

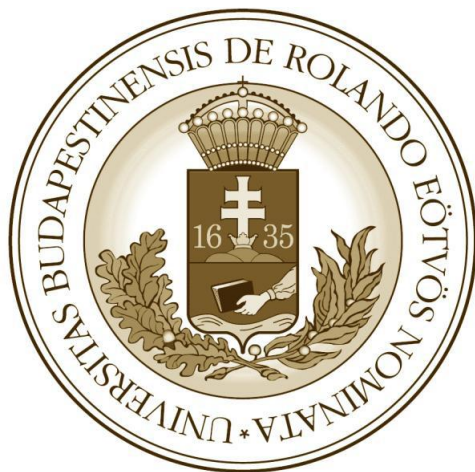
Szerkezetváltozások és doménmozgások RecQ helikázokban

Kocsis Zsuzsa

Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológia Doktori iskola
Iskolavezető: Prof. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Doktori Program
Programvezető: Prof. Nyitray László

Témavezető:
Dr. Kovács Mihály,
az MTA doktora, habilitált tudományos főmunkatárs



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék

2014

Bevezetés

A helikázok olyan nukleotidkötő fehérjék, melyek nukleinsav szálak szétválasztását végzik. A RecQ helikázok többek közt a homológ rekombinációs kettős-szálú DNS száltörés javításban játszanak szerepet, így segítve a genom karbantartását. Csökkentik az illegitim rekombinációk számát, feloldják a D-hurok szerkezeteket, átkereszteződés-mentes termékek felé terelik a rekombinációs termékek keletkezését. Ezenkívül segítenek a megtorpant replikációs villák kezelésében, a telomerek karbantartásában. Szerepük fontosságát jelzi, hogy meghibásodásuk igen súlyos genetikai betegségek kialakulásához vezet, mint például a Bloom-, Werner- és Rothmund-Thomson- szindrómák, melyek mind rákra való hajlammal, esetenként pedig felgyorsult öregedéssel járnak. *Escherichia coli*-ban (*Ec*) a család egyetlen tagja a névadó RecQ helikáz, emberben viszont öt tag található meg: Recq1, Bloom (BLM), Werner (WRN), Recq4, Recq5 helikáz.

A RecQ helikáz fehérjéknek számos aktivitása létezik, például az ATP hidrolízis által hajtott egyszálú (ss) DNS sín mentén való transzlokáció és a kétszálú (ds) DNS szálszétválasztás, melyekhez mind a DNS kötése szükséges. A RecQ helikázok tartalmaznak két RecA-domént, melyek az ATP hidrolízisért felelősek, Zn²⁺-kötő (ZB) domént, a winged-helix (WH) domént, és többnyire HRDC domént. Feltételezhetően a RecQ család öt doménjének mindegyike részt vesz a DNS kötésében. Nem ismertek azonban DNS-kötött kristályszerkezetek, pontos DNS-kötőhelyek, illetve a DNS-kötés mechanizmusa. Ismert a RecQ bakteriális fehérje szerkezete HRDC domén nélkül, és a Recq1 (szintén HRDC domén nélküli) DNS tartalmú kristályszerkezete, melyben a RecA doménekhez képest a WH domén nagymértékben elfordult helyzetben jelent meg. Felmerül a kérdés, hogy a két, egy családba tartozó fehérje különbözősége okozza a különbséget, vagy a RecQ fehérjében DNS-kötés hatására nagymértékű doménmozgás történik.

Vizsgált problémák és célkitűzések

1. A RecQ és a DNS-kötött Recq1 fehérje kristályszerkezete konzervált voltuk ellenére jelentősen különbözik, ami származhat a RecQ homológok különbségéből, vagy a DNS-kötés közben végbemenő izomerizációtól.

Meg kívántuk vizsgálni, hogy okoz-e a DNS-kötés szerkezetváltozást az *Ec* RecQ helikázban.
2. Nem ismert, hogy a RecQ helikáz DNS-kötésének erősségét, az esetleges szerkezetváltozást hogyan befolyásolja a helikáz enzimciklusa (nukleotid állapota).

Elemezni akartuk, hogy az esetleges szerkezetváltozást (illetve a DNS-kölcsönhatás erősségét) hogyan befolyásolja a RecQ enzimnek az ATPáz ciklus során ciklikusan változó enzimikus (nukleotid-) állapota.
3. A RecQ helikázok doménszerkezetében számos konzervált felépítési elv található, de felderítetlen a különböző domének szerepe a DNS-kötésben.

Célunk volt meghatározni a RecQ helikáz doménjeinek hozzájárulását a DNS-kötési folyamatokhoz.
4. Ismertek a RecQ helikáz steady-state transzlokációjának tulajdonságai (Sarlós et. al. 2013), de nem tisztázott, hogy mely nukleotid állapotok milyen mértékben járulnak hozzá a transzlokáció folyamatához, ami a DNS-szerkezetátalakító aktivitások alapja.

Fel kívántuk deríteni, hogy mely nukleotid állapotok (illetve DNS-kötött szerkezetek) fordulnak elő a legnagyobb arányban a steady-state ssDNS transzlokáció során.
5. Egyes kísérletek szerint a RecQ helikázok különböző aktivitásaikat különböző oligomerizációs állapotban végezhetik, ám ez nagyrészt felderítetlen, és régóta vita tárgyát képezi.

Célkitűzéseink közt szerepelt a BLM transzlokáció közben elfoglalt kötőhely méretéből az oligomerizációs állapotra való következtetés.

Kísérleti megközelítés, elvégzett kísérletek

1. A fehérje saját triptofánjainak (Trp) fluoreszcencia jelét használtuk fel a RecQ DNS-kötésének és az esetleges szerkezeti változás követéséhez, amely jel alkalmasnak ígérkezett a teljes fehérjét érintő szerkezeti változások detektálására.

A RecQ fehérjén dupla pirén jelölést hajtottunk végre, mely pirének átlapolása excimer jelként jelenik meg a fluoreszcencia emissziós spektrumban. Ehhez új RecQ mutánst hoztunk létre olyan módon, hogy az egyik pirén a RecA doménekre, a másik a WH doménre kerüljön, így lehetővé téve a Recq1-szerű lehetséges doménelfordulás megfigyelését. A dupla pirén jelöléshez QuickChange módszerrel létre kellett hozni a megfelelő mutáns fehérjét (4CRecQ), mely a megfelelő helyeken ciszteinekre cserélt aminosavakat tartalmaz a pirén jelöléshez, és két eredetileg meglévő felületi ciszteint kiiktat a molekulából (C94A, T187C, C351S, A487C). Létrehoztuk továbbá az egy cisztein bevitelével (és kettő kiiktatásával) készülő mutánsokat: 187C-RecQ (C94A, T187C, C351S) és 487C-RecQ (C94A, C351S, A487C).

A DNS-kötés megfigyeléséhez, jellemzéséhez, a kinetikai és egyensúlyi állandók meghatározásához stopped-flow tranziens kinetikai méréseket végeztünk.

2. Stopped-flow rendszerben különböző nukleotid állapotokban vizsgáltuk a RecQ helikáz DNS kötését.

3. RecQ mutáns konstrukciókkal vizsgáltuk a domének DNS-kötéshez való hozzájárulását. Felhasznált fehérjék: vad-típusú RecQ, RecQ-d523 és RecQ-d414, amely konstrukciók az adott aminosavval végződnek, RecQ-Y555A mutáns, melyben az 555-ös tirozint alaninre van cserélve. A RecQ-d523, fehérjéből hiányzik a HRDC, a RecQ-d414 konstrukcióból mind a HRDC, mind a WH domén. Irodalmi adatok alapján az Y555A mutáció megszünteti a HRDC domén ssDNS-kötését.

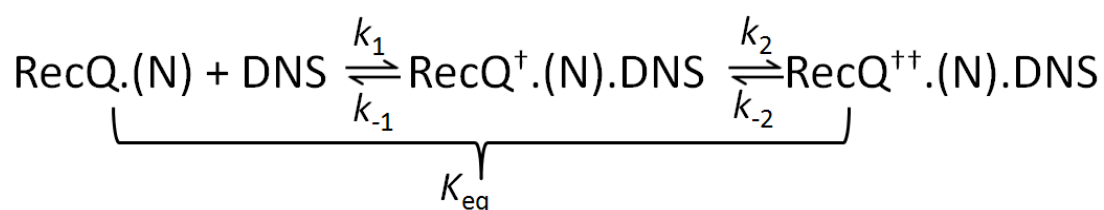
4. A transzlokáció legnagyobb arányban előforduló nukleotid állapotának (illetve állapotainak) meghatározásához DNS-kötött életidőket és disszociációs állandókat hasonlítottam össze transzlokációs és különböző nukleotid jelenlétében végzett DNS kötési kísérletekben.

5. A BLM oligomerizáció feltárásához steady-state fluoreszcencia vizsgálatokat végeztünk különböző hosszúságú fluoreszcensen (Cy3) jelölt ssDNS-ekkel.

Tézisek (eredmények) és következtetések

1/A. tézis: A RecQ DNS-kötési stopped-flow görbéinek két fázisát detektáltuk. Az első fázist lineáris DNS koncentráció függés jellemzi, míg a második fázis hiperbolikusan függést mutat a DNS koncentrációtól.

Következtetés: A RecQ fehérje DNS-kötési, gyors lépését egy lassabb, izomerizációs lépés követi.



A RecQ kétlépcsés DNS-kötése: A RecQ fehérje köti a DNS-t egy másodrendű folyamat során, majd a létrejött komplex egy lassabb, elsőrendű folyamat során konformációs változáson megy át. A folyamat mindkét lépése Trp fluoreszcencia csökkenéssel jár (τ -vel és $\tau\tau$ -vel jelölve). k_1 és k_{-1} sebességi állandók a kötés fázist, k_2 , k_{-2} sebességi állandók a konformáció változási lépés oda és visszaalakulási állandói. N a RecQ által kötött nukleotid, nukleotid analóg, de lehetséges a RecQ nukleotid mentes állapota is.

1/B. tézis: A RecQ DNS-kötésének sebességi állandói nem hosszfüggők. A lassú fázis amplitúdója azonban növekedik a DNS hosszával.

Következtetés: Sem a DNS végeffektusok, sem a lehetséges több RecQ molekula ugyanarra a DNS-re való kötődése nem befolyásolja a megfigyelt jelenséget. Az amplitúdó növekedés az izomerizációs lépés esetén arra mutat, hogy az elfoglalt elsődleges kötés helyen túli ssDNS régiókat is érinthet a RecQ kötése.

1/C. tézis: Az első fázis sebességi állandói, k_{-1} , k_1 is csökkennek a hőmérséklet csökkenésével, de ezek mértéke azonos. A reakció összesített egyensúlyi disszociációs állandója (K_{eq}) hőmérséklet növekedésével csökken.

Következtetés: A RecQ DNS-kötésének első fázisában az azonos sebességi állandó változás miatt K_1 változatlan, az első fázis nem hőmérsékletfüggő. Az összegzett affinitás kisebb 5 °C-on, ami endoterm DNS-kötési reakcióra utal.

1/D. tézis: Az egyes pirén jelölésű RecQ mutánsokban a pirén jel jelen van, míg az excimer jel hiányzik, a dupla pirén jelölésű 4CRecQ mutánsban pirén és excimer jel is található az emissziós spektrumban.

Következtetés: Az excimer csúcs megjelenése az emissziós spektrumban valóban a megfelelő helyeken, a RecA és WH doménon levő, átlapoló pirének jelenlétére utal.

1/E. tézis: A duplán pirén jelölt RecQ4C fehérje excimer jele DNS hatására csökken, a pirén csúcs kis mértékben nő. Az egyszeresen pirén jelölt RecQ mutánsok esetén nem tapasztalható emissziós spektrum jelentős változása.

Következtetés: A pirén excimer jel megszűnése vagy a domének egymáshoz képest való eltávolodását a szerkezetből következően valószínűleg a domének elfordulását jelenti.

1/F. tézis: A duplán pirén jelölt RecQ4C fehérje DNS-kötési stopped-flow görbéje kétfázisú, az első fázis sebességi állandói egyeznek a Trp fluoreszcencia mérésekből adódóakkal, a második fáziséi nem.

Következtetés: A kettős pirén jelölt 4CRecQ fehérjével sikerült kimutatni ugyanazon DNS-kötési lépést, mint a Trp jel megfigyelésével. Illetve megfigyeltünk egy másik, DNS-kötéstől függő izomerizációs lépést, mely a RecA domének és a WH domén eltávolodásával, valószínűsíthetően Recq1-szerű elfordulásával jár.

2/A. tézis: A RecQ fehérje DNS-kötése jelentősen függ a nukleotid állapottól.

Következtetés: Az izomerizációs lépés nukleotid állapottól való függése egyértelműen arra utal, hogy ez a lépés az ATP hidrolízis közben végbemenő konformáció változásoktól függ.

2/B. tézis: Az ADP·AlF₄ állapot esetében sokkal lassabb a kötési reakció, az egyensúlyi állandó megváltozása nélkül. A lassulás oka a visszaalakulás sebességi állandójának (k_{-2}) csökkenése, ami nagy ssDNS-affinitás növekedést okozott.

Következtetés: A DNS kötési sztöchiometriával együtt ez a kinetikai különbség egy, az egyéb nukleotid állapotokénál nagyobb DNS-en elfoglalt kötőhely méretet mutat a RecQ.ADP.AIF₄ komplexre nézve. Az ADP.AIF₄ nukleotid analógot eddig különböző publikációkban különböző ATPáz ciklus köztiállapotként azonosították. Mivel a RecQ.ADP.AIF₄ komplex tulajdonságai a RecQ.AMP.PNP prehidrolízis állapottól lényegesen különböztek, úgy gondoljuk, hogy vagy egy ATP hidrolízis köztes állapotot, vagy egy poszthidrolitikus, ADP.P_i-kötött állapotot képvisel. Ezen eredményeink azt sugallják, hogy a RecQ helikáz ATP hidrolízise konformáció változással jár, amely magában foglalja a DNS-kötő régió záródását.

3. tézis: A RecQ mutánsok DNS-kötése csak egy fázist tartalmaz. A mutáns fehérjék ATPáz aktivitása arra utal, hogy RecA doménjeik integritása nem sérült.

Következtetés: A DNS-kötött RecQ izomerizáció (K_2) lépés nem figyelhető meg a teljesen funkcionális HRDC domén nélkül. A RecQ-d523 és RecQ-Y555A tartalmazza mind a négy természetes triptofánt, tehát az izomerizáció során megváltozik a HRDC domén ssDNS-kölcsönhatása. Ezen két RecQ mutáns mindemellett megőrizte az erős ssDNS-affinitást, ami arra utal, hogy a HRDC doménnek nem a DNS kötés erősítésében van szerepe.

4. tézis: A RecQ helikáz ATPáz ciklusában az AMPPNP-nek megfelelő prehidrolitikus, illetve az ADP.AIF₄-nek megfelelő (véltetően poszthidrolitikus, ADP és foszfát-kötött) állapot fordul elő legnagyobb steady-state arányokban.

Következtetés: Ez arra utal, hogy az ATP-hidrolízis, a foszfát felszabadulás vagy valamely ezen lépésekhez kapcsolt szerkezeti átalakulás a ciklus sebességmeghatározó lépése.

5. tézis: A BLM helikáz fehérjekoncentráció függvényében ábrázolt fluoreszcencia görbéire másodfokú függvény illeszthető, amiből 40 nt hosszúságú DNS-kötőhely méret adódik.

Következtetés: További komplex vizsgálatokkal együtt megállapítottuk, hogy a BLM helikáz főleg monomerként van jelen DNS kötött állapotban, azonban a DNS-szerkezetek bonyolultságának növekedésével oligomerizációra (leginkább dimerizációra) való hajlama kis mértékben nő. A BLM helikáz 40 nt hosszúságú DNS-t vesz igénybe a kötése során, kooperációra való hajlamot nem mutat, transzlokációját monomerként végzi.

Összegzés

Összegezve megállapíthatjuk, hogy doktori disszertációmban felsorolt eredmények és adatok arra utalnak, hogy a DNS-kötött RecQ helikázban egy nukleotid állapot függő térszerkezet változás megy végbe. Ilyen izomerizációt RecQ helikázokban eddig még nem mutattak ki. Megfigyeltünk továbbá egy igen erős DNS-kötött állapotot, amely valószínűsíthetőleg az ATP hidrolízis ssDNS transzlokációhoz való mechanokémiai kapcsolatában játszik szerepet. A jellemzett izomerizáció a HRDC domén ssDNS kötését is magába foglalja, mely nélkül nem detektálható. A korábbi, RecQ helikáz ATPáz aktivitását, ssDNS transzlokációját és dsDNS szálszétválasztási aktivitását érintő munkákkal együtt elvégzett kutatásunk hozzájárul a RecQ helikáz DNS kötésének pontosabb megismerése által a genomkarbantartás mélyebb megértéséhez.

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

Folyóirat cikkek:

Nemzetközi, referált folyóiratban megjelent publikációk:

- Gyimesi M., Pires R. H., Billington N., Sarlós K., **Kocsis Z. S.**, Módos K., Sellers R. J., Kellermayer M. S., Kovács M.
Visualization of Human Bloom's Syndrome Helicase Molecules Bound to Homologous Recombination Intermediates. FASEB Journal 2013; 27(12):4954-64.
- **Kocsis Z. S.**, Sarlós K., Harami G. M., Martina M., Kovács M.
A nucleotide- and HRDC-domain-dependent structural transition in DNA-bound RecQ helicase. Journal of Biological Chemistry, 2014, e-pub 2014 Jan 8, in press (MS ID: JBC/2013/530741)

Konferencia előadások:

- 2013, Hungarian Molecular Life Sciences 2013 Conference, Siófok, Hungary:
Kocsis Z. S., Sarlós K., Kovács M., Harami G. M., Gyimesi M., Martina M., Seol Y., Ferencziová V., Neuman K. C.
Domain Movements and Sequence-specific Pausing of RecQ Helicases.
- 2013, The Student Scientific Conference on Biotechnology and Biomedicine, Brno, Czech Republic:
Kocsis Z. S., Sarlós K., Kovács M., Harami G. M., Gyimesi M., Martina M., Seol Y., Ferencziová V., Neuman K. C.
Domain Movements and Sequence-specific Pausing of RecQ Helicases.

További publikációk

Folyóirat cikkek:

Nemzetközi, referált folyóiratban megjelent publikációk:

- **Kocsis Z. S.**, Molnár C. S., Watanabe M., Daneels G., Moechars D., Liposits Z., Hrabovszky E. Demonstration of vesicular glutamate transporter-1 in corticotroph cells in the anterior pituitary of the rat. Neurochem Int 2009; 56:479-486.

Magyar cikkek:

- **Kocsis Z. S.**, Haracska L., Szüts D., Kovács M.
DNS-hibajavítás a megkettőződés során. Természettudományi közlöny, Természet Világa folyóirat 2013,144. évf 6. füzet
- **Kocsis Z. S.**
Helikáz-gátlók terápiai felhasználása. mRNS.hu, 2013.10.15.
- **Kocsis Z. S.**
Új tudományos megközelítés a rák gyógyításban. Daganatok.hu, 2013.12.05.

Konferencia absztraktok:

- 2008, Meeting of Hungarian Neuroscience Society, Debrecen, Hungary:
Kocsis Z. S.; Deli L.; Kalló I.; Horváth C. M.; Keller É.; Liposits Z.; Hrabovszky E.
Localisation of synaptic vesicle protein-2 in rat and human hypophysis.
- 2009, Meeting of Hungarian Neuroscience Society, Budapest, Hungary:
Kocsis Z. S.; Kalló I.; Wittmann G.; Fekete C.; Liposits Z.; Hrabovszky E.
Occurrence and phenotype of glutamatergic elements in the adenohypophysis of the rat.
- 2011, FASEB Summer Research Conference, Steamboat Springs, USA:
Kocsis Z. S., Pintér L., Haracska L., Kovács M.
Mechanistic basis of the DNA-restructuring activity of the Rad5 double-stranded DNA translocase.
- 2011, Annual Meeting of Hungarian Biochemical Society, Pécs, Hungary:
Kocsis Z. S., Pintér L., Haracska L., Kovács M.
Mechanistic basis of the DNA-restructuring activity of the Rad5 double-stranded DNA translocase.
- 2012, Biophysical Society 56th Annual Meeting, San Diego, USA:
Kocsis Z. S., Pintér L., Haracska L., Kovács M.
Mechanochemistry of the Rad5 double-stranded DNA translocase.
- 2012, FEBS3+ Meeting, Opatija, Croatia:
Kocsis Z. S., Pintér L., Haracska L., Kovács M.
Fork reversal by Rad5: Molecular basis.
- 2012, IUBMP&FEBS YSP, Cadiz, Spain:
Kocsis Z. S., Pintér L., Haracska L., Kovács M.
Molecular mechanism of the fork reversal by Rad5.
- 2012, IUBMP&FEBS, Sevilla, Spain:
Kocsis Z. S., Pintér L., Haracska L., Kovács M.
Molecular mechanism of the fork reversal by Rad5.