



EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR BIOKÉMIAI TANSZÉK

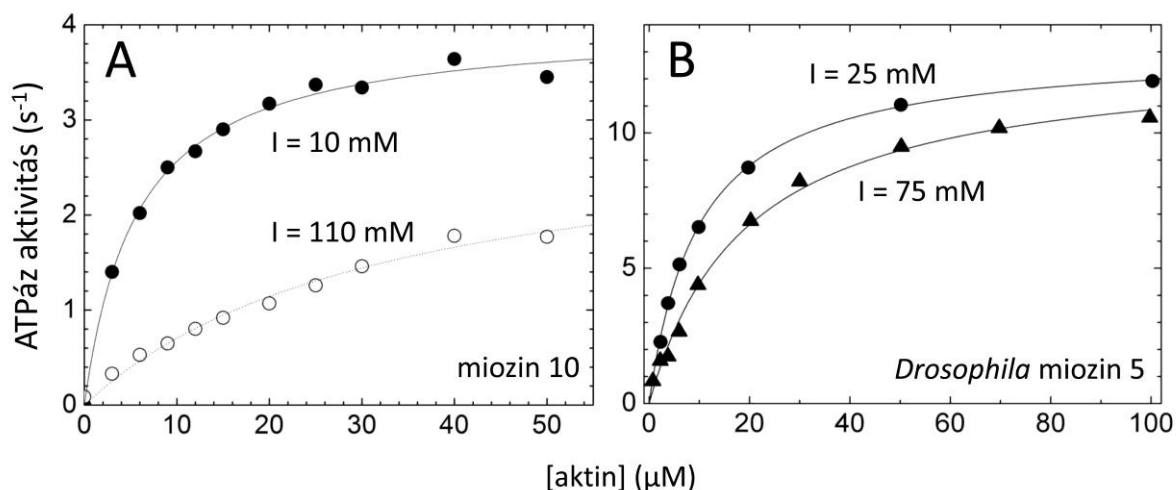
Válasz Dr. Haracska Lajos bírálói véleményére

Köszönöm a bírálónak dolgozatom gondos és precíz bírálatát. A bírálatban feltett kérdések a dolgozatban tárgyalt problémák további alapos végiggondolására ösztönöztek, és a közeljövőre tervezett munkáinkhoz is hasznos kiindulópontokat adtak. A feltett kérdésekre adott válaszaim a következők:

1. A miozinra mért kinetikai paramétereket mennyire befolyásolhatják a reakciókörülmények, pl. ionerősség vagy pH. Ezzel kapcsolatban felvetődik az a kérdés is, hogy mennyire összehasonlíthatóak a különböző miozin formák kinetikai paraméterei, ha azokat nem teljesen azonos kísérleti körülmények között állapították meg – mint pl. az 1-es táblázatban közöltek, amelyek egy része támaszkodik csak saját mérésekre, míg a többi az irodalomból nyert érték.

Az 1-2. táblázatokban közölt, saját és más laborokban meghatározott adatok a tudományterületen kialakult általános konszenzusnak megfelelő mérési körülmények között kerültek meghatározásra 25°C-on, pH 7-en, 75-125 mM ionerősségű oldatban. E konszenzus az élettani körülmények lehetőség szerinti reprodukálása, illetve az izolált fehérjék stabilitása által diktált gyakorlati szempontok nyomán alakult ki. A 14. cikkünkben közölt *temperature-jump/stopped-flow* módszer alkalmas humán enzimek 37°C-on történő vizsgálatára is, a humán miozinok ilyen körülmények között történő átfogó jellemzése azonban még nem történt meg.

A miozinok ismertett nagyfokú funkcionális és biokémiai változatossága ellenére – érdekes módon – a kinetikai ciklus egyes részlépései jellegzetesen hasonló függést mutatnak a különböző izoenzimek esetében. Erre példaként hozható az aktin-affinitás jelentős ionerősség-függése, főleg az ún. gyenge aktinkötő (miozin.ATP, illetve miozin.ADP.P_i) állapotokban. Ennek jellegzetes következménye, hogy a miozin *steady-state* ATPázának aktin-aktiválására jellemző, félmaximális aktiválást előidéző aktin-koncentráció ($K_{ATPáz}$) értéke jelentősen nő az ionerő növekedésével, míg a maximális aktivitás nem vagy jóval kisebb mértékben változik. Ennek példáját mutatja két különböző miozin esetén az alábbi 1. ábra, amelynek adatai a 7. illetve 10. cikkeinkből származnak. A vázizom miozin 2 $K_{ATPáz}$ értéke is hasonlóan kifejezett ionerősség-függést mutat. Ennek következményeként például White és munkatársai (1997, *Biochemistry* 36:11828) a gyengén aktinkötött állapotokban bekövetkező molekuláris eseményeket csak szélsőségesen alacsony (2 mM) ionerősségű oldatban tudták hatékonyan vizsgálni.

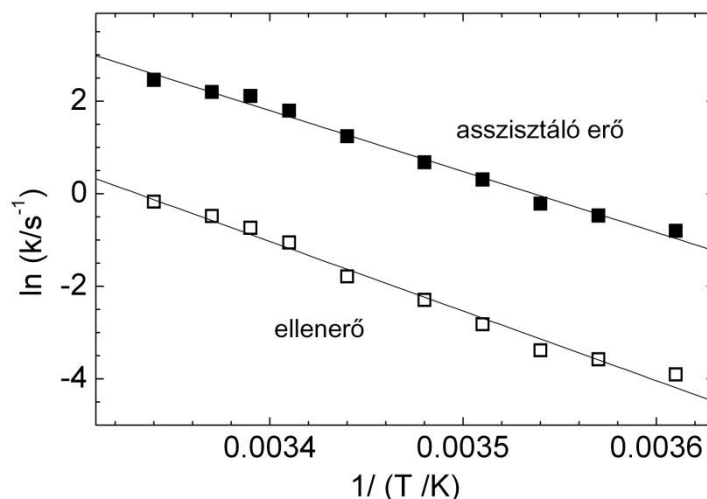


1. ábra: Szarvasmarha miozin 10 (A) és *Drosophila melanogaster* miozin 5 (B) szubfragmentum-1 konstrukciók *steady-state* ATPáz aktivitásának aktin-aktivációja különböző ionerősségű (I) oldatban (25°C, pH 7).

Hiperbolikus illesztéssel kapott maximális aktivitás (k_{cat}) és $K_{ATPáz}$ értékek: miozin 10: 4,0 s⁻¹ és 5,7 μM (I = 10 mM); 3,0 s⁻¹ és 33 μM (I = 110 mM); *Drosophila* miozin 5: 13 s⁻¹ és 9,9 μM (I = 25 mM), 13 s⁻¹ és 19 μM (I = 75 mM). (Forrás: 7. és 10. saját cikkek)

A pH jelentősen befolyásolja a miozinhoz kötött lezajló ATP-hidrolizislépés egyensúlyi állandóját (K_3 a dolgozat 16. ábráján), amire a *quenched-flow* mérésekben (pl. 18. ábra a dolgozatban) látható „P_i burst” amplitúdójának változásából következtethetünk. Bagshaw és Trentham úttörő cikkében (76. hivatkozás a dolgozatban) a vázizom miozin 2 hidrolizislépésének egyensúlyi állandója pH 8-on 9-nek adódott, míg későbbi, alacsonyabb pH-n végzett mérésekben ez az érték jóval alacsonyabbnak mutatkozott (6. saját cikkünkben például $K_3 = 0.35$ -öt határoztunk meg pH 7-en).

A magas terhelési arányú, processzív vagy erőtartó miozinokban az aktomiozinról történő ADP-felszabadulás, amely a haladási sebesség illetve az erőtartási hatékonyság alapvető meghatározója, NM2 izoformák esetében széles ionerősség-tartományban (10-110 mM) állandó (nem publikált saját adatok). Sarlós Kata doktorandusszal a folyamat hőmérséklet-függését is megvizsgáltuk a 17. cikkünkben ismertetett módszerrel, mechanikailag terhelt NM2A fejek esetén. E nem publikált adataink (alábbi 2. ábra) azt jelzik, hogy az ADP-felszabadulási kinetika terhelés-függése kis mértékben függ a hőmérséklettől: az asszisztáló illetve ellenérő hatása alatt álló fejekről történő ADP-felszabadulási sebességi állandók hányadosa a 4°C-on tapasztalt 22-ről 26°C-on 14-re csökken, ami a fejek flexibilitásának növekedésére utal.



2. ábra: Aktin-kötött, asszisztáló illetve ellenelő hatása alatt álló NM2A fejeokről történő ADP-felszabadulás sebességi állandóinak Arrhenius-ábrázolása. A folyamat látszólagos aktiválási energiája asszisztáló erő esetén 109 kJ/mol-nak, ellenelő esetén 125 kJ/mol-nak adódott. (Nem publikált saját adatok)

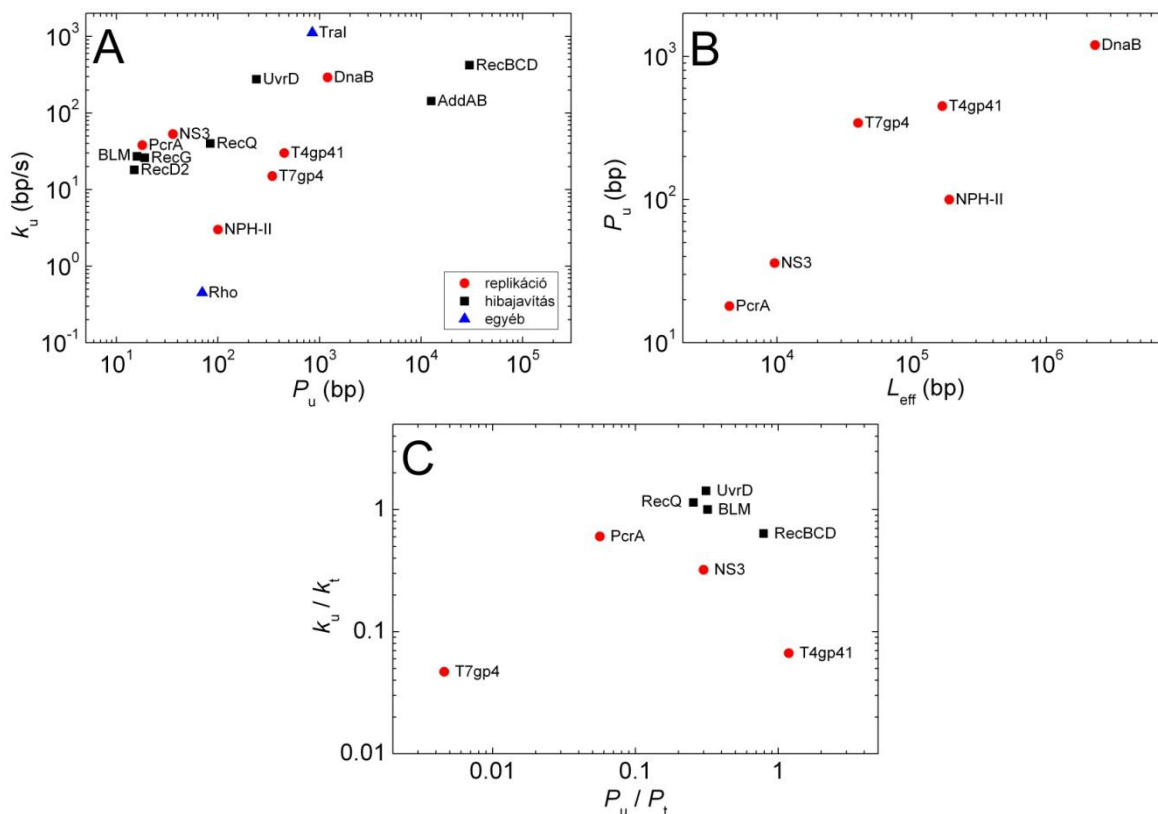
Általánosságban elmondható, hogy a dolgozatban hangsúlyosan tárgyalt, az egyes miozin izoformák mechanisztikus paraméterei közötti különbségek lényegesen nagyobbak, mint amit a fiziko-kémiai körülmények ésszerű mértékű változtatása okoz egy adott izoforma esetében. Emellett számos esetben előfordult az is, hogy a mérési körülmények változtatása a működési mechanizmus valamely fontos vonását fedte fel. Ennek egyik példája, hogy a 18. cikkünkben vizsgált *Dictyostelium* miozin 2 mutánsokban a katalitikusan aktív konformáció kialakulásának egyensúlyi állandója az ATP-hidrolízis kémiai lépésével párhuzamos hőmérséklet-függést mutatott, ami a két folyamat kapcsoltságára világított rá. Egy másik esetben az aktinkötés során bekövetkező szerkezet-változások közötti energetikai különbségeket sikerült felfednünk különböző miozinok aktinkötésének hőmérséklet- illetve ionerősség-függésének vizsgálatával (27. cikk).

2. A dolgozatból világossá vált, hogy a miozinok aktuális élettani szerepe jól tükröződik kinetikai jellemzőikben. Felfedezhető-e hasonló kapcsolat a DNS helikázok kinetikai jellemzői és funkciói között. Ha ez még nem ismert, milyen hipotézis lehetne felállítani erre pl. egy replikációs és egy rekombinációs helikáz összehasonlítása kapcsán.

A helikázok enzimatiságai és biológiai szerepei közötti összefüggés módszeres elemzése érdekes módon még hiányzik a szakirodalomból. Harami Gábor doktorandusszal írandó tervezett összefoglaló cikkünkhöz kigyűjtöttük annak a tizenöt, változatos biológiai funkciójú helikáznak az adatait, amelyek működéséről kvantitatív ismeretekkel rendelkezünk. Ezek közül a humán BLM és *E. coli* RecQ enzimek adatai saját munkánkból származnak. Az adatoknak már az előzetes elemzése is nagy számú érdekes megfigyelést tesz lehetővé, amelyek közül általánosságban az alábbiakat emelem ki:

- A helikázok szálszétválasztási sebessége korrelál processzív futáshosszukkal. Érdekes módon azonban, a hibajavító helikázok esetében a sebesség kevésbé meredeken nő a futáshosszal, mint a replikációs helikázok esetében (alábbi 3A ábra).
- A replikációs helikázok futáshossza korrelál a replikálandó genom méretével (3B ábra).
- Az egyszálú DNS-en történő akadálytalan transzlokáció és a kétszálú DNS szálszétválasztásának összehasonlításából az látszik, hogy a hibajavító helikázok esetében a

két aktivitásra jellemző sebesség- és futáshossz-értékek közel megegyeznek, míg a replikációs helikázoknál a szálszétválasztásra jellemző értékek alacsonyabbak a transzlokációsaknál. Ez a viselkedés arra utal, hogy a hibajavító helikázok aktív duplex-destabilizáló mechanizmust használnak, míg a replikációs helikázok esetében a mechanizmus részben passzív sajátságokat mutat (3C ábra).



3.ábra: Helikázok biokémiai sajátságai és biológiai funkciója közötti összefüggések előzetes elemzése (publikálatlan összefoglalás). **A:** A kétszálú DNS-szálszétválasztás várható processzív futáshossza (P_u , bp) és a szálszétválasztási sebesség (k_u , bp/s) közötti összefüggés. **B:** A replikálandó genom(szakasz) mérete (L_{eff} , bp) és a szálszétválasztás várható futáshossza (P_u , bp) közötti összefüggés. **C:** A kétszálú DNS-szálszétválasztás és az egyszálú DNS-en történő transzlokáció kinetikai paramétereinek hányadosai közötti összefüggés a futáshossz (P_u/P_t) és a sebesség (k_u/k_t) összevetésével. A biológiai funkció szerinti színek (A ábra) mindhárom panel esetén azonos. Az ábrán az alábbi helikázok adatai szerepelnek: NS3 (hepatitis C vírus), T7gp4 (T7 bakteriofág), UvrD (*E. coli*), PcrA (*B. stearothermophilus*), T4gp41 (T4 bakteriofág), TraI (*E. coli*), DnaB (*E. coli*), NPH-II (vaccinia vírus), BLM (humán), AddAB (*B. fragilis*), RecBCD (*E. coli*), RecG (*E. coli*), RecQ (*E. coli*), RecD2 (*D. radiodurans*). Források: 24. saját cikk, publikálatlan saját adatok (RecQ); illetve 111., 205-207., 211. hivatkozások a dolgozatban, valamint:

Yu J, Cheng W, Bustamante C, Oster G. Coupling translocation with nucleic acid unwinding by NS3 helicase. *J Mol Biol* 2010;404(3):439-455.

Rajagopal V, Gurjar M, Levin MK, Patel SS. The protease domain increases the translocation stepping efficiency of the hepatitis C virus NS3-4A helicase. *J Biol Chem* 2010;285(23):17821-17832.

Dumont S, Cheng W, Serebrov V, Beran RK, Tinoco I, Pyle AM, et al. RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP. *Nature* 2006;439(7072):105-108.

Kim DE, Narayan M, Patel SS. T7 DNA helicase: a molecular motor that processively and unidirectionally translocates along single-stranded DNA. *J Mol Biol* 2002;321(5):807-819.

Johnson DS, Bai L, Smith BY, Patel SS, Wang MD. Single-molecule studies reveal dynamics of DNA unwinding by the ring-shaped T7 helicase. *Cell* 2007;129(7):1299-1309.

Jeong YJ, Levin MK, Patel SS. The DNA-unwinding mechanism of the ring helicase of bacteriophage T7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(19):7264-7269.

- Dessinges MN, Lionnet T, Xi XG, Bensimon D, Croquette V. Single-molecule assay reveals strand switching and enhanced processivity of UvrD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(17):6439-6444.
- Niedziela-Majka A, Chesnik MA, Tomko EJ, Lohman TM. *Bacillus stearothermophilus* PcrA monomer is a single-stranded DNA translocase but not a processive helicase in vitro. *J Biol Chem* 2007;282(37):27076-27085.
- Slatter AF, Thomas CD, Webb MR. PcrA helicase tightly couples ATP hydrolysis to unwinding double-stranded DNA, modulated by the initiator protein for plasmid replication, RepD. *Biochemistry* 2009;48(27):6326-6334.
- Lionnet T, Spiering MM, Benkovic SJ, Bensimon D, Croquette V. Real-time observation of bacteriophage T4 gp41 helicase reveals an unwinding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(50):19790-19795.
- Young MC, Schultz DE, Ring D, von Hippel PH. Kinetic parameters of the translocation of bacteriophage T4 gene 41 protein helicase on single-stranded DNA. *J Mol Biol* 1994;235(5):1447-1458.
- Sikora B, Eoff RL, Matson SW, Raney KD. DNA unwinding by *Escherichia coli* DNA helicase I (TraI) provides evidence for a processive monomeric molecular motor. *J Biol Chem* 2006;281(47):36110-36116.
- Ribeck N, Kaplan DL, Bruck I, Saleh OA. DnaB helicase activity is modulated by DNA geometry and force. *Biophys J* 2010;99(7):2170-2179.
- Galletto R, Jezewska MJ, Bujalowski W. Unzipping mechanism of the double-stranded DNA unwinding by a hexameric helicase: quantitative analysis of the rate of the dsDNA unwinding, processivity and kinetic step-size of the *Escherichia coli* DnaB helicase using rapid quench-flow method. *J Mol Biol* 2004;343(1):83-99.
- Brendza KM, Cheng W, Fischer CJ, Chesnik MA, Niedziela-Majka A, Lohman TM, et al. Autoinhibition of *Escherichia coli* Rep monomer helicase activity by its 2B subdomain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(29):10076-10081.
- Jankowsky E, Gross CH, Shuman S, Pyle AM. The DExH protein NPH-II is a processive and directional motor for unwinding RNA. *Nature* 2000;403(6768):447-451.
- Patel SS, Donmez I. Mechanisms of helicases. *J Biol Chem* 2006;281(27):18265-18268.
- Reuter M, Parry F, Dryden DTF, Blakely GW. Single-molecule imaging of *Bacteroides fragilis* AddAB reveals the highly processive translocation of a single motor helicase. *Nucleic Acids Res* 2010;38(11):3721-3731.
- Roman LJ, Eggleston AK, Kowalczykowski SC. Processivity of the DNA helicase activity of *Escherichia coli* recBCD enzyme. *J Biol Chem* 1992;267(6):4207-4214.
- Walmacq C, Rahmouni AR, Boudvillain M. Influence of substrate composition on the helicase activity of transcription termination factor Rho: reduced processivity of Rho hexamers during unwinding of RNA-DNA hybrid regions. *J Mol Biol* 2004;342(2):403-420.
- Zhang XD, Dou SX, Xie P, Hu JS, Wang PY, Xi XG, et al. *Escherichia coli* RecQ is a rapid, efficient, and monomeric helicase. *J Biol Chem* 2006;281(18):12655-12663.
- Saikrishnan K, Powell B, Cook NJ, Webb MR, Wigley DB. Mechanistic basis of 5'-3' translocation in SF1B helicases. *Cell* 2009;137(5):849-859.
- Shadrick WR, Julin DA. Kinetics of DNA unwinding by the RecD2 helicase from *Deinococcus radiodurans*. *J Biol Chem* 2010;285(23):17292-17300.

3. Számos DNS helikáz *in vivo* más fehérjékkel képzett komplexben található pl. a BLM helikáz élesztő homológja az Sgs1 helikáz a Top3-val míg az Srs2 a SUMO-PCNA-vel formál komplexet. Mennyiben befolyásolhatják a helikázok fehérje-fehérje interakciói kinetikai tulajdonságait? Alkalmaz-e a jelölt jelenlegi kísérleti rendszere az ilyen jellegű kérdések megválaszolására.

A felvetett kérdés jelenleg folyó, illetve a közeljövőre tervezett vizsgálataink egyik központi problémája, amelyet a kutatási területen általánosan is jelentős érdeklődés kísér. Az általunk alkalmazott módszerek az izolált helikázok működésének felderítéséhez hasonlóan alkalmasak a fehérjekomplexek működésének, illetve az azok tagjai közötti együttműködésnek a részletes vizsgálatára is.

Az SSB egyszálú DNS-kötő fehérjéről például az a kép van kialakulófélben, hogy DNS-kötő funkciói mellett a DNS-módosító fehérjét toborzó csomóponti fehérjeként is működik. Mind bakteriális, mind eukarióta RecQ-helikázok esetében kimutatták, hogy azok molekuláris aktivitásait az adott fajból származó egyszálú DNS-kötő fehérjék jelentősen és izoforma-specifikus módon, közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatások révén befolyásolják (pl. Brosh *et*

al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:23500, Harmon *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:232). A fehérjék közötti együttműködés mechanizmusa azonban legnagyobb mértékben felderítetlen. Előzetes eredményeink azt sugallják, hogy az SSB fehérje az *E. coli* RecQ helikáz mechanokémiai működését közvetlenül nem változtatja meg, hanem egyes DNS-szerkezeti elemek felismerését, és ezen keresztül a bonyolultabb DNS-struktúrák hatékony átalakítását segíti elő. A közeljövőben tervezzük annak vizsgálatát is, hogy az *E. coli* illetve humán topoizoméráz 3 homológok hogyan befolyásolják az adott fajból származó RecQ-helikázok mechanokémiai működését, illetve hogy ez a hatás hogyan járul hozzá a fehérjekomplexek biológiai funkcióinak betöltéséhez.

Ismeretes, hogy számos különböző helikáz képes a Rad51 rekombinááz nukleoprotein szálak lebontására (pl. Wu *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:19375, Krejci *et al.* (2003) *Nature* 423:305). Ezt a folyamatot jelenleg a rekombináció minőségellenőrzésének egyik kulcseseményeként tartják számon. Jelenlegi vizsgálatainkban fordított irányú hatást is sikerült kimutatnunk: azt találjuk, hogy a Rad51 fehérje jelenléte jelentősen megnöveli a D-hurok-szerkezetek helikázok által katalizált lebontásának hatékonyságát.

Budapest, 2012. január 25.

Kovács Mihály