

dc_488_12

MTA Doktori Pályázat
Doktori Értekezés Tézisei

A specifikus DNS felismerés molekuláris mechanizmusai

Fuxreiter Mónika



Debreceni Egyetem
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

2012.

I. Bevezetés

A genetikai állomány megőrzése és másolása minden élő szervezet elsőrendű feladata. Ennek során kitüntetett DNS részek válnak hozzáférhetővé és bonyolult fehérjekomplexek közreműködésével íródnak át. A genetikai állomány épségének szempontjából kiemelten fontos a módosult, vagy sérült DNS szakaszok felismerése és eltávolítása. Mind a másolás, mind a javítás szempontjából alapvető, hogy a folyamatot végző fehérjék az adott sajátságú - ép vagy hibás - DNS szekvenciát meg tudják különböztetni a környezetétől.

A DNS egy kitüntetett bázisának, vagy bázissorrendjének felismerése azonban jelentősen különbözik a fehérjék kis, szerves molekulákhoz történő kötődésétől. A DNS-ben a keresett rész, célszekvencia kovalensen kapcsolódik a hozzá kémiaiilag nagyon hasonló szegmensekhez. Egy bakteriális genomban például a BamHI restrikciós enzim szubsztrátszekvenciája (GGATCC) más bázissorrendű DNS szakaszok ezerszeres feleslegébe ágyazódik be. A fehérje tehát a nem megfelelő szekvenciával történő érintkezés esetén leválhat a DNS-ről, de utána újra ugyanazzal a molekulával kell kölcsönhatásba lépnie. Ezért is szokás a specifikus DNS-felismerést a „tű a szénakazalban” problémához hasonlítani.

I.1. A DNS felismerés klasszikus értelmezése

A paradoxon a megoldására Peter von Hippel a „lineáris diffúzió” modelljét javasolta. Ennek lényege, hogy a fehérje először lazán kötődik a DNS-hez, felismerési (ún. „encounter”) komplexet képez. Ebben a stádiumban a fehérje és a DNS közötti térrészt víz tölti ki, mely lehetőséget biztosít a fehérjének, hogy a DNS mentén 1 dimenzióban, a hőmozgás energiájának segítségével mozogjon. A lineáris diffúzió során a fehérje végig laza kapcsolatban marad a DNS-el, ami megnöveli a célszekvencia azonosításának határfokát. Ha a fehérje rátalál a keresett szakaszra, akkor oldalláncai közvetlenül kölcsönhatásba lépnek a DNS megfelelő bázisaival és szoros, specifikus komplex alakul ki közöttük. Mivel a lineáris diffúzió Brown mozgás jellegű és így kitüntetett irányultsága nincs, a fehérje nem tud a teljes DNS szál mentén végighaladni. A fehérje nagyjából 40 bázispárt tud így „végigpásztázni”, majd leválk a DNS-ről és egy másik helyen kezdi újra az olvasást (ezt az angol

terminológia „hopping”-nak nevezi). A két DNS kötőhellyel rendelkező fehérjék esetén elképzelhető, hogy a fehérje csak az egyik helyet engedi el, és a másikhoz továbbra is kapcsolódik. Ez az ún. szegmensek közötti transzfer, melyben a fehérje az egyik helyről a másikra „ugrik” DNS-en hurkok képződését eredményezve.

Egy fehérje specificitását – azon képességét, hogy mennyire tudja megkülönböztetni a célszekvenciát bármely más DNS szakasztól – általában a kötődési állandók hányadosával jellemezzük ($K_{\text{spec}}/K_{\text{nonspec}}$). DNS-en működő enzimek esetén a specificitást a kémiai lépések is tovább növelik. Ilyen esetben az enzim hatékonyságát is össze kell vetni a célszekvencián, illetve az ettől eltérő szakaszokon. Erre a célra általában egy olyan, ún. csillag-szekvenciát szokás használni, mely a célszekvenciától csak 1 bázispárban különbözik. A *BamHI* esetén az enzimatis reakció sebességi állandója a specifikus és a csillag-szekvencia (GAATCC, a specifikustól eltérő bázis dőlttel szedve) esetén 6, míg a kötődési állandók csak 3 nagyságrendben különböznek.

1.2. A specifikus DNS felismerés molekuláris alap-pillérei

Mi a molekuláris alapja, mechanizmusa a DNS szekvenciák felismerésének és hatékony megkülönböztetésének? A kérdésre az elmúlt 4 évtizedben alapvetően a fehérje-DNS komplexek térszerkezeteinek elemzésével (~ 2500 szerkezet) keresték a választ. Ilymódon három specificitásért felelős tényezőt sikerült azonosítani. *i) A bázisokkal kialakított hidrogénkötés-mintázat.* A nukleinsav-bázisok hidrogénkötő képessége nem merül ki az AT és GC bázispárok létrehozásában. A szabadon maradó NH és CO csoportokkal kialakított hidrogénkötések szekvencia-specifikus mintázatot alkotnak. Ezt közvetlen olvasásnak („direct readout”) nevezzük, mely alkalmas a széles- és a keskeny árok megkülönböztetésére is. *ii) A foszfát csoportokkal kialakított elektrosztatikus kölcsönhatások.* A DNS gerincét alkotó foszfát-cukor lánc erősen negatív töltésű, mellyel a fehérjék pozitív töltésű oldalláncai kedvező kölcsönhatást tudnak kialakítani. Ilyenkor a fehérje nem közvetlenül a bázisokat ismeri fel, hanem a szomszédos foszfát-csoportok távolságán keresztül a DNS szekvencia-függő torzulásait. Ezért ezt közvetett felismerésnek („indirect readout”) nevezzük, mely különösen nagy jelentőséggel bír olyan esetekben, ahol a DNS szerkezete jelentősen torzul a fehérjéhez történő kötődéskor. *iii) Specifikusan*

elhelyezkedő vízmolekulák által közvetített hidrogénkötések. Megfigyelték, hogy a DNS körül elhelyezkedő vízmolekulák egy része a fehérjével alkotott komplexben is a helyén marad. Ezek részben kitöltik a fehérje-DNS közötti térrészt, részben pedig irányított hidrogénkötéseket hoznak létre.

I.3. A klasszikus modellek hiányosságai

A felsorolt tényezők mindegyike a DNS célszekvenciájára és a vele közvetlenül, vagy vízmolekulák közvetítésével kölcsönható fehérje-felszínre korlátozódik. Az utóbbi néhány évben számos kísérleti adat utalt azonban arra, hogy a specificitás kialakításában távolabbi DNS és fehérje régiók is közrejátszanak. A DNS-ben a célszekvenciát szegélyező bázisok hozzájárulnak a specifikus szakasz végső geometriájának kialakításához, vagy „árnyékoló” elektrosztatikus kölcsönhatások által befolyásolhatják a kötés affinitását. A Hox gének által kódolt homeodomének DNS célszekvenciái széles tartományban változnak és specificitásuk szövet-típustól függően is módosulhat. Ez arra utal, hogy a kötőfelszínen kívüli fehérje-részek jelentősen hozzájárulnak a célszekvencia kiválasztásához és a szoros illeszkedésű komplex kialakulásához. A távoli fehérje-szakaszok hatása azonban nehezen értelmezhető, mivel nem alakítanak ki stabil (permanens) kölcsönhatást a DNS-el.

A specifikus DNS felismerés molekuláris alapjainak vizsgálata gyakorlati jelentőséggel is bír. Számos biotechnológiai és gyógyszeripari alkalmazás igényel adott DNS specificitású és meghatározott körülmények között működő fehérjéket, enzimeket. A DNS-t javító enzimek, fehérje-komplexek fontos célpontjai például a rák-ellenes gyógyszerek kutatásának. Számos specifikus DNS-kötő fehérjét, (pl. restriktációs enzimek, transzkripció effektorok) a génsebészetben alkalmaznak. A DNS-t módosító vagy a módosítást felismerő enzimek (pl. metiltranszferázok) működésének értelmezése pedig az epigenetikai tényezők megértése és hasznosítása szempontjából érdekes.

A DNS-hez specifikusan kapcsolódó fehérjék tervezése azonban eddig nem sok sikerrel járt. Ennek elsődleges oka, hogy a kötőfelszín módosításának hosszútávú hatása van; azaz a kötésben kitüntetett szerepet játszó aminosavak megváltoztatása

jelentős befolyással bír a fehérje távolabbi részeinek szerveződésére, szerkezeti és elektrosztatikus tulajdonságaira is. Sajnálatos módon bevett gyakorlat azonban, hogy a szerkezet-meghatározáshoz vagy funkcionális vizsgálatokhoz csak a kötőhellyel szomszédos részeket használják. Egy gyakorlatilag is működőképes DNS-felismerési modell kidolgozásához tehát szükséges a fehérje globális sajátosságainak figyelembe vétele is. Ez olyan molekuláris tényezők vizsgálatát jelenti, mint a DNS és a fehérje dinamikus tulajdonságai, határfelületi jelenségek (víz, ionok), valamint a nem közvetlenül kölcsönható fehérje-részek szerepe.

I.4. Az értekezésben vizsgált témakörök

Kutatásaim során azt elmúlt 13 évben azt vizsgáltam, hogy mely molekuláris tényezők járulnak hozzá DNS szekvenciák specifikus felismeréséhez és kémiai módosításához. Tanulmányaimat több szinten végeztem, a részletesebb megközelítéstől az átfogóbb felé haladva: *i)* A specifikus DNS hasítás mechanizmusai; *ii)* Fémionok és vízmolekulák szerepe a specifikus DNS felismerésben; *iii)* A DNS flexibilitás szerepe a DNS hibák azonosításában; *iv)* A rendezetlen régiók szerepe a specifikus DNS felismerésben.

II. Célkitűzések

A specifikus DNS hasítás mechanizmusai.

1. A szekvenciális változatosság magyarázata a PD..D/ExK típusú restrikciós endonukleázok aktív helyén.
2. A fémionok számának és szerepének felderítése a II típusú restrikciós enzimek foszfodiészter hidrolízisében.
3. A PD..D/ExK típusú restrikciós endonukleázok egységes katalitikus modelljének kidolgozása.
4. A katalízis és a DNS-kötés kapcsolata, szerepe a restrikciós enzimek szelektivitásában.

A fémionok és vízmolekulák szerepe a specifikus DNS felismerésben.

5. A DNS-hez kötődő fémionok szelektivitáshoz történő hozzájárulásának magyarázata. A Mg^{2+} és Mn^{2+} ionok hatása közötti különbség molekuláris hátterének felderítése.
6. A BamHI specifikus és csillag szekvenciával alkotott komplexeinek részletes szerkezeti jellemzése, a hidrátburok szekvencia-függésének elemzése.
7. A víz szerepének magyarázata a specifikus DNS felismerésben.

A DNS flexibilitás szerepe a DNS hibák azonosításában.

8. A timin dimert vagy uracilt tartalmazó sérült és a megfelelő ép DNS szekvenciák szerkezeti és dinamikai tulajdonságainak jellemzése. A DNS torzulás (hajlítás) és a bázis-kinyílás közötti csatolás felderítése.
9. A bázis-kinyílással járó folyamatok energetikájának jellemzése.
10. Általános modell kidolgozása a DNS sérülések felismerésére.

A rendezetlen régiók szerepe a specifikus DNS felismerésben

11. A rendezetlen fehérje-szegmensek specifikus DNS kötésben játszott szerepének felderítése. A rendezetlen és globuláris fehérje-részek DNS kölcsönhatásainak csatolása homeodoméneknél.
12. A rendezetlen szegmensek hatása a homeodomének DNS kötésének kinetikájára és termodinamikájára.
13. A fehérje-DNS kötőfelszínétől távoli, rendezetlen szegmensek hatása a specifikus DNS kötésre. A folyamat molekuláris mechanizmusainak feltárása.
14. A rendezetlen részek szabályozó mechanizmusai a bolyhos fehérje-DNS komplexekben, szerepük a transzkripció regulációjában.
15. A bolyhos fehérje-DNS komplexek jelentősége a szövet-specifititás kialakításában.

III. Az alkalmazott megközelítések

Munkámat elméleti módszerekkel, számítógépes eljárások segítségével végeztem. Az enzimatikus katalízis tanulmányozására hibrid kvantummechanikai/molekulamechanikai megközelítést, az ún. EVB/FEP-US (Empirical Valence Bond/Free Energy Perturbation-Umbrella Sampling) módszert alkalmaztam. A protonáltsági állapotokat, és a szolvatációs szabadentalpia meghatározását szemi-mikroszkópikus PDL/D (Protein Dipoles Langevin Dipoles) eljárással végeztem. A fémion-nukleinsav bázisok komplexeinek vizsgálata magas-szintű *ab initio* kvantumkémiai számítások felhasználásával történt. A víz-szerkezet leírására nagykanonikus Monte Carlo (GCMC) módszert alkalmaztam, elemzésére Voronoi poliédereken alapuló módszert használtam. A flexibilitások vizsgálatát a minden atomot figyelembe vevő (all-atom) molekuladinamikai (MD) szimulációkból származó adatokon végeztem. A rendezetlen régiók és fehérje-feltekeredés tanulmányozására alacsony felbontású („coarse-grained”, CG) szimulációt alkalmaztunk. A rendezetlen fehérjék és komplexeik elemzése elsősorban bioinformatikai eljárásokkal (szerkezet-becslés, szekvencia összerendezés, profil számítás) történt. A bolyhos („fuzzy”) komplexek elméletének kidolgozásához szerkezeti adatok és irodalomban közölt funkcionális mérések adtak segítséget. A felhasznált módszerek közül számos eljárás fejlesztésében vettem részt (PDL/D, EVB, pKa számítások, GCMC, CG MD) vagy munkatársaimmal dolgoztam ki (E_{gap}).

A számítások eredményeit minden esetben kísérleti eredményekkel vettem össze. Ily módon az elméleti modelleket valós rendszereken nyert mérési adatokkal támasztottam alá. A számítások azonban sokszor betekintést engedtek olyan molekuláris részletekbe is, melyek kísérletileg közvetlenül nem vizsgálhatók. Célom az volt, hogy a konkrét rendszerek megértésén túl olyan modelleket állítsak fel, melyek az adott molekulacsaládon belül általánosan alkalmazhatók.

IV. Eredmények

IV.1. *A specifikus DNS hasítás mechanizmusai.*

1. **Értelmeztem a PD..D/ExK típusú restrikciós endonukleázok katalitikus oldalláncainak szerepét.** A PD..D/ExK típusú restrikciós endonukleázok aktív helyét általában 2-3 negatív töltésű oldallánc és egy lizin alkotja. A BamHI enzimben azonban a Lys helyén Glu található, a két oldallánc cseréje az enzimatis aktivitás megszűnéséhez vezet. A BamHI enzimben meghatároztam a lehetséges protonátadási folyamatok szabadentalpia-változását és megállapítottam, hogy a legkedvezőbb az OH⁻ nukleofilnak egy külső vízmolekula által történő aktiválása. pKa számításokkal igazoltam, hogy a Glu-113 negatívan töltött állapotban van jelen az aktív helyen, szerepe általános bázisként nem valószínű. A teljes reakciómechanizmus vizsgálata megerősítette a „külső” nukleofil modelljét. Később munkatársaimmal rámutattunk arra, hogy a BamHI-ben a Glu→Lys helyettesítés a fémionok helyzetének megváltozásán keresztül vezet drasztikus aktivitáscsökkenéshez, és a két oldallánc variabilitása a fémionokkal összefüggésben magyarázható (3. pont).

2. **Értelmeztem a fémionok szerepét a PD..D/ExK típusú restrikciós endonukleázok katalízisében.** A BamHI aktív centrumában két fémion helyezkedik el, melyek látszólag ideálisan megfelelnek a Klenow fragmenszen felállított Steitz-féle modellnek. Más PD..D/ExK enzimsaládoknál azonban csak egy fémiont sikerült megfigyelni. Hosszú ideje vitatott kérdés, hogy hány fémionra van szükség a foszfodiészter kötés hidrolíziséhez. Molekuladinamikai számításokkal megállapítottuk, hogy a BamHI-ben a két fémion pozíció nem egyenértékű. A nukleofil támadó oldalán elhelyezkedő M_A pozíció stabil, míg a távozó csoport kilépése oldalán elhelyezkedő M_B ion helyzete változékonyabb. Ez alapvetően a hasítandó foszfátcsoporttal való kölcsönhatás megszűnésében mutatkozik meg. A két fémion katalitikus hatásában – az aktiválási szabadentalpia-csökkenéshez történő hozzájárulásában – is lényeges eltérés mutatkozik. Míg az M_B fémion hiánya az aktiválási energiát csekélyebb mértékben növeli, addig a támadó nukleofil stabilizáló M_A fémion elvesztése a katalitikus hatás megszűnéséhez vezet. Ennek alapján arra következtettünk, hogy a reakcióhoz csupán egy fémion jelenléte szükséges

feltétlenül, melynek a nukleofilt kell stabilizálnia. Elkészítettük a BamHI egy fémionos modelljét, és meghatároztuk az M_A katalitikusan fontos pozícióit.

3. Egységes katalitikus modellt dolgoztunk ki a PD..D/ExK típusú restrikciós endonukleázokra. Számításaink alapján javaslatot tettünk a PD..D/ExK típusú restrikciós endonukleázok egységes reakciómechanizmusára. Ennek alapján a nukleofil-aktiválása ún. „külső” mechanizmussal történik. Ez azt jelenti, hogy az aktív helyen az M_A fémionhoz kapcsolódva egy OH^- ion van jelen, és a proton az aktív helyen kívül található. A reakció első lépése tehát nem általános bázis közreműködésével játszódik le. A második lépés a nukleofil támadása és a pentaédes intermedier kialakulása. Ebben az M_A fémion kritikus szerepet játszik, mindvégig stabilizálja a nukleofilt, illetve a megfelelő nem észterezett foszfát-oxigénnel létesít kölcsönhatást. A másik fémion, M_B szintén hozzájárul a kétszeresen negatívan töltött foszfátcsoport stabilizálásához, de lazábban kötődik, és hatása kisebb mértékben érvényesül. Éppen ezért ez az ion poláros, vagy pozitív töltésű oldalláncokkal helyettesíthető. Ezt a szerepet sokszor Lys tölti be. Az M_B fémionnak további feladata a távozó csoport kiválásának és protonálódásának elősegítése. Ezt a katalitikus modellt kísérletileg is igazoltuk.

4. Az EcoRI esetén értelmeztük a katalízis és a DNS-kötés kapcsolatát. Az EcoRI és RsrI enzimek azonos, GAATTC szekvenciát ismernek fel. Kísérleti tapasztalatok alapján mégsem lehet a két enzim szegmenseit szabadon rekombinálni, működőképes kimérát eredményezve. A vad típusú EcoRI-től 22 aminosavban különböző egyik kiméránál azonban nagyobb specifikus DNS kötő affinitást, de kisebb aktivitást figyeltünk meg az EcoRI-hez hasonlítva. Ez a kis aktivitással rendelkező EcoRI-RsrI kiméra meglepő módon toxikusabb volt olyan *E. coli* baktérium – amelynek DNS-ét nem védte EcoRI-specifikus metiláció – számára, mint a vad típusú EcoRI endonukleáz. Molekuladinamikai számítások alapján megállapítottam, hogy bár a csere nem okoz jelentős változást az EcoRI szerkezetében, de a célszekvenciával több hidrogénkötés kialakítását eredményezi. A kiméra szerkezetében ugyanakkor kimutattam, hogy azok a kölcsönhatások (Arg145_A-Glu144_B és Arg144_B-Glu145_A), melyek az alegységek működését koordinálják („cross-talk”), megszűnnek. A kiméra enzim fenotípusára az tűnt a legvalószínűbb magyarázatnak, hogy az erősebb kötődés és a két alegység működése

közötti szinkron elvesztése lassítja az enzim disszociációját a hasított DNS-ről ezáltal megakadályozva a DNS-javító folyamatok beindulását.

IV.2. *A fémionok és vízmolekulák szerepe a specifikus DNS felismerésben.*

5. Értelmeztük a kétértékű fémionok DNS szelektivitásban játszott szerepét. A kétértékű fémionok alapvető szerepet töltenek be a DNS enzimek működésében. Elsősorban a foszfátcsoport kémiai átalakításában segédkeznek, de fontos szerepük van a specificitás kialakításában is. A restriktációs endonukleázok szelektivitásában a Mg^{2+} és Mn^{2+} ionok jelenlétében tapasztalt 5 nagyságrend különbséget azonban korábban nem sikerült értelmezni. Magas szintű *ab initio* kvantumkémiai számításokkal kimutattuk, hogy a két fémion nukleinsav-bázisokhoz történő kötődésének energetikája mind vákumban, mind oldatban jelentősen különbözik. Ez a Mn^{2+} komplexek nagyobb torzíthatóságával, polarizálhatóságával és az ionra történő megnövekedett töltés-átmenettel magyarázható. A különböző bázisokkal alkotott fémion-komplexek stabilitása közötti eltérés különösen oldószerben jelentős, ami arra utal, hogy a környezet elektrosztatikus tulajdonságai felerősítik az említett effektusokat. Egyben azt is jelzi, hogy a Mn^{2+} ionok fehérje oldalláncokkal történő könnyebb helyettesíthetősége szelektivitás csökkenéshez vezet.

6. Jellemeztük a felismerési komplexben a víz szerkezetét. A felismerési komplex szerkezetének meghatározása a szubsztrát nagy mozgékonyága miatt számos nehézségbe ütközik. Ezért ezt az állapotot a a célszekvenciától 1 bázispárban eltérő csillag komplexekkel szokás vizsgálni. BamHI enzim csillag-komplexében (GAATCC, a specifikustól eltérő bázis dőlttel szedve) a kristályvizeknek csak ~65%-át sikerült csak kísérletileg meghatározni. A hiányzó vízmolekulák helyzetét – a kísérletileg megfigyelt pozíciókat jól reprodukáló – nagykanonikus Monte Carlo számításokkal térképeztem fel. A kötőfelszínen található vizek szerkezetét, ennek szekvencia-függését Voronoi poliéderek vizsgálatán alapuló, ún. „proximity” analízissel végeztem. A vízmolekulák nukleotidok körüli eloszlása jellegzetes mintázatot mutat specifikus és a csillag komplexben is. A célszekvenciában a hasítás helye körül koordinálódik a legkevesebb vízmolekula, ez a leginkább „exponált” hely a fehérje számára. Ugyanakkor ezek a vízmolekulák kötődnek a leggyengébben a

DNS-hez, tehát helyettesíthetők legkönnyebben a fehérje oldalláncával. A csillag-komplexben a báziscsere helyén lényegesen több vizet találunk: ez a legjobban hidratált pozíció. A hasítás helyén a vízmolekulák erősebben kapcsolódnak a DNS-hez, mint a specifikus komplexben, nehezebben hozzáférhetők a fehérje számára, tehát a szoros komplex kialakulását akadályozzák.

7. Javaslatot tettünk a „hidratációs ujjlenyomat” modelljének bevezetésére. A felismerési komplexben vízmolekulák DNS körüli szekvencia-specifikus eloszlását és energetikáját „hidratációs ujjlenyomat”-nak neveztük. A vízmolekulák mintázataiban az alacsony koordinációs számú és kölcsönhatási energiájú helyek valószínűleg az első kapcsolódási pontokat jelölik ki a DNS-en a fehérje számára. Meghatároztam a felismerési komplex specifikussá alakulásakor az oldatba távozó vizek számát, mely jól egyezett a kísérleti eredményekkel. A „felszabaduló” vízmolekulák száma szekvencia-függést mutatott és a központi bázisok körül maximális értéket vett fel. Ez jól magyarázza a központi bázisok mutációs kísérletek alapján jósolt ún. „kapocs” (clamp) szerepét. A specifikus és csillag-komplex összehasonlítása alapján rámutattam a hidrofób effektus bázis-sorrendtől való függésére, és ily módon a specifikus felismerésben játszott szerepére.

IV.3. A DNS flexibilitás szerepe a DNS hibák azonosításában.

8. Jellemeztem a DNS dinamikus tulajdonságait sérült és ép szekvencia esetén. Az Uracil DNS-glikoziláz (UDG) és a cis,syn-timin dimert (TD) javító Endonukleáz V (EndoV) is báziskivágás útján távolítják el a DNS hibát. A két enzim látszólag eltérő stratégiát alkalmaz a sérülés megkülönböztetésére: az UDG közvetlenül az uracillal létesít kölcsönhatást, míg az EndoV a szemközti adeninnel alakít ki kontaktust. Mindkét enzim jelentősen torzítja a DNS-t és a megfelelő bázist a DNS tengelyéből „kiforgatja” (base flipping). Sem mutációs kísérletek, sem a specifikus komplexek térszerkezete nem ad azonban választ a sérülések azonosításának mechanizmusára. A hibás és az ép szekvenciák dinamikai tulajdonságait megvizsgálva azt találtuk, hogy a DNS sérülés körüli lokális meghajlás és a kiforduló bázis nyílásszögének eloszlása lényeges különbséget mutat a sérült és az ép bázist tartalmazó szekvenciák esetén. A sérült DNS paraméterei lokálisan (de nem globálisan) szélesebb tartományban változnak. A megfelelő eloszlások alapján

kiszámítottuk e két koordináta mentén a zárt és a nyílt állapotok szabadenergia-felszínét, az ép és a hibás szekvencia esetén is. Mindkét sérülés-típusnál csatolást találtunk a DNS lokális meghajlása és a báziskinyílás között.

9. Meghatároztam a DNS torzításának szabadenergia-felszínét. A timin dimert és az uracil tartalmazó hibás, illetve a megfelelő ép DNS esetén az szabadenergia-felszínnek alapján meghatároztuk a bázis-kinyílás útvonalára vonatkozó kombinált reakciókoordinátát. Megállapítottuk, hogy a sérült szekvencia esetén a DNS-nek a hiba helyén történő lokális meghajlása nagyobb mértékben járul hozzá a bázis-kinyíláshoz, mint az ép DNS esetén. A sérült DNS-ek könnyebb torzíthatóságát a zárt állapotban a kombinált koordináta mentén számított erőállandó is alátámasztja: a timin dimer esetén 50%-al, DNS-uracil esetén közel 100%-al alacsonyabb, mint a sérülést nem tartalmazó szekvencia esetén. A könnyebb deformálhatóság következtében hibás szekvenciák esetén a bázisok kifordulásának energiagátja jelentős csökkenést mutat a megfelelő ép DNS-hez képest. Ezt a fehérjével történő kölcsönhatások még tovább csökkenthetik.

10. Javaslatot tettünk a DNS hibák felismerésének általános modelljére. Ennek alapján egy általános modellt javasoltunk a DNS hibák felismerésére, mely a sérült és ép DNS szekvenciák eltérő dinamikai tulajdonságain alapul. A DNS hibák gyengítik a hidrogénkötést a szemközti bázissal (bázisokkal), ami elősegíti a DNS hiba körüli lokális meghajlását és a hibás bázis kifordulását. A javító fehérje kölcsönhatásai révén mindkét koordináta mentén tovább torzítja a DNS-t. A hibás DNS megnövekedett flexibilitása következtében a bázis kifordulásának gátja a hibás szekvenciák esetén annyira lecsökken, hogy összemérhetővé válik a fehérje haladási sebességével a DNS-en. A fehérje a kifordult bázissal alkotott a irányított kölcsönhatások révén tovább növelheti a szelektivitást, illetve megkülönböztetheti az egyes DNS sérüléseket. A specifikus komplex nem feltétlenül igényli a DNS meghajlását, ez a bázis-kinyílás megkönnyítéséhez szükséges.

IV.4. *A rendezetlen régiók szerepe a specifikus DNS felismerésben*

11. Jellemeztük a rendezetlen szakaszok szerepét a homeodomének szerkezetének kialakításában. A többsejtű állatok egyedfejlődése során a végtagok, függelékek fejlődését szabályozó homeodomének szelektivitásában meghatározó szerepet játszik a rendezetlen N-terminális régió. A rendezetlen N-végek („N-tail”) egyes homeodomének közötti cseréje fenotípus-változást okoz. Az NK-2 és Antp homeodomének feltekeredését és kötődését vizsgálva azt találtuk, hogy a különböző hosszúságú rendezetlen N-végek szabad állapotban destabilizálják a homeodomén globuláris részét. Ezek a kompetitív kölcsönhatások azonban DNS jelenlétében a bázisok felé irányulnak, így ez esetben a rendezetlen N-vég a fehérje-szerkezetet stabilizálását okozza. Az N-vég specifikus kontaktusokat létesít a DNS-el, ilymódon a teljes homeodoménknél a fehérje-feltekeredés és a kötődés nem kapcsolódik össze. A rendezetlen N-vég hiányában – mikor csak a globuláris rész van jelen – a két folyamat erősen csatolódik.

12. Jellemeztük a rendezetlen szakaszok hozzájárulását a homeodomének specifikus DNS kötéséhez. A rendezetlen N-terminális régiónak jelentős hatása van a DNS-hez történő kötődés kinetikájára és termodinamikájára is. Az N-vég jelenlétében a specifikus kontaktusok kialakulásához szükséges idő lényegesen lerövidül. A rendezetlen rész tehát a DNS-el kialakított specifikus (direkt) kölcsönhatások által gyorsítja a homeodomén kötődését és hozzájárul a szelektivitáshoz. A rendezetlen N-vég jelenléte csökkenti a kötési szabadentalpiát. A teljes, valamint az N-vég nélküli homeodomén kötődésének termodinamikáját elemezve kimutattuk, hogy ezért nagyrészt a hidrofób effektus – a keskeny árokból felszabaduló vízmolekulák entrópiánövekedése – a felelős.

13. Jellemeztem a bolyhos fehérje-DNS komplexeket és feltártam kialakulásuk molekuláris mechanizmusait. A specifikus DNS-komplexek kialakulása sokszor együtt jár a rendezetlen fehérje-szegmens feltekeredésével. Gyakori azonban, hogy a rendezetlen régiók csak részben alakítanak ki stabil térszerkezetet (pl. a vizsgált NK-2, Antp homeodoménknél). Meglepő azonban, hogy a kötőfelszíntől távoli, a komplexben is rendezetlenül maradó (ún. „fuzzy”) szakaszok jelentősen befolyásolhatják a DNS-kötés affinitását vagy specifitását.

Összegyűjtöttem azokat az eseteket, ahol szerkezeti adatok bizonyítják, hogy egy adott fehérje-szakasz a komplexben rendezetlen marad és biokémiai eredmények (mutációs, deléciós kísérletek) pedig igazolják a funkcióra gyakorolt hatást. A bolyhos fehérje-DNS komplexek sajátosságait elemezve javaslatot tettem ennek lehetséges mechanizmusaira. 4 kötődési modellt javasoltam, melyeket kísérleti adatokkal támasztottam alá. *i)* Konformációs szelekció: a rendezetlen rész eltolja a kötő régió konformációs egyensúlyát a partnerrel kompatibilis szerkezet felé. *ii)* Flexibilitás moduláció: a rendezetlen rész a kötő régió mozgékonyágát változtatja és ezen keresztül a kötés entrópiáját módosítja. *iii)* Kompetíció: a rendezetlen vég a DNS-el versenyzik a töltött oldalláncokért ezzel befolyásolva a fehérje konformációs egyensúlyát. *iv)* Pányvázás: a rendezetlen rész megnöveli az egyik kötő régió lokális koncentrációját a DNS körül.

14. Jellemeztem a bolyhos fehérje-DNS komplexek szabályozó mechanizmusait. A bolyhos komplexek távoli, rendezetlen régiói a specifikus DNS kötés ideális szabályozóiként szolgálhatnak, mivel ezek a szegmensek befolyásolni tudják a kötőfelszín viselkedését, de ugyanakkor nem hat rájuk szerkezeti kényszer. A rendezetlen régiók módosításával tehát a DNS kötés finom-hangolását lehet elérni. A rendezetlen régiók tulajdonságait további fehérje-fehérje kölcsönhatásokkal, poszt-transzlációs módosításokkal, illetve ún. alternatív splicing-al lehet megváltoztatni. A bolyhos fehérje-DNS komplexeken megmutattam, hogyan működnek ezek a változtatások, hogyan hatnak a DNS kötésre és a 13. pontban leírt mechanizmusok alapján értelmeztem ezeket a hatásokat.

15. Jellemeztük a bolyhos komplexek szövet-specifitásban játszott szerepét. Korábban kimutatták, hogy bizonyos exonok adott szövet-típusokban fordulnak elő. Megvizsgáltuk a szövet-specifikus exonok által kódolt fehérje-szakaszok és a megfelelő teljes fehérjék tulajdonságait. Azt találtuk, hogy a szövet-specifikus exonok nagyrészt rendezetlen régiókat kódolnak, melyek konzervált kötő motívumokat tartalmaznak. Ezek szerkezeti sajátosságait kísérleti adatok alapján elemezve azt találtuk, hogy a partnerrel való interakcióban csak rövid motívumok vesznek részt, míg azok közvetlen, vagy távolabbi környezete a partnerhez kötődve is rendezetlen marad. Vagyis a szövet-specifikus exonok bolyhos komplexek kialakítására alkalmas szakaszokat kódolnak. Ezek jelentős arányban poszt-

transzlációs módosítási helyeket is tartalmaznak, melyek a 12. pontban leírt mechanizmusok által befolyásolják a komplex viselkedését. Ennek egyik szép példája az Ultrathorax transzkripció faktor, melynek DNS-hez kötődését részletesen jellemeztünk. Kimutattuk továbbá, hogy a kölcsönható motívumok ki- és bekapcsolása a különböző szövetekben előforduló fehérje izoformákban a partnerek számának és típusának megváltozásához vezethet.

V. Diskusszió

A klasszikus DNS felismerési modellek szerint a specifikus komplex kialakulását, elsősorban a célszekvencia és a kötőhely komplementaritása és az így kialakuló kölcsönhatások kedvező energetikája vezérli. Ez feltételezi, hogy a szelektivitásért felelős tényezőkre a végső, szoros illeszkedésű komplex szerkezetéből lehet következtetni. A felsorolt eredmények rámutatnak, hogy a specifikus DNS-fehérje komplex kialakulásához számos egyéb tulajdonság is hozzájárul, melyek az összekapcsolódás korábbi fázisaiban játszanak szerepet. Az elvégzett kutatások világosan bemutatják a felismerési komplex és a dinamikus sajátosságok korábban fel nem ismert jelentőségét; a távoli, dinamikus fehérje szakaszok szerepét a specifikus DNS kötésben és új irányokat szabnak a specifikus DNS-kötő fehérjék tervezésében.

i) A DNS dinamikus tulajdonságai. A DNS flexibilitása szekvencia-függően változik, mely jelentősen befolyásolhatja a kötődés termodinamikáját. A hibás bázisok jelenlétében a DNS torzíthatósága olyan mértékben növekszik, mely önmagában alkalmas lehet a sérülés megkülönböztetésére. Ez magyarázhatja, hogy a báziskivágással működő DNS-javító enzimek miért alkalmazzák a „bázis-nyitást” függetlenül a hiba típusától. A „dinamikus markerek” szerepét más, emlős sejtekben működő DNS javító útvonalakban is felismerték és tumor ellenes szerek fejlesztésénél alkalmazták. Az élő szervezetben a DNS a kromatin részeként van jelen és hozzáférhetőségét, javíthatóságát fehérje-komplexek szabályozzák. A DNS dinamikus tulajdonságainak változása befolyásolja a nukleoszóma szerkezetét és ezáltal a kromatinnal kapcsolatba lépő fehérjék speciális célpontjává válik. Ezzel

kísérletileg is igazolódott, hogy az általunk feltárt mechanizmus nemcsak *in vitro*, de *in vivo* rendszerekben is működik.

ii) *Határfelületi tulajdonságok.* A felismerési komplexben a DNS-fehérje határfelületen elhelyezkedő vízmolekulák és kétértékű fémionok egy része az oldatba távozik a specifikus komplex kialakulásakor. Kimutattuk, hogy a DNS körüli specifikus víz-mintázat mind a fehérje oldalláncainak kötődési sorrendjére, mind azok lokális entrópiájára hatással van. Igazoltuk, hogy ez az entrópiakülönbség akár 1 bázispárnyi különbség észleléséhez is elegendő. A víz mintázatot később a fehérje-fehérje, illetve fehérje-gyógyszer kölcsönhatások „hot-spot”-jainak (kötődéshez lényegesen hozzájáruló pontjainak) felderítésénél is alkalmazták. Rendezetlen fehérjék kötődését vizsgáló tanulmányok arra utalnak, hogy a „hidratációs ujlenyomat” általános sajátosság és fehérje kölcsönhatások kötő motívumait is jelzi.

iii) *Multimer fehérjék dinamikai tulajdonságai; a felismerés és katalízis csatolása.* A DNS kötő fehérjék gyakran homodimer, vagy trimer formában vannak jelen. Két enzim (EcoRI-RsrI kiméra és dUTPáz) kimutattuk, hogy a monomerek kölcsönhatásában közreműködő, flexibilis oldalláncok, szakaszok a kémiai aktivitást is jelentős mértékben befolyásolják. II típusú restrikciós endonukleázok szerkezeti és biokémiai adatainak elemzése alapján arra következtettünk, hogy a „cross-talk” (kereszt-kommunikáció; az egyik alegységben a felismerésért felelős oldallánc mindkét alegység aktív centrumával kölcsönhatást alakít ki) biztosítja, hogy a kémiai reakció csak akkor indul el, ha már minden specifikus DNS kapcsolat kialakult. Ennek az összehangolt működésnek a sérülése az EcoRI-RsrI kiméra esetén toxicitáshoz vezet.

iv) *A katalízis szerepe a specifitásban.* A II típusú, specifikus DNS szekvenciát hasító PD..D/ExK restrikciós enzimeknél sikerült a kétértékű fémionok szerepét értelmezni és az enzimesaládra egy egységes katalitikus modellt felállítani, melyet kísérletileg is igazoltunk. A restrikciós enzimek természetes evolúciójának ezen az alapon történő értelmezése új restrikciós enzimek azonosítását és megváltozott aktivitású/specifitású restrikciós enzimek kifejlesztését tette lehetővé. A fémionok szerepének kvantitatív értelmezése a génterápiában alkalmazott zink-ujj transzkripciós faktorok és metallo-nukleázok tervezését is elősegíti.

v) *A rendezetlen fehérjeszakaszok szerepe.* Korábban feltételezték, hogy a rendezetlen szakaszok a DNS-hez kapcsolódáskor kitüntetett háromdimenziós szerkezetet vesznek fel, mely jelentős entrópiavesztéssel jár. A kötődéshez kapcsolt „feltekeredés”-nek fontos szerepe van a kötőfelszín kialakításában és számos specifikus kontaktust eredményez a fehérje és a DNS között. A rendezetlen részeknek általában a DNS kötésre és a specifikásra gyakorolt hatása ennél azonban jóval összetettebb. A töltött fehérje-szakaszok elősegítik a DNS-el történő nem-specifikus asszociációt és a lineáris diffúziót. A fehérje lokális koncentrációjának megnövekedése a DNS közelében hatékonyabbá teszi a specifikus kontaktusok kialakulását is. Ezt először részletesen homeodomének esetében sikerült kimutatnunk. Azt is igazoltuk, hogy a rendezetlen részeknek a kötődést gyorsító hatása nem csak elektrosztatikus hatásokra vezethető vissza, hanem a DNS-el kialakított tranziens vagy permanens specifikus kontaktusok kialakulására is. A rendezetlen szegmensek – a kinetikai előnyök mellett – a termodinamikai paraméterek hangolásában is szerepet játszanak. A kötődéskor felszabaduló vizek lokális entrópia-hozzájárulása jelentős szerepet játszik a Hox transzkripció faktorok specificitásának kialakításában.

vi) *Bolyhos fehérje-DNS komplexek.* A korábbi javaslatokkal ellentétben nem minden rendezetlen szakasz vesz fel stabil térszerkezetet a DNS-hez történő kötődés során. A bolyhos („fuzzy”) DNS komplexeket alkotó fehérjék funkcionálisan sokfélék: transzkripció faktorok (Max, Ets-1, Ubx, HMGB1, Oct1, NKx3), DNS javító enzimek (TDG), magreceptorok (PPAR- γ), valamint DNS szerkezetét módosító fehérjék (UvrD). A rendezetlen szakaszok tranziens kölcsönhatások révén befolyásolják a DNS-el közvetlen kontaktust kialakító oldalláncok, fehérje-szakaszok konformációs vagy elektrosztatikus tulajdonságait és ennek eredményeként a DNS kötés affinitását/specifitását. A rendezetlen szakaszok poszt-transzlációs módosításai, fehérje-fehérje kölcsönhatásai, illetve alternatív splicing által történő változásai lehetővé teszik, hogy a fehérje különböző körülmények között eltérő DNS szekvenciákat ismerjen fel. Ily módon járulnak hozzá a rendezetlen fehérje szakaszok kötő motívumai a szövet-specificitás kialakulásához. Ez egy új lehetőséget nyit meg a transzkripció szabályozásba történő beavatkozásra, pl. a biotechnológiában vagy gyógyszerkutatásban használt transzkripció effektorok kifejlesztése felé.

VI. Konklúzió és kitekintés

A felsorolt eredmények alapján javaslatot tettem a „Dinamikus DNS olvasás” („Dynamic DNA readout”) modelljére. Ez klasszikus tényezőkön alapul, de a fehérje egészen a komplex dinamikus sajátosságait befolyásoló hatását is figyelembe veszi. A dinamikus modell segítségével számos olyan kísérleti eredményt sikerült értelmezni, melyek molekuláris magyarázatát korábban nem tudták felderíteni.

A specifikus DNS felismerés alapvető biológiai kérdésekhez kapcsolódik, mint a transzkripció szabályozás mechanizmusa és evolúciója. A feltárt elvek jelentősen hozzájárulhatnak célzott kísérletek tervezéséhez és segíthetik a szerkezeti adatok interpretációját. A bemutatott eredmények mellett érvelnek, hogy a kötőfelszíntől távoli részeknek fontos hatása lehet a DNS-kötés szabályozásában a környezettől függő specificitás kialakításában is. Ez egy eddig nem vizsgált, új perspektíva, mely a gyógyszerkutatás számára is alkalmazható lehet.

VII. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Buljan M, Chalancon G, Eustermann S, Wagner GP, Fuxreiter M, Bateman A, Babu MM (2012) Tissue-Specific Splicing of Disordered Segments that Embed Binding Motifs Rewires Protein Interaction Networks. *Mol Cell* 46(6): 871-883

Chuluunbaatar T, Ivanenko-Johnston T, Fuxreiter M*, Meleshko R, Rasko T, Simon I, Heitman J, Kiss A (2007) An EcoRI-RsrI chimeric restriction endonuclease retains parental sequence specificity. *Biochim Biophys Acta* 1774(5): 583-594

Fuxreiter M (2012) Fuzziness: linking regulation to protein dynamics. *Mol Biosyst* 8(1): 168-177

Fuxreiter M, Luo N, Jedlovsky P, Simon I, Osman R (2002) Role of base flipping in specific recognition of damaged DNA by repair enzymes. *J Mol Biol* 323(5): 823-834.

Fuxreiter M*, Mezei M, Simon I, Osman R (2005) Interfacial water as a "hydration fingerprint" in the noncognate complex of BamHI. *Biophys J* 89(2): 903-911

Fuxreiter M, Osman R (2001) Probing the general base catalysis in the first step of BamHI action by computer simulations. *Biochemistry* 40: 15017-15023

Fuxreiter M*, Simon I, Bondos S (2011) Dynamic protein-DNA recognition: beyond what can be seen. *Trends Biochem Sci* 36(8): 415-423

Fuxreiter M, Tompa P (2011) *Fuzziness: Structural Disorder in Protein Complexes* Austin, New York: Landes BioScience/Springer.

Fuxreiter M*, Tompa P, Simon I, Uversky VN, Hansen JC, Asturias FJ (2008) Malleable machines take shape in eukaryotic transcriptional regulation. *Nat Chem Biol* 4(12): 728-737

Mones L, Kulhanek P, Florian J, Simon I, Fuxreiter M* (2007) Probing the two-metal ion mechanism in the restriction endonuclease BamHI. *Biochemistry* 46(50): 14514-14523

Mones L, Simon I, Fuxreiter M* (2007) Metal-binding sites at the active site of restriction endonuclease BamHI can conform to a one-ion mechanism. *Biol Chem* 388(1): 73-78

Osman R, Fuxreiter M, Luo N (2000) Specificity of damage recognition and catalysis of DNA repair. *Comput Chem* 24(3-4): 331-339.

Pingoud A, Fuxreiter M, Pingoud V, Wende W (2005) Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62(6): 685-707

Pingoud V, Wende W, Friedhoff P, Reuter M, Alves J, Jeltsch A, Mones L, Fuxreiter M, Pingoud A (2009) On the divalent metal ion dependence of DNA cleavage by restriction endonucleases of the EcoRI family. *J Mol Biol* 393(1): 140-160

Solt I, Simon I, Csaszar AG, Fuxreiter M* (2007) Electrostatic versus nonelectrostatic effects in DNA sequence discrimination by divalent ions Mg^{2+} and Mn^{2+} . *J Phys Chem B* 111(22): 6272-6279

Toth-Petroczy A, Simon I, Fuxreiter M, Levy Y (2009) Disordered tails of homeodomains facilitate DNA recognition by providing a trade-off between folding and specific binding. *J Am Chem Soc* 131(42): 15084-15085

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Fuxreiter M, Warshel A (1998) Origin of the catalytic power of acetylcholineesterase. Computer simulation studies. *J Am Chem Soc* 120: 183-194

Fuxreiter M, Warshel A, Osman R (1999) Role of active site residues in the glycosylase step of T4 endonuclease V. Computer simulation studies on ionization states. *Biochemistry* 38(30): 9577-9589.

Fuxreiter M*, Simon I (2002) Protein stability indicates divergent evolution of PD-(D/E)XK type II restriction endonucleases. *Protein Sci* 11(8): 1978-1983.

Fuxreiter M*, Osman R, Simon I (2003) Computational Approaches to Restriction Endonucleases. *J Mol Struct* 666-667: 469-479

Fuxreiter M, Simon I, Friedrich P, Tompa P (2004) Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins. *J Mol Biol* 338(5): 1015-1026

Fuxreiter M, Tompa P, Simon I (2007) Local structural disorder imparts plasticity on linear motifs. *Bioinformatics* 23(8): 950-956

Mehler EL, Fuxreiter M, Simon I, Garcia-Moreno EB (2002) The role of hydrophobic microenvironments in modulating pKa shifts in proteins. *Proteins* 48(2): 283-292.

Mones L, Kulhanek P, Simon I, Laio A, Fuxreiter M* (2009) The energy gap as a universal reaction coordinate for the simulation of chemical reactions. *J Phys Chem B* 113(22): 7867-7873

Nemeth-Pongracz V, Barabas O, Fuxreiter M, Simon I, Pichova I, Rumlova M, Zabranska H, Svergun D, Petoukhov M, Harmat V, Klement E, Hunyadi-Gulyas E, Medzihradsky KF, Konya E, Vertessy BG (2007) Flexible segments modulate co-folding of dUTPase and nucleocapsid proteins. *Nucleic Acids Res* 35(2): 495-505

Pancsa R, Fuxreiter M* (2012) Interactions via intrinsically disordered regions: what kind of motifs? *IUBMB Life* 64(6): 513-520

Solt I, Magyar C, Simon I, Tompa P, Fuxreiter M* (2006) Phosphorylation-induced transient intrinsic structure in the kinase-inducible domain of CREB facilitates its recognition by the KIX domain of CBP. *Proteins* 64(3): 749-757

Tompa P, Fuxreiter M (2008) Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci* 33(1): 2-8

Toth-Petroczy A, Oldfield CJ, Simon I, Takagi Y, Dunker AK, Uversky VN, Fuxreiter M* (2008) Malleable machines in transcription regulation: the mediator complex. *PLoS Comput Biol* 4(12): e1000243

A disszertációban szereplő közlemények száma: 28 (első szerző: 6, levelező szerző: 14)

(*ahol első és egyben levelező szerző, ott levelező szerzőként lett számítva)

A disszertációban szereplő könyvek száma: 1

A disszertációban szereplő közlemények impakt faktora: 155,6

Az összes közlemény száma: 45

Az összes közlemény impakt faktora: 205,6

Összes hivatkozás száma: 1343 (független: 1103)

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni családomnak: Szüleimnek, Krisztinek, Palkónak, Ejó néninek és nagyszüleimnek a kitartó türelmet és szeretetet. Hálás vagyok tanáraimnak: Ván Lászlónénak, Sándor Zoltánnak, Kajtár Mártonnak, Kálmán Alajosnak, Császár Jánosnak, Perczel Andrásnak, Böcskei Zsoltnak, Náray-Szabó Gábornak és Arie Warshelnek, hogy ápták bennem a tudomány szeretét és segítettek az előrehaladásban. Diákjaimnak: Tóth-Petróczy Ágnesnek, Mones Letifnek, Solt Ivánnak, Pancsa Ritának, Lábas Anikónak, Szabó Eszternek köszönöm az érdeklődést és az odaadó munkát. Köszönöm együttműködő kollégáimnak: Tompa Péternek, Vértessy Beának, Kiss Antalnak, Csányi Gábornak, Dan Tawfiknak, Madan Babunak, Alfred Pingoudnak, Jeff Hansennek, Francisco Asturiasnak, Koby Levynek a közös gondolkodást és ennek eredményeit. Kiss Antalnak külön köszönöm dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségét. Munkatársaimnak: Roman Osmannak, Mezei Mihálynak, Simon Istvánnak, Tusnády Gábornak, Dosztányi Zsuzsannának és Magyar Csabának köszönöm a hasznos diszkussziókat. Köszönöm az MTA Enzimológiai Intézetének, hogy közel 10 évig biztosította kutatásaim háttérét. Köszönöm a Weizmann Intézetnek, a Cambrige-i Egyetemnek és az MRC Laboratory of Molecular Biology-nak a sok új dolgot, amit tanulhattam. Hálás vagyok Fésüs Lászlónak és a Debreceni Egyetem OEC Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetének, hogy támogatást adtak önálló kutatói létemhez. Köszönöm barátaimnak szerte a világon, hogy mindig mellettem voltak.