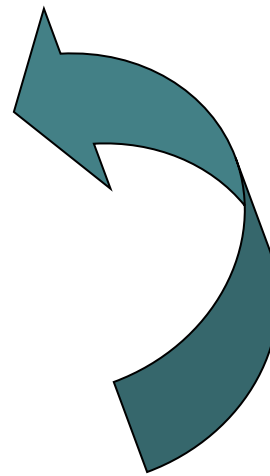
Vázlat

- Általános elvek
- Célzott problémára fókuszálás
- DNS módosulások szerepei
- Egy szokatlan bázis a DNS-ben
- Enzimatikus reakció mechanizmus: dUTPáz
- Racionális inhibitor tervezés

Hogyan tegyünk fel kérdéseket a mai molekuláris biológiában (kémiában)?

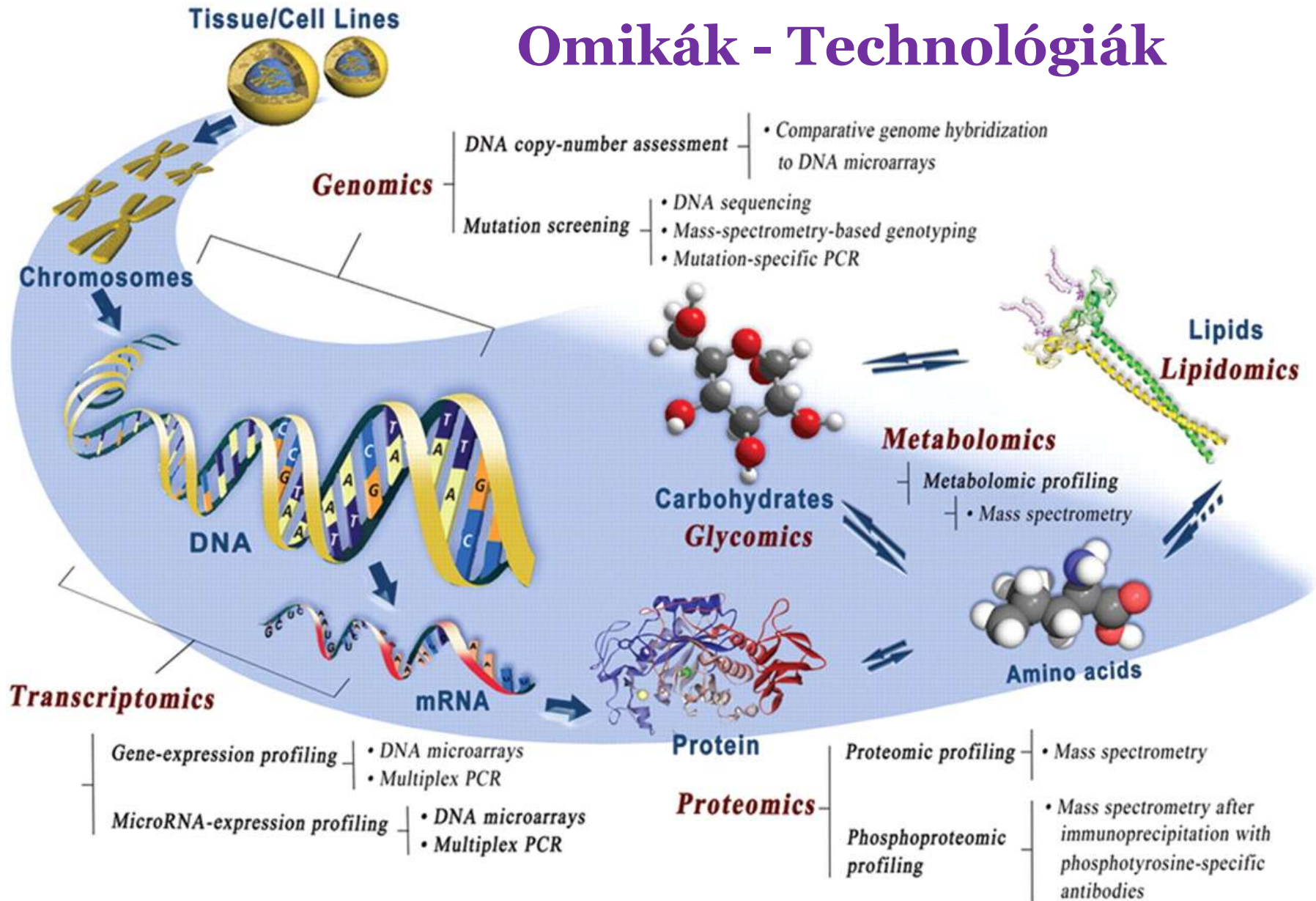


- ❖ Kísérlet-vezérelt kutatás
Adatbázisok / rendszerbiológia
Omikák



- ❖ Hipotézis-vezérelt kutatás
Esettanulmányok, specifikus problémák
Ellenőrzés/Igazolás/ÉRTELMEZÉS!!!
mindazon adatokra, melyeket
a rendszerszemlélet begyűjtött

Omikák - Technológiák



Választott megközelítés

- ❖ Hipotézis-vezérelt kutatás
Esettanulmányok, specifikus problémák

Ellenőrzés/Igazolás/ÉRTELMEZÉS!!!

Kémiai biológia - mi az?

- Az élettudományok és a kémia/fizika közti határmezsgye
- Kémiai technológiákat használ a biológiai folyamatok leírásához és megértéséhez
- Rendszerszemléletű megközelítés: szintetikus biológia/kémia, szerkezeti/molekuláris/sejtbiológiai módszerek
- Kvantitatív megközelítési módok
- Dinamikus analízis – kinetika!
- Ismert példa: farmakogenomika – kémiai genomika

A mi esetünk:

Paradoxon: stabil infotárolás reaktív makromolekulákban??

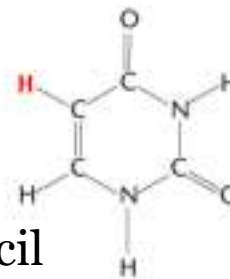
DNS és sejtbeli környezet: reaktív!!

Spontán kémiai módosítások normál élettani körülmények mellett

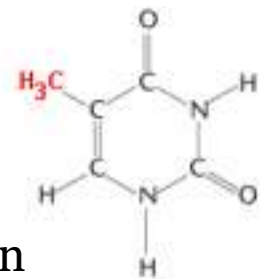
Hogyan lehet feloldani a paradoxont?

DNS javító mechanizmusok

Genom stabilitás biztosítása



Uracil



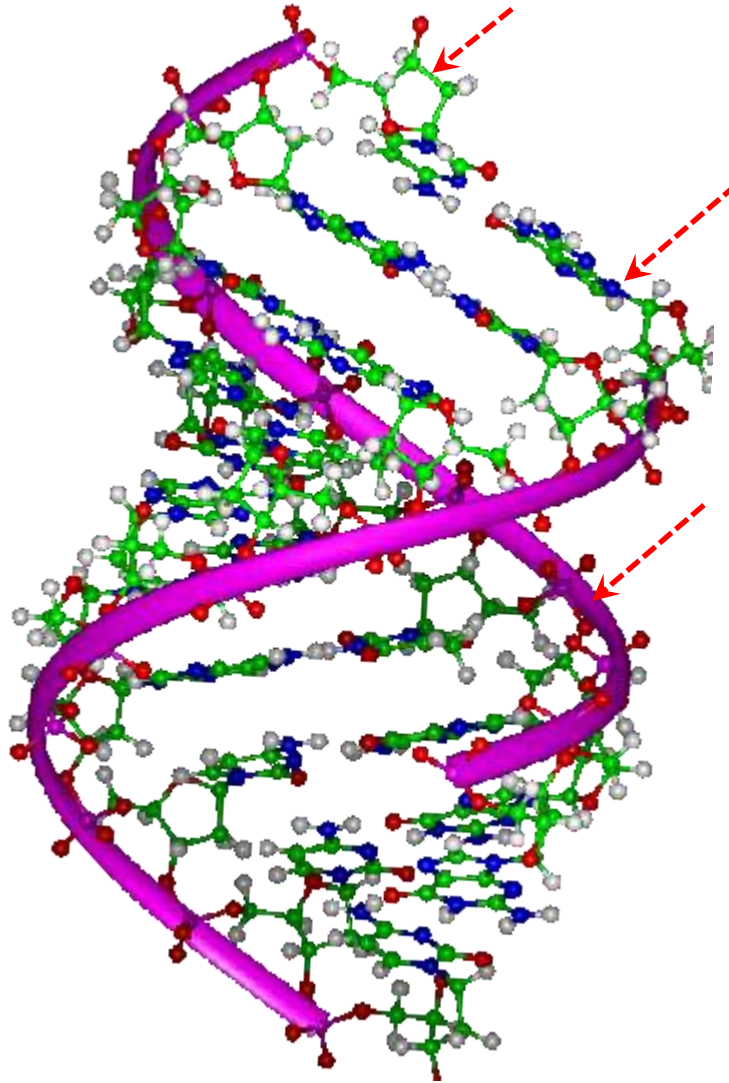
Timin

Uracil – a leggyakoribb hiba

Uracil – talán nem csak hiba? Jelátvitel!

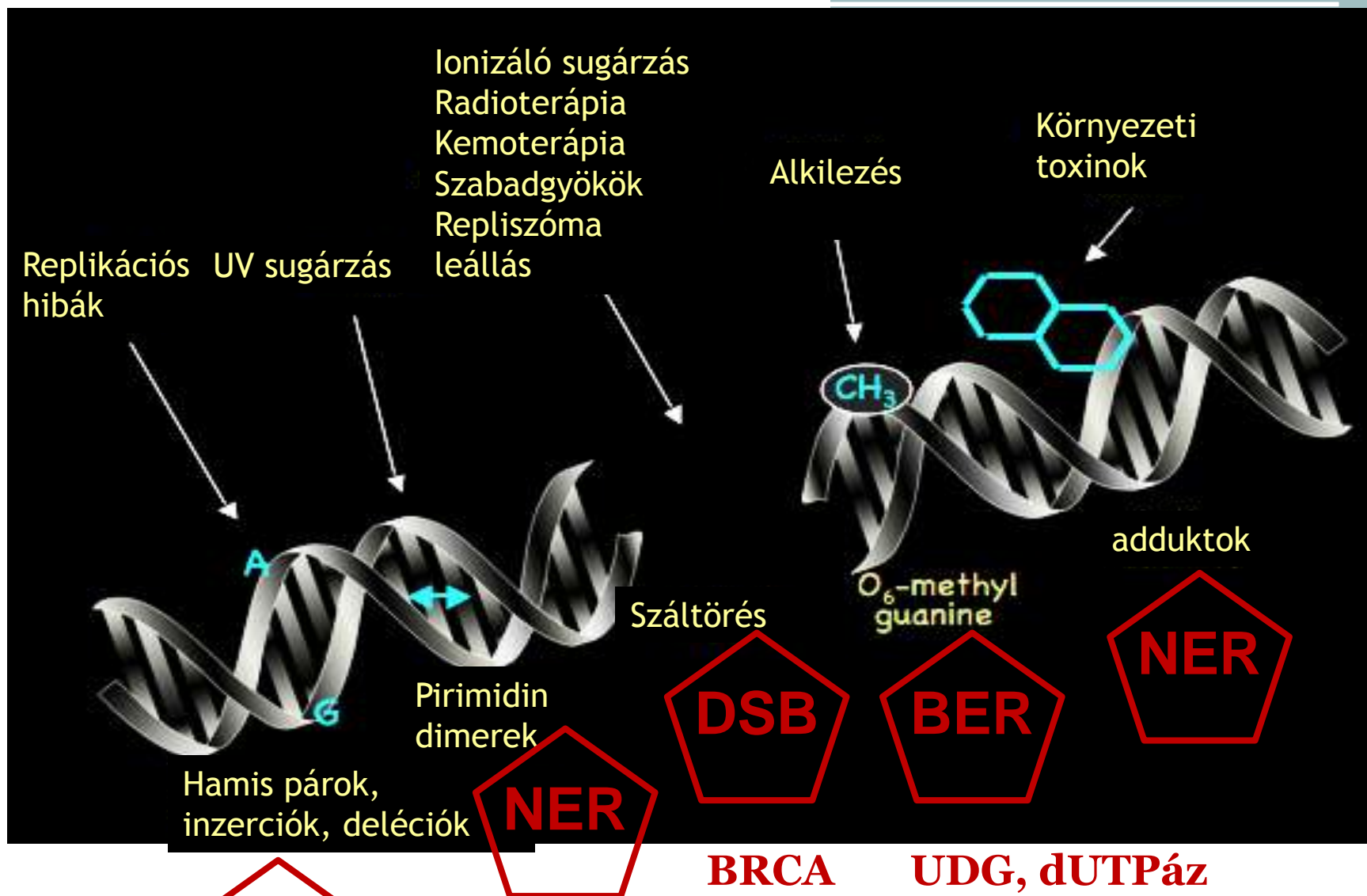
DNS - kémiai nézőpontból

H
O
N
P
C



Reaktív csoportok
sokasága
egy lineáris
polimerre fűzve

DNS-polimer reaktív centrumai és a javítás útjai



MMR

Adott hibákra specializált javítás

Alapvető: a módosított kémiai szerkezet felismerése

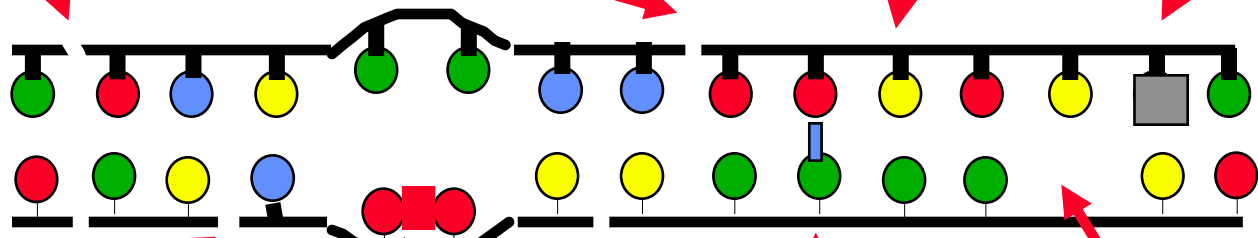
DNS károsodások

● G ● A ● T ● C

ds DNS törés

Hamis pár

C-U deaminálás



ss törés

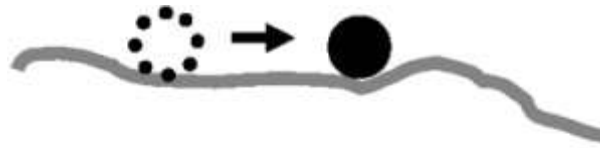
Timidin dimer

Kovalens keresztkötés

AP hely

ÉRZÉKELÉS: 3D \rightarrow 1D

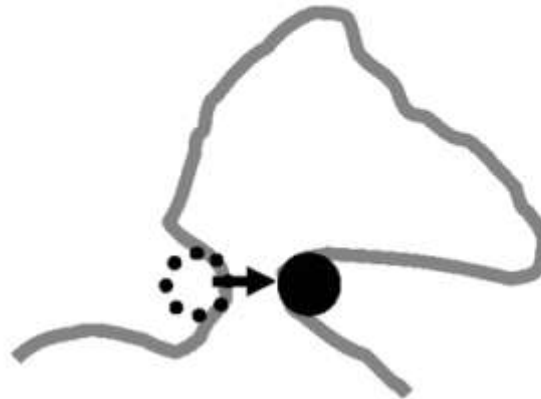
Csúszik



Ugrál

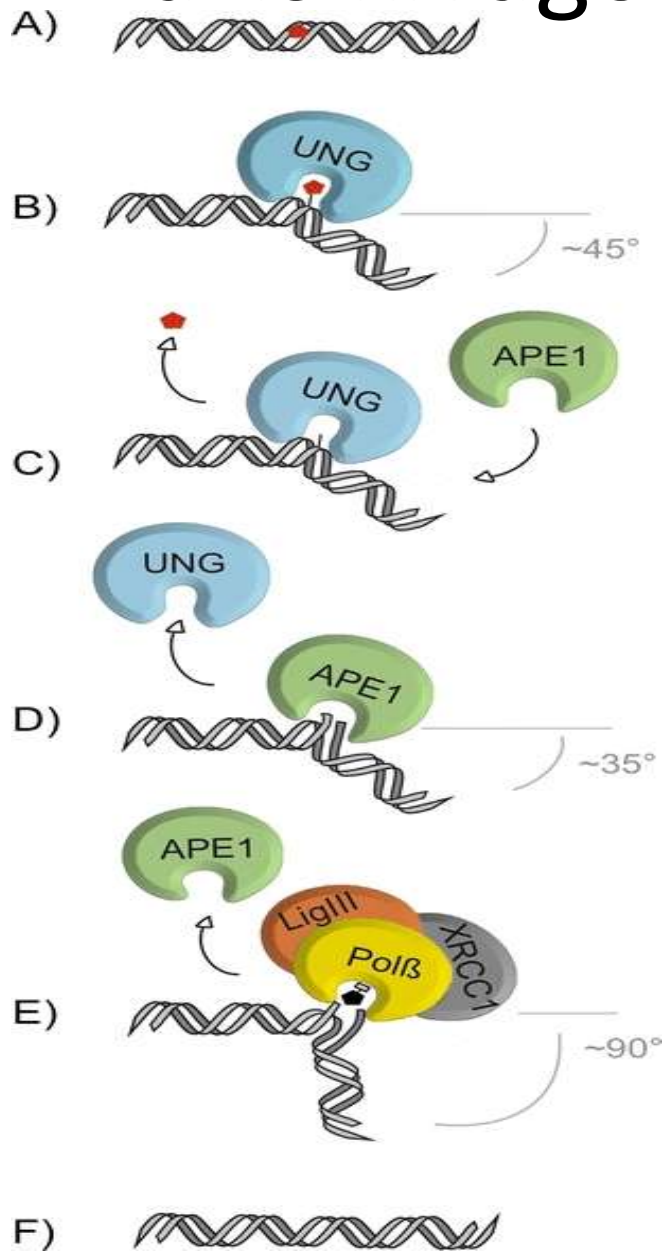


Áthurkol



Halford S E , Marko J F Nucl. Acids Res. 2004;32:3040-3052

Bázis kivágó DNS hibajavítás (BER)

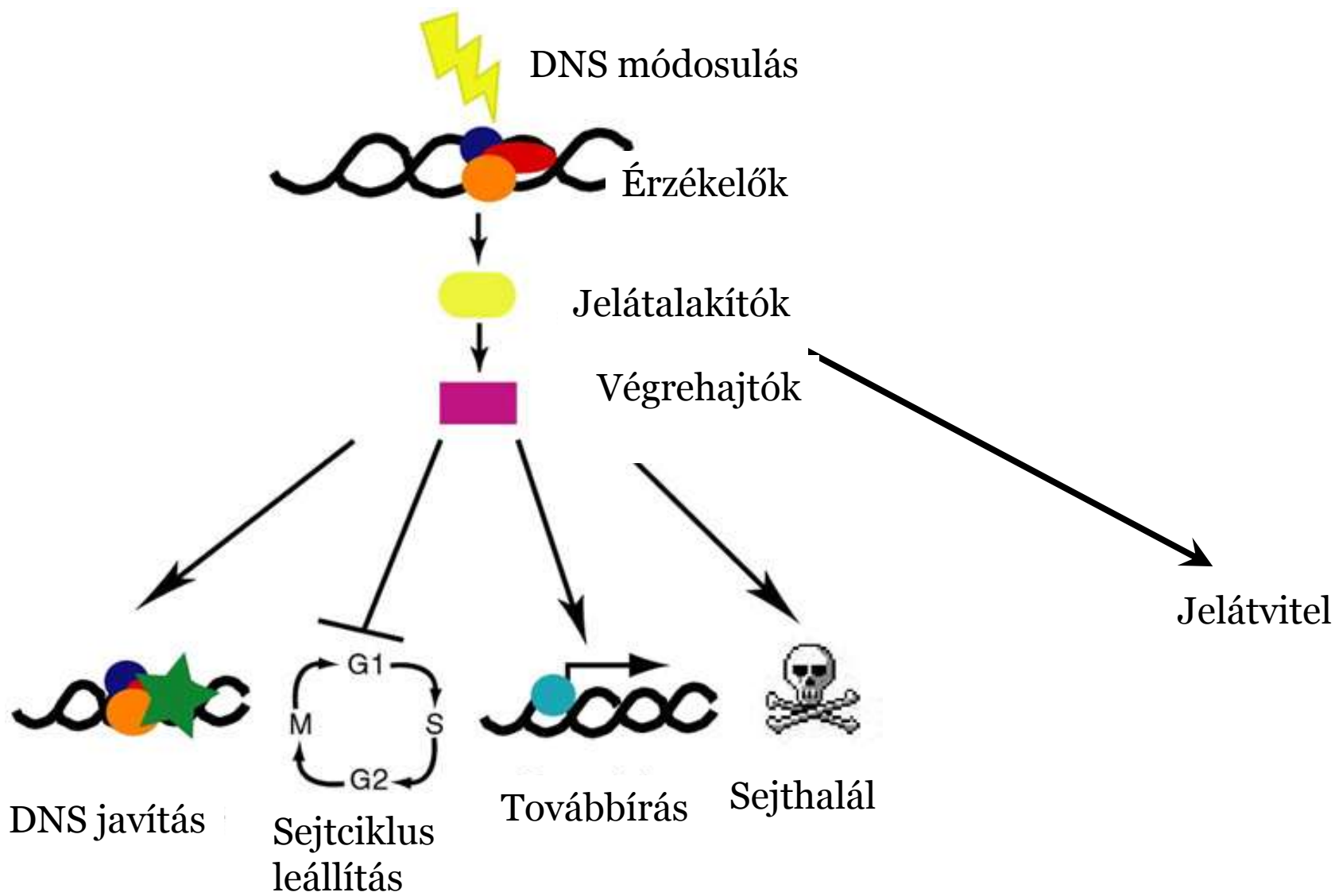


DNS-glikoziláz felismeri a sérült/hibás bázist

A sérült/hibás bázis lehasítása, szubsztrát elengedés, AP hely

AP endonukleáz a cukor-foszfát gerincet a hibától 5' irányban elvágja

Polβ hidrolizálja az 5' dezoxiribóz foszfátot és kitölti a lyukat; ligáz összevarr



Orvosbiológiai vonatkozások

DNS-módosulások a karcinogenezisben:
mutációs gyakoriság - hibás gének, pl BRCA

Tumorsejtek támadása a DNS-károsodás
válaszreakciói útján

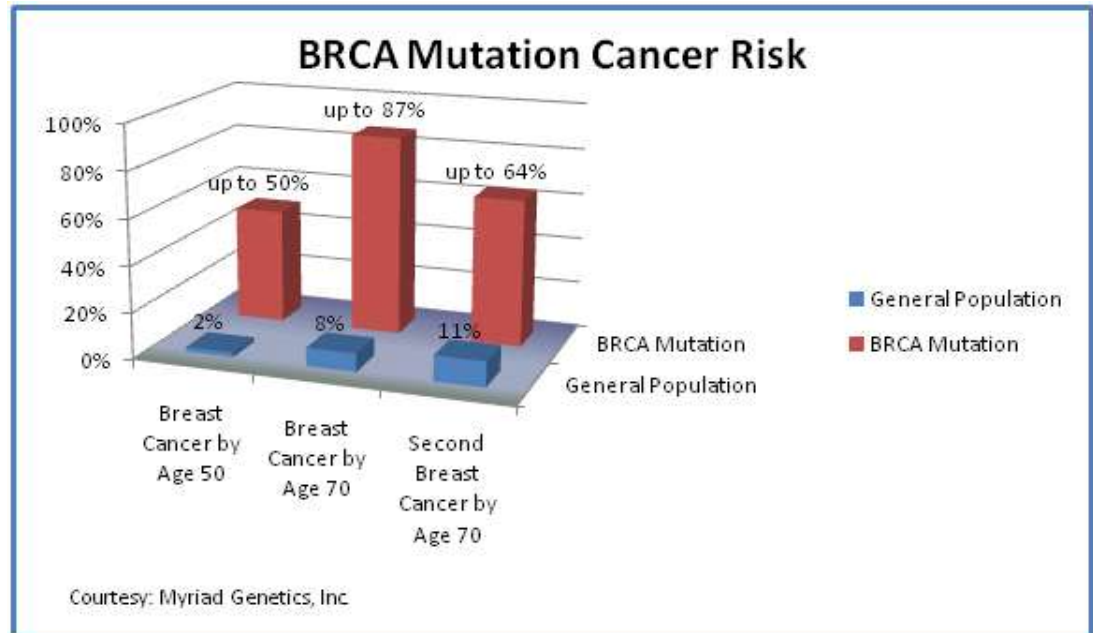
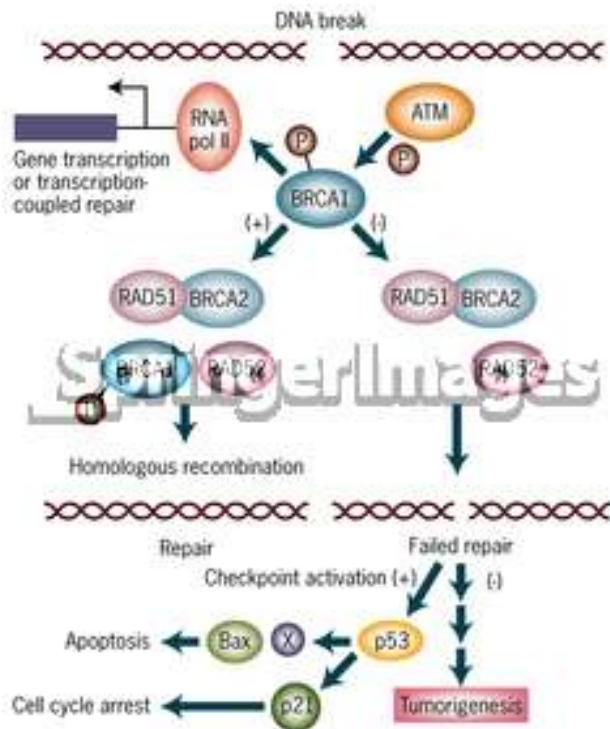
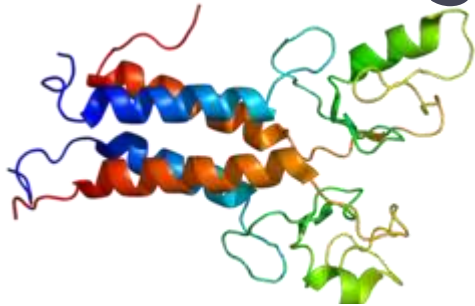
Fertőző mikroorganizmusok elleni küzdelem
(mikobaktérium stratégia: hibatűrő polimerázok)

Kutatási módozatok

Organizmus-szint: humán tumoros vs normál sejtvonalak
Drosophila modellek (Szeged, Budapest)

In vitro: molekuláris és szerkezeti biológia, kinetika, egyedi
molekulavizsgálatok

BRCA: egy DNS-javító fehérje mutációi a karcinogenezisben



A DNS kémiai tere limitált!

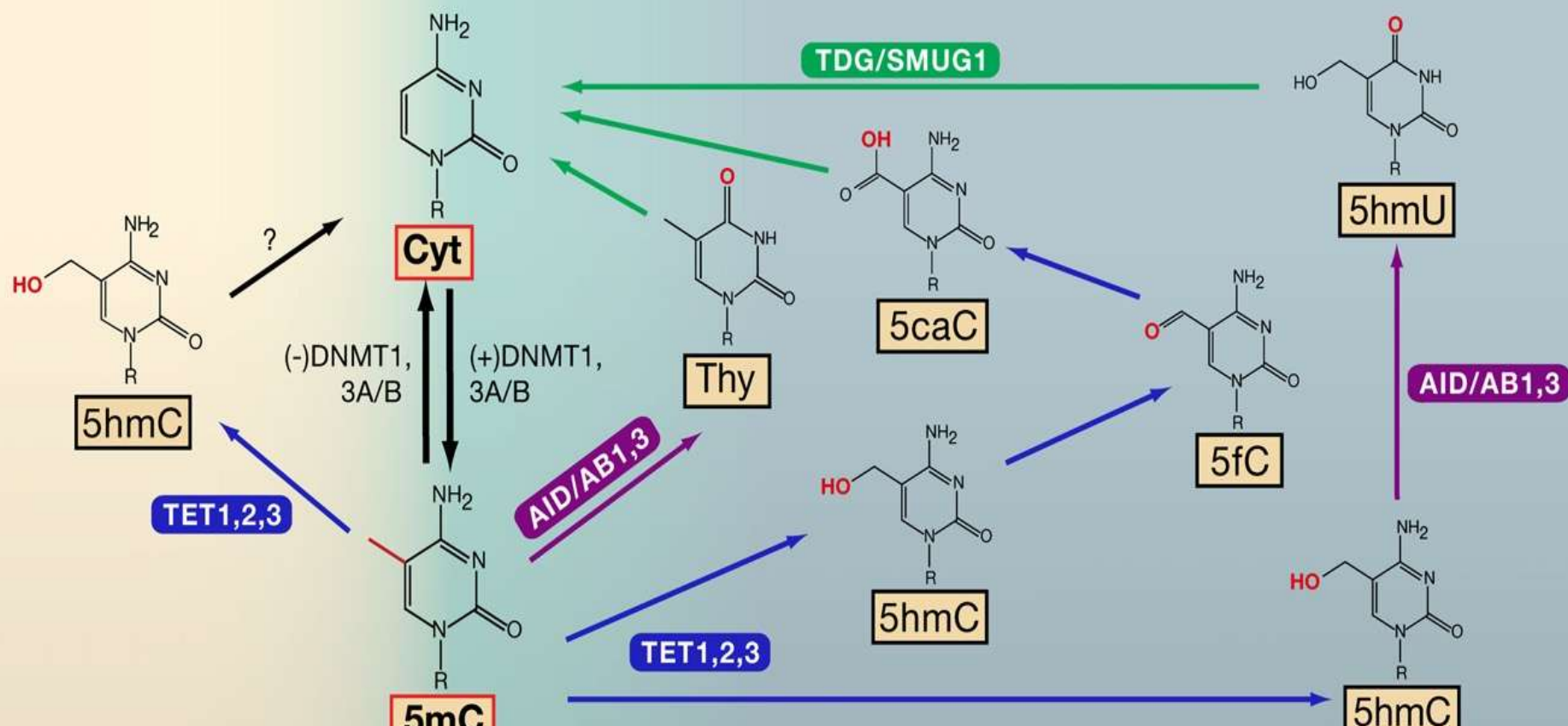
- Ez sok korlátot jelent
- De vannak azért érdekes, ritkább alkotók is!
- Ritka bázisok: lehet hiba, lehet jel

A DNS kémiai tere limitált!

- METILÁCIÓ: citozin, adenin
- Prokarióták: „saját” DNS definiálása
- Eukarióták: génkifejeződés szabályozása, epigenetika

Passive DNA Demethylation

Active DNA Demethylation



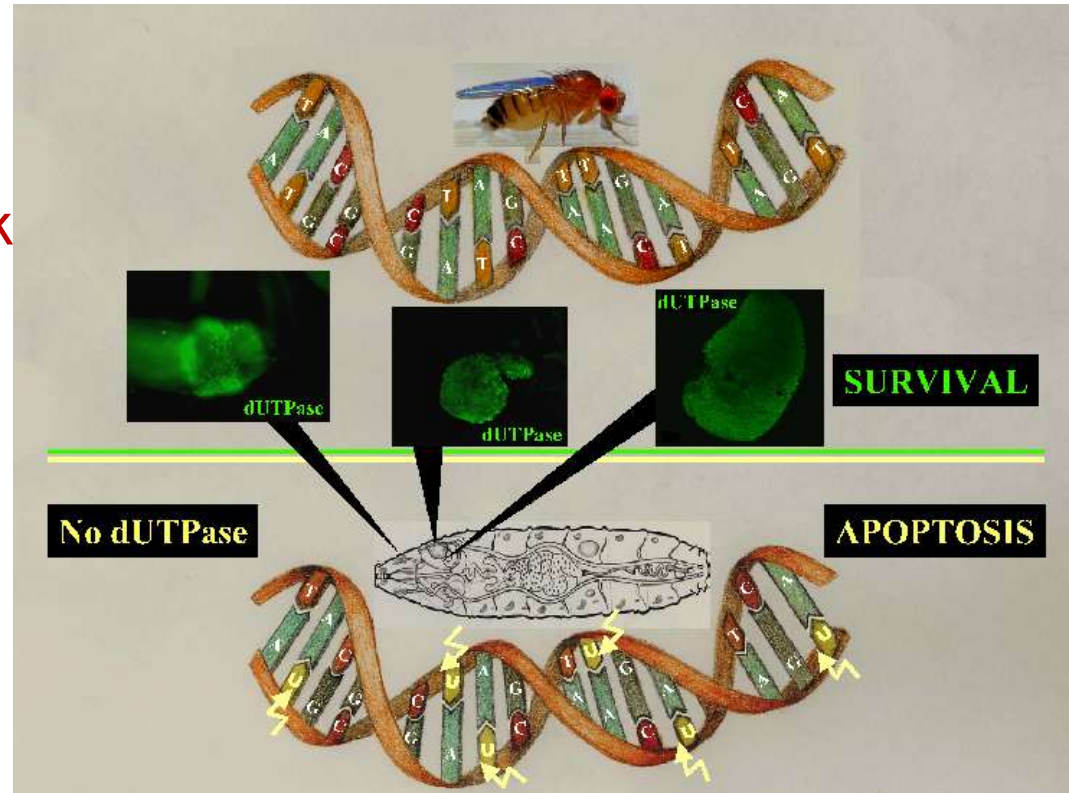
Szokatlan alkotóelemek: szokatlan szerepek

Uracil

- Hiba
- Jel a immunoglobulin gének diverzifikációjához
- Fejlődésbiológiai kapcsoló
- HIV genom integrálódáshoz kell
- U-DNS fágok

Ribonukleotidok

- Hiba
- Távtartó-vezérelt száltörés indukálás (architektúra-elem)

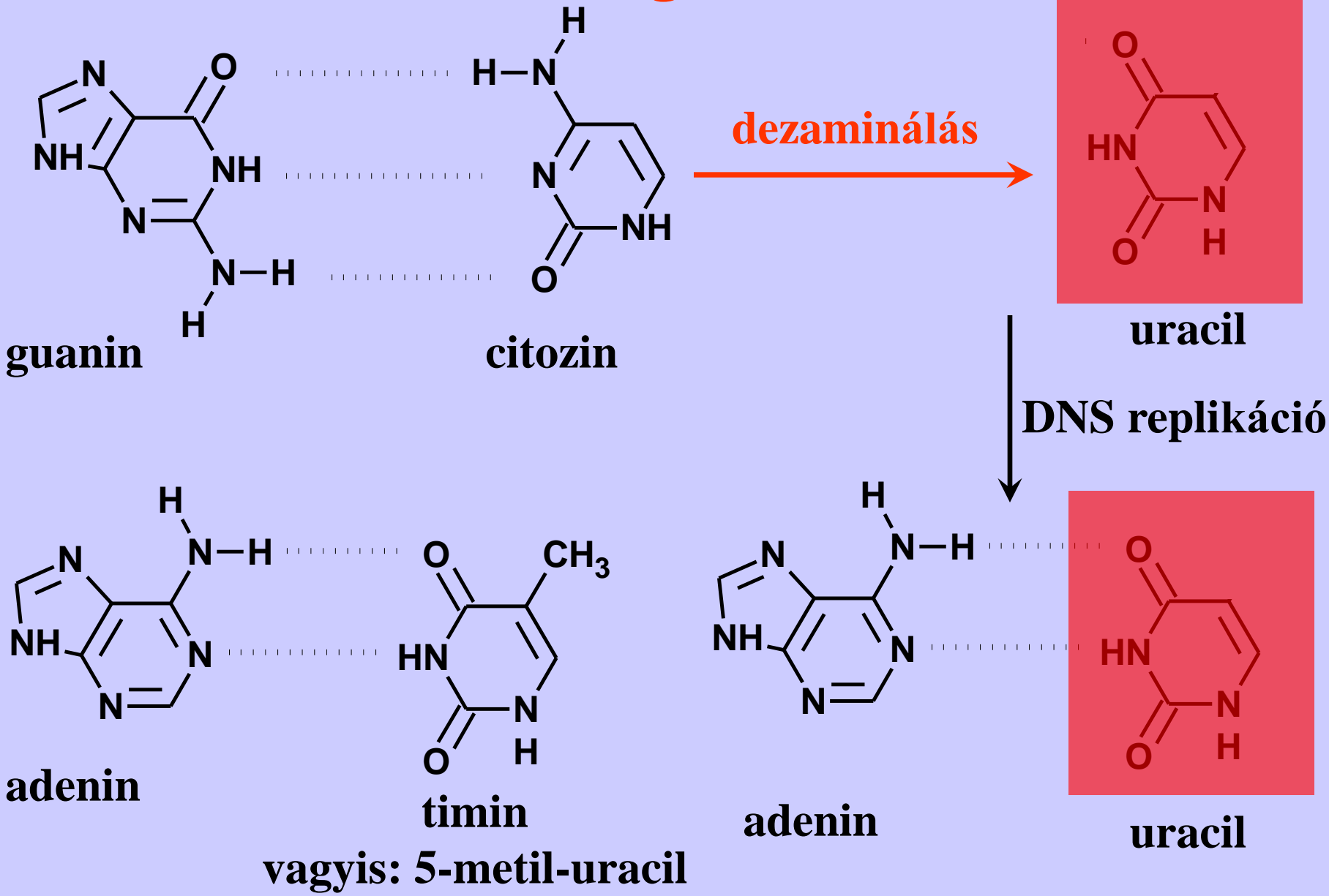


Első fejezet:

Uracil: hiba, amit javítani kell

G-C → A-U

Dezaminált citozin: mutagén uracil

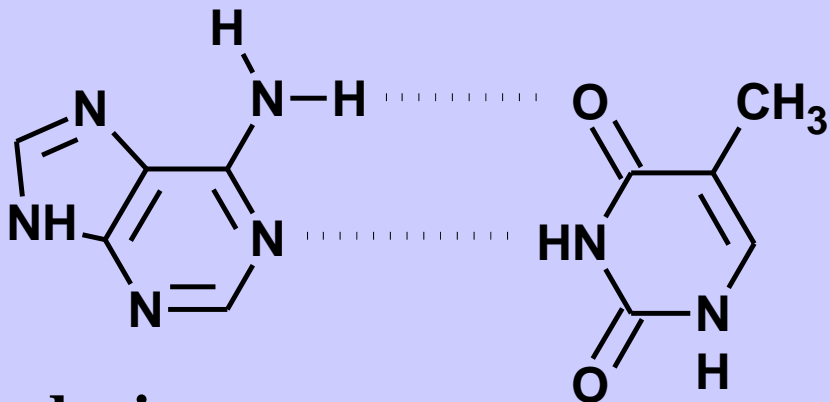


Timin-helyettesítő uracil: ártalmatlan uracil



DNS szintézis

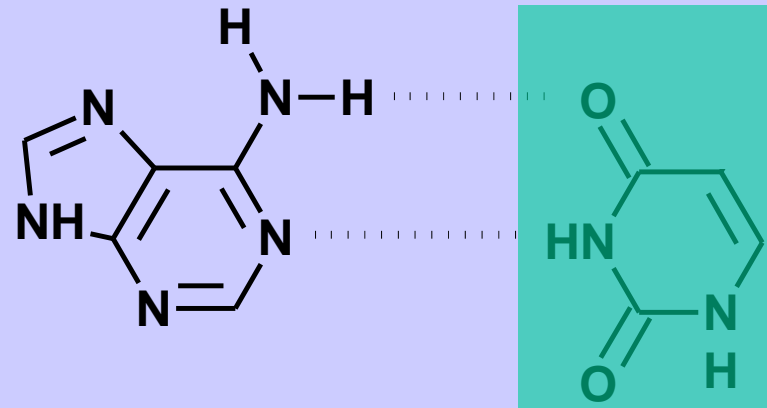
DNS szintézis



adenin

timin

vagyis: 5-metil-uracil



adenin

uracil

Uracil a DNS-ben?

Két útvonal

➤ Citozin dezaminálás

- 500/nap/genom
- MUTAGÉN
- Javító rendszert igényel: bázis-kivágó javítás (BER)

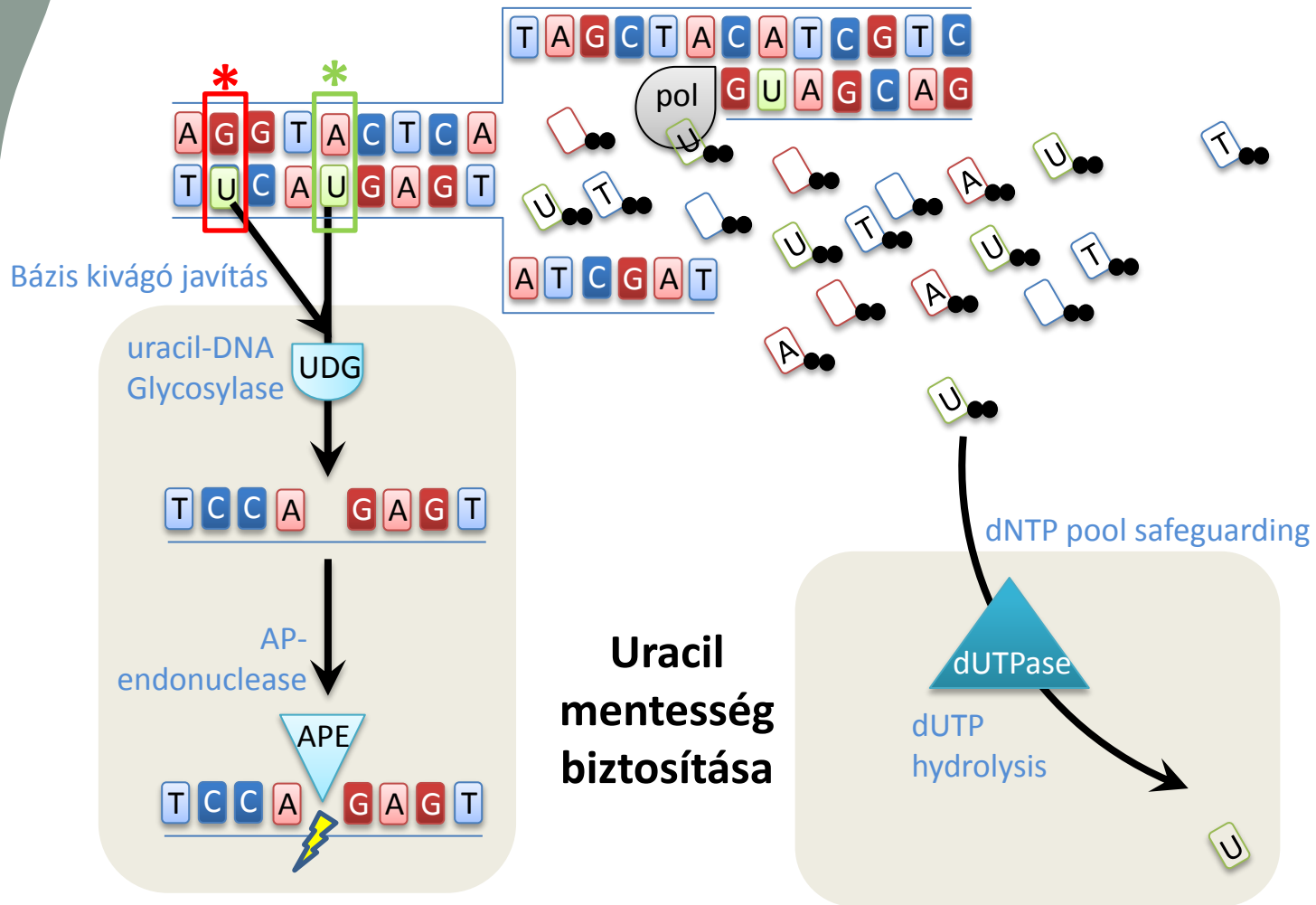
➤ Timin-helyettesítő beépülés

- magas sejtbeli dUTP/dTTP
- ÁRTALMATLAN
- nem feltétlenül javítandó, de BER szubsztrát
- hiábavaló ciklust generál

Uracil
(dUMP)
DNS-ben

Hogyan jön
létre?

Hogyan
távolítható
el?



KIVÁGÁS : UDG
Dezaminált citozinra és
timin-helyettesítő uracilra
egyaránt

**Uracil
mentesség
biztosítása**

MEGELŐZÉS : dUTPáz
Csak timin-helyettesítő uracilra

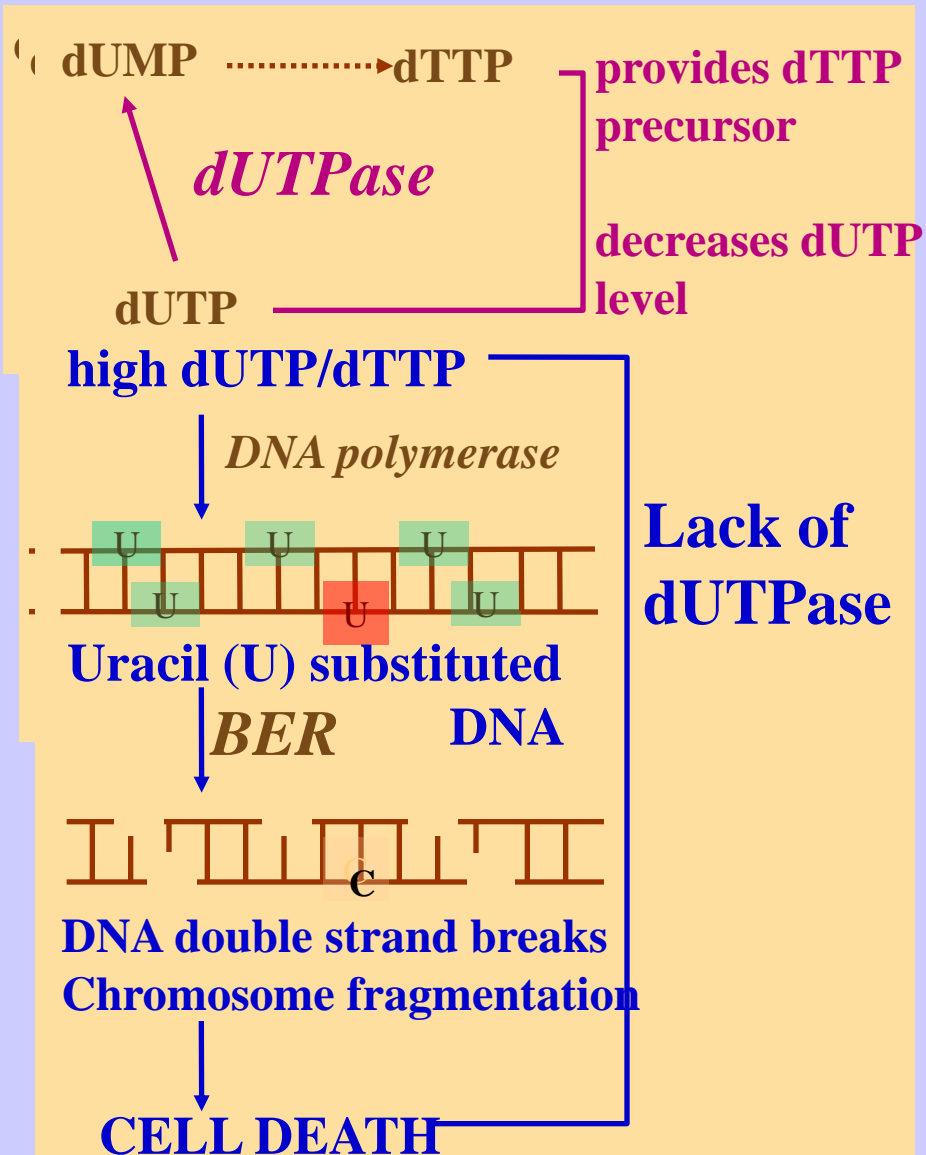


NDP



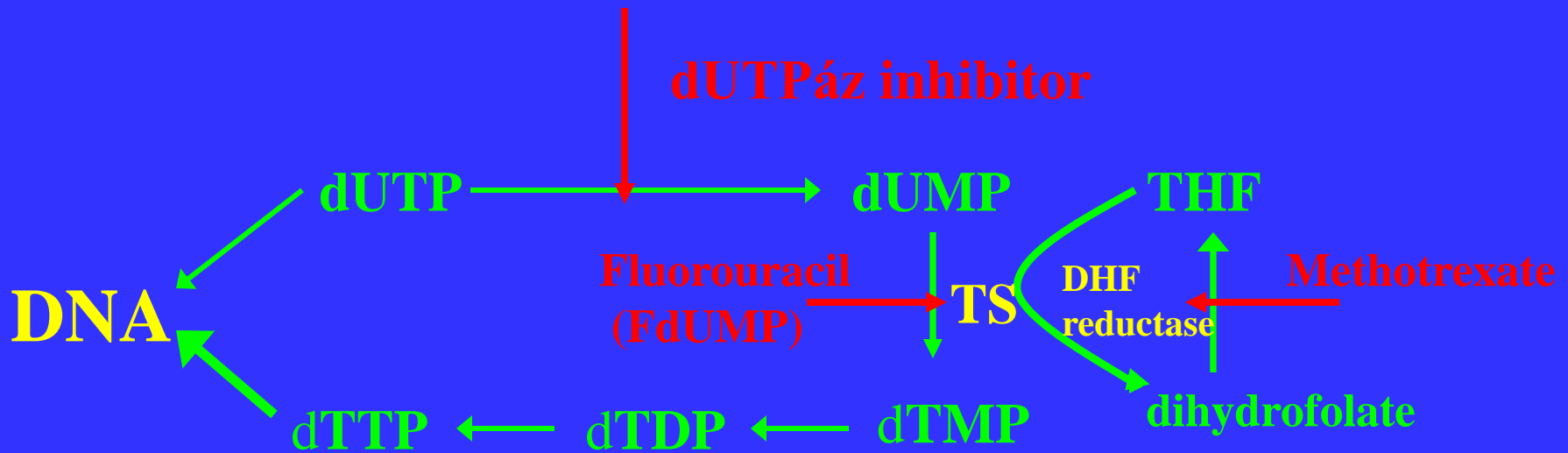
dNMP

dUTPáz hiánya genomi instabilitást okoz



- Pécsi et al, 2011 PNAS
- Toth et al 2007 JBC
- Kovári et al 2004 JBC
- Dubrovay et al 2004 JBC
- Barabás et al 2004 JBC
- Békési et al 2004 JBC
- Németh et al 2007 NAR
- Varga et al 2007 FEBS Lett
- Vértessy 2009 Acc. Chem. Res.
- Merényi et al, 2010 FEBS J
- Pukáncsik et al 2010 FEBS J
- Pécsi et al, 2010 NAR
- Horváth et al, 2010 NAR
- Békési et al, 2011 FEBS J
- Muha et al, 2012 PLoS Genetics

Timinmentes sejthalál: a kemoterápia egyik fő eszköze



Az inhibitorok sejthalált indukálnak a dTTP / dUTP arány perturbálása révén, a timidilát szintáz (TS), dihidrofolát reduktáz (DHF) vagy a dUTPáz gátlásával.
p53-deficiens tumorsejtekben is működő stratégia!

Főbb céljaink

- A timinmentes sejthalál vizsgálata humán tumoros és normál sejtvonalakban
- Az uracil-DNS szerepének felderítése különböző organizmusokban
- dUTPáz-gátló gyógyszerjelöltek azonosítása: tumorok ellen, de patogén mikroorganizmusok ellen is!

Projektek/Módszerek

Szerkezeti biológia

- Mechanistic studies
- Species-specific characteristics
- Folding

- Enzyme kinetics
- Low resolution conformational spectroscopies (CD, fluoresc.)
- EPR-ENDOR
- Multidimensional NMR
- X-ray crystallography

Mit vizsgálunk:

Uracil-DNS metabolizmus

Élettani szerep

- Developmental and cell-cycle-dependent regulation
- Role in DNA repair / apoptosis
- Mechanism of thymine-less cell death
- Expression patterns
- Subcellular localisation
- Proteomic search for interacting networks
- Overexpression
- Knock-out / RNA interference
- Nucleo-cytoplasmic trafficking



Biostruct Laboratórium

Kristályosítás és röntgenkristallográfia
-kis- és makromolekuláris/komplexek-



Contact:

BME CH épület

Biostruct laboratórium

Budapest, 1113 Szt Gellért tér 4 www.biostruct.enzim.hu

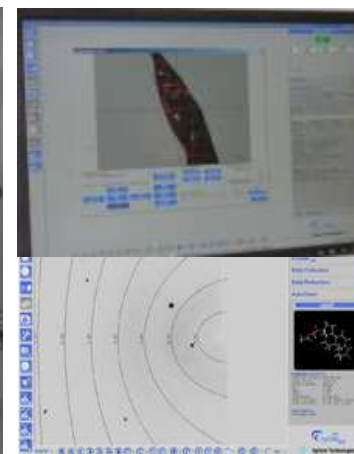
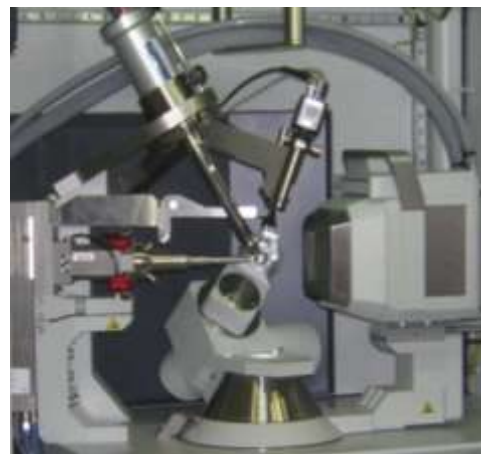
E-mail: vertessy@enzim.hu,

leveles@enzim.hu

Homepage:

www.biostruct.enzim.hu

SuperNova egykristály diffraktométer



Mosquito kristályosító robot 96 csepp/2 per

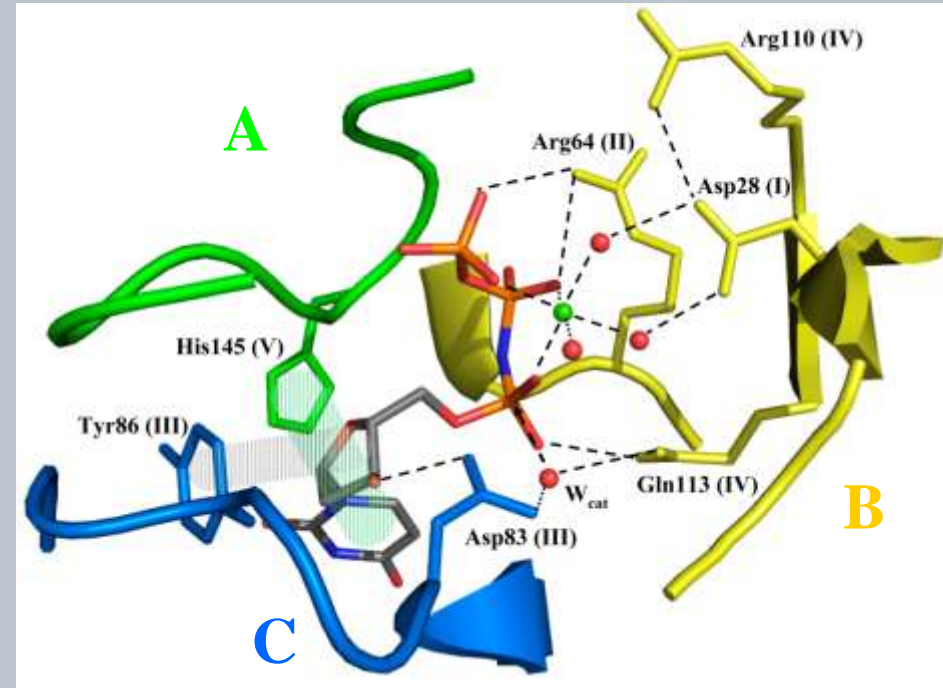
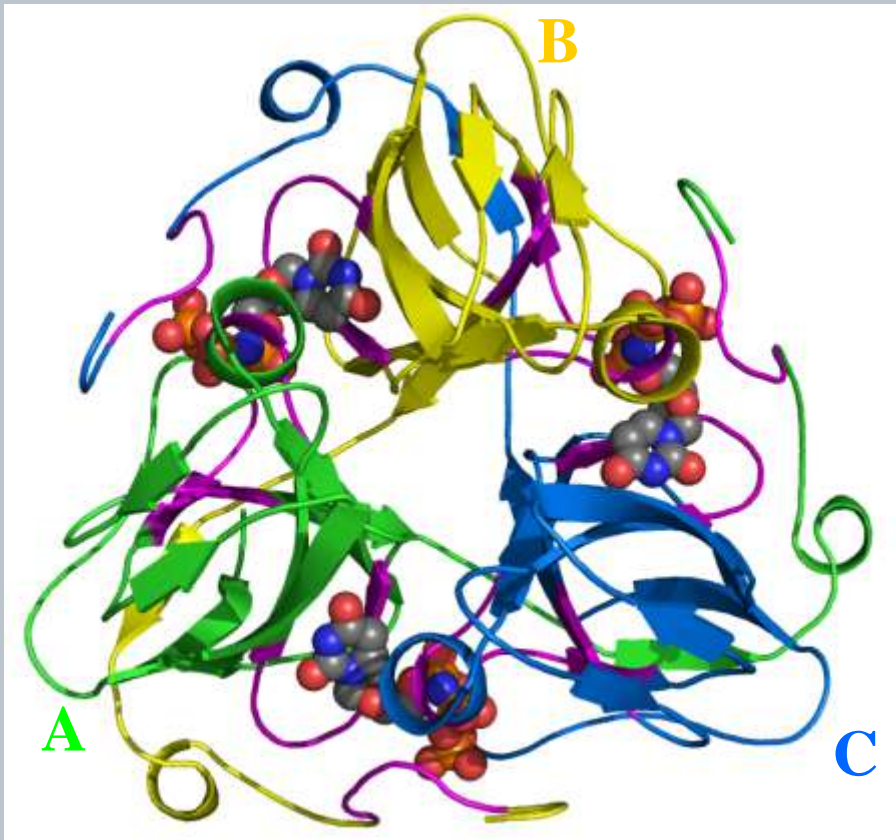


Képképző rendszer/Rock Imager

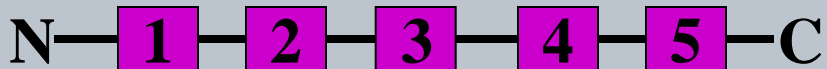


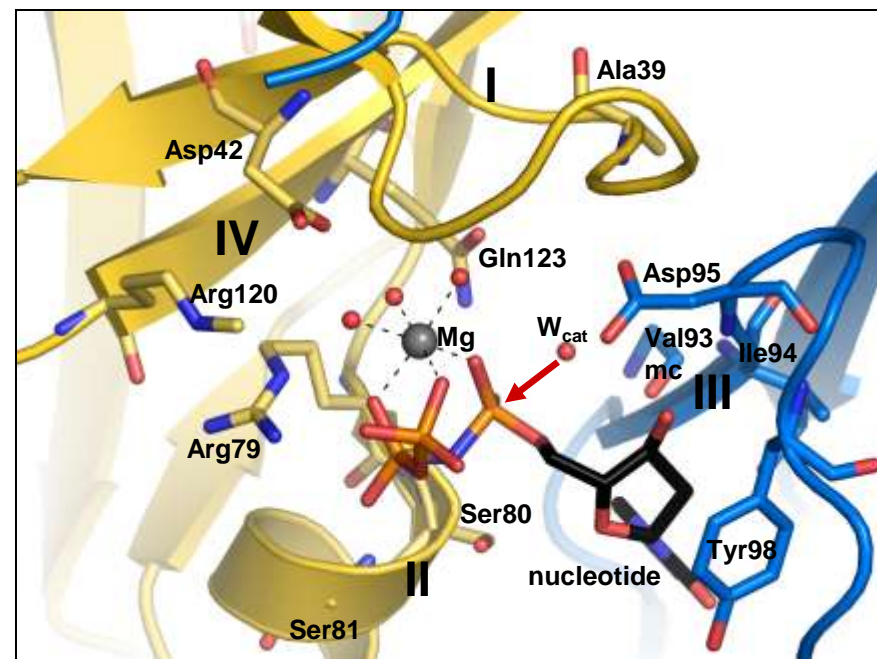
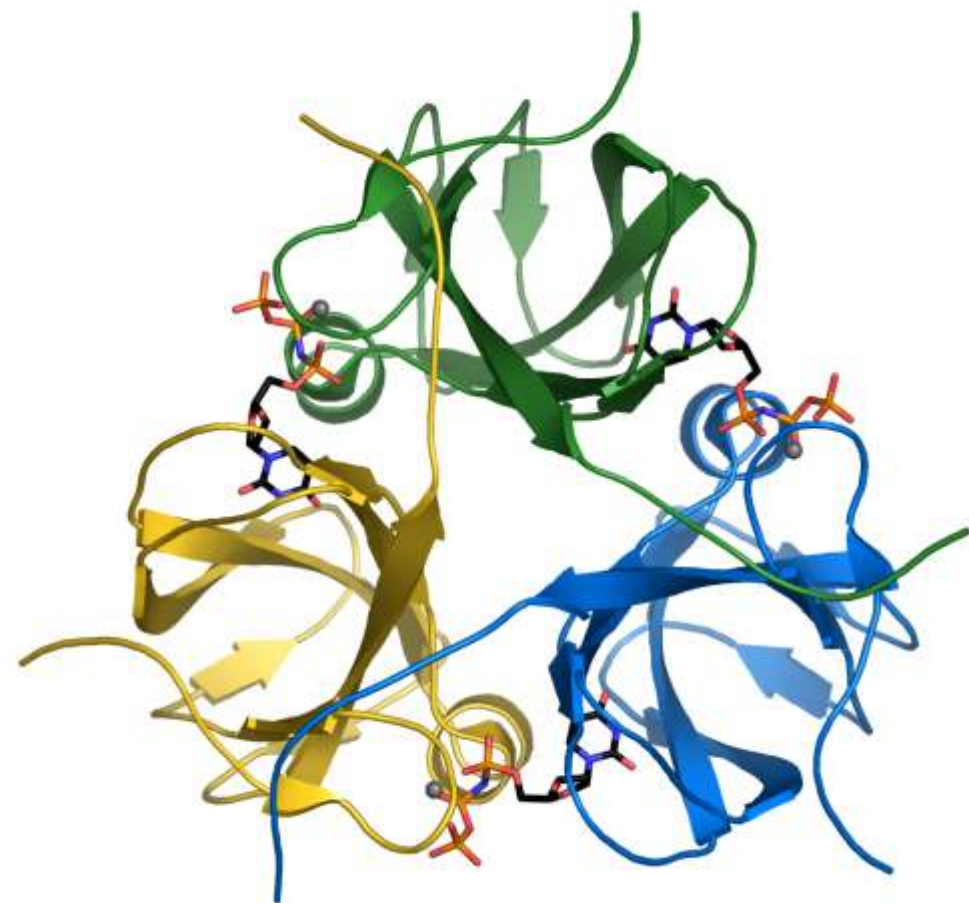
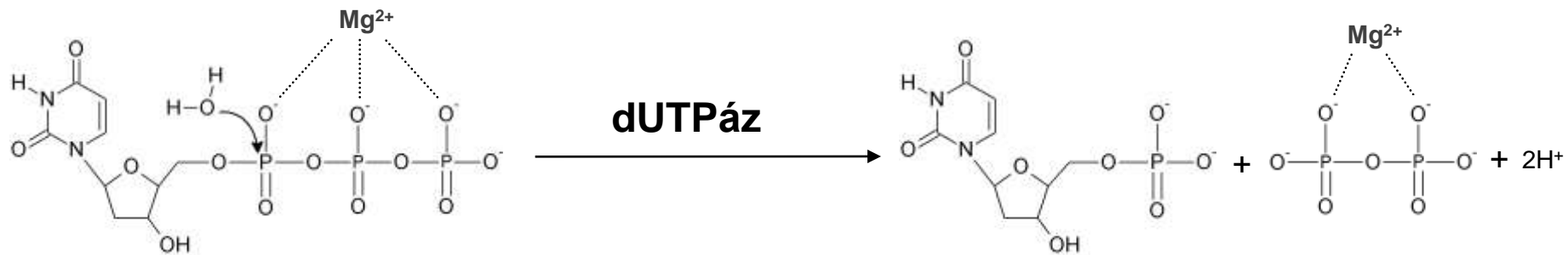
dUTPáz szerkezet

Szimmetrikus homotrimer

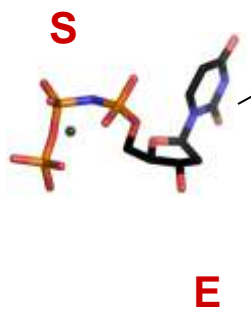


Három aktív centrum
Mindhárom monomer részt vesz
az aktív centrum felépítésében

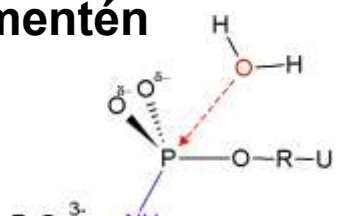




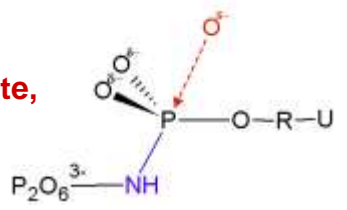
Intermedierek a reakció koordináta mentén



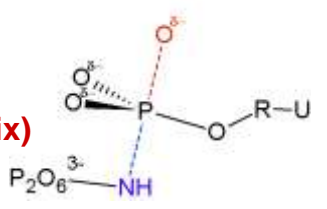
E-S



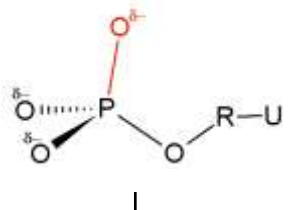
Approach Intermediate, (E-AI)



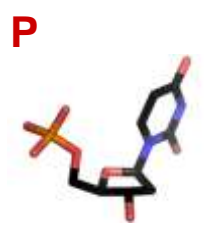
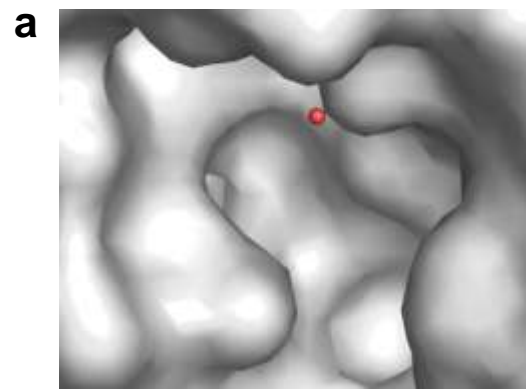
TS mimic intermediate (E-S/E-piP mix)



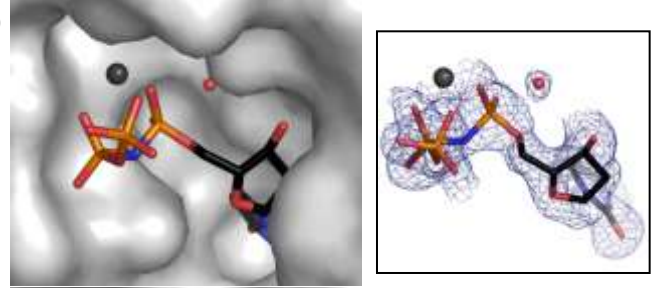
Post-attack Intermediate (E-piP)



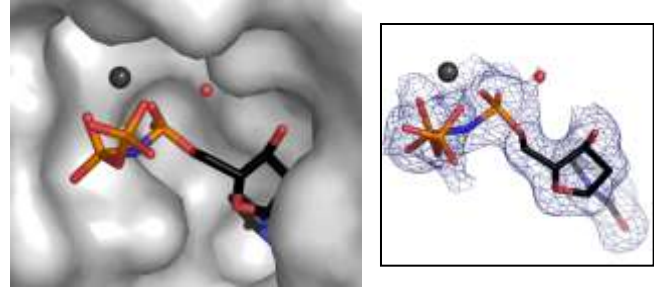
E-P



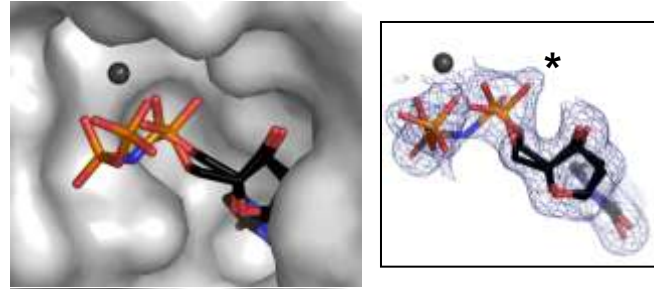
b



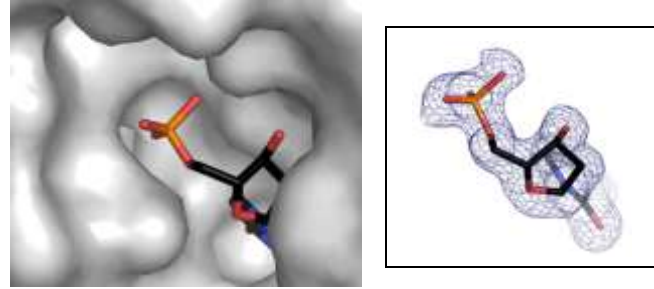
c



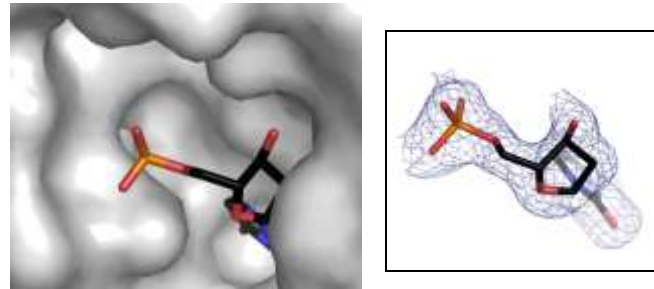
d



e



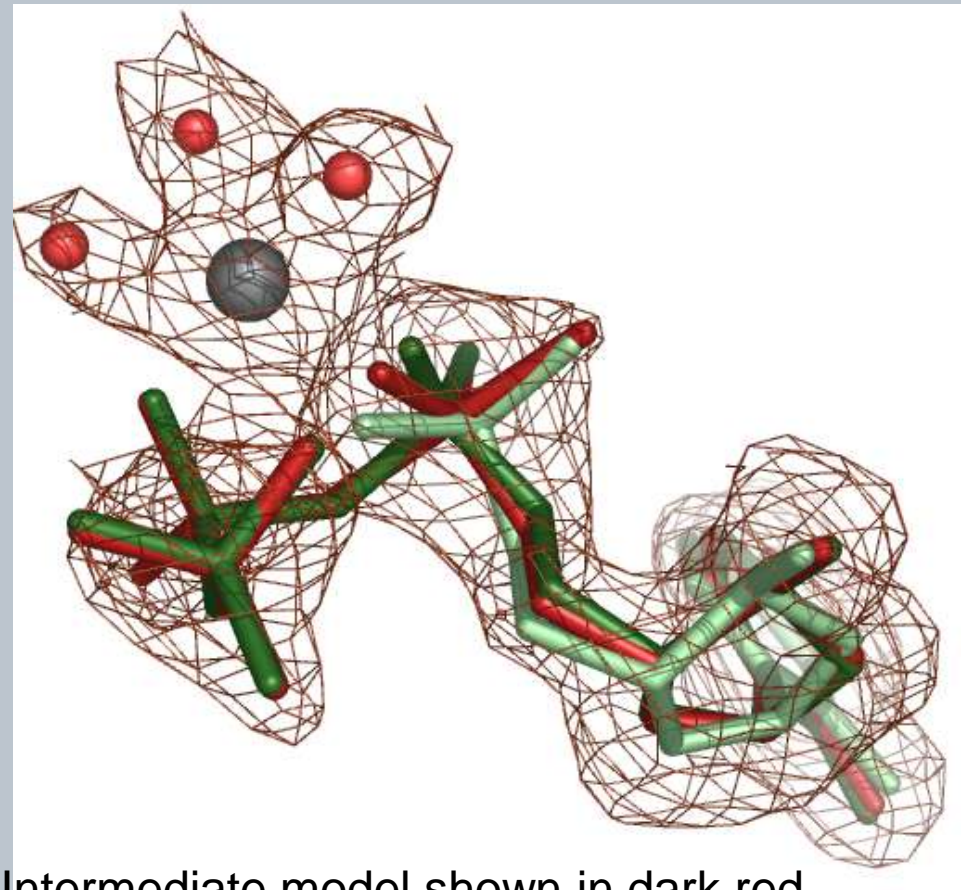
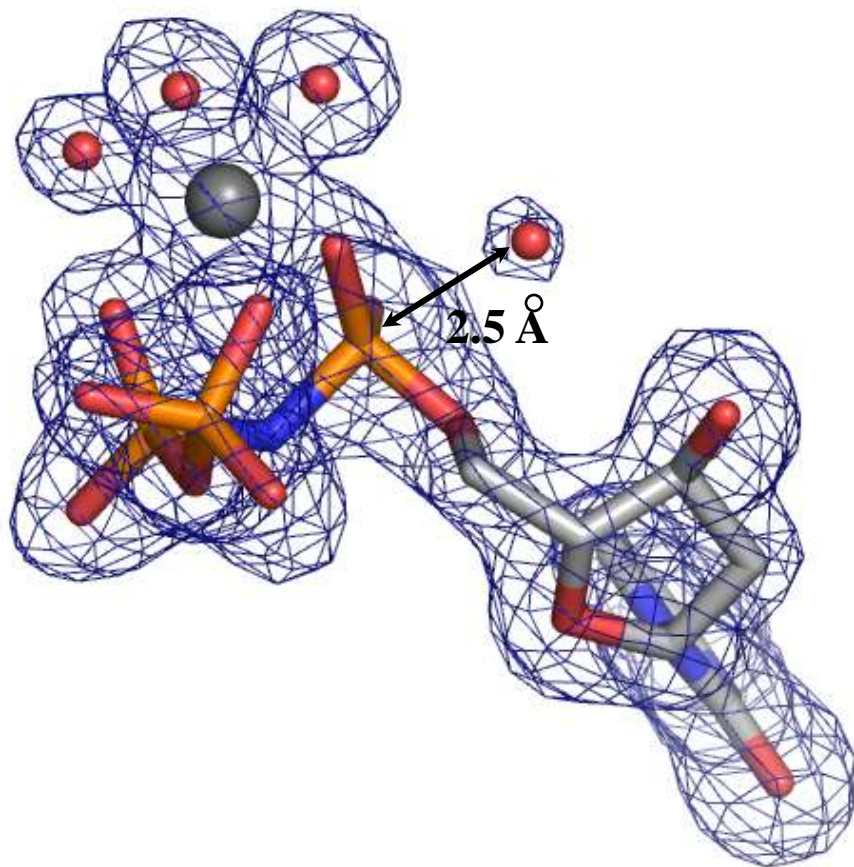
f



Intermedierek a reakció koordináta mentén: 3D szerkezetek különböző intermedierekre

Near-attack conformer

E-I int, mix density



Intermediate model shown in dark red.

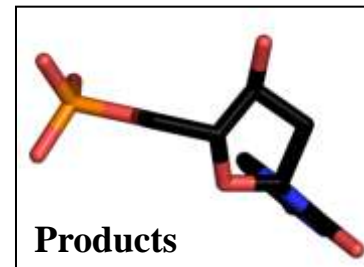
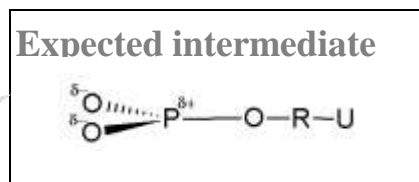
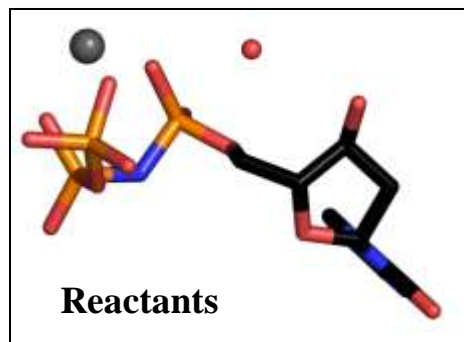
Mixture model shown in two shades of green.

Light green: the product dUMP,

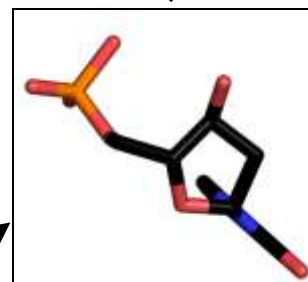
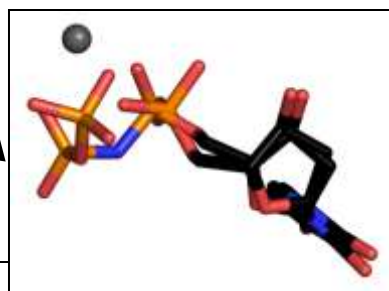
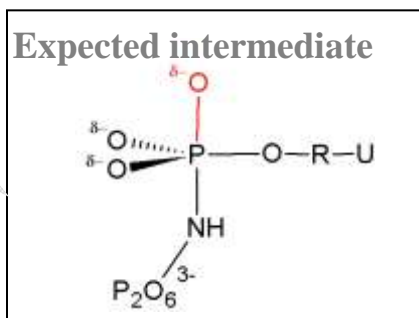
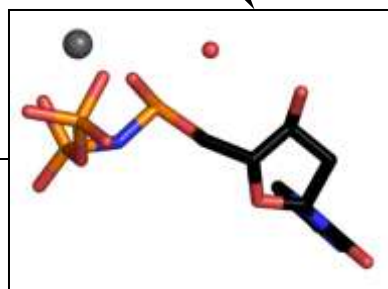
dark green: the substrate a,b-imino-dUTP

Note: Wcat and aP densities separate.

Dissociative mechanism



Associative mechanism



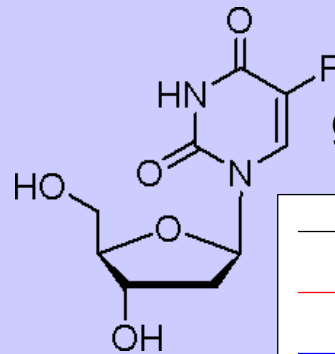
Experimentally described intermediates 1-3

Crystallographic intermediate 1 (E-AI)

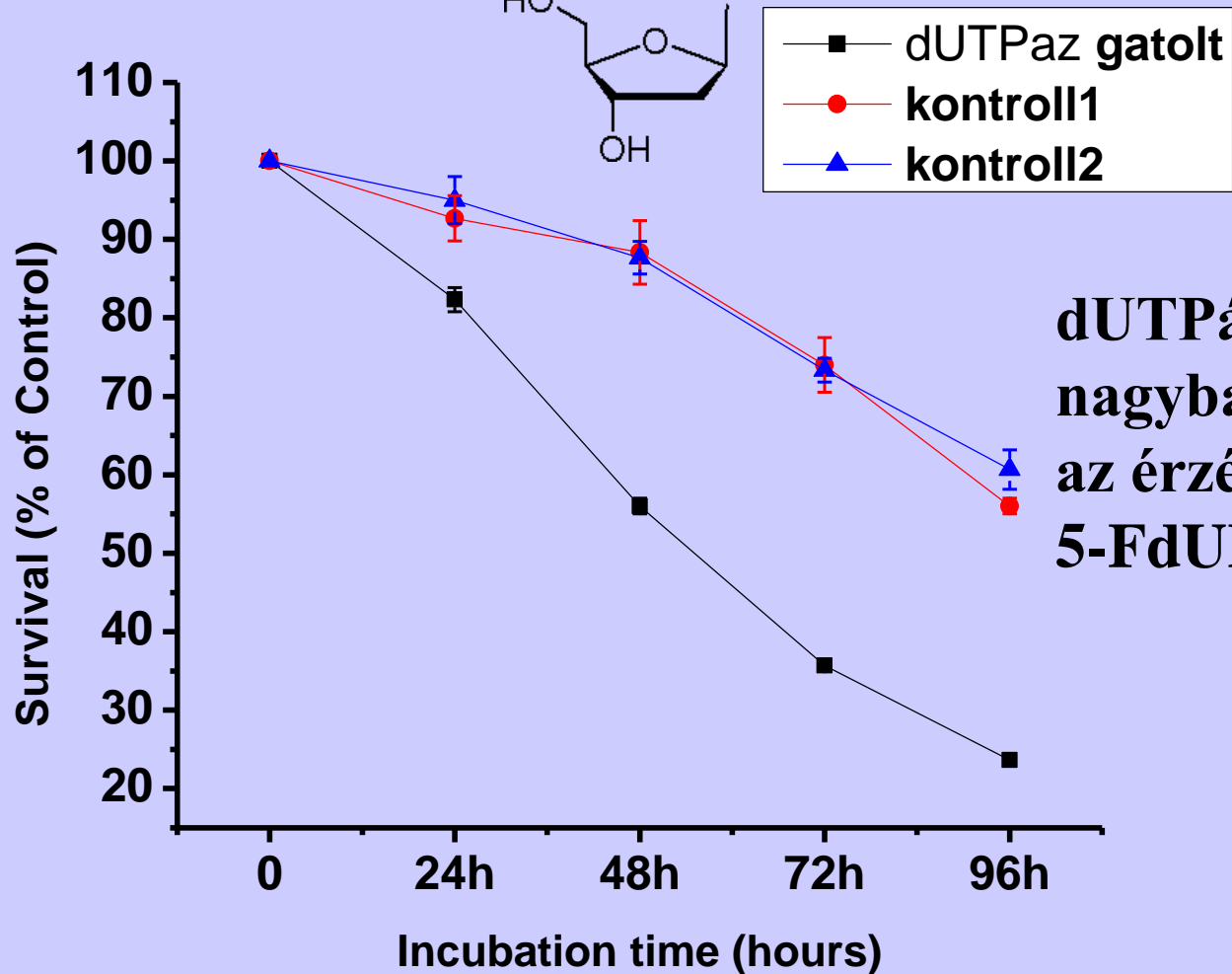
Crystallographic intermediate 2 (E-S/E-piP mix)

Crystallographic intermediate 3 (E-piP)

dUTPáz gátlás hatása a sejt proliferációra 5-FdUR jelenlétében



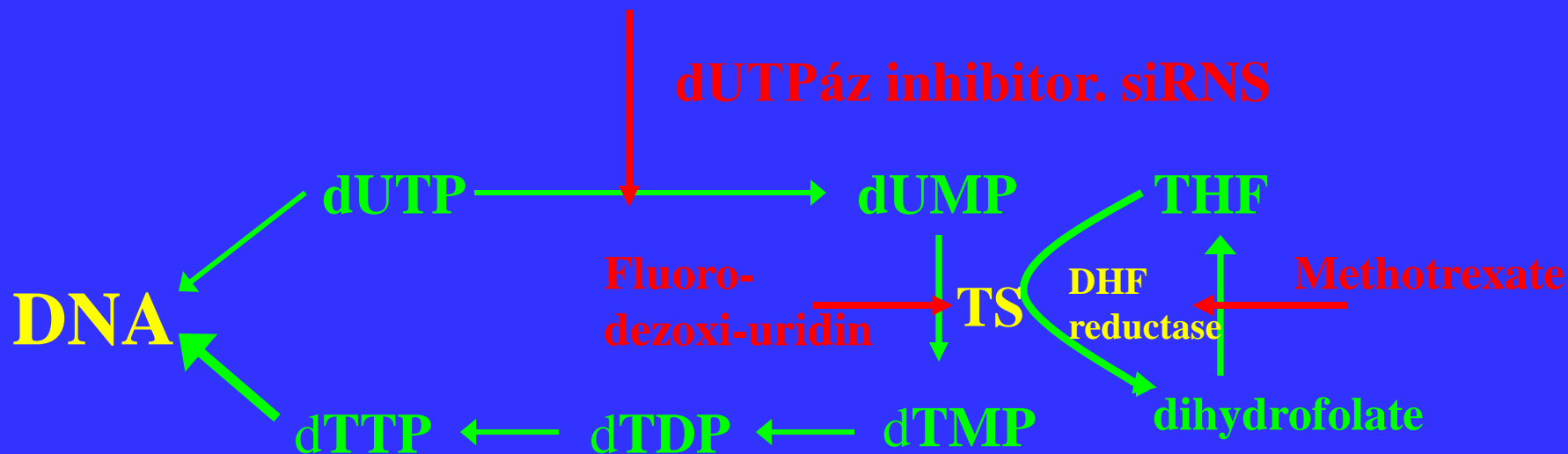
gyakran használt kemoterápiás szer



**dUTPáz gátlás
nagyban növeli
az érzékenységet
5-FdUR-re**

Timinmentes sejthalál: a kemoterápia egyik fő eszköze

Proof of concept: igazoltuk, hogy itt a több helyen való támadás előnyös!

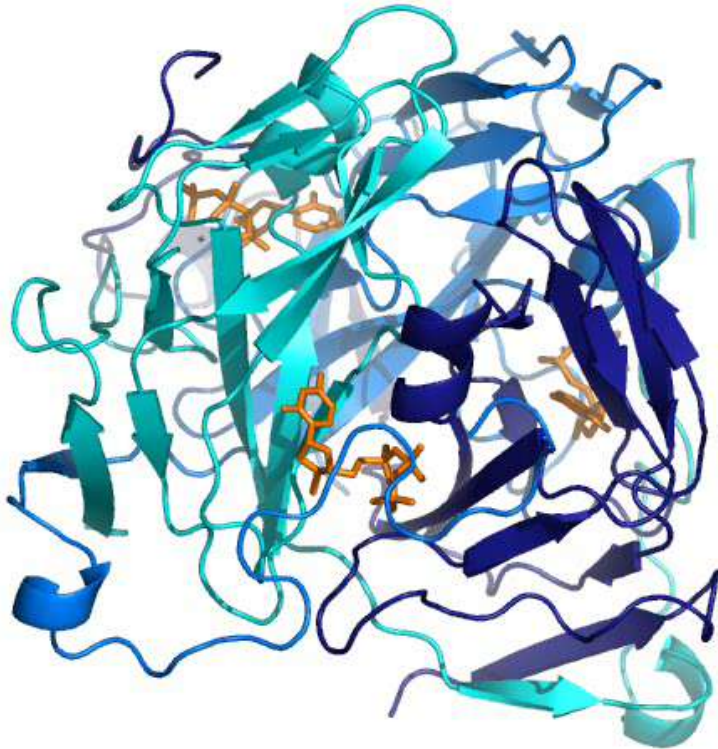


Az inhibitorok sejthalált indukálnak a dTTP / dUTP arány perturbálása révén, a timidilát szintáz (TS), dihidrofolát reduktáz (DHF) vagy a dUTPáz gátlásával.

Szerkezet és mechanizmus alapú inhibitor tervezés

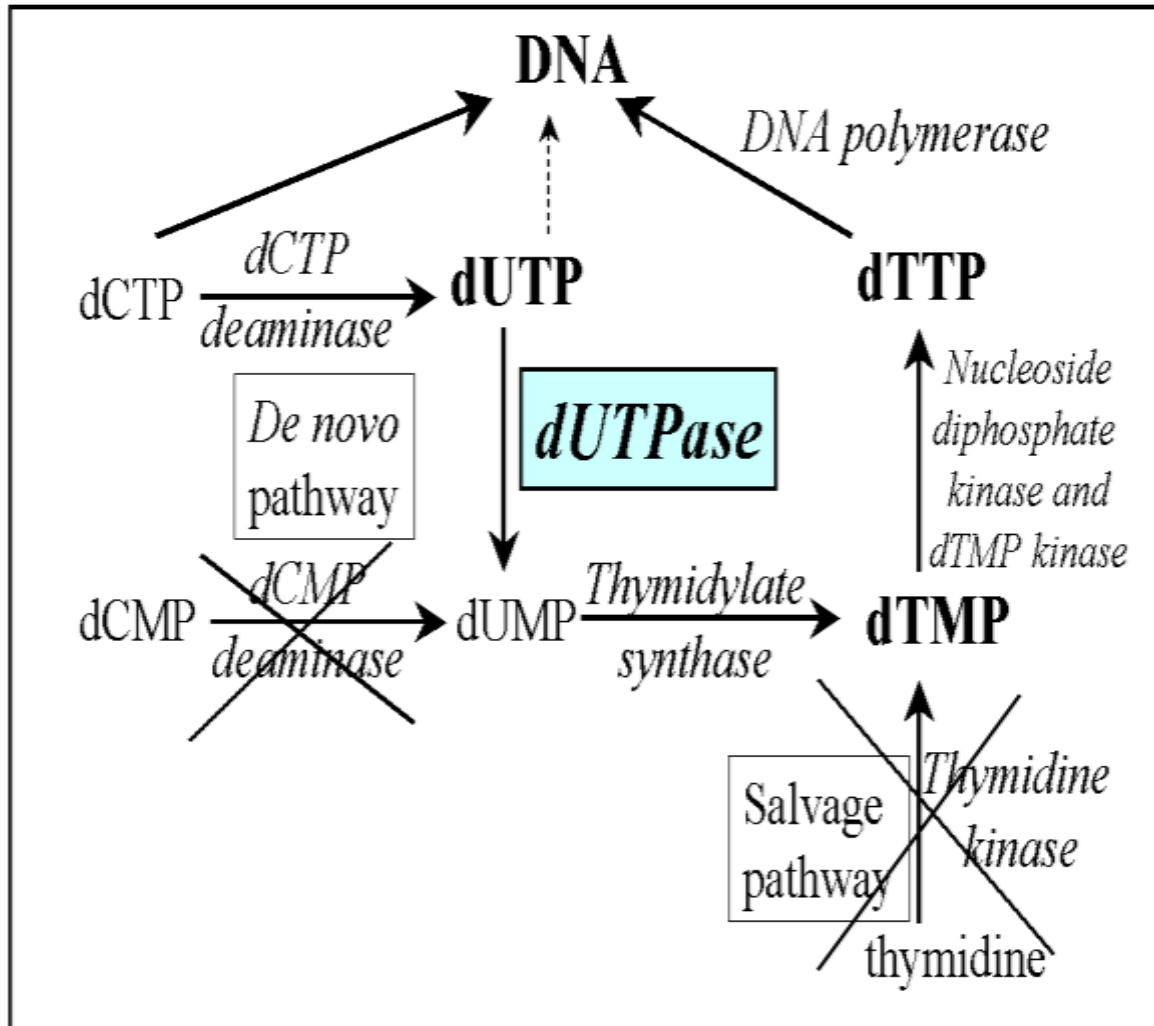
Munkafolyamat

1. HTS In silico screening
2 millió vegyületre
2. In vitro enzimesztek
100-200 vegyületre
3. Sejtbeli gátlás
350 vegyületre
4. Humán sejt vizsgálatok
50 vegyületre
5. Állatkísérletek
6. Szabadalmaztatás



Humán dUTPáz: rákos sejtekben túltermelt, védő faktor a tumornak
Ha gátoljuk, csökken a tumorsejt életképessége

Tuberkulózis és malária: dUTPáz, mint közös target fehérje



Mycobacterium tuberculosis
és
Plasmodium falciparum

Két fontos enzim hiányzik
-dCMP dezamináz
-Timidin kináz

dUTPáz:
Nemcsak a dUTP elbontásában,
hanem a dUMP/dTTP
termelésben is
kulcsszerepe van

M. tuberculosis dUTPáz

Mikobaktérium-specifikus szegmensek



Specifitási szegmensek : fajspecifikus inhibitorok

Varga et al 2008, Pécsi et al 2012

PDB ID: 2PY4

Második fejezet:

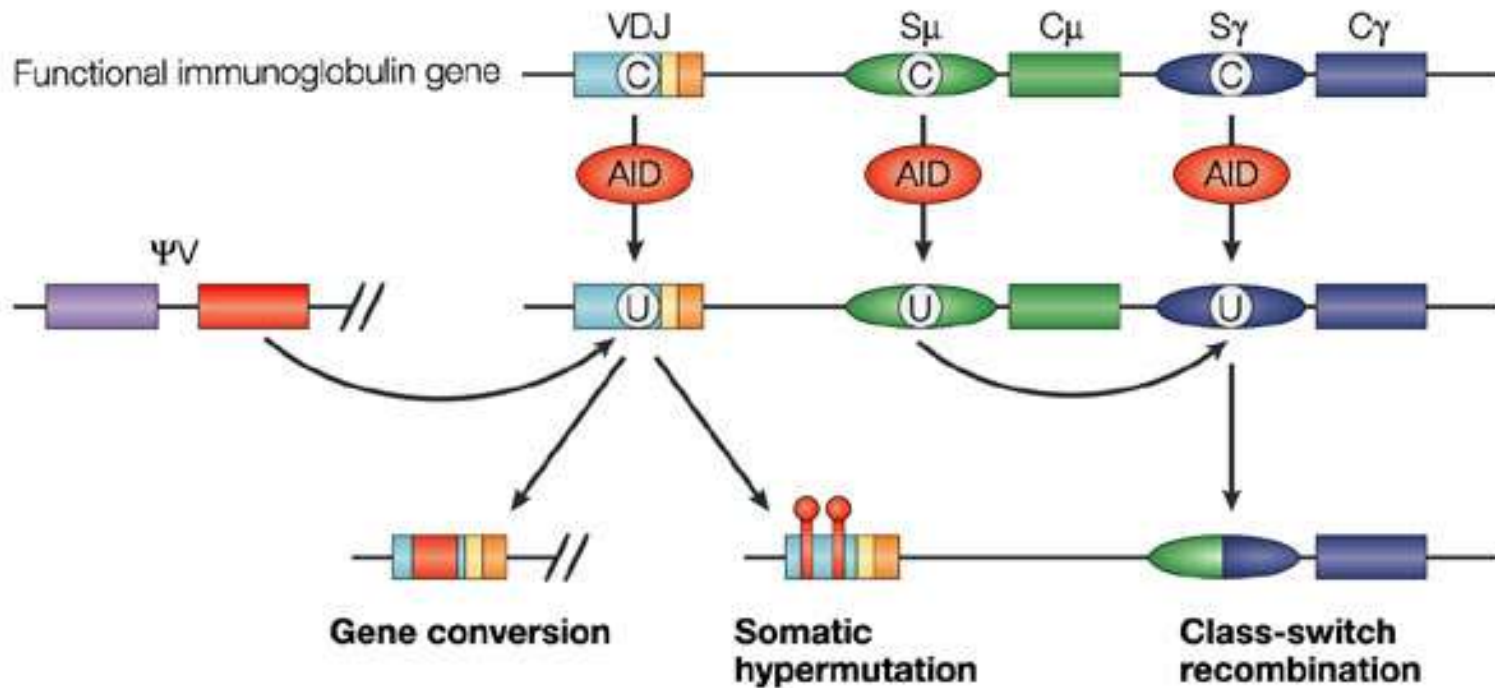
Uracil: jel, ami élettanilag fontos

Paradigma váltás

Korábban csak hibaként tekintetbe vett
DNS módosulások új szerepei

Uracil, illetve egyéb DNS-hibák a javító útvonalakon kívül
más jelátviteli útvonalakba is bekapcsolódhatnak

Az uracil bázis fontos jelátviteli szignál:
IgG gének, indukált dezaminálás adott helyen



Nature Reviews | Immunology

A megfelelő helyen keletkezett uracil elindítja a DNS-száltöréshez vezető utat

UNG enzim hiánya egérben: immundeficiens tünetegyütteshez vezet

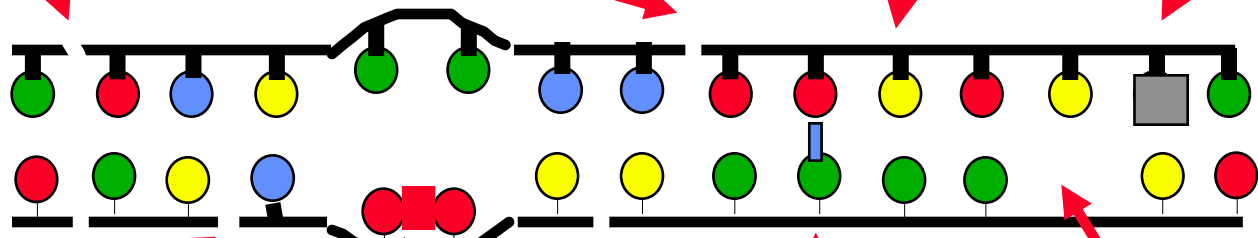
DNS károsodások

● G ● A ● T ● C

ds DNS törés

Hamis pár

C-U dezaminálás



ss törés

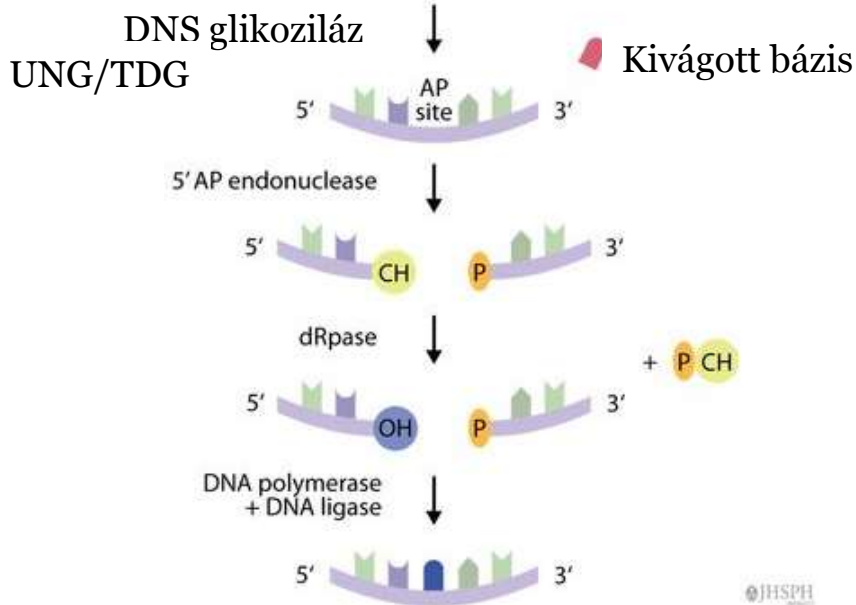
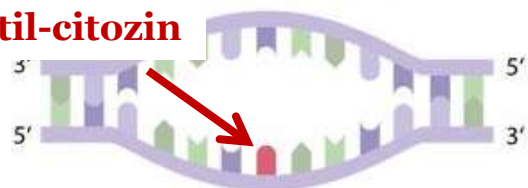
Timidin dimer

Kovalens keresztkötés

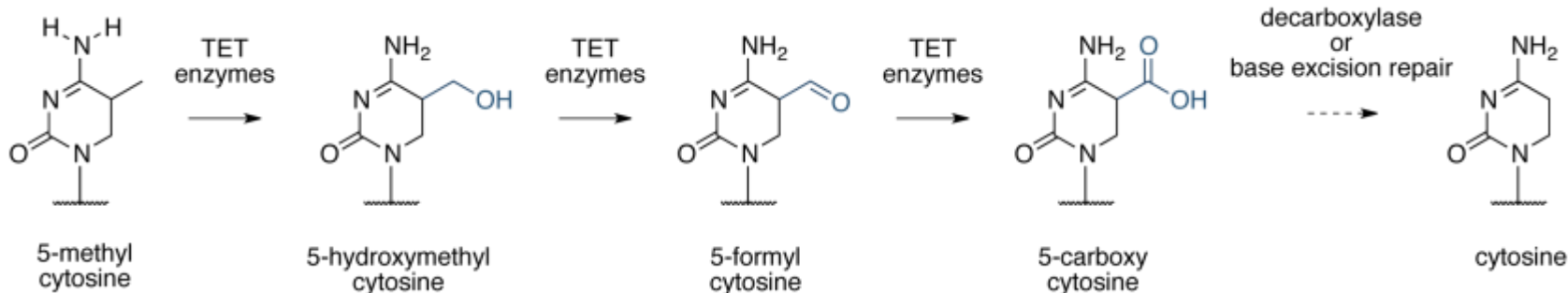
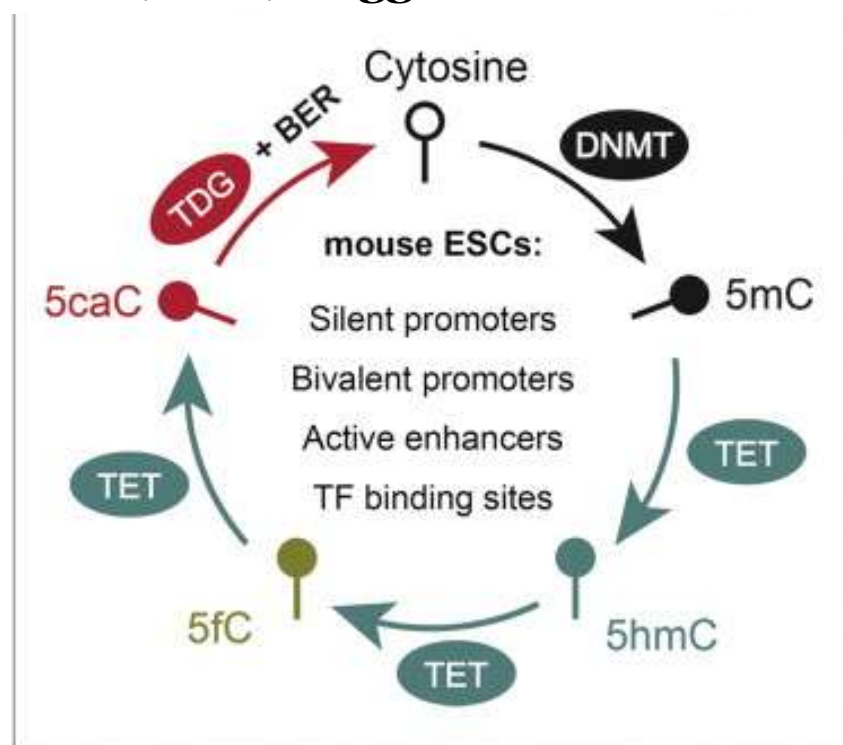
AP hely

BER javítás és epigenetika kapcsolata

Hibás bázis
vagy metil-citozin



TDG(UDG)-függő aktív demetiláció

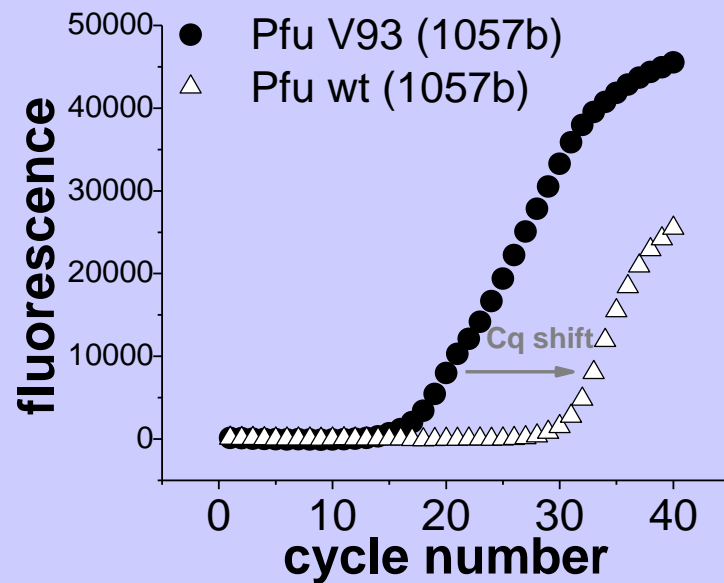
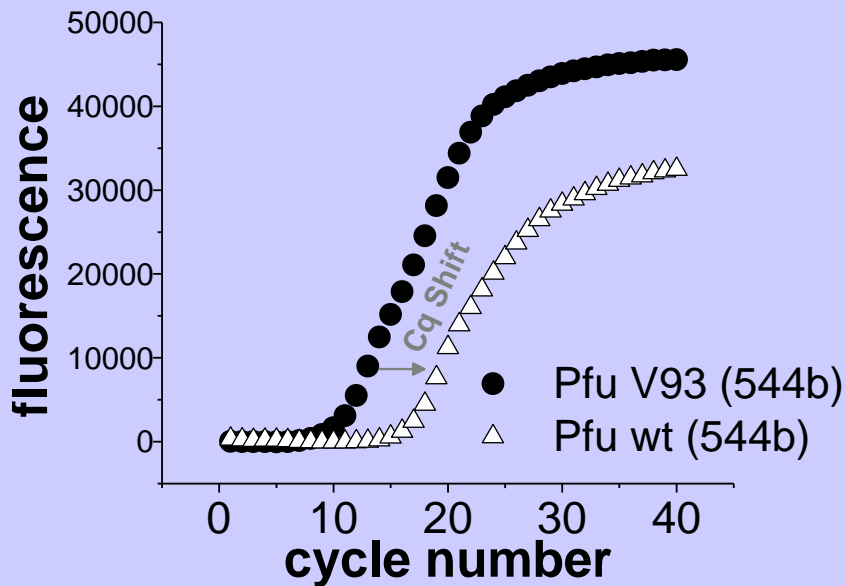
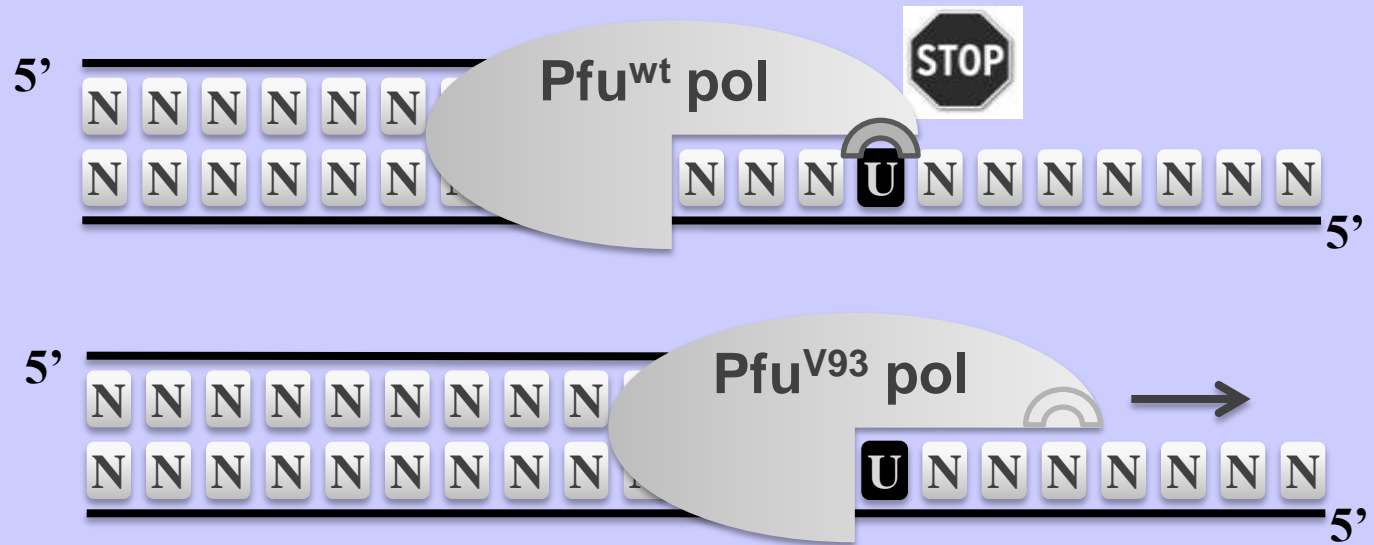


Uracil-DNS:

- közvetlen mérés a genomi DNS-ből a személyre szabott gyógyítás indikátora lehet
- mintázatának feltérképezése a jelátviteli funkciók megértéséhez is kell

- Hogyan mérhető a genomi uracil?
- Több módszer létezik: kvalitatív, kevésbé érzékeny
- Tömegspektrometria: viszonylag megbízható, de hosszadalmas, indirekt
- **EGYIK SEM ALKALMAS A KÖRNYEZET FELDERÍTÉSÉRE!**

**PCR-alapú
assay:
Közvetlen
Egylépcsős
Kvantitatív**

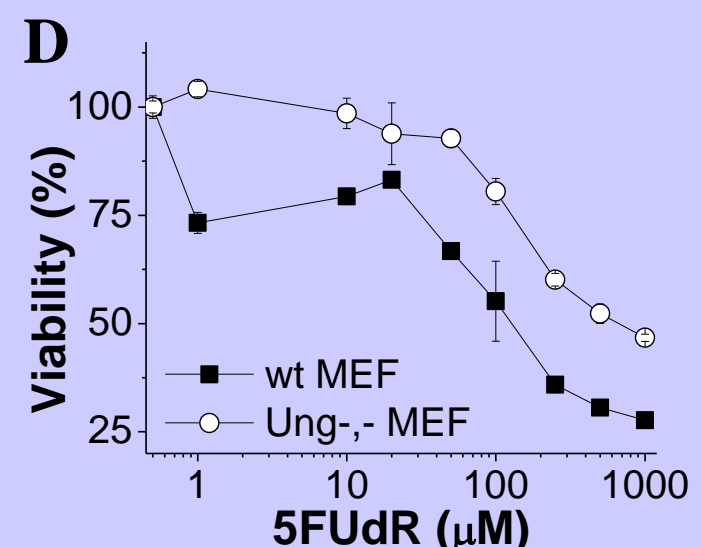
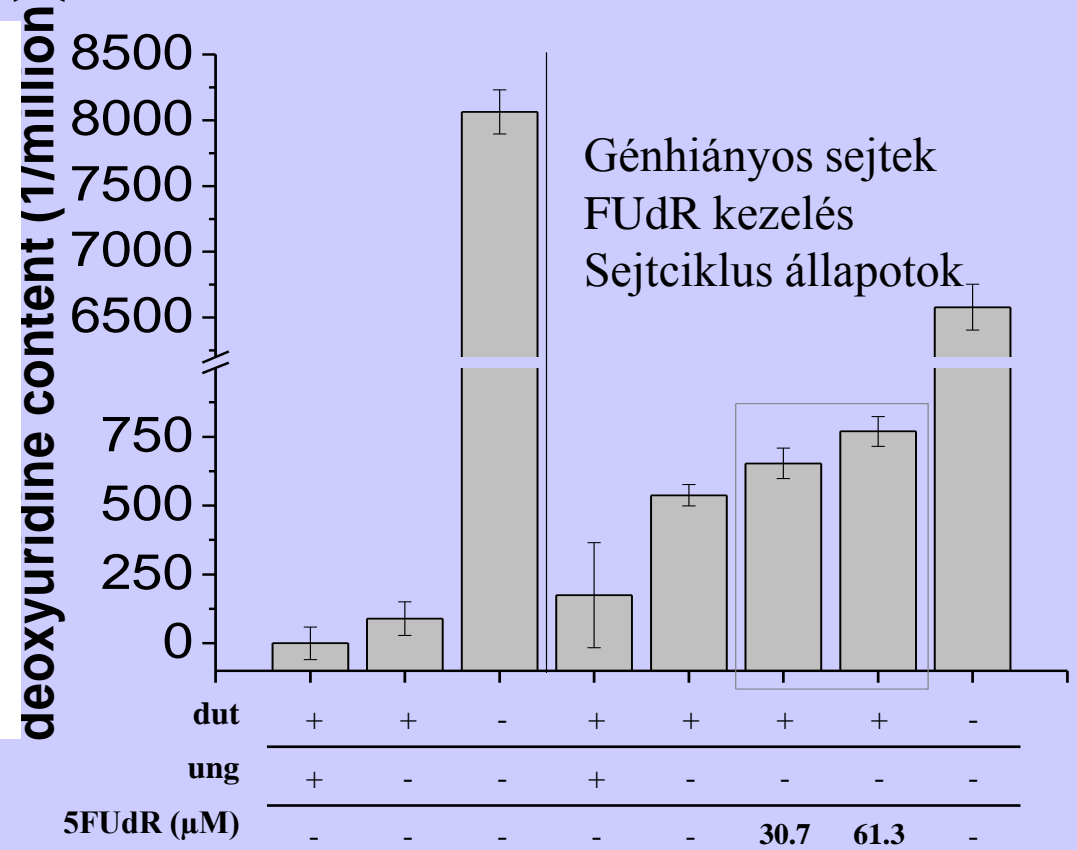
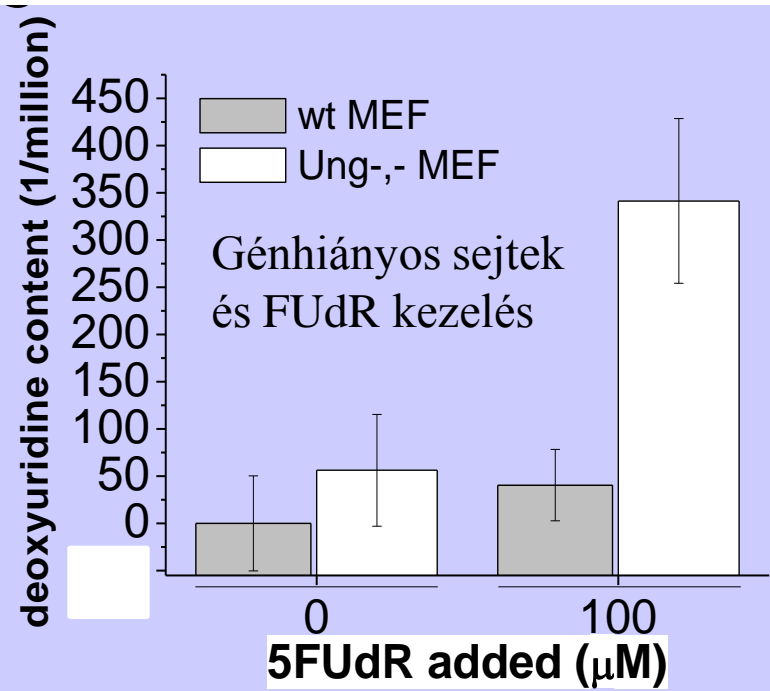


**Horváth and Vértessy, Nucleic Acids Research, 2010
Muha et al PLoS Genetics, 2012**

A DNS-beli uracil tartalom
a kvantitatív PCR módszerrel
az egyes különböző sejtekben
és állapotokban

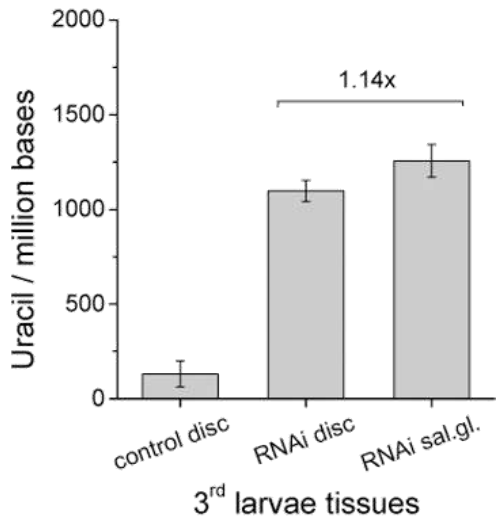
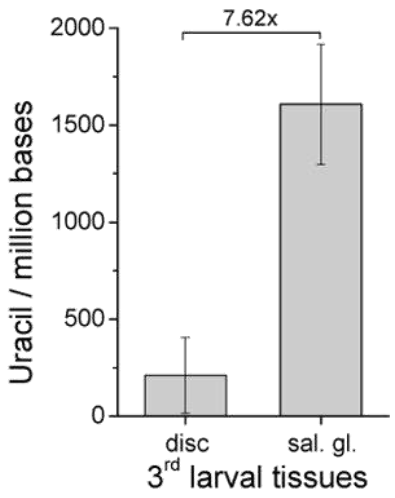
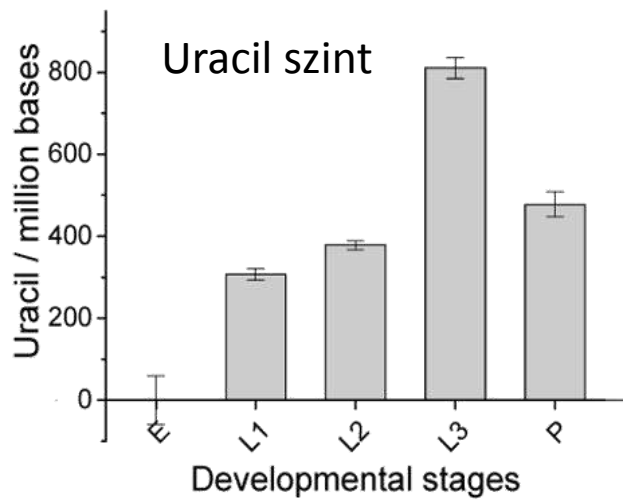
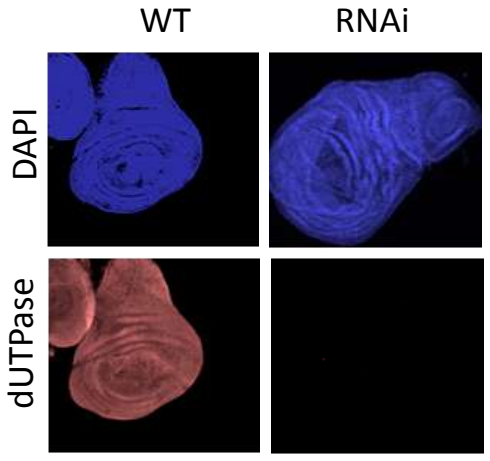
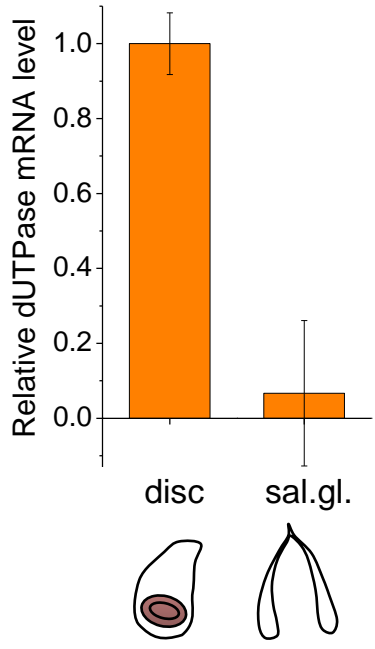
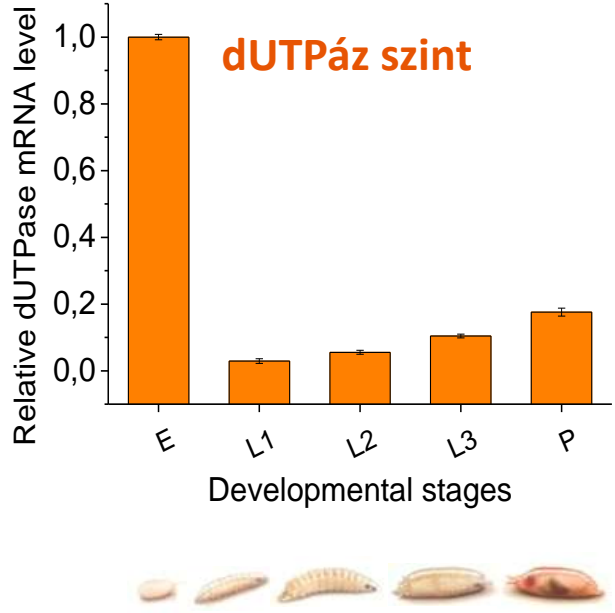
- sejtciklus fázisok,
- gyógyszeres kezelés,
- génkiütések

jól mérhető, „tetszőlegesen”
feltérképezhető



dUTPáz jelenléte negatív korrelációt mutat a DNS-beli uracil szinttel

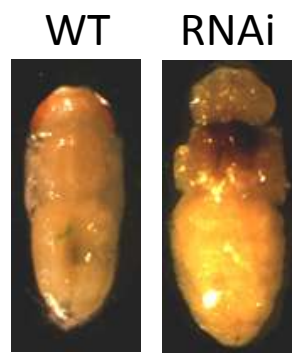
Muha et al. 2012, PLoS Gen.



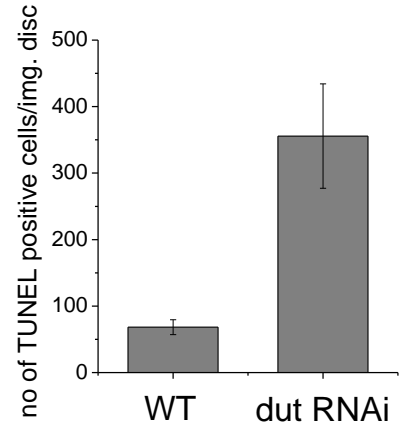
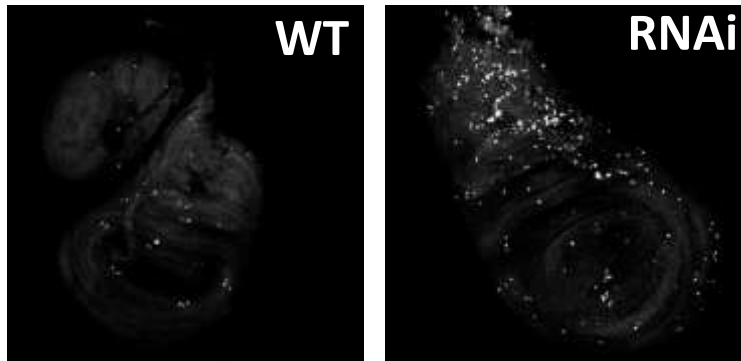
dUTPáz gátlása transzgénikus muslicában letális

Muha et al. 2012, PLoS Gen.

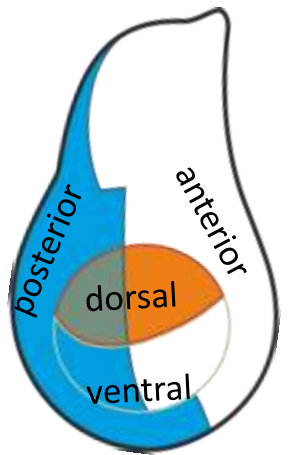
Báb-állapotbeli elhalás



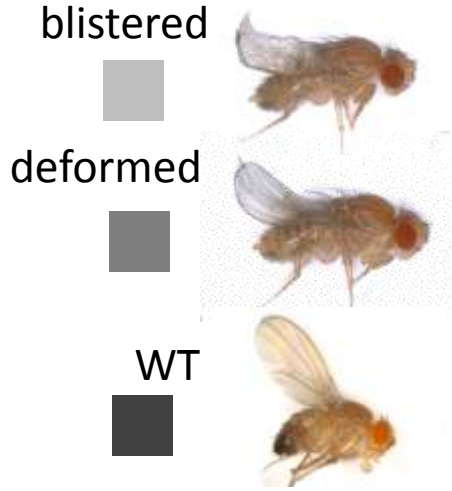
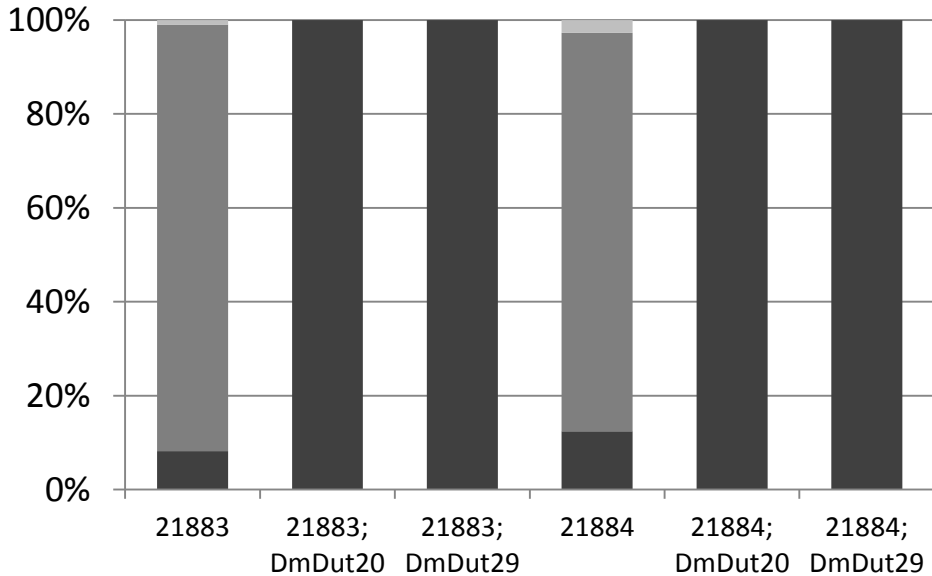
TUNEL assay



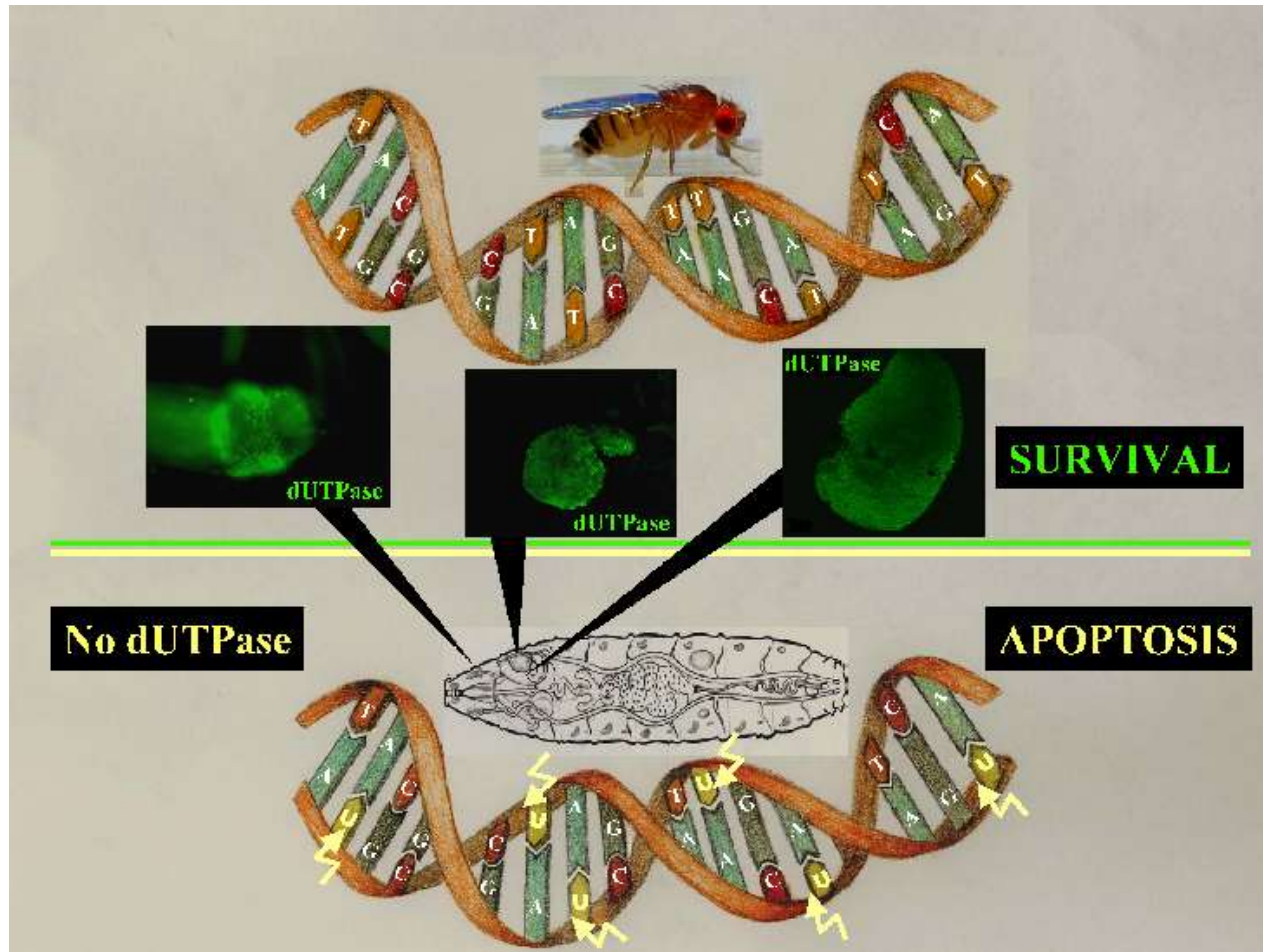
dUTPáz gátlás egyes szöveti régiókra irányítható: ahol gátolva van, pontosan ott elhal a szövet!



MS1096 → siRNA



**Ecetmuslica modellszervezet:
A dUTPáz élet/halál döntést közvetít,
a DNS-beli uracil jelenléte a fejlődési állapottól függ**



A dUTPáz jelenlétében túlélnek, hiányában elhalnak a szövetek

Konklúziók:

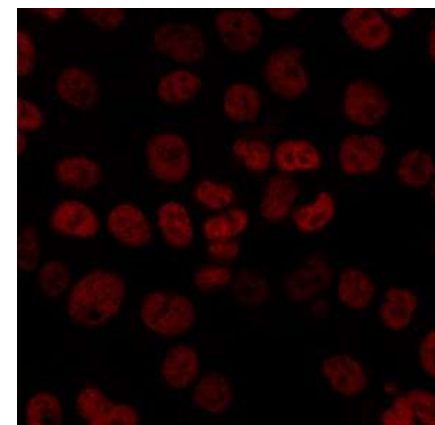
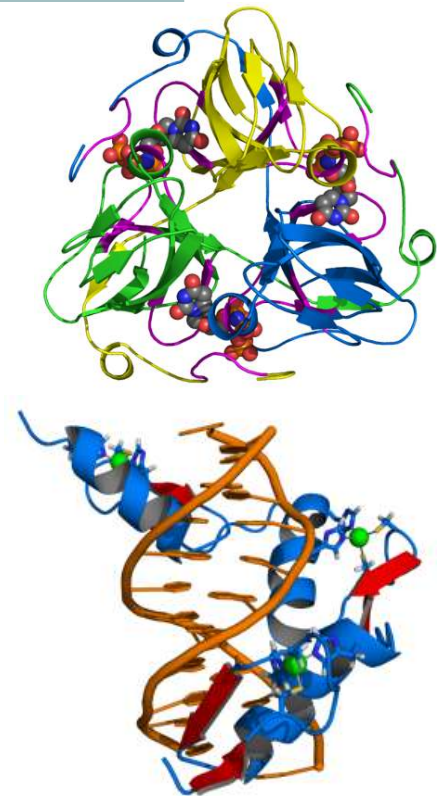
A DNS módosulások karcinogén hatásuk mellett más szerepeket is betöltenek

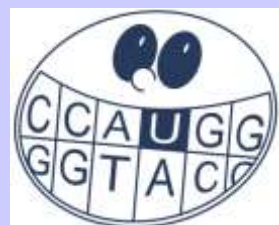
A DNS-beli uracil adekvát példája a kettős szerepnek

A rákterápiában gyakori gyógyszerek hatásmechanizmusát vizsgáljuk többféle nézőpontból

Módszert alkottunk a DNS-beli uracil genom-környezetbeli feltérképezésre

A dUTPáz lényegi voltát igazoltuk, jelenleg a kapcsolódó jelátviteli utakat vizsgáljuk





Genom Metabolizmus Laboratórium



Köszönet:
Hudecz Ferenc
Perczel András
ELTE
Erdélyi Miklós
Szabad János
Henn László
SZBK Genetika



