

A RecQ helikázok mechanobiokémiája

Sarlós Kata

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: Professzor Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Program

Programvezető: Professzor Gráf László

Témavezető: Dr. Kovács Mihály, tudományos főmunkatárs



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Biológiai Intézet
Biokémiai Tanszék

2012

BEVEZETÉS

Az élet alapvető információit kódoló molekula a DNS, melynek stabil, zárt szerkezete az információ hosszú távú megőrzésére rendkívül alkalmassá teszi. Ennek ellenére a DNS a szervezet normális, fiziológiás működése során számos károsító hatásnak van kitéve (pl. az anyagcsere során keletkező reaktív oxigénradikálok, UV, stb.), melyek különböző típusú hibákat okoznak. E hibák kijavítására specifikus, evolúciósan konzervált útvonalak jöttek létre, melyekben dedikált enzim komplexek látnak el rendkívül összetett és finoman szabályozott feladatokat. A sejt számára az egyik legtoxikusabb DNS hiba a kettős száltörés, mely már kis számban is programozott sejtihalált indíthat be.

A homológ rekombináció (HR) egy olyan evolúciósan konzervált folyamat, mely kettős szerepet tölt be az élő szervezetben. Egy részről a meiózis során biztosítja az anyai és apai információk keveredését, más részről a DNS kettős száltörés információmegőrző, hibamentes javítását teszi lehetővé. A HR számos lépése során esszenciális a kettős szálú (ds) DNS szétválasztása. Azon enzimeket, melyek a dsDNS szálainak elválasztására képesek helikázoknak nevezzük. A helikázok olyan motor enzimek, melyek a nukleotid trifoszfátokban (általában ATP) rejlő energiát az egyszálú (ss) DNS (néhány esetben RNS) menti egyirányú haladássá (transzlokáció) alakítják, szétválasztva ez által a dsDNS (illetve RNS) szálait.

A HR-ben a RecQ család enzimei kulcs szerepet töltenek be. A család tagjai az élővilágban mindenhol képviseltetik magukat, az *Escherichia coli* (*E. coli*) RecQ-tól az öt különböző humán formáig. Jelentőségüket tükrözi, hogy az öt humán enzimből három funkcióvesztéses mutációja súlyos, autoszómás betegségekkel köthető össze, melyek közös jellemzője a különböző rákos megbetegedésekre való fokozott hajlam. Ezek a Bloom szindróma (BLM helikáz), a Werner szindróma (WRN helikáz), valamint a Rothmund-Thomson szindróma (RecQL4). Jelen dolgozat fő szereplői a RecQ és BLM helikázok.

A RecQ és BLM helikázok részt vesznek a HR korai, úgynevezett minőség ellenőrzési szakaszában, melynek során a rekombinációs intermedierek szétválasztását végzik. Ennek a folyamatnak fontos szerepe van a nem allélikus, ún. illegitim rekombináció megakadályozásában. Más részről a HR későbbi szakaszaiban a folyamat továbbvitelét támogatják, fontos szerepük van a HR minden útvonalán megjelenő intermedierek, a Holliday szerkezet oly módon történő feloldásában, mely információmegőrző, nem átkeresztződött termékeket eredményez. A DNS kettős száltörés javítása mellett a RecQ és BLM helikázoknak fontos szerepe van az elakadt replikációs villák stabilizálásában, és feldolgozásában, szintén HR közvetítette módon.

Minden RecQ helikáz szerkezetének alapját két RecA domén képzi, melyek az ATP-kötő zsebet alkotják. Ez a szerkezeti elem a helikázok körében általánosan elterjedt, szinte mindenhol előfordul (ahol nem, ott AAA⁺ domén helyettesíti), konzervált motívum, mely a közös evolúciós eredetük bizonyítéka. A két RecA doménon kívül a RecQ helikázokra jellemző egyedi domén az úgynevezett RecQ-C-terminális domén, melyet egy cink-kötő szerkezet stabilizáló domén (ZB) és egy szárnyas-hélix domén (WH) épít fel. Ezeken kívül szintén majdnem minden RecQ helikázban jelen van az úgynevezett HRDC (Helikáz/RN-áz D C-terminális) domén, melynek szerepe még nem teljesen tisztázott. Az *E. coli* RecQ helikáz ezekből a szerkezeti elemekből épül fel, valamint a BLM helikáz úgynevezett helikáz modulját (BLM^{HM}, a 642-1290 aminosavak által alkotott régió) szintén ezek a domének alkotják. A teljes hosszúságú BLM-et még számos, feltehetően fehérje-fehérje interakciókért, oligomerizációért, illetve sejtmagi lokalizációs jelként szolgáló szerkezeti elemek alkotják. A RecQ helikázzal rendelkező *apo* és ATP- γ -S kötött kristályszerkezettel (melyről a HRDC domén hiányzik), a BLM helikáz modulját eddig még semmilyen állapotban nem sikerült kristályosítani. DNS kötött szerkezet sem a RecQ, sem a BLM esetében nem készült, így a DNS kötésének pontos helyére, illetve a szászétválasztásért és transzlokációért fontos szerkezeti elemek szerepére csak funkcionális tesztekkel következtethetünk.

A fent említett okokból kifolyólag a RecQ és BLM helikázok *in vivo* és biokémiai tulajdonságai széles körben kutattak. Hiányzik viszont egy olyan átfogó modell, mely az alapvető aktivitásokat (ATP-áz, transzlokáz, helikáz) leírja, valamint ezek kapcsoltságát meghatározza. Hipotézisünk szerint az alap molekuláris mechanizmusok kvantitatív megértése számos olyan kérdésre ad választ, mely más megközelítéseken keresztül nem volt elérhető.

CÉLKITŰZÉSEK

Célunk volt a RecQ és BLM helikázok molekuláris működésének megértése, bővebben annak felderítése, hogy az ATP-áz ciklus egyes lépései hogyan kapcsolnak a DNS-sel történő interakcióval, és mindez hogyan és milyen mechanizmussal eredményez processzív transzlokációt a DNS-sín mentén. Ennek érdekében a következő lépéseket tettük:

- Lépésenként megvizsgáltuk a RecQ és a BLM ATP-áz ciklusát, valamint a DNS ezekre gyakorolt hatását.
- Részletesen vizsgáltuk a RecQ DNS-sel való kölcsönhatásának kinetikáját különböző nukleotid állapotokban.

- Kidolgoztunk egy általános módszert bármely NTP-függő nukleinsav mentén mozgó motorfehérje transzlokációjának karakterizálására.
- A fentebb említett, valamint más kiegészítő módszerekkel karakterizáltuk a RecQ és a BLM egyszálú DNS menti transzlokációját.
- Globális kinetikai modellezéssel validáltuk a RecQ helikáz kísérletes adatok alapján kidolgozott mechanokémiai működési modelljét.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- Rekombináns fehérjék klónozása genomi DNS-ből PCR reakcióval, a RecQ és BLM^{HM} konstrukciók NcoI és LglI restriktációs hasító helyek közé történő inszertálása pTXB3 plazmidba.
- A fehérjék expresszióját RecQ esetén *E. coli* B ER2566, BLM^{HM} esetén pedig *E. coli* BL21 Rosetta sejtben végeztük.
- Fehérje tisztítás:
 - Affinitás kromatográfia – intein-kitinkötő fehérje – kitin oszlop (RecQ, BLM^{HM})
 - Affinitás kromatográfia – heparin oszlop (RecQ, BLM^{HM})
 - Ioncsere kromatográfia – CM oszlop (BLM^{HM})
 - Ioncsere kromatográfia – Q Sepharose FF (Foszfátkötő fehérje - PBP)
- Fehérje módosítás: Foszfátkötő fehérje jelölése MDCC-vel (7-dietilamino-3-(((2-malemidil)etil)amino)karbonil)kumarin)
- *Steady-state* kinetikai mérések PK/LDH kapcsolt reakcióval (bazális és DNS-aktivált; Shimadzu UV-2101PC spektrofotométer)
- Egyensúlyi fluoreszcencia titrálás – RecQ triptofán (Trp) fluoreszcencia (SPEX Fluoromax spektrofluorométer)
- Gyorskinetikai mérések
 - KinTek-2004, BioLogic SFM-300/400
 - Fluoreszcens jelek:
 - Trp – gerjesztés: 280 nm illetve 297 nm, filter: 320 LP, 340 IF
 - MDCC-PBP – gerjesztés: 436 nm, filter: 455 LP
 - mdATP/ADP ((3'-(N-methylantraniloyl)-2'-deoxy-ATP és -ADP) – gerjesztés: 280 nm, filter 420 LP
- Oxigén kicserélődéses kísérletek
- SDS-PAGE

EREDMÉNYEK (TÉZISEK)

- Kidolgoztunk egy általánosan használható módszert NTP-áz motor enzimek nukleinsavak menti direkcionális mozgásának karakterizálására.
- A fent említett és más, kiegészítő módszerekkel karakterizáltuk a BLM helikáz ssDNS menti transzlokációjának mechanizmusát:
 - A BLM^{HM} random módon, 12-14 nukleotidot lefedve köt az ssDNS-hez.
 - A BLM^{HM} helikáz 1 ATP elfogyasztása alatt 1 nukleotid egységet tesz meg a DNS mentén, úgynevezett araszoló („inchworm”) mechanizmussal.
 - Az enzim egyszeri futás során átlagosan 50 ATP-áz cikluson megy keresztül.
 - Meghatároztuk a BLM^{HM} transzlokációját jellemző legfontosabb sebességi állandókat (transzlokációs sebesség, ATP-áz aktivitás transzlokáció során illetve a végen, disszociáció a végről, illetve belső régiókról)
- Karakterizáltuk a RecQ helikáz ATP-áz ciklusának lépéseit
 - A gyors és reverzibilis nukleotid (ATP, ADP) kötés a DNS jelenlététől független folyamat.
 - A ciklus sebesség-meghatározó lépése DNS távollétében az irreverzibilis ATP hidrolízis, melyet a DNS jelentős mértékben gyorsít, de ennek ellenére sebesség-meghatározó marad.
 - A foszfát felszabadulás gyors és irreverzibilis.
- Karakterizáltuk a RecQ helikáz és az ssDNS interakciójának részleteit:
 - A DNS kötés egy kétlépéses folyamat, mely egy gyors asszociációból és egy lassú izomerizációból áll.
 - A kötött nukleotid allosztérikus hatásán keresztül jelentős mértékben befolyásolja a DNS kötés és felszabadulás kinetikáját.
 - A feltehetően poszthidrolitikus ADP·AlF₄-kötött állapot egy olyan zárt szerkezeti állapotot indukál, melyben a DNS kötése és elengedése jelentős mértékben gátolt (Az enzim feltehetően „ráfog” a DNS sínre). Ebből arra következtethetünk, hogy a hidrolízis egy olyan szerkezeti változással kapcsolt folyamat, mely a DNS affinitás erősödését idézi elő, ez feltehetően egy DNS menti mechanikai lépéssel összekötött folyamat.
- Szintén a fent említett és más, kiegészítő módszerekkel karakterizáltuk a RecQ helikáz ssDNS menti transzlokációjának mechanizmusát:
 - A RecQ 18 nukleotidot fed le az ssDNS-en.

- A RecQ helikáz 1 ATP elfogyasztása alatt 1 nukleotid egységet tesz meg a DNS mentén, úgynevezett araszoló („inchworm”) mechanizmussal.
- Az enzim egyszeri futás során átlagosan 110-350 ATP-áz cikluson megy keresztül.
- Meghatároztuk a RecQ transzlokációját jellemző legfontosabb sebességi állandókat (transzlokációs sebesség, ATP-áz aktivitás transzlokáció során illetve a végen, disszociáció a végről, illetve belső régiókról)
- Az ATP-áz ciklus és a DNS kötés paramétereinek segítségével megalkottunk egy összegző mechanisztikus modellt a RecQ működéséről. Ezt a modellt a kísérletileg meghatározott paraméterek segítségével globális kinetikai szimulációkkal validáltuk.

KÖVETKEZTETÉSEK

- Kidolgoztunk egy általános módszert nukleinsav motorok mechanokémiai karakterizálására
- Ezzel a módszerrel karakterizáltuk a RecQ és BLM helikázok ssDNS menti transzlokációját, melyek eltérései nagy valószínűséggel nem az evolúciós kapcsolatot, hanem a funkcionális adaptációt tükrözik.
- A RecQ ATP-áz ciklusának hidrolízis lépése sebesség meghatározó mind DNS jelenlétében, mind távollétében, annak ellenére, hogy ezt a lépést a DNS jelentős mértékben aktiválja.
- A hidrolízis lépés egy olyan szerkezetváltozáshoz kapcsolt folyamat, mely a poszthidrolízis állapot (ADP.P_i) DNS-re zárt állapotát idézi elő. Ez feltehetően egy ssDNS menti transzlokációs lépéssel együtt jár.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

I. Tudományos közlemények

Sarlós, K., Gyimesi, M., Kovács, M (2012) RecQ helicase translocates along single-stranded DNA with a moderate processivity and tight mechanochemical coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* (Publikálásra elfogadva).

Gyimesi, M, **Sarlós, K.**, Kovács, M (2010) Processive translocation mechanism of the human Bloom's syndrome helicase along single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 38:4404-4414.

Gyimesi, M, **Sarlós, K.**, Derényi, I, Kovács, M (2010) Streamlined determination of processive run length and mechanochemical coupling of nucleic acid motor activities. *Nucleic Acids Res* 38:e102.

II. Konferencia kivonatok

Sarlós, K., Gyimesi, M., Kovács, M. (2010): Mechanism of DNA-dependent enzymatic activation of *Escherichia coli* RecQ helicase. *54th Annual Meeting of the Biophysical Society*, San Francisco, CA, USA

Gyimesi, M., Sarlós, K., Kovács, M. (2009): Mechanism of translocation of the BLM helicase along DNA. *Central-Eastern European INSTRUCT Meeting, Budapest*

Gyimesi, M., **Sarlós, K., Kovács, M.** (2009): Mechanism of translocation of the BLM helicase along DNA. *EMBO Young Investigator Meeting, Istanbul, Turkey*

Gyimesi, M., **Sarlós, K., Kovács, M.** (2009): Processive translocation mechanism of the human Bloom's syndrome helicase along single-stranded DNA. *EMBO Meeting on Helicases and Nucleic Acid Machines, Les Diablerets, Switzerland*

Sarlós, K., Gyimesi, M., Kovács, M. (2009): Mechanism of DNA-dependent enzymatic activation of *Escherichia coli* RecQ helicase. *EMBO Meeting on Helicases and Nucleic Acid Machines, Les Diablerets, Switzerland*

Gyimesi, M., Sarlós, K., Kovács, M. (2009): Processive translocation mechanism of the human Bloom's syndrome helicase. *Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Budapest, Hungary*

Sarlós, K., Gyimesi, M., Kovács, M. (2009): Mechanism of DNA-dependent enzymatic activation of *Escherichia coli* RecQ helicase. *Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Budapest, Hungary*

Gyimesi, M., Sarlós, K., Kovács, M. (2009): Working mechanism of the human Bloom's syndrome helicase. *53rd Annual Meeting of the Biophysical Society, Boston, MA, USA*

(Az előadó szerző aláhúzva)