

A preventív DNS-hibajavítás szerkezeti biológiája

VÉRTESSY G. Beáta^{a,b,*}

^aAlkalmazott Biotechnológiai és Élelmiszertudományi Tanszék, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szt Gellért tér 4, 1111 Budapest, Magyarország

^bMTA Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet, Magyar Tudósok körútja 2, 1117 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

Idén ünnepeljük a Krisztallográfia Nemzetközi Évét. A jubileumi dátum ahhoz a nagyjelentőségű megfigyeléshez kötődik, amit Sir William Henry Bragg és Sir William Lawrence Bragg az 1910-es években tett. Korábban Max von Laue kimutatta, hogy a Wilhelm Conrad Röntgen által felfedezett sugárzás réz-szulfát kristályokon fizikailag a szerkezettel összefüggően értelmezhető diffrakciós képet nyújt, mivel a röntgensugárzás hullámhossza összemérhető a kémiai kötésben lévő atomok közti távolságokkal. W. L. Bragg ezen összefüggés rendkívül elegáns és egyszerű matematikai leírását adta, W. H. Bragg megépítette az első röntgen-fotométert (a mai diffraktométerek/szinkrotronok őst), és ezzel meghatározták a kősó, majd a gyémánt térszerkezetét. Ezen felfedezések jelentőségét szinte azonnal felismerve, 1914-ben Laue, 1915-ben a két Bragg (apa és fia) Nobel-díjban részesült (a fiatalabb Bragg ekkor 25 éves volt!).

A makromolekuláris szerkezetmeghatározás terén ezek után jó negyven évet kellett várni arra, hogy az első fehérjeszerkezetet meghatározzák (mioglobin, John Kendrew, 1958, Nobel díj 1962). Kicsit korábban, 1953-ban került közlésre a hipotézis a DNS térszerkezeti modelljéről (Rosalind Franklin adatai alapján Francis Crick és James Watson tollából). Ma a makromolekuláris térszerkezeteket tároló adatbázis százezernél is több fehérje és komplex szerkezetét tárolja, és havonta hozzávetőlegesen 1000 új szerkezet kerül - szigorú ellenőrzés - után az adattárba (Protein Data Bank). A szerkezetmeghatározások robbanásszerű gyorsulásának több lényegi oka van, ezek között a két legfontosabb: a szerkezetmeghatározási módszerek matematikai és fizikai fejlődése és a vizsgálandó objektumok géntechnológiai előállításának egyre hatékonyabb lehetősége. A legutóbbi Nobel díjat ezen a téren 2012-ben a kis G-fehérjékkel kapcsolt receptorok térszerkezetének feltárásáért adták (Robert Lefkowitz és Brian Kobilka), továbbá a tavalyi kémiai Nobel díj (kvantummechanika és molekuláris dinamika, Karplus-Levitt-Warshel) is szorosan kötődik a röntgenkrisztallográfiához.

Napjainkban a szerkezetek felderítéséből származó tudás felbecsülhetetlen hasznot hoz a biológiai felderítő kutatásokban és a molekuláris mechanizmusok megértésében. A biológiai egyedekben és közösségekben (a mikrobiálistól a gerincesekig) megvalósuló jelátvitel, ingerületátvitel, kommunikáció alapjait is ilyen szerkezetek révén érthetjük meg, és a megértés révén céljainknak megfelelően befolyásolhatjuk. A térszerkezeti információ nélkülözhetetlen a gyógyszertervezésben, a biotechnológiában, a nano-tudományokban és

fejlesztésekben egyaránt. Saját kutatócsoportom a dUTPáz enzimesalád egyes komplexeinek szerkezeti leírásával a genomi integritás folyamatainak megértésén dolgozik. Eredményeink mind rákellenes, mind anti-mikrobiális gyógyszerek tervezésében fontosak.

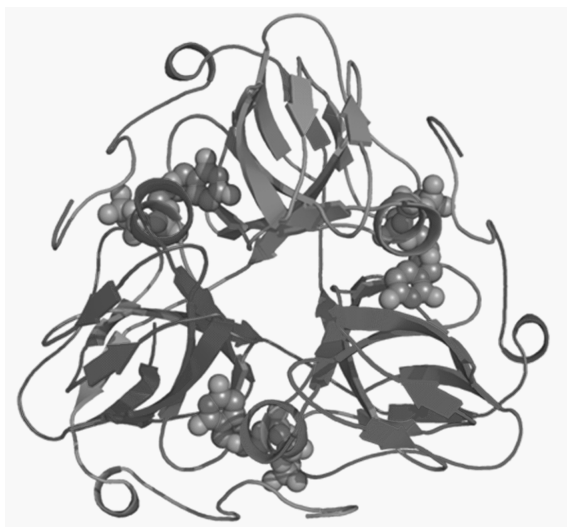
2. A dUTPáz enzimesalád szerepe a genomi integritás fenntartásában

Az élő szervezetek sejtjeiben a genetikai információját tárolásáért a DNS felelős. Egy információtároló eszköztől elvárható lenne, hogy a rábizott adatokat hűen őrizze. Sajnos, a DNS távolról sem felel meg ennek a kívánalomnak, mivel inherens kémiai reaktivitása a sejtbeli körülmények között percnként több olyan reakcióhoz vezet, ahol az információ tárolásáért felelős bázisok átalakulnak, vagy más módon (pl. a dezoxiribóz gyűrű felhasadásával vagy a foszfodiészter lánc felszakadásával) sérül a DNS kovalens szerkezete. Ezen nagyfokú változékonyság korlátok közé szorítását a DNS hibafelismerő és javító mechanizmusok végzik. A DNS-javító útvonalak nem megfelelő működése a genom instabilitásához, és ezen keresztül rákos elváltozásokhoz vezethet.

Az egyik leggyakoribb DNS-beli hiba az uracil megjelenése a DNS-ben. A citozin hidrolitikus dezaminálása során uracil jön létre, ami pontmutációhoz vezet. Az uracil egy másik módon is megjelenhet a DNS-ben: ha a sejtbeli dUTP szint megemelkedik és összemérhetővé válik a dTTP szinttel, akkor a DNS polimeráz adeninnel szemben uracilt is be tud építeni. A DNS-beli uracilt a bázis kivágási javító mechanizmus tudja eltávolítani, ami több lépésne keresztül helyre tudja állítani az eredeti, uracil-mentes és mutációmentes DNS-t.¹ Ha azonban a sejtbeli dUTP/dTTP arány tartósan magas, akkor a DNS-beli uracilok aránya nagyon megnövekedhet, és a javító mechanizmus kapacitása kimerülhet. Ilyen körülmények között a DNS kettősszál töréseket szenvedhet, a kromoszómák fragmentálódása pedig sejtihalálhoz vezethet. A dUTP/dTTP nukleotidszintek helyes fenntartásáért a dUTPáz enzimesalád a felelős felel, amely tehát jelentős szerepet játszik a genom épségének fenntartásában. A dUTPáz enzim a dUTP → dUMP + PP_i reakciót katalizálja, így elbontja a sejtbeli dUTP-t, ezzel megakadályozza az uracil DNS-be való beépülését. A reakció terméke, a dUMP a dTTP szintézis kiinduló anyaga: a timidilát szintáz enzim katalizálja az uracil gyűrű metilezését, így a dTMP keletkezését és a dTMP aztán dTTP-ve foszforilálódik. A dUTPáz tehát egyrészt a dUTP szint csökkentésével, másrészt a dTTP szintézis elősegítésével állítja be a megfelelően alacsony dUTP/dTTP arányt.

* Főszerző. Tel.: +361 3826707, +361 463 1401; fax: +361 ; e-mail: vertessy@mail.bme.hu, vertessy.beata@ttk.mta.hu

A dUTPáz enzim genom integritásában betöltött védőfaktor szerepét a rákos sejtek is „kihasználják”, több esetben megfigyelhető, hogy rákos szövetekben a dUTPáz szintje megemelkedik, és a magas dUTPáz szint a tumorok rossz prognózisával társítható.^{2,3} Ezért nagyjelentőségű a dUTPáz ellenes inhibitorok fejlesztése, amivel a rákos sejtek életképességét csökkenteni lehet.⁴ Ezen túlmenően, a dUTPáz ellenes inhibitorok számos patogén mikroorganizmus (pl a tüdővész és a malária kórokozói) ellen is jelentős új gyógyszerjelölt molekulákat eredményezhetnek.^{1,5-8} Az inhibitorok tervezéséhez a dUTPáz szerkezetét és működési mechanizmusát kell megismernünk. Az 1. Ábra mutatja a dUTPázokra leginkább jellemző homotrimer szerkezetet, amelyet egykristály röntgendiffrakcióval határoztunk meg.^{9,10}



1. Ábra. A homotrimer dUTPáz enzim térszerkezete. Az egyes alegységek szalagmodellje (kék, sárga, zöld) jól mutatja a trimer szoros szerkezetét. A három aktív centrum helyét az odakötött szubsztrát (dUTP analóg) jelzi (atomi színézésű térkitöltő modell, N: kék, O: piros, C: szürke, P: narancs)

Az enzimatis reakciómechanizmus megértéséhez elengedhetetlen az egyes elemi lépések pontos jellemzése. Ehhez a reakcióút előrehaladását röntgenkristallográfiai „pillanatfelvételekkel” sikerült követnünk, melynek során jellemeznünk tudtuk az egyes intermedierek szerkezetét. Az intermedierek inhibitor jelölt molekulák tervezéséhez

nyújtanak fontos információt. Az intermedierek ilyen jellegű azonosítását az teszi lehetővé, hogy az enzimfehérje kristályos fázisában is képes katalizisra, csak jelentősen lelassult módon. A lassított felvétel képeit a kristályosított enzim-szubsztrát komplex különböző időpontokban történő röntgendiffrakciós szerkezeteiből nyertük. Következtéseinket számításonként, QM/MM módszerrel is igazoltuk.¹¹

Köszönetnyilvánítás

Kutatásainkat az OTKA NK84008 és K 109486 pályázatai támogatták.

Hivatkozások

1. Vertessy, B.G.; Toth, J. *Acc Chem Res.* **2009**, *42*, 97-106.
2. Wilson, P.M.; Ladner, R.D.; Lenz, H.J. *Gastrointest Cancer Res.* **2007**, *1*, 237-46.
3. Peters, G.J. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2014**, *33*, 358-74.
4. Saito, K. et al. *Cancer Chemother Pharmacol* **2014**, *73*, 577-83.
5. Szabo, J.E. et al., Highly potent dUTPase inhibition by a bacterial repressor protein reveals a novel mechanism for gene expression control. *Nucleic Acids Res.* **2014**.
6. Peesi, I. et al. *PLoS One* **2012**, *7*, e37461.
7. Horvati, K. et al. *Bioconjug Chem.* **2012**, *23*, 900.
8. Whittingham, J.L. et al. *Structure* **2005**, *13*, 329-38.
9. Peesi, I. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 14437-42.
10. Barabas, O. et al. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 42907-15.
11. Barabas, O. et al. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 10542.

Structural Biology of Preventive DNA repair

The International Year of Crystallography celebrates the 100th year anniversary of the discovery of Bragg's law. Crystallography of macromolecules and their complexes presents a highly useful and quite indispensable method to gain structural and functional information for drug design. Our group works towards understanding the mechanistic details of preventive DNA repair using protein crystallography, in combination with other techniques of structural cell biology. The enzyme family of dUTPases play a crucial role in maintaining genome integrity and these enzymes present a promising novel target for drug design against tumors and infectious pathogens. Our results led to a detailed description of dUTPase mechanism, providing the key information required for inhibitor design.