

OTKA projekt záró beszámoló
K-71915 – DNS helikáz motorok enzimológiája

Projektidőszak: 2008.04.01-2012.04.30

Témavezető: Kovács Mihály, ELTE TTK Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék

1. A projekt célkitűzése

A RecQ családba tartozó DNS-helikázok minden élőlényben központi szerepet játszanak a genom épségének fenntartásában. Kiemelkedő biológiai és gyógyászati jelentőségük ellenére e fehérjék sokrétű aktivitásainak molekuláris mechanizmusai legnagyobb részben felderítetlenek. A projekt során a RecQ helikázok biológiai „prototípusának” tekinthető *E. coli* RecQ enzim, valamint az öt humán RecQ-homológ közül a DNS-hibajavításban legfontosabb szerepet játszó Bloom-szindróma helikáz (BLM) működési mechanizmusát kívántuk felderíteni élvonalbeli gyorskinetikai, spektroszkópai és egyedimolekula-biofizikai technikák alkalmazásával. Kísérleteinkben az enzimek DNS-szállakon történő haladását (transzlokáció), DNS-szálszétválasztó aktivitását, a rekombinációs hibajavítás során megjelenő bonyolultabb DNS-szerkezetek (D-hurok, Holliday-szerkezet) enzimátikus feloldását, illetve a felsorolt aktivitásokat energetikailag lehetővé tevő ATP-hidrolitikus aktivitást és az enzimek szerkezetváltozásait vizsgáltuk.

2. Elért eredmények

2.1 Motoraktivitás jellemzésére alkalmas eljárás kidolgozása

Kidolgoztunk és publikáltunk egy olyan analitikai eljárást, amelynek segítségével a nukleinsavak mentén haladó motorfehérjék (transzlokázok, helikázok, polimerázok) legfontosabb működési jellemzői (egy ATP-hidrolízis ciklus alatt megtett nukleinsav-hossz, transzlokációs és szálszétválasztási sebesség, ATPáz aktivitás, processzivitás) tranzienst kinetikai kísérletsorozatokban meghatározhatók (1).

2.2 A humán BLM helikáz motorenzimátikus és DNS-átalakító mechanizmusa

Meghatároztuk és publikáltuk a BLM helikáz egyszálú DNS-en történő transzlokációjának mechanizmusát (2). Kimutattuk, hogy a BLM szoros mechanokémiai kapcsoltsággal (1 ATP hidrolízise/1 nukleotid egység (nt) transzlokáció a DNS-szállon) és mérsékelt processzivitással (50 nt várható futáshosszal) halad a DNS-szállakon. Eredményeink egy olyan egyenirányított, araszoló mozgási mechanizmusra engednek következtetni, amelynek részletes megismerése elősegítheti a BLM hibajavító funkcióinak illetve más helikázok és DNS-motorok működésének jobb megértését.

Kísérleteinkben nagy időbeli felbontással közvetlenül mértük az ATP fogyasztást illetve az enzim és az ATP, valamint az enzim és a DNS közötti kölcsönhatást. Az ATPáz ciklus során sem az ATP hidrolízis, sem a termékfelszabadulás lépései nem bizonyultak sebesség-meghatározónak. Az általunk javasolt modellben a BLM az egyszálú DNS-en araszoló mozgással halad, melynek során a sebesség-meghatározó lépés a foszfát felszabadulását követő szerkezeti átrendeződés. Ez a transzlokációs mechanizmus, melyet a humán DNS-helikázok esetében elsőként írtuk le, számos olyan meghatározó tulajdonsággal bír, melyek jelentősen eltérnek a korábban jellemzett helikázoktól.

2.3 A humán BLM helikáz szerkezeti elemeinek szerepe a DNS-átalakító aktivitásokban

A humán BLM helikáz doménjeinek szerepét vizsgálva azt a felfedezést publikáltuk, hogy egy, a korábban vizsgáltaknál rövidebb „csonka” konstrukció a teljes enzim valamennyi alapvető enzimaktivitásával rendelkezik, így az enzimműködés hatékony, könnyen

vizsgálható modelljévé válhat (3). Ezek az eredmények rávilágítottak arra, hogy a fenti „csonka” konstrukcióból hiányzó szárnyas hélix (*winged helix*) domén – a más RecQ-helikázokban tapasztaltaktól eltérően – nem közvetlenül a DNS-szálak szétválasztásában, hanem bonyolultabb DNS-szerkezetek felismerésében játszhat szerepet (beküldés előtt álló összefoglaló kézirat (7)). Ezt a feltételezést alátámasztják további kísérleteink, amelyekben azt tapasztaltuk, hogy a három- illetve négyszálú D-hurok-struktúrák feloldásának hatékonyságát a szárnyas hélix domén nagymértékben megnöveli (előkészületben lévő cikk (6)).

2.4 A humán BLM helikáz szubsztrát-indukált oligomerizációja

A humán BLM helikáz oligomerizációs állapotát oldatbeli és egyedimolekula-mérésekkel megvizsgálva azt – az eddigi nézeteknek ellentmondó – megfigyelést tettük, hogy a nagyrészt monomer formában működő enzim oligomerizációs állapota az átalakítandó DNS-szubsztrát szerkezetétől függően, alegység-kölcsönhatásokon keresztül dinamikus szabályozás alatt áll (bírálat alatt álló kézirat (5)).

2.5 Az *E. coli* RecQ helikáz mechanoenzimatis működése

Kísérleteink alapján megalkottuk és publikáltuk az *E. coli* RecQ helikáz mechanokémiai aktivitásának részletes, kvantitatív modelljét (4). A modell pontos leírást ad az enzimatis (ATPáz) aktivitás és a DNS-en történő tovahaladás (transzlokáció) molekuláris eseményeinek kapcsoltágáról, és ezen keresztül a mechanoenzimatis aktivitás processzivitásáról, sebességéről és energetikai hatékonyságáról. Kimutattuk, hogy az *E. coli* RecQ helikáz a humán BLM helikázéhoz hasonló szoros mechanokémiai kapcsoltággal (1 ATP hidrolízise/1 nukleotidegység (nt) transzlokáció a DNS-szálon), viszont annál jelentősen magasabb processzivitással (100-330 nt várható futáshosszal) halad a DNS-szálakon.

További kísérleteinkben kimutattuk, hogy a DNS jelenléte sem az ATP, sem az ADP RecQ-hoz történő kötődését nem befolyásolja. Quenched-flow kísérletekkel sikerült azonban kimutatni, hogy a DNS jelenléte az ATP-hidrolízist nagymértékben elősegíti. Eredményeink azt mutatják, hogy a RecQ enzimatis ciklusában a különböző nukleotid-állapotok DNS-kötési kinetikája jelentősen eltér; a poszthidrolitikus állapot kötődik a legerősebben a DNS-hez. Ez arra utal, hogy a mechanikai lépés az ATP-hasítási lépéshez kapcsoltan történik (beküldés előtt álló kézirat (8)).

2.6 RecQ helikázok szerkezetváltozásainak vizsgálata egy-triptofános konstrukciókkal

Az RecQ és BLM enzimek különböző szerkezeti régióiban a mechanoenzimatis aktivitás során bekövetkező konformációváltozások teljesen felderítetlenek. E változások vizsgálatához előállítottunk és jellemeztünk egy-triptofános mutáns RecQ és BLM konstrukciókat. A RecA-doménben egyedi triptofánt tartalmaznak a RecQ-W154+ és BLM-W803+ konstrukciók, illetve a HRDC doménben egyedi triptofánt tartalmaz a BLM-W1288+ konstrukció. Az ezen konstrukciókkal kapott adatok jelenleg feldolgozás alatt állnak.

2.7 A DNS-szálszétválasztás fizikai mechanizmusa

Részletesen jellemeztük a RecQ és BLM helikázok DNS-szálszétválasztó aktivitását a DNS-szubsztráton elhelyezett FRET jelek, illetve az aktivitás során az ATP-hidrolízisből felszabaduló szervesetlen foszfát fluoreszcens foszfátkötő fehérjével történő követése révén. A szálszétválasztó aktivitás sebessége és processzivitása a korábban jellemzett egyszálú DNS-transzlokációs aktivitáséhoz hasonló, ami aktív DNS-duplex-destabilizáló mechanizmusra utal. Mágnesesapadás egyedi molekula-vizsgálatokban azt a meglepő eredményt kaptuk, hogy a transzlokáció és a DNS-szálszétválasztás ATP-kapcsolási sztöchiometriája (azaz az 1 ATP

hidrolízise során transzlokált illetve szétválasztott nukleotid-egységek illetve bázispárok száma) hőmérsékletfüggő. Ezek az adatok jelenleg feldolgozás alatt állnak.

2.8 A RecQ helikázok együttműködése más rekombinációs fehérjékkel

Jellemeztük az SSB (egyszálú DNS-kötő) fehérje hatását a RecQ helikáz ATPáz és DNS-transzlokációs aktivitására. Méréseinkben a teljes hosszúságú SSB fehérje mellett annak C-terminális oktapeptidjét is használtuk, amely korábbi vizsgálatokban a teljes fehérjével megegyező affinitással kötődött a RecQ helikázhoz. Az SSB illetve a C-terminális peptid nem befolyásolta a DNS-aktivált ATPáz illetve egyszálú DNS-transzlokációs aktivitásokat, amiből arra következtetünk, hogy az SSB korábban kimutatott DNS szétválasztás-serkentő aktivitása kétszálú DNS-struktúráktól függő módon fejtődik ki (előkészületben lévő kézirat (9)).

Megvizsgáltuk a BLM helikáz Rad51 rekombináz nukleoprotein-lebontó aktivitását, amely folyamat kimagasló jelentőségű a rekombináció minőségellenőrzésében. Az e témában kapott adataink jelenleg feldolgozás alatt állnak (előkészületben lévő kézirat (10)).

3. A projektből származó publikációk, sajtómegjelenések

3.1 Referált folyóiratban megjelent nemzetközi publikációk

1. Gyimesi, M., Sarlós, K., Derenyi, I., **Kovács, M.** (2010): Streamlined determination of processive run length and mechanochemical coupling of nucleic acid motor activities. *Nucleic Acids Res.* 38: e102.
2. 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: 4404-14.
3. Gyimesi, M., Harami, G. M., Sarlós, K., Hazai, E., Bikádi, Z., **Kovács, M.** (2012): 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 Jan 16 [Epub ahead of print]
4. 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. USA*, in press

3.2 Előkészületben illetve bírálat alatt álló nemzetközi publikációk

5. Gyimesi, M., Pires, R.H., Billington, N., Sarlós, K., Kocsis, Z. S., Módos, K., Sellers, J. R., Kellermayer, M. S., **Kovács, M.** (2012): Monomeric form of the human Bloom's syndrome helicase is recruited to various homologous recombination intermediates
6. Harami, G., Gyimesi, M., **Kovács, M.** (2012): Mechanism of D-loop disruption by the human Bloom's syndrome helicase
7. Harami, G., Gyimesi, M., **Kovács, M.** (2012): Roles of the winged helix domain in DNA binding proteins
8. Sarlós, K., Gyimesi, M., Kele, Z., **Kovács, M.** (2012): Insights into the DNA activation of the RecQ enzymatic cycle reveal mechanistic diversity within RecQ-family helicases
9. Harami, G., **Kovács, M.** (2012): Effect of the SSB protein on the mechanoenzymatic action of RecQ helicase
10. Spirek, M., Harami, G., Gyimesi, M., Nagy, N., Molnár, E., Krejci, L., **Kovács, M.** (2012): Effects of RecQ-family helicases on the formation and disassembly of human Rad51 nucleoprotein filaments

3.3 Magyar nyelvű cikkek, interjúk

11. Takács Balázs, **Kovács Mihály** (2009): Motorok a sejtben – Mi hajt bennünket? *Élet és Tudomány*, LXIV/6.
12. Sarlós Kata, Gyimesi Máté, **Kovács Mihály** (2009): Anyagmozgatás és információ-továbbítás a sejtben: biológiai motorok. *Természet Világa*, 2009 május
13. Képességek kibontakozása a mai Magyarországon. *Nemzeti Tehetségsegítő Tanács honlapja*, 2009
14. Kalandvágyból építkezni. *Nyúz (Az ELTE TTK hetilapja)*, 2009. okt. 21.
15. Hibajavító fehérjemotorok. *OTKA – A hónap kutatója*, 2010 február
16. Gyimesi Máté, Vellai Tibor, **Kovács Mihály** (2010): A genetikai állomány stabilitása: helikáz enzimek szerepe a DNS-hibajavításban. *Természet Világa*, 2010 március
17. A motorenzimek szerepe a rákkutatásban. *MTA honlap – A tudomány hírei*, 2011. júl. 5.
18. Mozgató enzimek. *Figyelő*, 55/33. 2011. aug. 18-24.
19. Hibák a DNS-ben. *ELTE honlap*, 2012. feb. 22.

3.4 Médiamegjelenések

20. ATV, *Jam*. 2009. feb. 18.
21. Info Rádió, *Talentum*. 2009. feb. 20.
22. mr1 Kossuth Rádió, *Szonda*. 2009. feb. 22.
23. Fúzió Rádió, *Délutáni Randevő*. 2009. márc. 12.
24. Duna TV, *Mentor – Magyar csillagok*. 2009. márc. 29.
25. mr1 Kossuth Rádió, *Esti beszélgetés tudományról*. 2009. ápr. 17.
26. m1, *Delta*. 2011. okt. 22.
27. m1, *Delta*. 2012. ápr. 14.

3.5 Konferencia-kivonatok

28. Gyimesi, M., **Kovács, M.** (2008): A humán BLM helikáz működési mechanizmusa. *A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése*, Szeged
29. 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
30. Gyimesi, M., Sarlós, K., **Kovács, M.** (2009): Mechanism of translocation of the BLM helicase along DNA. *Central-Eastern European INSTRUCT Meeting*, Budapest
31. Gyimesi, M., Sarlós, K., **Kovács, M.** (2009): Mechanism of translocation of the BLM helicase along DNA. *EMBO Young Investigator Meeting*, Istanbul, Törökország
32. 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, Svájc
33. 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, Svájc
34. Gyimesi, M., Sarlós, K., **Kovács, M.** (2009): A humán Bloom szindróma helikáz processzív transzlokációs mechanizmusa. *A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése*, Budapest
35. Sarlós, K., Gyimesi, M., **Kovács, M.** (2009): A DNS-függő enzimaktiváció szerepe a RecQ helikáz működésében. *A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése*, Budapest

36. 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
37. Gyimesi, M. Sarlós, K., Harami, G., Kocsis, Z., **Kovács, M.** (2010): Deciphering the mechanochemistry of RecQ-family DNA helicases. *EMBO DNA Repair Meeting*, Brno, Csehország
38. Gyimesi, M., Pires, R. H., Sarlós, K., Módos, K., Kellermayer, M. S., **Kovács, M.** (2010): The role of substrate induced oligomerization in the working mechanism of the human Bloom's syndrome DNA helicase (BLM). *A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése*, Budapest
39. Gyimesi, M., Sarlós, K., **Kovács, M.** (2011): Two RecA domains comprise a minimal functional unit of the human BLM helicase. *55th Annual Meeting of the Biophysical Society*, Baltimore, MD, USA
40. Sarlós, K., Gyimesi, M., Neuman, K.C., **Kovács, M.** (2011): Mechanochemistry of DNA helicases. *HFSP Meeting*, Montreal, Kanada
41. Sarlós, K., Gyimesi, M., Neuman, K.C., **Kovács, M.** (2011): Temperature-dependent switch in the mechanochemical activity of RecQ helicases. *Central European Meeting on Genome Stability and Dynamics*, Pozsony, Szlovákia
42. Gyimesi, M., Harami, G., Sarlós, K., **Kovács, M.** (2011): Basic homologous recombination activities can be performed by the minimal core of Bloom's syndrome helicase. *Central European Meeting on Genome Stability and Dynamics*, Pozsony, Szlovákia
43. Kocsis, Z. S., Pintér, L., Haracska, L., **Kovács, M.** (2011): Non-canonical helicase in DNA repair. *TÁMOP Meeting*, Dobogókő
44. Sarlós, K., Gyimesi, M., **Kovács, M.** (2011): Harnessing of chemical energy for mechanical work in DNA-restructuring enzymes. *TÁMOP Meeting*, Dobogókő
45. Gyimesi, M., Sarlós, K., Harami, G., Kocsis, Z. S., Pires, R. H., Módos, K., Derényi, I., Kellermayer, M., **Kovács, M.** (2011): Stability and variability: genome-maintaining activities of DNA-restructuring motor enzymes. *TÁMOP Meeting*, Dobogókő
46. Harami, G., Gyimesi, M., Sarlós, K., **Kovács, M.** (2011): Functional anatomy of the human Bloom's syndrome helicase. *FASEB Helicase Meeting*, Steamboat Springs, CO, USA
47. Sarlós, K., Gyimesi, M., Pires, R. H., Módos, K., Kellermayer, M. S. Z., **Kovács, M.** (2011): Dynamic switch between assembly states of the human Bloom's syndrome helicase during homologous recombination. *FASEB Helicase Meeting*, Steamboat Springs, CO, USA
48. Kocsis, Z. S., Pintér, L., Haracska, L., **Kovács, M.** (2011): ATPase properties of a non-canonical helicase. *FASEB Helicase Meeting*, Steamboat Springs, CO, USA
49. **Kovács, M.** (2011): Stability and variability: genome-maintaining activities of DNA-restructuring motor enzymes. *25th Anniversary of the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA)*, Budapest
50. Gyimesi, M., Harami, G., Sarlós, K., Roy, D., **Kovács, M.** (2011): Bloom's syndrome helicase: functional anatomy of a DNA-restructuring motor protein. *A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése*, Pécs
51. Kocsis, Z. S., Pintér, L., Haracska, L., **Kovács, M.** (2011): ATPase properties of a non-canonical helicase. *A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése*, Pécs
52. Harami, G., Gyimesi, M., Sarlós, K., **Kovács, M.** (2011): Enzymatic processes in DNA repair: Genome maintaining activities of RecQ helicases. *4th European Conference on Chemistry for Life Sciences*, Budapest

53. Kocsis, Z. S., Pintér, L., Haracska, L., **Kovács, M.** (2012): Mechanochemistry of the Rad5 double-stranded DNA translocase. *56th Annual Meeting of the Biophysical Society*, San Diego, CA, USA
54. Harami, G., Gyimesi, M., **Kovács, M.** (2012): Mechanism of D-loop disruption by the human Bloom's syndrome helicase. *56th Annual Meeting of the Biophysical Society*, San Diego, CA, USA
55. Gyimesi, M., Pires, R. H., Sarlós, K., Nagy, N. T., Módos, K., Kellermayer, M. S. Z., **Kovács, M.** (2012): Dynamic switch between assembly states of the human Bloom's syndrome helicase during homologous recombination. *56th Annual Meeting of the Biophysical Society*, San Diego, CA, USA
56. Gyimesi, M., Harami, G., Pires, R. H., Sarlós, K., Hegyi, G., Módos, K., Kellermayer, M. S., **Kovács, M.** (2012): Mechanism of regulation of homologous recombination by the human Bloom's syndrome helicase. *FEBS3+ Meeting*, Opatija, Horvátország
57. Kocsis, Z. S., Pintér, L., Haracska, L., **Kovács, M.** (2012): Mechanochemistry of the Rad5 double-stranded DNA translocase. *FEBS3+ Meeting*, Opatija, Horvátország