

A RecQ helikáz doménjeinek szerepe a DNS-szerkezetek átalakításában

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Biokémia tagozat

Martina Máté

II. éves biológus MSc hallgató

Témavezetők: Dr. Kovács Mihály, tudományos főmunkatárs

Harami Gábor, PhD hallgató

Eötvös Lóránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Biológiai intézet

Biokémiai Tanszék



2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3.
1.1. A helikázokról	3.
1.2. A RecQ helikázok és felépítésük	4.
1.3. WH domén	5.
1.4. A HRDC domén	6.
1.5. Az <i>E. coli</i> RecQ helikáz	7.
2. Célkitűzés	8.
3. Anyagok és módszerek	8.
3.1. A RecQ helikáz konstrukciók termeltetése <i>E.coli</i> rendszerben	8.
3.2. A RecQ helikáz konstrukciók tisztítása affinitás kromatográfiával	9.
3.3. ATPáz aktivitás mérése	10.
3.4. Fluoreszcencia mérések	10.
3.5. DNS-szubsztrátok	11.
3.6. Kétszálú DNS-szubsztrát készítése	12.
3.7. Egyszeri futásos szálszétválasztási kinetikai mérések	13.
4. Eredmények és megbeszélésük	13.
4.1. Fehérjék kitermelése, tisztítása	13.
4.2. A RecQ helikázok ATPáz aktivitásának nyomon követése	14.
4.3. A RecQ helikázok transzlokációjának nyomon követése	16.
4.4. ATPáz aktivitás kétszálú DNS jelenlétében	17.
4.5. A szálszétválasztás nyomon követése	19.
4.6. Egyszeri futásos szálszétválasztási kinetikai mérések	24.
4.7. További tervek, kísérletek	27.
5. Összefoglalás	28.
6. Irodalomjegyzék	29.
7. Szerzői hozzájárulás	30.

1. Bevezetés

1.1. A helikázokról

A helikázok olyan fehérjék, melyek kettősszalú DNS- vagy RNS-molekulák széttekerését végzik. Az energiát a folyamat végrehajtásához nukleozid-trifoszfátok (NTP) hidrolíziséből nyerik. Egyaránt szubsztrátjuk a nukleinsav-lánc és az NTP is. A helikázok a kétszalú DNS egyik szálán haladva egyszalú szakaszokat hoznak létre. Haladási sebességük rendkívül széles skálán mozog, néhány nukleotid/másodperctől akár több ezer nukleotid/másodpercig. Meghatározó tulajdonságaik közé tartozik továbbá a processzivitás, a lépéshossz, valamint hogy aktívan vagy passzívan vesznek-e részt a kétszalú DNS széttekerésében. Az aktív helikázok gyorsabbak és dinamikusan választják szét a szálakat, a passzív helikázok pedig a bázispárok hőmozgását használják ki, és a szétnyílt állapotot rögzítik. A processzivitás alatt azt értjük, hogy a DNS-szubsztrát megkötésétől kezdve várhatóan hány katalitikus ciklust hajt végre az enzim a DNS-ről való leválás előtt. A processzívabb enzim több ciklust végez. A lépéshossz pedig kifejezi, hogy egy katalitikus ciklus alatt hány nukleotidegységet halad előre az enzim a DNS-szálon, illetve hány bázist teker szét. Egy adott helikáz a sínként szolgáló DNS-láncon mindig csak egy irányba tud haladni; ez lehet 5'-től a 3'-felé és fordítva is [1,2].

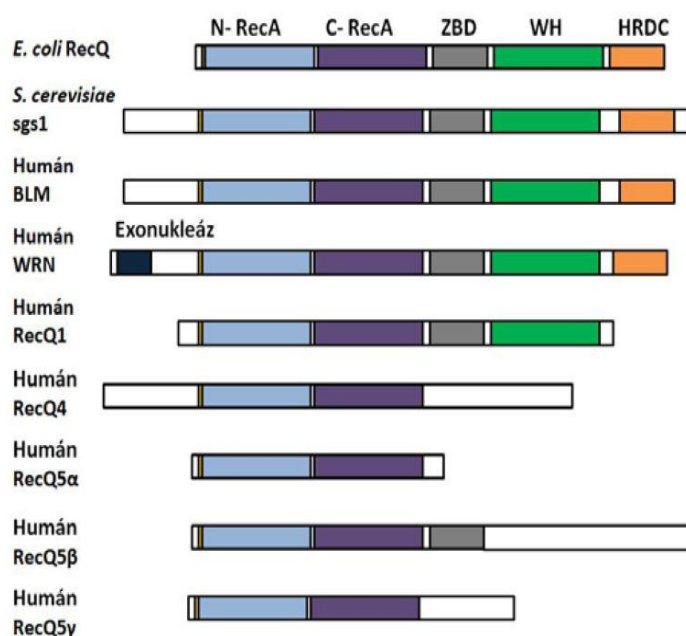
A RecQ helikáz család tagjai minden élő szervezetben megtalálhatók. Működésük elengedhetetlen a genomintegritás fenntartásához, ezért ezeket a fehérjéket a „genom őrangyalainak” is nevezik [3]. A RecQ helikázok a homológ rekombináción alapuló hibajavítás elengedhetetlen szereplői. Ez a folyamat nem csak a DNS kettős száltörése (az egyik leg súlyosabb DNS-hiba) bekövetkezése esetén lép működésbe, hanem az elakadt replikációs villák újraindítása során is. A homológ rekombináción alapuló útvonal esetében a hibajavítás alapjául az épen maradt homológ testvérkromatid szolgál. A hibás kópiából exonukleázok és egyszalú DNS-kötő fehérjék segítségével alakul ki a rekombinázon által feldolgozható szubsztrát. A rekombinázon, a helikázok és a topoizomerázok együtt alakítják ki azt az összetett DNS szerkezetet, amelyben a a DNS-polimeráz kiegészítheti a hiányzó szakaszt. Az így kialakuló Holliday-szerkezet feloldása a mechanizmustól függően szomatikus átkereszteződéshez vezethet. Ez elkerülendő a sejt számára, mivel káros genom-átrendeződéseket okozhat. A RecQ helikázok központi szerepet játszanak az átkereszteződés elkerülését szolgáló rekombináció-szabályozó mechanizmusokban [4,5].

1.2. A RecQ helikázok és felépítésük

A helikázokat hat szupercsaládra osztották fel az evolúció során konzervált motívumaik alapján. A RecQ helikázok a második szupercsaládba (SF2) tartoznak. A RecQ család a nevét az *Escherichia coli* recQ nevű génjéről kapta és egyben a RecQ fehérjéről is, amit 28 évvel ezelőtt fedeztek fel és írtak le helikáz aktivitása illetve a RecF rekombinációs útvonalban betöltött szerepe alapján [6].

A RecQ család minden tagja tartalmazza a hét konzervált motívumot tartalmazó, két tandem RecA-homológ doménből álló helikáz magrégiót, amely az ATPáz aktívhelyet tartalmazza (**1. ábra**) [7]. Az enzim DNS-szerkezetátalakító aktivitásait további járulékos domének határozzák meg. A tagok többségében megtalálható a RecQ C-terminális (RQC) régió és az ún. helikáz és RNázD C-terminális (HRDC) domén is.

Az RQC régiót további két doménre lehet elkülöníteni. Az N-terminális felől egy Zn^{2+} -kötő domén (**1. ábra; szürke szín**) található, ezt pedig a szárnyas hélix domén (winged helix; WH) (**1. ábra; zöld szín**) követi [8]. Az emberi szervezetben öt RecQ izoforma található, melyek konzerváltságuk ellenére különböző élettani folyamatokban vesznek részt és másféle DNS-szerkezetek feldolgozását végzik. A RecA

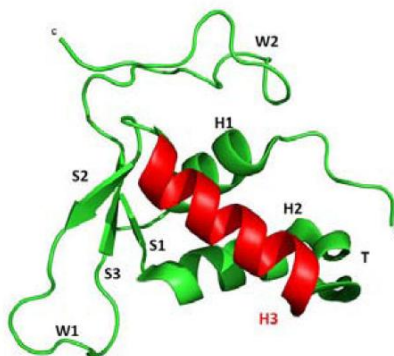


1. ábra: A RecQ helikázok sematikus, nem méretarányos doméntérképe. A humán RecQ5 három splice-formája (α , β , γ) közül fehérjeszinten eddig csak a RecQ5 β -t mutatták ki [12].

domének és a Zn^{2+} -kötő domén szekvenciája erős konzerváltságot mutat, míg a WH és HRDC domének esetében csak szerkezeti hasonlóság figyelhető meg [9,10]. A humán paralógok közül a BLM helikáz mutációja a Bloom-szindrómát, a WRN-é a Werner-szindrómát, míg a RecQL4-é a Rothmund-Thomson szindrómát (RTS) okozza. Mindhárom betegségben közös a genomkarbantartó rendszer meghibásodása, ezért a tünetek között a különböző ráktípusokra való hajlam, immunrendszeri problémák és felgyorsult öregedés jelentkezik [11].

1.3. A WH domén

A WH domént először transzkripció faktorok szekvencia-specifikus kétszálú DNS-kötő szerkezeti elemeként azonosították. A WH domén központi eleme egy hélix-fordulat-hélix szerkezeti motívum. A domén három α -hélixből, három β -szálból és két viszonylag nagyméretű hurokból épül fel. E hurkok megjelenése alapján kapta a „szárnyas” nevet (2. ábra) [12].



2. ábra: A WH domén szerkezete. A hélix-fordulat-hélix (H2-T-H3) motívum ún. felismerő hélice (H3) pirossal került kiemelésre. Az S1-S2-S3 jelölés a β -szálakat, a W1-W2 pedig a hurkokat jelzi [12].

A DNS-felismerő funkciót főként a 2. ábrán pirossal jelzett α -hélixnek (H3) tulajdonítják, amely ezért a felismerő hélix nevet kapta. A WH domén DNS-kötése a felismerő hélix töltéssel rendelkező aminosav-oldalláncai és a DNS-bázisok nagy árok felőli csoportjai közötti kölcsönhatások révén valósul meg. A W2 – és feltehetőleg a W1 – szárny további DNS-kötő felületet alkot azáltal, hogy képes a kis árokhoz illeszkedve kötéseket létesíteni a DNS cukorfoszfát-gerincével. A konzervált felépítésű WH domén számos funkció ellátására adaptálódott az evolúció során. Transzkripció faktorokban szekvencia-specifikus DNS- felismerő kulcsként szerepel. A domén nukleinsav-kötő funkciója mellett kimutatták, hogy szerepet játszik intra- és intermolekuláris fehérje-fehérje kölcsönhatásokban is. Számos transzkripció faktor e domén segítségével tud dimerizálódni. Továbbá egészen egyedi kölcsönhatások is megfigyelhetők a humán ADAR1 fehérje esetében, amely specifikusan kötődik a balmenetes Z-DNS-hez. Ezek a példák alátámasztják, hogy a WH domén szerkezete a funkcionális adaptációnak a szekvencia- illetve konformáció-specifikus DNS-kötéstől a fehérje-fehérje kölcsönhatásokig terjedő széles spektrumát tette lehetővé [12].

A WH domént RecQ helikázokban is azonosították. A domén térszerkezete nagymértékben konzervált a RecQ családon belül, jóllehet aminosav-szekvenciája alacsony

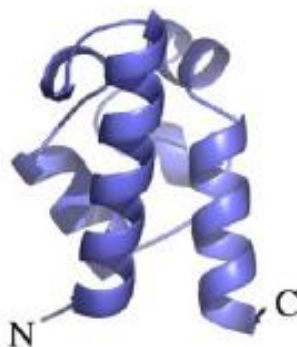
konzerváltságot mutat. Az utóbbi évek eredményei alapján elmondható, hogy a RecQ helikázokban megtalálható WH domén fontos funkciót lát el a fehérjék DNS-szerkezetátalakító működése során, sőt a RecQ1 és WRN esetében az adaptáció egy szélsőséges példáját is mutatja: a W1 szárny DNS-szálszétválasztó „tolólapátként” funkcionál [12]. A RecQ1 és WRN fehérjékben a W1-szárnny csúcsán aromás aminosav található, mely a kétszálú DNS terminális bázispárjához benyúlva kifordítja az egyik szál terminális bázisát. Az *E. coli* RecQ fehérje kristályszerkezetében a WRN és RecQ1 W1 szárnyához képest jóval rövidebb szárny figyelhető meg, és ezzel összhangban a W1 szárny nem bizonyult elengedhetetlennek a szálszétválasztó aktivitáshoz [13]. Laborunk korábbi munkája nyomán az is kiderült, hogy a humán BLM helikáz esetében a teljes WH domén hiányában is történik szálszétválasztás [14]. Azonban érdekes módon a WH domént nem tartalmazó humán RecQ helikáz izoformák (RecQ4, RecQ5) csökkent DNS-szálszétválasztó aktivitást mutatnak [15]. A WH domének szerkezetében és DNS-szálszétválasztásban betöltött funkciójában mutatkozó különbségek részben magyarázhatják a RecQ család tagjainak eltérő biológiai specificitásait. A WH domén továbbá egyes RecQ helikázokban fehérje-fehérje kölcsönhatásokban is részt vesz [9,12,14].

1.4. A HRDC domén

Az *E. coli* RecQ, valamint humán BLM és WRN helikázok a fent említett doménekhez képest C-terminálisan elhelyezkedő HRDC domént is tartalmaznak (**1. ábra**). Egyik helikáz magrégióját sem sikerült a HRDC doménnel együtt kikristályosítani, vélhetőleg azért, mert a HRDC domén flexibilisen kapcsolódik az enzim többi régiójához.

Az izolált HRDC domént azonban már sikerrel kristályosították, így a térszerkezetéről pontos ismeretekkel rendelkezünk. E szerkezet öt α -hélixet tartalmaz (**3. ábra**). Az *S. cerevisiae* Sgs1 és az *E. coli* RecQ helikázok HRDC doménjéről kimutatták, hogy preferáltan köti az egyszálú DNS-t [16]. A WRN helikáz HRDC doménje a bonyolultabb DNS-szerkezetek felismerésében és a DNS-szerkezetátalakító enzimaktivitás koordinálásában is szerepet játszik [16]. Feltételezések szerint a HRDC domén flexibilis kapcsolódásának köszönhetően az enzim előtt vagy mögött is segédkezhethet a DNS-szálak rögzítésében és rendezésében. Növelheti a szálszétválasztó aktivitás processzivitását, részt vehet fehérje-fehérje kölcsönhatásokban és toborozhatja az enzimet az átalakítandó DNS-szerkezetekhez

[16,17]. A HRDC domén pontos funkciója sok esetben még felderítetlen, így ez a domén jelenleg is a figyelem középpontjában áll.



3. ábra a HRDC domén térszerkezeti ábrája [16]

1.5. Az *E. coli* RecQ helikáz

Az *E. coli* RecQ helikáz két RecA-típusú motordomént, egy Zn^{2+} -kötő domént, egy WH domént és egy HRDC domént tartalmaz (1. ábra). A teljes fehérjét sajnos még nem sikerült kikristályosítani. Viszont a HRDC domént, illetve a helikázmagot a RQC (Zn^{2+} -kötő + WH) doménnel együtt önállóan kristályosították (PDB kódok: 1WUD illetve 1OYW). Az enzim feltehetőleg monomer formában működik [18,19].

A RecQ helikáz *in vitro* aktivitásai közé tartozik a DNS- és Mg^{2+} -függő ATPáz aktivitás. Az enzim a nukleozid-trifoszfátok közül csak az ATP-t képes hasznosítani a kétszálú DNS szálainak szétválasztására. A RecQ nagy affinitással, random helyen kötődik az egyszálú DNS-szubsztrátokhoz, de preferáltan köt az elágazó és 3'-túlnyúlást tartalmazó többszálú DNS-régiókhoz. A helikáz 12-15 nukleotidegységnyi szakaszt fed le a DNS-molekulán [14,20].

A RecQ egyszálú DNS-en 3'-5' irányban transzlokál, ami meghatározza a kétszálú DNS szálszétválasztásának irányát is. Az irányultságot annak a DNS szálnak a polaritása alapján határozzák meg, amelyen az enzim szálszétválasztás közben halad. Nagy koncentrációban az enzim a tompavégű kétszálú DNS szétválasztására is képes. A szétválasztó aktivitás függ az ATP-koncentrációtól és a Mg^{2+} /ATP koncentrációaránytól.

Megfigyelték, hogy az *E. coli*-ban található RecQ helikáz részt vesz a DNS-hibajavító RecF rekombinációs útvonalban. Ez az útvonal akkor aktiválódik, ha külső illetve belső

tényezők hatása miatt a DNS károsodik. A károsodott DNS szakaszok akadályozzák a replikációs villa haladását ezzel gátolva genom tökéletes replikációját [21].

2. Célkitűzés

Kutatásaim célja, hogy betekintést nyerjek a helikáz enzimek működési mechanizmusába, amely meghatározza a genomkarbantartó folyamatok kimenetelét. Vizsgálataimmal szeretném azonosítani a WH és HRDC doméneknek a RecQ helikázokban betöltött funkcióját. Vizsgálataimhoz az *E. coli* RecQ helikázt választottam, mely a RecQ család modellenzimeként ismert. (A 609 aminosavból álló vad típusú *E. coli* RecQ helikázt továbbiakban RecQ^{vt} jelöléssel említem.) A domének szerepének tisztázására két rövidített enzimvariánst is előállítottunk: a RecQ⁵²³ mutáns nem tartalmazza a HRDC domént (az 523. aminosav után a fehérjelánc véget ér), míg a RecQ⁴¹⁴ mutáns a HRDC-n kívül a WH domént sem tartalmazza (a 414. aminosav után a fehérjelánc véget ér). Munkám során az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- Befolyásolják-e a WH és a HRDC domének a helikáz ATPáz aktivitását?
- Befolyásolják-e a WH és a HRDC domének a helikáz egyszálú DNS-en történő transzlokációját?
- Mi a szerepe a WH és a HRDC doméneknek a kétszálú DNS-szálainak enzimatisztázásában?
- Módosítják-e a WH és a HRDC domének a RecQ enzim DNS-affinitását?

3. Anyagok és módszerek

3.1. RecQ helikáz konstrukciók termeltetése *E.coli* rendszerben

A vad típusú és mutáns RecQ konstrukciókat kódoló DNS-szakaszok klónozását korábban elvégezték laboratóriumunkban. A mutáns fehérjék előállításához csak a megfelelő hosszúságú DNS-szakaszt szaporították fel a vad típusú génből. A RecQ-kódoló régiót pTXB3 plazmidba illesztették, amely klónozó helye után tartalmazza az *Mycobacterium xenopi* GyrA intein fehérje és *Bacillus circulans* kitináz fehérjéjének kitinkötő domén kódoló szekvenciáit. Ezáltal a sejtben RecQ–intein–kitinkötő domén fúziós fehérje fejeződik ki. Az egyes RecQ konstrukciókat kódoló plazmidokat *E. coli* BL21 kompetens sejtekbe

transzformáltam, majd a sejteket 12 liter LB táptalajban, 150 µg/ml ampicillin antibiotikum hozzáadásával 37°C-on $OD_{600} = 0,3$ -ig növesztettem. Ekkor 18°C-ra hűtve és 0,2 mM végkoncentrációban adott IPTG-vel (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid) indukálva 16 órán át expresszáltattam.

3.2. RecQ helikáz konstrukciók tisztítása affinitás-kromatográfiával

A kezdeti tisztítási lépések megegyeztek mindhárom fehérjénél. A tisztítási lépések 4°C-on történtek. A sejteket centrifugálással (Beckman JLA-9.100 rotor, 4000 rpm, 10 perc) összegyűjtöttem, majd újraszuszpendáltam CH pufferben (50 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 (v/v)% Triton X-100, pH = 8). A sejteket ezután szonikátor segítségével feltártam. Az oldatban található sejtörmelékét centrifugálással (Beckman JA-20 rotor, 18000 rpm, 30 perc) távolítottam el. A felülúszót előzőleg CH pufferrel egyensúlyba hozott kitin oszlopon tisztítottam. A RecQ C-terminálisához fuzionált kitinkötő domén nagy affinitással kötődik a kitinhez. Az oldat felvitele után az oszlopot tovább mostam a nem specifikusan kötődött fehérjék eltávolítása érdekében, majd feltöltöttem 50 mM ditiotreitrolt (DTT) tartalmazó oldattal és állni hagytam éjszakára. A redukálószer hatására az intein domén lehasad a RecQ C-terminálisáról, és így a RecQ az oldatba kerül. A RecQ ezután CH pufferrel lemosható az oszloptöltetről. Az eluált fehérjét Bradford reagenssel mutattam ki. A további tisztítási lépések eltérőek voltak a vad típus és a rövidebb mutáns fehérjék esetében.

A vad típusú RecQ fehérje további tisztítása során a fehérjét tartalmazó frakciókat összegyűjtöttem, majd két és félszeresére hígítottam 50 mM Tris-HCl (pH = 7,5) puffer használatával. Az oldatot előzőleg HP + 200 mM NaCl pufferrel (50 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7,5) egyensúlyba hozott heparin oszlopra vittem fel. A heparin polimer, szerkezetében hasonlít a DNS cukorfoszfát-gerincéhez, így a legtöbb DNS-kötő fehérje kötődik hozzá. A fehérjét 50 perces (1 ml/perc), lineáris, 200 mM → 1 M NaCl + HP puffer grádienssel eluáltam az oszlopról ÄKTA rendszer segítségével. A fehérjét tartalmazó frakciókat összegyűjtöttem és tárolópuffer (50 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 200 mM NaCl 1 mM DTT, 10 (v/v)% glicerol pH=7,5) ellenében dializáltam.

A RecQ⁵²³ és RecQ⁴¹⁴ fehérjék további tisztítása során a fehérjét tartalmazó frakciókat összegyűjtöttem, és MonoQ puffer (50 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 (v/v)% glicerol pH=7,5) ellenében dializáltam 2*2 óráig. Az oldatot ezután MonoQ pufferrel egyensúlyba hozott MonoQ anioncsere oszlopon tisztítottam tovább FPLC rendszer

segítségével. A fehérjét 50 perces (1 ml/perc) lineáris sógrádiens (0 mM $\rightarrow$ 1 M NaCl + MonoQ puffer) segítségével eluáltam. A fehérjéket tárolópufferbe dializáltam.

A fehérjék tisztaságát és az egyes lépések hatékonyságát SDS-PAGE eljárással ellenőriztem. A fehérjék koncentrációjának mérését Bradford módszere szerint végeztem. Hosszú távon a fehérjéket folyékony nitrogénben gyorsfagyasztva tároltam.

3.3. ATPáz aktivitás mérése

A steady-state ATPáz aktivitás-mérések Shimadzu UV-2101PC készüléken történtek. A kísérletek az ATP/NADH kapcsolt reakcióelven alapulnak. Az ATP-hidrolízis során keletkező ADP-t a piruvát-kináz (PK) enzim foszforilálja ATP-vé, foszfoenolpiroszőlősav (PEP) piroszőlősavvá alakítása közben. A keletkező piroszőlősavat a tejsav-dehidrogenáz (LDH) enzim redukálja tejsavvá NADH oxidációhoz kapcsoltn. A NADH-nak 340 nm-es hullámhosszon elnyelési maximuma van ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), viszont a NAD^+ -nak nincs. Így 340 nm-en detektálva a fényelnyelés változását, a kapott egyenesek meredekségéből az ATPáz aktivitás meghatározható.

A méréseket ATPáz pufferben (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl_2 , 2 mM β -merkaptóetanol, 50 mg/ml BSA) végeztük, 25°C-on. A reakcióoldat (1 mM ATP, 14 U/ml és 20 U/ml LDH mix, 1 mM PEP, 200 μM NADH, enzim, DNS) kiindulási térfogata 1 ml volt.

3.5. DNS-szubsztrátok

Az oligonukleotidokat a Sigma Aldrich-tól rendeltük.

Kódjel	Szekvencia
DL1	5'-GAC GCT GCC GAA TTC TAC CAG TGC CTT GCT AGG ACA TCT TTG CCC ACC TGC AGG TTC ACC C-3'
DL2	5'-GGG TGA ACC TGC AGG TGG GCG GCT GCT CAT CGT AGG TTA GTT GGT AGA ATT CGG CAG CGT C-3'
DL4	5'- Cy3 -TAA GAG CAA GAT GTT CTA TAA AAG ATG TCC TAG CAA GGC AC-3'
DL5	5'-TAT AGA ACA TCT TGC TCT TA-3'
DNA_1	5'- FLU -TCC TTT TGA TAA GAG GTC ATT TTT GCG GAT GGC TTA GAG CTT AAT TGC GCA ACG-3'
DNA_4	5'-TCC TTT TGA TAA GAG GTC ATT TTT GCG GAT GGC TTA GAG CTT AAT TGC GCA ACG-3'
DNA_5	5'-CGT TGC GCA ATT AAG CTC TAA GCC ATC CGC AAA AAT GAC CTC TTA TCA AAA GGA-3'
DNA_6	5'-CGT TGC GCA ATT AAG CTC TAA GCC ATC CGC AAA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'
X4J_1	5'-GAC GCT GCC GAA TTC TGG CTT GCT AGG ACA TCT TTG CCC ACG TTG ACC CG-3'
X4J_2	5'-CGG GTC AAC GTG GGC AAA GAT GTC CTA GCA ATG TAA TCG TCT ATG ACG TC-3'
X4J_3	5'-GAC GTC ATA GAC GAT TAC ATT GCT AGG ACA TGC TGT CTA GAG ACT ATC GC-3'
X4J_4	5'-GCG ATA GTC TCT AGA CAG CAT GTC CTA GCA AGC CAG AAT TCG GCA GCG TC-3'

1. táblázat: A kísérletek során használt DNS oligonukleotidok elnevezése és szekvenciája

A későbbiekben használt kétszálú régióval rendelkező szubsztrátok rövidítése az azokat alkotó két szál nevéből alakul ki (**4. ábra**).

Villás elágazás (splayed arm, DNA₁₆): A DNA₁ és a DNA₆ kombinációja, tehát DNA₁₆. 33 bázispár kétszálú és 21 bázisnyi egyszálú DNS-szakaszokat tartalmazó villás elágazás.

Tompavégű (blunt-ended, DNA₄₅): A DNA₄ és a DNA₅ kombinációja, tehát 54 bázispár hosszúságú kétszálú szubsztrát.

Jelölt tompa végű (blunt-ended*, DNA₁₅*): A DNA₁ és a DNA₅ kombinációja fuoreszcein jellel ellátva.

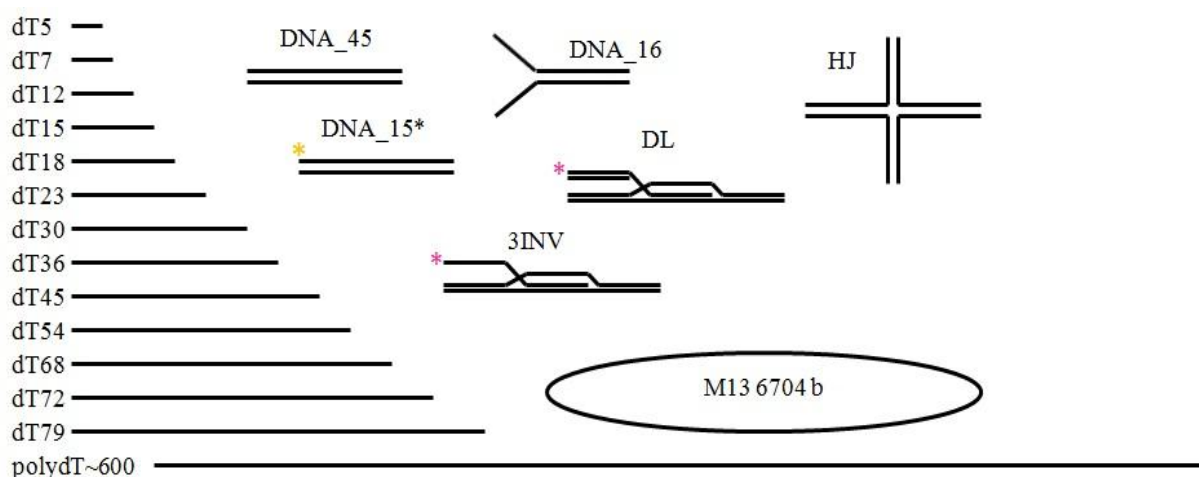
D-hurok (D-loop, DL): A DL1 + DL2 + DL4 + DL5 kombinációja, amely D-hurok DNS-szerkezetet alkot.

3INV: A DL1 + DL2 + DL4 kombinációja kismértékben módosított D-hurok DNS szerkezetet alkot, amely – a DL-szubsztráttal ellentétben – egyszálú túlnyúlást tartalmaz.

Holliday-kereszt (*Holliday junction*, HJ): A X4J_1 + X4J_2 + X4J_3 + X4J_4 kombinációja négy, egyenként 25 bázispár hosszú kétszálú DNS-kart tartalmaz.

dTn: oligo-dezoxi-timidilát: a rövidítést követő szám jelzi az oligonukleotid hosszát nukleotidegységekben kifejezve (dT5, dT7, dT12, dT15, dT18, dT23, dT30, dT36, dT45, dT54, dT68, dT72, dT79, polydT ~ 600)

M13: Cirkuláris egyszálú fág DNS, amely 6704 nukleotidegység hosszú (előállítását korábban laborunkban elvégezték).



4. ábra: A felhasznált DNS-szubsztrátok nem méretarányos sematikus rajzai.

Az Eredmények és megbeszélésük fejezetben, ha nem tüntetem fel másképp, akkor a DNS-koncentrációk az oligonukleotid-mennyiségre vannak vonatkoztatva.

3.6. Kétszálú DNS-szubsztrát készítése

A megfelelő DNS-oligonukleotidok 400 μ M-os törzsoldatából 50-50 μ l-t mértem 200 μ l DNS pufferbe (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH = 7,5). Az oldatot ez után forrásban lévő vízfürdőbe helyeztem és hagytam, hogy a víz szobahőmérsékletűre visszahűljön. Ezután az oldatot DNS pufferrel 1 ml-re hígítottam. A DNS-frakciókat MonoQ anioncsere oszlopon választottam el. A gradienshez puffer A-t (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl pH = 7,5) és puffer B-t (10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl pH = 7,5) használtam. A gradiens 35 % B-től indult és 20 perc alatt érte el a 75 %-ot, majd újabb 20 perc alatt a 100 %-ot. Az oszlop átfolyó fényelnyelését folyamatosan detektáltam, jelöletlen DNS esetében 260 nm-es hullámhosszon,

jelölt esetén 494 nm-es (a fluoreszcein elnyelési maximumán mért) hullámhosszon is. A DNS-t tartalmazó csúcsok frakcióit natív akrilamid gélen futtatva ellenőriztem azok tisztaságát. A gélből kimutatás jelöletlen DNS esetében GelGreen festékkel történt, jelölt DNS esetén pedig Typhoon Trio gélscennerrel a fluoreszcein fluoreszcencia-emissziója alapján. A DNS-t Amicon Ultra 3000 Da molekulásúly alatt átengedő töményítő oszlop segítségével sómentesítettem. A kétszálú DNS koncentrációjának meghatározása 260 nm-es hullámhosszon való elnyelés alapján történt. A mintákat -20°C-on tároltam.

3.7. Szálszétválasztási kinetikai mérések

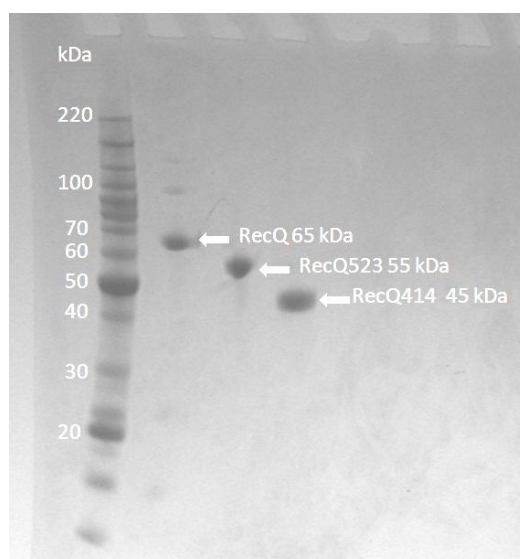
A jégen összekevert, 10 µl térfogatú reakcióelegyek 2 mM ATP-t, 2,4 mM MgCl₂-ot és az Eredmények részben ismertetett koncentrációjú DNS-szubsztrátot tartalmaztak H pufferben (30 mM Tris-HCl pH = 7.5, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 10 µg/ml BSA, 20 mM kreatin-foszfát, 20 µg/ml kreatin-kináz). A reakciót az enzim hozzáadásával indítottam és 37°C-on inkubáltam az aktuális méréshez megfelelő ideig. A reakciót kezelőfestékkel (10 mM Tris-HCl pH = 7.5, 60 mM EDTA, 60 % glicerín, 0.075 % Orange G, 0.83 % SDS) állítottam le. Ezután TBE pufferben (89 mM Tris-HCl pH = 7.5, 89 mM bórsav, 20 mM EDTA) 12 % akrilamid gélen futattam, 100 V feszültség mellett 4°C-on. A fluoreszcens DNS-szubsztrátokat Typhoon Trio gélscennerrel jelenítettem meg. Az egyes csíkokban lévő DNS relatív mennyiségét a gélképekből denzitometria segítségével határoztam meg.

Az egyszeri futásos kísérletek esetében a DNS-szubsztrátokat megadott mennyiségű helikázzal előinkubáltam. A reakciót 2 mM ATP és 3 µM jelöletlen csapda DNS-szál egyidejű hozzáadásával indítottam. A reakcióelegyből megadott időközönként 10 µl-t vettem ki, és a reakciót kezelőfestékkel állítottam le (3 µl minden mintához). A további lépések a fentebb említettek szerint történtek.

4. Eredmények és megbeszélésük

4.1. Fehérjék termelése, tisztítása

Mindhárom fehérjét sikerült 90% feletti tisztaságban előállítani (**5. ábra**). Aktivitásukat az alábbi kísérletek igazolják.



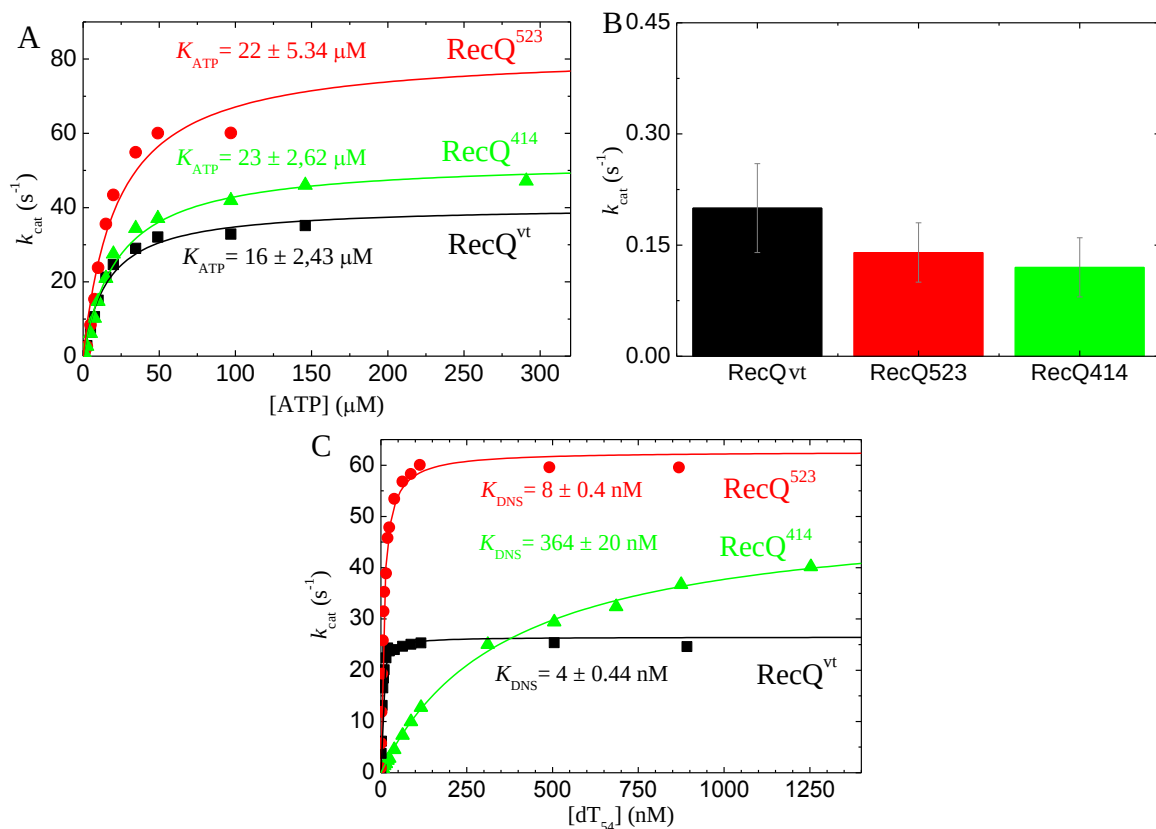
5. ábra: SDS-PAGE gélkép

(1. oszlop: Létra BenchMark-10742-012, 2. oszlop: RecQ vad típus, 3. oszlop: RecQ⁵²³, 4. oszlop: RecQ⁴¹⁴)

4.2. A RecQ helikázok ATPáz aktivitásának nyomon követése

Meghatároztam az ATPáz aktivitás ATP koncentráció függését. A mérés az Anyagok és módszerek fejezetben leírt ATP/NADH módszerrel történt. A RecQ^{vt} és a RecQ⁵²³ esetében 0,2 μM dT54, a gyengébb DNS-affinitást mutató (lásd alább) RecQ⁴¹⁴ esetében pedig 3 μM dT54 volt a szubsztrát. Mindhárom esetben 10 nM volt az enzim koncentrációja. A reakciót fotométerben követtem nyomon, és minden egyes titrálási pontnál kapott egyenes meredekségéből a Lambert-Beer törvény segítségével meghatároztam az ATPáz aktivitást. ATPáz aktivitás (k_{cat}): Aktivitás (s^{-1}) = meredekség (s^{-1}) / ($I_{\text{küivetta}} * \epsilon_{\text{NADH } 340\text{nm}} * [\text{RecQ}]$). A mérés során emelkedő koncentrációjú ATP-vel titráltam a mintát. Az ATPáz aktivitást ábrázoltam az emelkedő ATP-koncentráció függvényében. A kapott pontokra hiperbolát illesztettem a Michealis-Menten modellnek megfelelően (ATPáz

aktivitás= $k_{cat} \cdot [ATP] / K_{ATP} + [ATP]$). A vad típusú RecQ fehérje a laborunkban korábban végzett, publikált mérésekben kapottal megegyező ATPáz aktivitást mutatott [20], a RecQ⁵²³ és RecQ⁴¹⁴ esetében magasabb aktivitást kaptam. Az illesztésből kapott K_{ATP} értékek közel azonosnak adódtak. Az eredmények alapján a domének hiánya nem befolyásolja az enzimek ATP-affinitását (**6A ábra**).



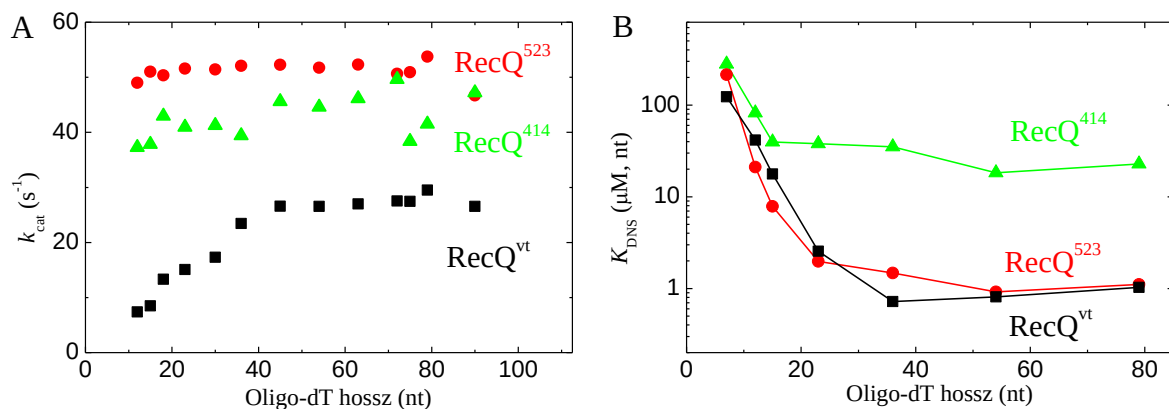
6. ábra A: DNS-aktivált ATPáz aktivitás az [ATP] függvényében ([enzim] = 10 nM minden esetben; [dT54] = 0,2 μM (RecQ^{vt} és RecQ⁵²³ esetében) illetve 3 μM (RecQ⁴¹⁴ esetében)). **B:** A három fehérje-konstrukció bazális (DNS-mentes) ATPáz aktivitása ([enzim] = 10 nM). **C:** DNA-aktivált ATPáz aktivitás a [dT54] függvényében ([enzim] = 10 nM, [ATP] = 1 mM).

A következő mérések során 10 nM enzimet és 1 mM ATP-t tettem a reakcióelegybe. A mérés során emelkedő koncentrációjú dT54-gyel titráltam a mintát és az ATPáz aktivitást ábrázoltam emelkedő dT54 koncentráció függvényében (**6C ábra**). DNS távollétében mindhárom konstrukció alacsony ATPáz aktivitást mutatott (**6B ábra**), míg a DNS jelenléte az ATPáz aktivitást közel százszorosára emelte. A kapott pontokra hiperbolát illesztettem. A DNS-aktivált k_{cat} értékek $k_{cat} = 25 s^{-1}$ -nak (RecQ^{vt}), $63 s^{-1}$ -nak (RecQ⁵²³) illetve $48 s^{-1}$ -nak (RecQ⁴¹⁴) adódtak (**6A és C ábra**). Az illesztésekből kapott K_{DNS} érték (a DNS-re

vonatkoztatott Michaelis konstans), ami a RecQ⁴¹⁴ esetében látványosan növekedett (364 μ M-ra, míg a RecQ^{vt} esetében 4 μ M-nak, a RecQ⁵²³ esetében 8 μ M-nak adódott) (**6C ábra**). Ebből arra lehet következtetni, hogy a RecQ⁴¹⁴ esetében a WH és a HRDC domének együttes hiánya csökkenti a DNS iránti affinitását. Az előző méréssel összhangban a mutánsok gyorsabban hidrolizálják az ATP, mint a vad típus. Feltételezésem szerint a mozgékony HRDC-t vesztett enzim gyorsabban halad a DNS szálon és feltehetőleg processzívebb is. A HRDC nagyfokú mozgékonyasága lehetséges, hogy bizonyos esetekben akadályozza az enzim tovább haladását.

4.3. A RecQ helikázok transzlokációjának nyomon követése

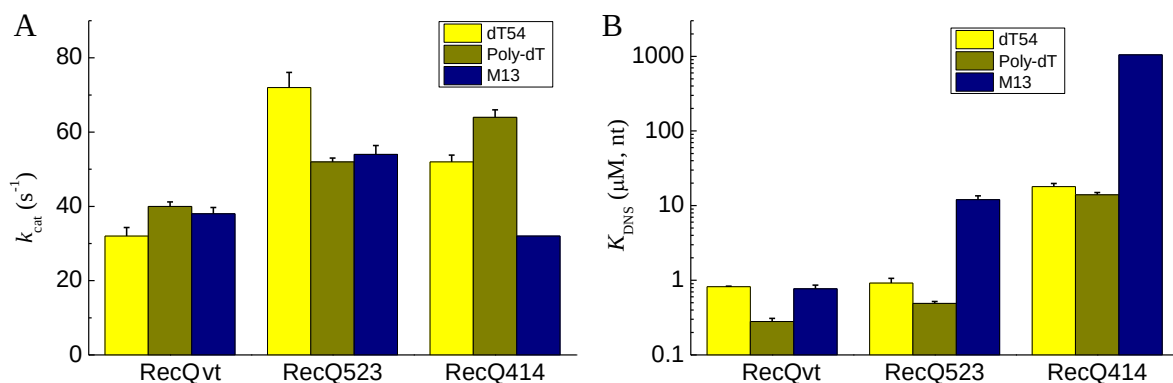
Amennyiben egy enzim ATPáz aktivitása eltérő a DNS-szálon való haladás közben illetve a DNS-végén, abban az esetben az enzimátikus paraméterek DNS-hosszfüggésének vizsgálatából (laborunkban korábban kidolgozott módszerek segítségével [22]) fontos paramétereket lehet megtudni. Ezért megvizsgáltam a RecQ-helikáz konstrukciók ATPáz paramétereinek hosszfüggését: egyre hosszabb DNS-szubsztrátok mellett követtem nyomon az enzimek ATPáz aktivitását. A RecQ^{vt} helikáz az irodalommal megegyező hosszfüggést mutatott (**7A ábra**) [20]. Meglepő módon a mutáns konstrukciók nem mutattak hosszfüggést (**7A ábra**). Ennek két lehetséges magyarázata lehet: (1) A mutánsok ugyanolyan gyorsan hidrolizálják az ATP-t a DNS-szál végén, mint amikor haladnak a szál közepén, vagy (2) nem transzlokálnak a DNS-szubsztráton. A kötőhely méretével megegyező méretű, vagy rövidebb szubsztrátok esetén a helikáz csak ráköt a DNS darabra, viszont elmozdulni nem tud rajta, tehát úgy viselkedik, mintha egy DNS-lánc végén tartózkodna. A különböző hosszúságú dT szubsztrátokkal végzett titrálásokból meghatároztam az adott hosszúságú szubsztrátokra vonatkozó K_{DNS} értékeket nukleotidokra vonatkoztatva (**7B ábra**). A K_{DNS} érték csökkent a növekvő dT hosszúság függvényében, míg egy adott hosszról az érték közel állandó maradt. Feltételezhető, hogy a töréspont az enzim látszólagos kötőhely méretet tükrözi. Az ábra alapján a RecQ^{vt} esetében ez 30-40 nt (nukleotidegység), a RecQ⁵²³ esetében 20-25 nt, a RecQ⁴¹⁴ esetében pedig 18-22 nt körülnek adódik. Elvárásainknak megfelelően a HRDC illetve illetve mindkét (WH és HRDC) domén hiányában csökkent a látszólagos kötőhelyméret.



7. ábra A: ATPáz aktivitás a dT-hossz függvényében. B: K_{DNS} a dT-hossz függvényében.

4.4. ATPáz aktivitás kétszálú DNS jelenlétében

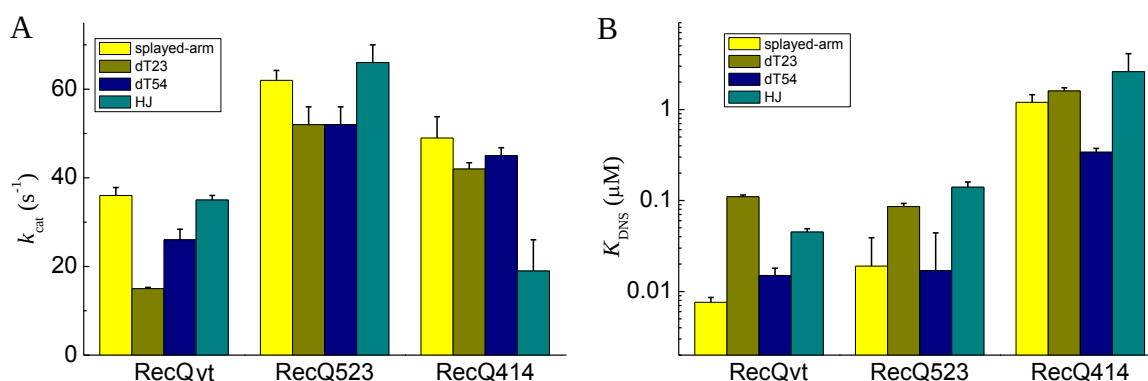
Első kísérletemben az M13-as cirkuláris DNS végeket nem tartalmazó DNS-szubsztrát hatását vizsgáltam. PolydT szubsztrát mellett is végeztem méréseket. A polydT végeket tartalmaz és monoton a nukleotidok szempontjából, így nem alakít ki másodlagos szerkezeteket. A kísérlet kivitelezése az ATP/NADH módszerrel történt. Minden esetben 10 nM enzim-koncentrációt alkalmaztam. E kísérletekben is megfigyelhető volt a RecQ⁵²³ emelkedett ATPáz aktivitása. (8A ábra). Azonban a DNS-affinitás tekintetében a RecQ⁴¹⁴ esetében jelentős csökkenés volt tapasztalható. Az eredmények alátámasztják azt, hogy a WH domén szükséges a kétszálú DNS felismerésében. Az M13 DNS valószínűleg másodlagos szerkezeteket alakít ki, ami még tovább csökkenti a mutánsok DNS-affinitását (8B ábra).



8. ábra A: ATPáz aktivitás ([enzim]=10 nM) és B: A K_{DNS} értékek különböző DNS-szubsztrátok esetében.

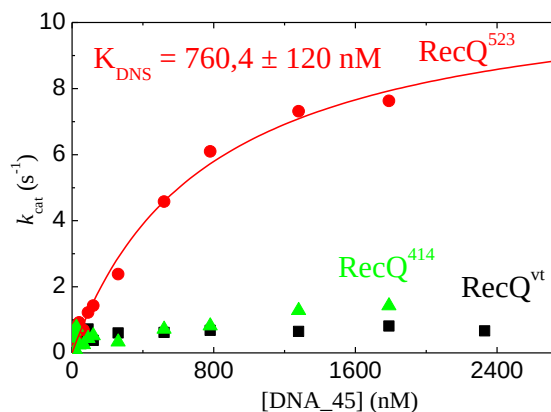
Az ábrán nukleotid-egységekre vonatkoztatott DNS-koncentrációt tüntettem fel.

Másik kísérletemben villás elágazású (splayed-arm) és Holliday keresztet (HJ) tartalmazó DNS-szubsztrátok képviselték a bonyolultabb DNS-szerkezeteket, továbbá dT23-mal és dT54-nal is végeztem összehasonlító méréseket. Ez a kísérlet is a fenti módszerekkel megegyező módon zajlott. Az eredményekből látható, hogy a RecQ⁵²³ fokozottabb ATPáz aktivitást mutatott a vizsgált szubsztrátokon, mint a vad típus (**9A ábra**). A RecQ⁴¹⁴ esetében a HJ szubsztráttal az ATPáz aktivitás és a DNS-affinitás is csökkent (**9B ábra**). Ez a megfigyelés tovább erősíti azt az elgondolást, miszerint a WH domén növeli a DNS-szálszétválasztás hatékonyságát, illetve elősegíti a bonyolultabb DNS-szerkezetek felismerését. Továbbá látható, hogy mindhárom enzim-konstrukció képes szétválasztani a kétszálú DNS molekulát, de a WH és a HRDC domén hiánya nagymértékben csökkenti a kétszálú és komplexebb DNS-formák felismerését.



9. ábra A: ATPáz aktivitás és **B:** K_{DNS} értékek különböző DNS-szubsztrátok esetében.
(10 nM enzim koncentráció)

Az alábbi kísérletemben tompavégű kétszálú DNS (DNA_45) szubsztráton határoztam meg az enzimek ATPáz aktivitását, a fent említett ATP/NADH kapcsolt reakcióval. A reakcióelegy 10 nM enzimet tartalmazott, amit emelkedő koncentrációjú DNA_45 szubsztráttal titráltam. A mérés eredményét a **10. ábra** mutatja.

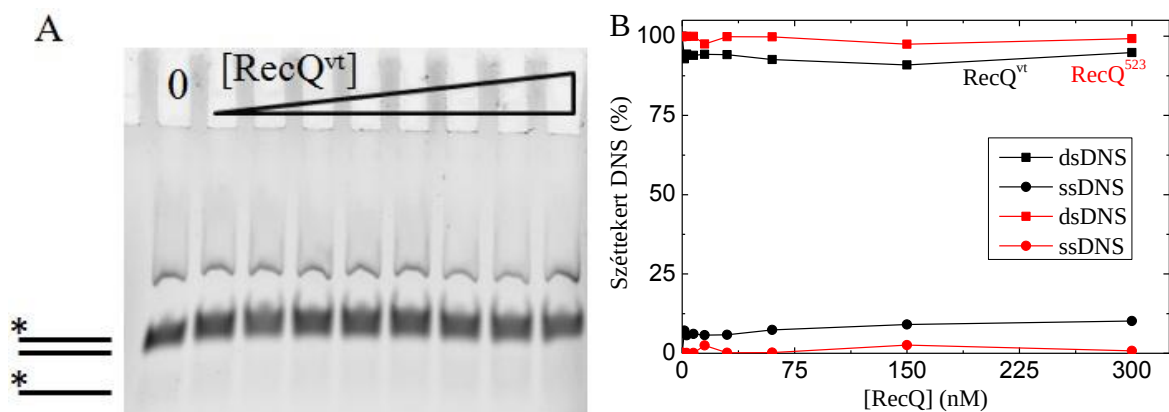


10. ábra: ATPáz aktivitás [DNA_45] koncentráció függvényében ([enzim]=10 nM).

A vad típus és a RecQ⁴¹⁴ mutáns esetében elhanyagolható ATPáz aktivitást figyeltem meg az egyszálú illetve az egyszálú régióval is rendelkező szubsztrátokhoz képest. A RecQ⁵²³ ATPáz aktivitását meglepő módon aktiválta a tompavégű kétszálú DNS, ám a k_{cat} érték (11,3 s⁻¹) az egyszálú DNS esetében megfigyelhető k_{cat} értéknél (63 s⁻¹) jóval alacsonyabbnak adódott (10. ábra; vö. 6. ábra). A tompavégű DNS-szubsztrát valószínűleg nem biztosít elérhető kötőhelyet az enzimnek ahhoz, hogy megfelelően elinduljon és elválassa egymástól a DNS két szálát. Ezen elképzelést a szálszétválasztást közvetlenül nyomon követő kísérletek során ellenőriztem.

4.5. A szálszétválasztás nyomon követése

Először fluoreszcensen jelölt tompavégű DNS (DNA_15*) szubsztráton végeztem szálszétválasztási kísérleteket. Az egyes reakcióelegyekben növekvő enzim-koncentrációt alkalmaztam. A szálszétválasztás hatékonyságát 10 percig követtem nyomon, 60 nM jelölt DNA_15* szubsztrát jelenlétében. Az idő elteltével minden egyes mérést leállítottam és az Anyagok és módszerek fejezetben leírt módszerrel meghatároztam a kétszálú DNS (mint kiindulási anyag) és az egyszálú DNS (mint reakciótermék) mennyiségi arányát a gélben.

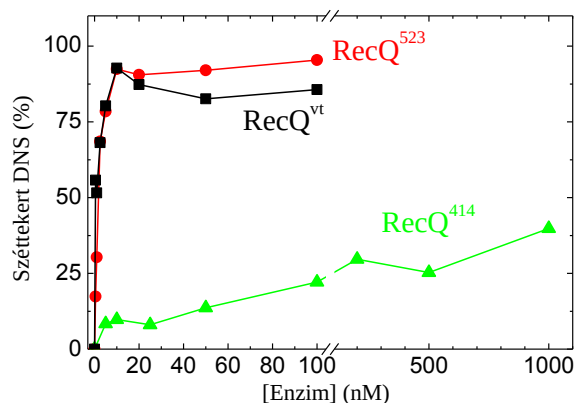


11. ábra A: DNS-szálszétválasztási kísérlet gélképe RecQ^{vt} esetében. (Az egyes mintákban enzim-koncentráció balról jobbra emelkedik 0 nM – 300 nM-ig). **B:** A széttekert DNS aránya az enzim-koncentráció függvényében (60 nM DNA₁₅* DNS; 10 perc).

A gélen legfelső csík a festékből eredő szennyezés (**11A ábra**). A RecQ^{vt} esetében fent említett csekély ATPáz aktivitás ellenére tapasztalható némi szálszétválasztási hatékonyság (~10%). Az RecQ⁵²³ viszont a fent megfigyelt, a vad típushoz képest magasabb ATPáz aktivitás ellenére nem volt képes széttekerni a tompavégű DNS szubsztrátot (**11A és B ábra**). Az ATPáz aktivitás emelkedésének megmagyarázása végett további kísérletek elvégzésére lesz szükség. A tompavégű DNS (DNA₄₅, DNA₁₅*) szubsztrátok esetében az ATPáz aktivitásból és a szálszétválasztási kísérletekből arra következtettek, hogy a RecQ helikáznak szüksége van egyszálú DNS jelenlétére egy összetettebb szubsztráton belül ahhoz, hogy megfelelően szétválassza a DNS két szálát. A RecQ^{vt} esetében korábban kimutatták [16], hogy rossz hatékonysággal választja szét a tompavégű, tisztán duplaszálú DNS szerkezetet. Feltételezték, hogy kell egy egyszálú „támadási” hely ahol az enzim megfelelően tud kötődni a DNS szubsztráthoz. Mivel a fenti kísérletek azt erősítik, hogy a RecQ⁴¹⁴ mutáns minden tulajdonságában alulmarad a vad típusú és a RecQ⁵²³ fehérjéhez képest, feltételezzük, hogy a RecQ⁴¹⁴ mutáns sem képes szétválasztani a tompavégű DNS szubsztrátot, amit a tompaszálú DNS jelenlétében végzett ATPáz kísérletek is támogatnak.

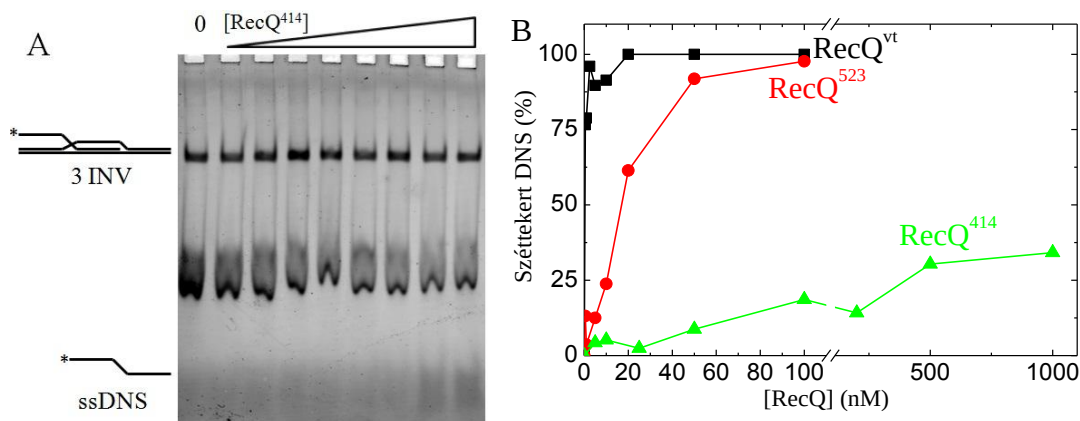
Mivel a RecQ helikázok az egyszálú DNS-túlnyúlással vagy karokkal rendelkező villás DNS szerkezeteket hatékonyan választják szét (szemben a tompavégű DNS-sel), az alábbi kísérleteket végeztem el annak érdekében, hogy fényt derítsek a HRDC és WH domének ezen szubsztrátok széttekérésében betöltött szerepére. A kísérlet során szintén a szálszétválasztási hatékonyságot vizsgáltam egyre növekvő enzimkoncentráció jelenlétében villás és más összetettebb DNS szubsztrátokkal.

Az alábbi reakció 6 nM villás (splayed-arm) DNS (DNA₁₆) szubsztrátot tartalmazott és 10 percig futott. Azt tapasztaltam, hogy a vad típus és az RecQ⁵²³-as mutáns szinte teljesen hasonló eredményeket produkált, ellenben a RecQ⁴¹⁴-es mutáns csak nagyon magas enzim-koncentráció mellett volt képes a DNS-szubsztrátok 40%-át széttekerni. Tehát a RecQ⁴¹⁴ is képes széttekerni a kétszálú DNS-t, de közel háromszázszor rosszabb hatékonysággal (12. ábra).



12. ábra: Széttekert DNS aránya az Enzim koncentráció függvényében.
(6 nM splayed-arm DNS; 10 perc).

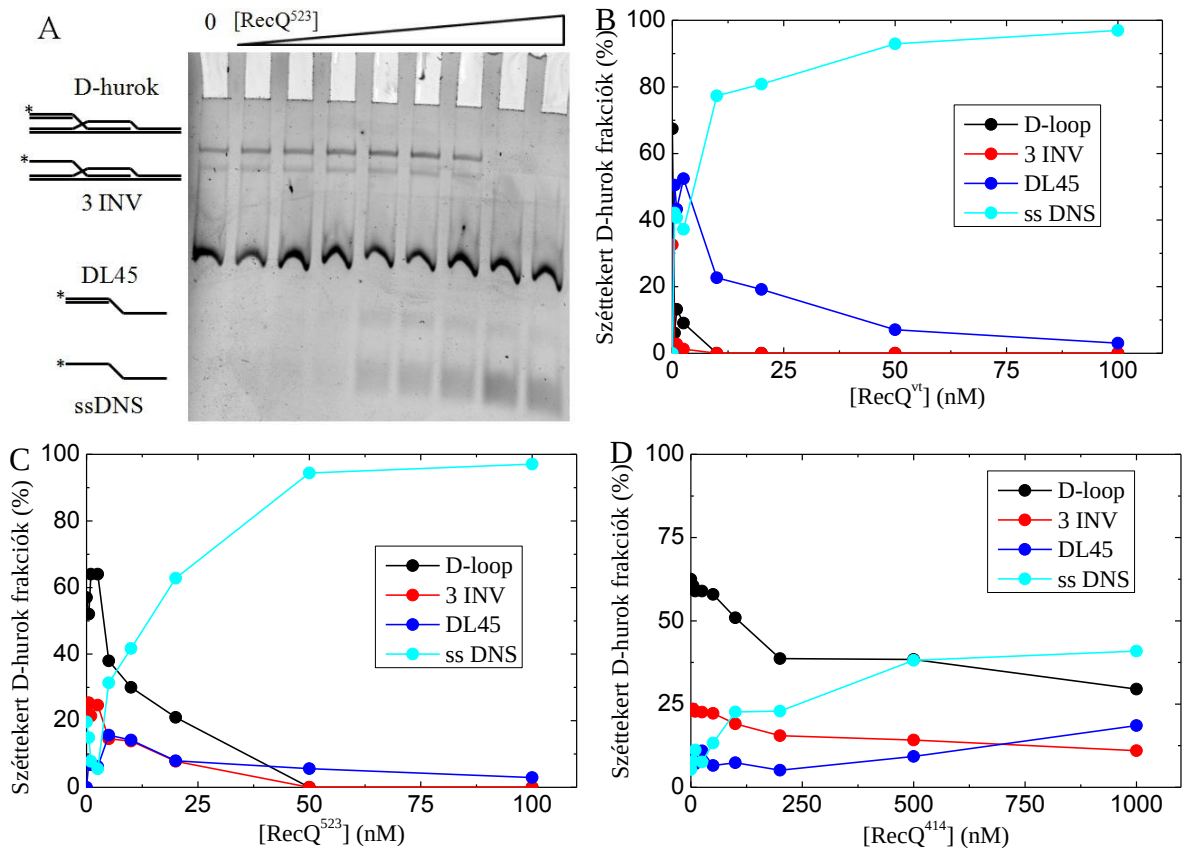
A homológ rekombináció és az ezen alapuló hibajavítás minden esetben egy D-hurok DNS szerkezetet mutató szakaszon megy keresztül. A RecQ helikázok nélkülözhetetlen tagjai az előbb említett folyamatoknak azáltal, hogy képesek a D-hurok szerkezetek átalakítására. E mérések során D-hurok (DL) és 3INV DNS-szubsztrátokat alkalmaztam. A D-hurok szubsztrátban egy kétszálú DNS egyszálú 3'-túlnyúlása egy másik DNS kettősszála közé, a vele komplementer régióhoz köt. A 3INV szubsztrát a D-hurok szerkezetnél egyszerűbb: ebben csak egyszálú DNS köt a másik kétszálú DNS vele komplementer szálához (4. ábra). Az alábbi reakciók 10 percig futottak 30 nM 3INV DNS-szubsztrát jelenlétében.



13. ábra **A:** 3INV szálszétválasztó kísérlet gélképe a RecQ⁴¹⁴ esetében. (Az enzim-koncentráció balról jobbra emelkedik 0 nM – 1000 nM-ig.) **B:** A széttekert DNS aránya az enzim-koncentráció függvényében (30 nM 3INV DNS; 10 perc)

A két termék között látható csíkok a festékből eredő szennyeződések. Az eredményekből látható, hogy a RecQ^{vt} már kis koncentrációnál is képes a DNS-szubsztrát 100 %-át széttekerni. A RecQ⁵²³ mutáns pedig tízszer akkora enzim-koncentráció mellett képes a szubsztrátok 100%-át széttekerni ugyanannyi idő elteltével. A RecQ⁵²³ a splayed arm szubsztrátnál a vad típussal megegyező eredményeket mutatott (**12. ábra**). A 3INV szubsztrátnál azonban csökkent a szálszétválasztási képessége. Ezekből a különbségekből arra következtettek, hogy a HRDC doménnek meghatározó szerepe van a D-hurok DNS struktúra felismerésében. A RecQ⁴¹⁴ enzim pedig százszoros enzim-koncentráció mellett is csak a 3INV DNS-szubsztrát 25 %-át tekerte szét. Ilyen komplex DNS-szubsztrátok esetében a WH és a HRDC hiánya jelentős mértékben csökkenti a RecQ helikáz szálszétválasztó képességét.

A következő kísérletben a 3INV szubsztrátnál egy fokkal komplexebb, DL-szubsztráton vizsgáltam az enzimek szálszétválasztó aktivitását (**14A ábra**). A DL szubsztrát előállításánál 3INV-szubsztrát is képződik: mivel a két DNS-konstrukció közötti töltéskülönbség csekély, ezért tökéletes elválasztásuk ioncserés eljárással nem lehetséges.



14. ábra A: D-hurok szétválasztási kísérlet gélképe a $RecQ^{523}$ konstrukció esetében. (Az enzim-koncentráció balról jobbra emelkedik 0 nM – 300 nM-ig). **B:** a $RecQ^{wt}$ - **C:** a $RecQ^{523}$ - **D:** a $RecQ^{414}$ - esetében a széttekert D-hurok frakciók aránya az enzim-koncentráció függvényében (30 nM DL DNS; 10 perc)

A kísérlet során két termék keletkezését követtem nyomon: egyrészt a DL45 elnevezésű 3' túlnyúlással rendelkező kétszálú DNS-ét, másrészt az egyszálú DNS keletkezését. A reakció folyamán a kiindulási termékeket, azaz a DL és 3INV szerkezetek fogyását is nyomon lehet követni.

A legsötétebb, ívben futó csíkok a festékből származó szennyeződések (**14A ábra**). A vad típusú enzim 10 nM enzim-koncentráció mellett már a DL szubsztrát 100 %-át szétválasztotta a különböző végtermékekre. Az egyszálú DNS (ssDNS) aránya már elérte a 80 %-ot. A $RecQ^{523}$ mutáns helikáznál a 3INV szubsztrát esetében is tapasztalt rosszabb hatékonyság megfigyelhető volt a DL szubsztrátnál is (**14B és C ábra**). A 523-as mutáns 10 nM enzim-koncentráció mellett a DL szubsztrátnak csak az 50 %-át választotta szét és az egyszálú DNS aránya is csak 45 % körüli volt. A $RecQ^{414}$ mutáns szétválasztási képességei drasztikusan visszaestek a vad típushoz képest (**14D ábra**). Az egyszálú DNS mennyisége alig érte el az 50 %-ot még 1000 nM enzim-koncentráció mellett is. Továbbá a

RecQ^{vt} és a RecQ⁵²³ konstrukció esetében a termékek keletkezése különböző profilt mutatott. Megfigyelhető az eltérő keletkezési majd fogyási lefutás a DL45 termék esetében, ami eltérő D-hurok szálszétválasztási mechanizmusra utal.

A 3INV és DL-szubsztrátokon végzett enzim koncentrációfüggő szálszétválasztási kísérletek alátámasztják a hipotézisemet, miszerint a HRDC domén hiánya csökkenti a D-hurok DNS-szerkezetek felismerésének hatékonyságát, továbbá a WH domén hiánya tovább rontja a D-hurok szerkezet felismerését és a szálszétválasztási képességet is.

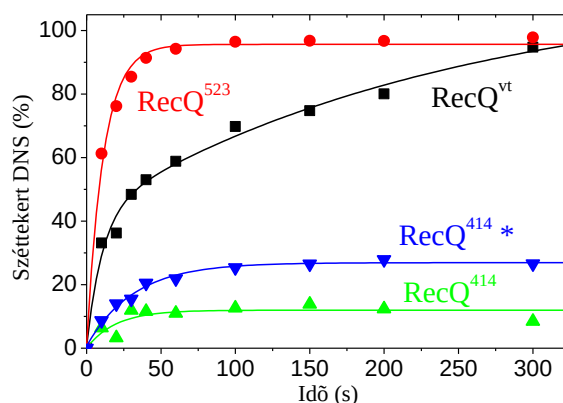
4.6. Egyszeri futásos szálszétválasztási kinetikai mérések

A következő kísérletekben azt vizsgáltam, hogy mi történik abban az esetben, amikor az enzim csak egy futási ciklust végezhet el a DNS-szubsztráton. Ez azt jelenti, hogy ha egy enzim disszociált egy DNS-szubsztrátról, akkor arra többet nem tud visszakötni. Így maradhatnak „félbehagyott” szubsztrátok is a rendszerben. Ez jelentős eltérés a fent leírt szálszétválasztó kísérletekhez képest, ugyanis ott egy steady-state folyamatban az összes DNS-szubsztrát feldolgozásra került, mert egyszerre több enzim többször végezhetett munkafolyamatot a DNS-szubsztrátokon.

Így az alábbi kísérletekben megfelelő DNS-csapdát használtam, hogy biztosítsam az egyszeri futást. Így ha egy enzim disszociál a DNS-ről, akkor a nagy feleslegben lévő DNS-csapda szálra (jelöletlen egyszálú DNS) fog rákötni és nem mutat további helikáz aktivitást a jelölt DNS-szubsztráton. A reakció indítása előtt inkubáltam az enzimet és a DNS-szubsztrátot 5 percig. Ezután hozzá adtam az ATP-t és a csapda molekulát és különböző időközönként mintát vettem az elegyből és leállítottam a reakciót. A megjelenő termékek mennyisége exponenciális időfüggést mutatott. Ezek az egyszeri futásos szálszétválasztási kinetikai mérések megfelelőek arra, hogy az egyes enzim-konstrukciók processzivitását és szálszétválasztási sebességét egyszerre követhessük nyomon.

Az első kísérletben a reakcióelegy 30 nM splayed-arm DNS-szubsztrátot, a RecQ^{vt} és RecQ⁵²³-as esetében 100 nM enzimet, az alacsonyabb DNS-affinitást mutató RecQ⁴¹⁴ esetében pedig 2 μ M enzimet tartalmazott. A mérések eredményeiből látszik, hogy a vad típus esetében 2 fázisú a görbe, amely egy gyors első szakasz és egy lassabb második szakaszra osztható. A jelenséget két okra vezethetjük vissza.

Az első elképzelés szerint a gyors fázis megfeleltethető azon enzimek szálszétválaszó aktivitásának, melyek a 3' karról indulva egy futással széttekerik a szubsztrátot. A lassú fázis jelenléte egy úgynevezett szálváltás jelenséggel magyarázható. Az adott koncentrációviszonyoknál az enzimek a villa mindkét karját kötik. Amennyiben egy 3'végről induló helikáz a DNS-vég elérése előtt leesik, megeshet, hogy egy az 5' karon lévő enzim átköt a 3' végre és befejezi a szálszétválasztást. Ezt az esetet erre a célra megfelelő DNS-szubsztrátokkal még a jövőben vizsgálni fogom. Egy másik lehetséges magyarázat pedig az, hogy a monomer és dimer formák aktivitását láthatjuk. A RecQ⁵²³ továbbra is a gyors és processzív jelleget mutatja. Valószínűleg olyan gyors vagy processzív az enzim, hogy a szálváltás nem játszik szerepet. Másik elképzelés, hogy a HRDC hiánya miatt nem képes dimerizálódni. Ezért láthatjuk az egyfázisú görbét. RecQ⁴¹⁴ esetében egy hosszabb és egy rövidebb (RecQ^{414*} görbe) szubsztrátot alkalmaztunk. A rövidebb szubsztrát esetében némileg emelkedett a széttekert DNS mennyisége. Eredményeim alapján a WH domén hiánya nagymértékben csökkenti az enzim processzivitását, viszont a szálszétválasztás sebességét nem befolyásolja (**15. ábra**).

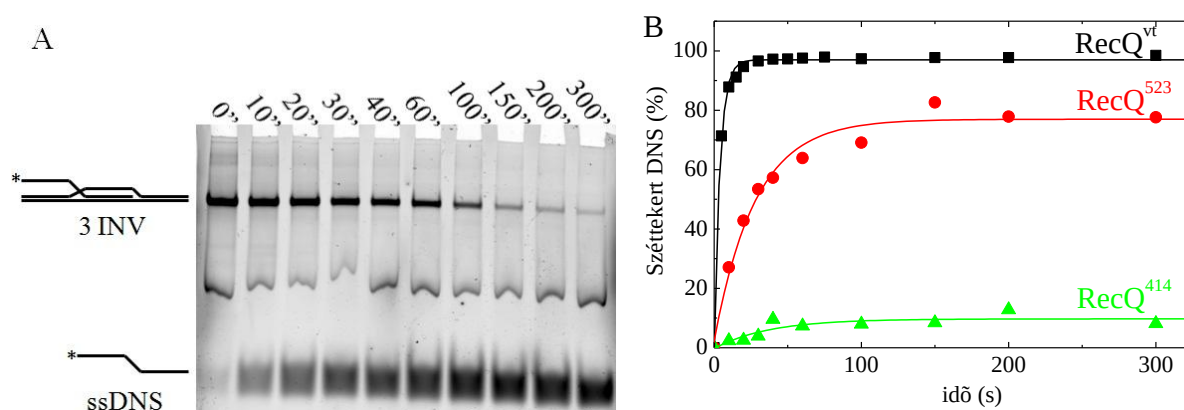


15. ábra Széttekert DNS aránya az idő függvényében.
(30 nM *splayed-arm* DNS; 100 nM RecQ/RecQ⁵²³; 2 μ M RecQ⁴¹⁴).

A következő két kísérletben a reakció paraméterei és körülményei megegyeztek a fent leírt első kísérlettel, csak itt 3INV majd DL DNS-szubsztráton vizsgáltam az egyszeri futást.

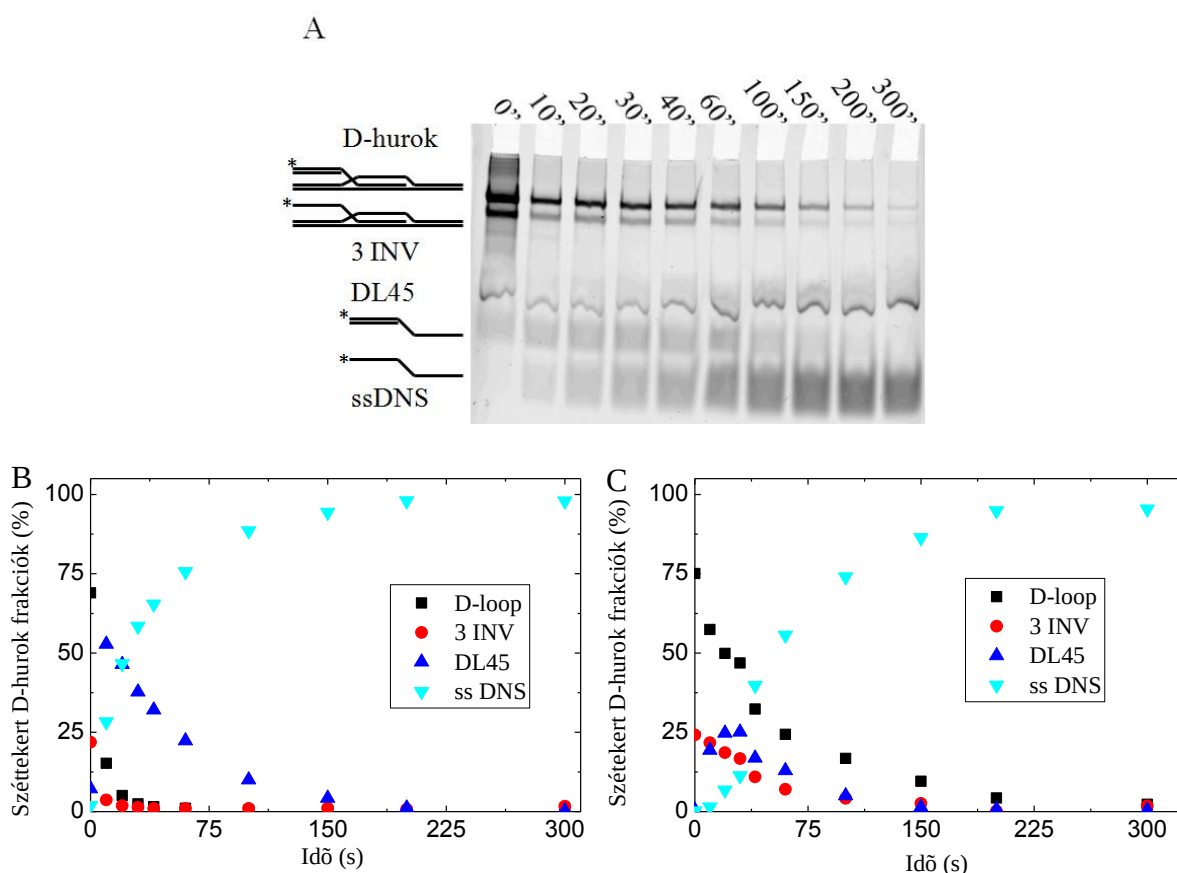
Szemben az enzim koncentrációfüggő 3INV és DL kísérletekkel itt a termékek és kiindulási DNS-szerkezetek fogyását az időben követtem nyomon, így hasonlóan az előző kísérlethez a szálszétválasztás sebességét és a processzivitást tudtam vizsgálni.

A két termék közt megfigyelhető csíkok a festékből származó szennyeződést jelzik (**16A ábra**). A 3INV-szubsztrát esetében a vad típus gyors és processzív jelleget mutat viszont nem tapasztaltam kétfázisú görbét, mint a splayed arm DNS-szubsztrát esetében. Ez utóbbi megfigyelés a szálváltás tényét erősíti az előző szubsztrát (splayed arm) esetében. Ezzel szemben a RecQ⁵²³ rosszabb teljesítményt mutat a vad típushoz képest, csökkent a processzivitása és a gyorsaságából is veszített. A RecQ⁴¹⁴ mutáns rendkívül gyenge szálszétválasztó aktivitást mutatott. A processzivitása hasonló módon alacsony, mint a splayed arm szubsztrát esetében (**16B ábra**).



16. ábra A: A 3INVegyszeri futásos szálszétválasztó kísérlet gél képe a RecQ⁵²³ konstrukció esetében. **B:** Széttekert DNS aránya az idő függvényében. (30 nM 3 INV DNS; 100 nM RecQ/RecQ⁵²³; 2 μ M RecQ⁴¹⁴)

A harmadik csíksorozat a festékből származó szennyeződés (**17A ábra**). A DL szubsztráton mért időfüggő szálszétválasztási kísérletek is egybevágó eredménnyel végeztek, mint az előző 3 INV szubsztrát esetében. A RecQ^{wt} már szinte 20 másodperc elteltével szétválasztotta valamennyi DL és 3INV szubsztrátot. Az RecQ⁵²³ fehérje pedig tízszer rosszabb hatékonysággal dolgozta fel a DL szubsztrátot a különböző végtermékekre (**17B és C ábra**). A RecQ⁴¹⁴ mutáns esetében a mérések még jelenleg is folynak és a meglévő eredmények még kiértékelés alatt állnak. Itt is megfigyelhető, mint az enzim koncentrációfüggő szálszétválasztó kísérletekben, hogy a keletkező termékek mennyiségében eltérő lefutást tapasztalunk a RecQ^{wt} és a RecQ⁵²³ esetében. Ez is támogatja az előző megállapítást, miszerint a két konstrukció eltérő mechanizmussal dolgozza fel a D-hurok DNS-szerkezetet. Az eredmények azt tükrözik, hogy a D-hurok DNS-szerkezetek azonosításában és megfelelő processzivitással való feldolgozásukban szükséges a HRDC domén jelenléte.



17. ábra A: A D-hurok egyszeri futásos szétszétválasztó kísérlet gél képe a $RecQ^{523}$ konstrukció esetében.

B: a $RecQ^{wt}$ - C: a $RecQ^{523}$ – esetében a széttékt D-hurok frakciók aránya az idő függvényében
(30 nM DL DNS;)

4.7 További tervek, kísérletek

Az egyes mutánsok DNS-kötési tulajdonságainak (affinitás, kötőhely-méret) összehasonlítására fluoreszcencia-kísérletekkel szeretnék választ kapni. A mérés során különböző hosszúságú egyszálú DNS szubsztrátokkal fogom titrálni a mutánsokat és követem a mutánsokban található triptofánok (Trp) fluoreszcencia emisszió változását. Amikor a helikáz köt a DNS-láncra, akkor a helikázban található Trp oldalláncok környezete – és fluoreszcens tulajdonságai - megváltoznak. Ezen kapcsoltság miatt a Trp fluoreszcencia mértéke arányos a DNS-kötött helikáz mennyiségével. Továbbá a leírt eredmények összevetése a laborunkban ugyanezen fehérje konstrukciókkal folytatott bakteriális fág-rekombináció elemzés vizsgálataival és a kollaboráló labor egyedi molekula vizsgálatok eredményeivel.

5. Összefoglalás

A helikázok a DNS szálainak szétválasztására specializálódott motorfehérjék. E népes enzimescsoport közül a RecQ helikázok nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a genomintegritás fenntartásában. Ezek a speciális helikázok részt vesznek a homológ rekombináción alapuló DNS-hibajavítás mechanizmusában, továbbá gátolják az illegitim rekombináció kialakulását. A RecQ helikázokat egy központi motorrégió és további, a szálszétválasztási hatékonyságot segítő járulékos domének építik fel. Ilyen járulékos domének a Zn^{2+} -kötő, a szárnyas hélix (winged hélix) és a HRDC domén. E domének funkciójáról még kevés információ áll rendelkezésünkre, és máig erősen kutatott terület.

Kutatásom az *E. coli* RecQ helikáz szárnyas hélix és HRDC doménjeinek funkciójára fókuszál. Azt szeretném meghatározni, hogy e domének milyen szerepet töltenek be az enzim működése során. A vad típusból kiindulva géntechnológiai módszerekkel két mutáns fehérjét állítottunk elő: a RecQ⁵²³ fehérjéből hiányzik a HRDC domén, a RecQ⁴¹⁴ fehérjéből pedig a HRDC és WH domén is hiányzik. E fehérjék működését jellemző legfontosabb kinetikai paramétereket vizsgáltam fotometriás és biokémiai mérőmódszerek segítségével. Vizsgáltam a fehérjék haladását különböző hosszúságú és koncentrációjú egyszálú-DNS szubsztrátokon, valamint a többszálú DNS-szubsztrátok szálainak enzimatisz szétválasztását.

Többek között azt tapasztaltam, hogy a RecQ⁵²³ esetében a HRDC domén hiánya növelte az enzim ATPáz aktivitását DNS jelenlétében, illetve megszüntette az enzim ATPáz aktivitásának DNS-hosszfüggését. Továbbá növelte a villás DNS-szubsztrát szétválasztásának sebességét és processzivitását. Elképzelhető, hogy az ilyen egyszerű egyszálú DNS-szubsztrátok esetén a nagy mozgástérrel rendelkező HRDC domén akadályozza az enzimet a haladásban, ezért tapasztalható az RecQ⁵²³ mutáns esetében a magasabb ATPáz aktivitás. Azonban összetettebb (pl. D-hurok-szerű) DNS-szerkezeteket rosszabb hatékonysággal és valószínűleg eltérő mechanizmussal dolgozza fel, mint a vad típusú RecQ helikáz.

A RecQ⁴¹⁴ konstrukció esetében a HRDC és WH domének hiánya nagymértékben csökkentette a DNS-hez való affinitást, azonban az ATPáz aktivitás nem változott és az enzim hasonlóan a RecQ⁵²³-hoz hosszfüggetlenséget mutatott. Továbbá a DNS-szálszétválasztás hatékonysága, de nem a sebessége, az egyszerű DNS-szerkezetek esetében lecsökkent, valószínűleg a processzivitas jelentős csökkenése miatt. A komplex DNS-szerkezeteken rendkívül rossz szálszétválasztási aktivitást tapasztaltam.

Mindkét mutáns esetében elmondható, hogy a látszólagos kötőhely mérete csökkent a domének elvesztésével, továbbá a domének hiánya nem befolyásolta az ATP-kötés paramétereit.

Ahhoz, hogy a RecQ helikázok a homológ rekombináció és DNS hibajavító folyamatok során maradéktalanul el tudják végezni a feladatukat, szükséges számukra e domének jelenléte. A HRDC domén funkcióját illetően elengedhetetlen, hogy a komplex többszálú DNS-szerkezetek azonosítása megfelelően megtörténjen a szálszétválasztás folyamata közben, ezáltal növelve az enzimek hatékonyságát. A szárnyas hélix domén központi szerepet tölt be a fehérjében, mivel a hiánya drasztikusan rontja az enzim valamennyi tulajdonságát és e domén nélkül szinte képtelen elvégezni az élettani funkcióját. A WH domén a DNS kötés és a processzivitás szempontjából nélkülözhetetlen szerkezeti elemei a RecQ helikázoknak.

6. Irodalomjegyzék

1. Hopfner KP, Michaelis J: **Mechanisms of nucleic acid translocases: lessons from structural biology and single-molecule biophysics.** *Curr Opin Struct Biol* 2007, **17(1)**:87-95.
2. Enemark EJ, Joshua-Tor L: **On helicases and other motor proteins.** *Curr Opin Struct Biol* 2008, **18(2)**:243-257.
3. Bachrati CZ, Hickson ID: **RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork.** *Chromosoma* 2008, **117(3)**:219-233.
4. Waters R: **Maintaining genome integrity.** *EMBO Rep* 2006, **7(4)**:377-381.
5. Singh DK, Ahn B, Bohr VA: **Roles of RECQ helicases in recombination based DNA repair, genomic stability and aging.** *Biogerontology* 2009, **10(3)**:235-252.
6. Bachrati C, HICKSON I: **Family Helicases.** *DNA Repair (Amst)* 2006, **409**:86.
7. Zittel MC: **Coupling DNA-binding and ATP hydrolysis in Escherichia coli RecQ: role of a highly conserved aromatic-rich sequence.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33(22)**:6982-6991.
8. Bennett RJ, Keck JL: **Structure and function of RecQ DNA helicases.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2004, **39(2)**:79-97.
9. Vindigni A, Marino F, Gileadi O: **Probing the structural basis of RecQ helicase function.** *Biophys Chem* 2010, **149(3)**:67-77.
10. Bernstein DA, Zittel MC, Keck JL: **High-resolution structure of the E.coli RecQ helicase catalytic core.** *EMBO J* 2003, **22(19)**:4910-4921.

11. Harrigan J: **Human diseases deficient in RecQ helicases.** *Biochimie* 2003, **85(11)**:1185-1193.
12. **biokémia internetes folyóirat.** 2012, :0133-8455.
13. Pike ACW, Shrestha B, Popuri V, Burgess-Brown N, Muzzolini L, Costantini S, Vindigni A, Gileadi O: **Structure of the human RECQ1 helicase reveals a putative strand-separation pin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, **106(4)**:1039-1044.
14. Gyimesi M, Harami GM, Sarlos K, Hazai E, Bikadi Z, Kovacs M: **Complex activities of the human Bloom's syndrome helicase are encoded in a core region comprising the RecA and Zn-binding domains.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40(9)**:3952-3963.
15. Xu X, Liu Y: **Dual DNA unwinding activities of the Rothmund--Thomson syndrome protein, RECQ4.** *EMBO J* 2009, **28(5)**:568-577.
16. Bernstein DA, Keck JL: **Conferring substrate specificity to DNA helicases: role of the RecQ HRDC domain.** *Structure* 2005, **13(8)**:1173-1182.
17. Singleton MR, Dillingham MS, Wigley DB: **Structure and Mechanism of Helicases and Nucleic Acid Translocases.** *Annu Rev Biochem* 2007, **76(1)**:23-50.
18. Xu HQ: **The Escherichia coli RecQ helicase functions as a monomer.** *J Biol Chem* 2003, **278(37)**:34925-34933.
19. Zhang XD: **Escherichia coli RecQ is a rapid, efficient, and monomeric helicase.** *J Biol Chem* 2006, **281(18)**:12655-12663.
20. Sarlos K, Gyimesi M, Kovacs M: **RecQ helicase translocates along single-stranded DNA with a moderate processivity and tight mechanochemical coupling.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, **109(25)**:9804-9809.
21. Handa N, Morimatsu K, Lovett S, Kowalczykowski S: **Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of E. coli.** *Genes & development* 2009, **23(10)**:1234-1245.
22. Gyimesi M, Sarlos K, Derenyi I, Kovacs M: **Streamlined determination of processive run length and mechanochemical coupling of nucleic acid motor activities.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38(7)**:e102-e102.

Szerzői hozzájárulás

Géntechnológiai módszerekkel előállítottam a méréseimhez szükséges fehérjéket. Megmértem a fehérjék ATPáz aktivitást különböző ATP koncentrációk mellett és különböző koncentrációjú és hosszúságú DNS-szubsztrátokkal. Továbbá vizsgáltam a szálsétválasztási képességeket összetett DNS-szubsztrátokon. Az eredményeket feldolgoztam és kiértékeltem.