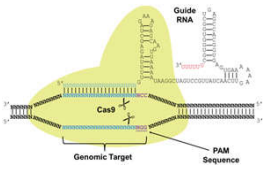
Diszkerin mutációk *in vivo* és *in vitro* jellemzése

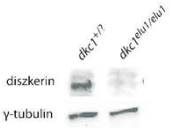
Ferenczy György[1], Schay Gusztáv[2], Varga Máté[3,4]

[1]Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi Kutatóközpont, Gyógyszerkémiai Kutatócsoport
[2]Semmelweis Egyetem, Biofizikai Intézet
[3]Eötvös Loránd Tudományegyetem, Genetikai Tanszék
[4]MTA-SE Lendület Nephrogenetikai Kutatócsoport



CRISPR/Cas9 alapú genomeditálás segítségével, a zebradánió *dkc1* gén 6. exonjában két mutációt hoztunk létre. Az egyik (c.566_567insTCATGGT) eredményeként egy frameshift mutáció korai STOP kodon megjelenését eredményezi, a másik (c.567_568insGTG) pedig egy Val inszerciót eredményez a fehérje egy különösen konzervált doménjében.

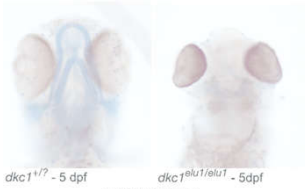
A c.566_567insTCATGGT mutáció révén létrejövő nonszensz allélra homozigóta egyedek (*dkc1*$^{elu1/elu1}$) az egyedfejlődés ötödik napján számos jellegzetes fejlődési rendellenességet mutatnak: (1) kisebb és görbültebb test, (2) kisebb szem,(3) szív-ödéma, (4) deformált belsőfül,(5) lassabban fogyó szikanyag.



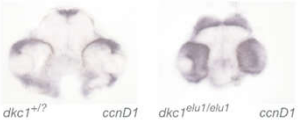
Western-blottal igazoltuk, hogy a *dkc1*$^{elu1/elu1}$ egyedekben nem jön létre funkcionális diszkerin enzim.

Varga Máté

A nullmutáns lárvák kisebb feje számos rendellenességet mutat: például, mint azt a mellékelt Alcián Kék festés is mutatja, a diszkerin hiányában nem jön létre a lárvális állkapcsokat kialakító porc.

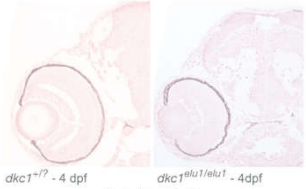


Alcián Kék festés

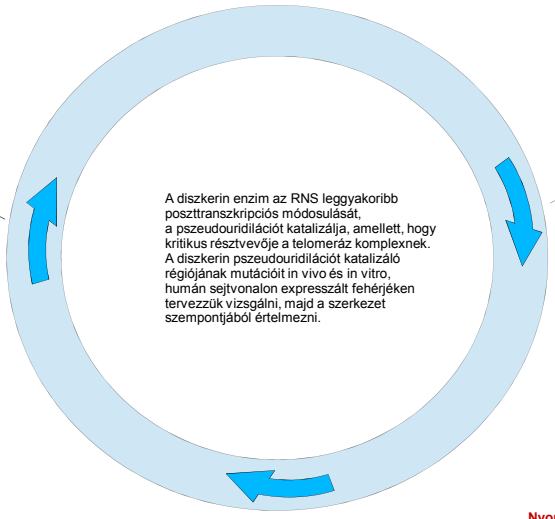


Különösen meglepő eredmény, hogy a *dkc1*$^{elu1/elu1}$ halakban a retina és tectum opticum (TO) területén a sejtek képtelenek kilépni a sejtciklusból és elkezdeni a differenciálódást.

Szövettani vizsgálatok azt mutatják, hogy mind a retina, mind a TO területén megnyúlt, epithelialis jellegű, differenciálatlan progenitor sejtekre emlékeztető sejtek találhatók.

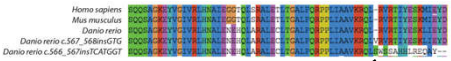


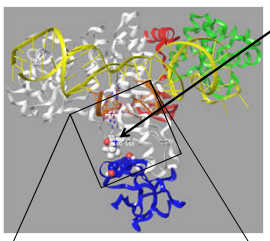
Neutral Red festés



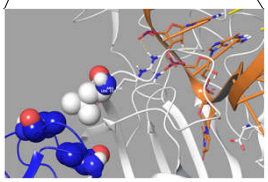
A diszkerin enzim az RNS leggyakoribb poszttranszkripciós módosulását, a pszeudouridilációt katalizálja, amellett, hogy kritikus résztvevője a telomeráz komplexnek. A diszkerin pszeudouridilációt katalizáló régiójának mutációit in vivo és in vitro, humán sejtvonalon expresszált fehérjéken tervezzük vizsgálni, majd a szerkezet szempontjából értelmezni.

zebradánió mutációk





Ferenczy György



A mutáció potenciális hatásai a szerkezet alapján:

a) Befolyásolja a diszkerin-Gar1 kölcsönhatást
Az inzerció melletti aminosav (L153) érintkezik Gar1-gyel

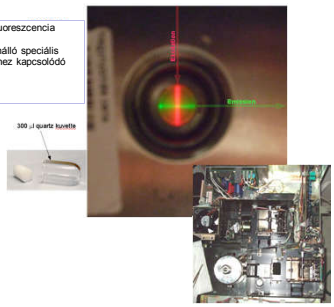
b) Befolyásolja a szubsztrát kötődését
Az inzerció melletti aminosav (R154) sóhidat képez a szubsztrát átalakítandó U10-ehez kapcsolódó G9 foszfát csoportjával

c) Befolyásolja a katalízist
Az inzerció a szekvenciában az aktivációs hurokhoz közeli

Nagynyomású fluoreszcencia spektroszkópia:
7000 atm-ig ellenálló speciális mintatartó és ehhez kapcsolódó spektrométer

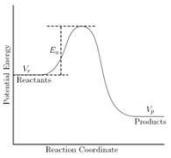
SE Biofizikai Int.

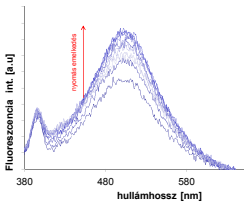
Schay Gusztáv



Nyomás perturbáció

$$dE = V\,dp - S\,dT + \sum_{i=1}^{k} \mu_i\, dN_i$$

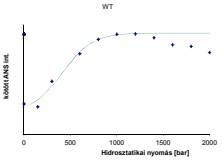


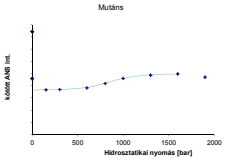


$$I = I_0 + \Delta I \frac{\sqrt{K_0^2 e^{-2\frac{p\Delta V}{RT}} + 16\, C_0 K_0 e^{-\frac{p\Delta V}{RT}}} - K_0 e^{-\frac{p\Delta V}{RT}}}{8\, C_0}$$

K : disszociációs állandó.

A fluoreszcencia mérések adataira a fenti összefüggés illesztésével közvetlenül a disszociációs állandó, és ΔV, az aktivációs térfogat meghatározható.

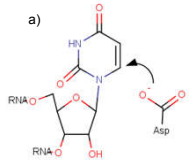




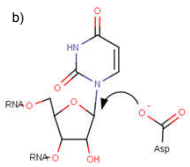
A vizsgált mutáció hatására a fehérje komplex asszociációs erőssége megnövekszik, míg a kölcsönhatási felszín mérete csökkenhet.

Reakció mechanizmus vizsgálata QM/MM számításokkal

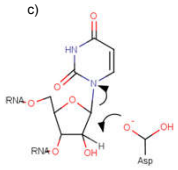
Javasolt mechanizmusok (a, b és c) 1. lépése



Az addíció modell molekuláknál nem játszódik le.
Fehérje-RNS hatása?



S_N2 reakció a szerkezettel nem egyeztethető össze



Magas energiagát modell molekuláknál
Fehérje-RNS hatása?

A kutatás további résztvevői:
Tory Kálmán, Karancsiné Menyhárd Dóra, Kiss Dóra Judit, Balogh Eszter